

付瑞敏,常慧萍,邢文会,等. 解淀粉芽孢杆菌所产脂肽丰原素是防治苹果采后青霉病的关键物质[J]. 江苏农业科学,2018,46(3):80-85.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.03.020

# 解淀粉芽孢杆菌所产脂肽丰原素是防治苹果采后青霉病的关键物质

付瑞敏<sup>1,2</sup>, 常慧萍<sup>1,2</sup>, 邢文会<sup>1,2</sup>, 陈五岭<sup>2</sup>

(1. 河南教育学院生命科学系,河南郑州 450046; 2. 西北大学生命科学学院,陕西西安 710069)

**摘要:**为构建解淀粉芽孢杆菌丰原素合成酶基因 *fenC* 缺失突变株,研究丰原素在苹果采后青霉病防治中所起的作用。根据同源重组的原理,采用 PCR 扩增 *fenC* 基因上、下游的同源序列,将其连接至穿梭质粒 pMAD,构建含有壮观霉素抗性基因(*spe*)的同源重组质粒 pMAD- $\Delta fen$ ,通过电转化技术,将其转至解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8,通过抗生素抗性筛选、蓝白斑筛选和高温培养筛选出解淀粉芽孢杆菌 *fenC* 基因敲除突变株 BA-16-8- $\Delta fen$ 。通过高效液相色谱(high performance liquid chromatography,简称 HPLC)分析、质谱鉴定和抑菌性试验检测敲除 *fenC* 基因对解淀粉芽孢杆菌防治青霉病的影响。结果表明,与野生株相比,突变菌株细胞及其所产抗生素脂肽对扩展青霉的防治效果显著降低。说明丰原素在解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 防治青霉病中发挥主要作用。

**关键词:**解淀粉芽孢杆菌;青霉病;丰原素;突变株;同源重组;扩展青霉菌

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)03-0080-06

苹果青霉病是苹果采后最为常发的病害,其致病菌是扩展青霉菌(*Penicillium expansum*)<sup>[1]</sup>。由于在果实的贮藏时期或运输途中,不可避免会造成果实相互之间的碰撞而导致机械损伤,此时原本潜伏于果实表面的扩展青霉菌孢子会从伤口入侵果实,产生菌丝体,不仅会引起果实腐烂,其次级代谢产物展青霉素还会危害人体健康,造成极为严重的食品安全问题<sup>[2]</sup>。通常采用喷洒克霉净、氟硅唑等化学杀菌剂防治苹果采后青霉病,这种方法具有见效快、效果好等优点,但长期使用易使病菌产生抗药性,并危害食品安全,污染环境。随着人们环保意识的不断增强,越来越多的生物农药被用于植物病害的防治中<sup>[3-4]</sup>。其中,芽孢杆菌以其对环境的高度耐受性和产生各种多肽类、脂肽类和细菌素等抑菌性物质的特点,成为当前生物农药的研究热点。解淀粉芽孢杆菌可以产生多种抗生素,其中,通过非核糖体多肽合成酶合成的分子量小于 2 000 u 的脂肽类抗生素发挥重要的抗菌作用。根据其氨基酸构型不同,将解淀粉芽孢杆菌所产的脂肽抗生素分为表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturin)、丰原素(fengycin)等 3 个家族。丰原素、伊枯草菌素具有极强的抗真菌活性,特别是丰原素,可以显著抑制丝状真菌的生长。表面活性素具有

很强的表面活性,其乳化和发泡能力都很强,可以有效降低液体表面的张力。此外,表面活性素还有溶血、抗病毒、抗细菌等生物学活性<sup>[5-7]</sup>。由于具有重要的生物活性,很多脂肽已从芽孢杆菌的菌株中得以分离和鉴定,并从遗传水平阐明了其生物功能。

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) BA-16-8 是笔者所在实验室前期分离选育的,可以有效抑制扩展青霉的拮抗菌<sup>[8]</sup>。采用高效液相色谱(high performance liquid chromatography,简称 HPLC)和基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry,简称 MALDI-TOF-MS)分析该菌的代谢产物,发现该菌株可以产丰原素、表面活性素等 2 类脂肽抗生素。通过检测这 2 种物质拮抗扩展青霉菌的性能,发现丰原素是解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 抑制扩展青霉菌的主要物质。为进一步验证这一结论,本研究采用分子遗传学技术,通过构建解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 的丰原素缺失突变体并结合抑菌试验和果实生防试验,以证实丰原素在解淀粉芽孢杆菌抑制扩展青霉菌中所起的作用,从而为探讨解淀粉芽孢杆菌的抑菌机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 菌株与质粒 试验所用菌株、质粒的详细信息如表 1 所示。

1.1.2 主要试剂 试验所用试剂的详细信息如表 2 所示。

1.1.3 试验仪器 Agilent 1100series 高效液相色谱系统,购自美国安捷伦公司;液相色谱-电喷雾质谱仪由 Waters Alliance2690 高效液相色谱仪(购自美国 Waters 公司)和 TSQ Quantum Discovery 三级四极杆质谱仪(购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司)组成。

收稿日期:2016-08-26

基金项目:国家农业科技成果转化资金(编号:2012GB2G000451);河南省科技计划(编号:132102310253);河南省高等学校重点科研项目(编号:15B180002);陕西省重大科技创新项目(编号:2009ZKC04-16);河南省基础与前沿技术研究项目(编号:152300410092);河南教育学院青年科研课题(编号:20100103)。

作者简介:付瑞敏(1981—),女,河南郑州人,博士研究生,讲师,主要从事农业及食品微生物研究。E-mail:angelaminmin@163.com。

通信作者:陈五岭,硕士,教授,博士生导师,主要从事农业、环境及食品微生物研究。E-mail:angelaminmin@163.com。

表 1 试验所用菌株及质粒

菌株/质粒	来源	特征
解淀粉芽孢杆菌( <i>B. amyloliquefaciens</i> ) BA-16-8	笔者所在实验室选育	野生株
解淀粉芽孢杆菌( <i>B. amyloliquefaciens</i> ) BA-16-8 $\Delta$ <i>fen</i>	本试验构建	丰原素基因表达缺失突变株
扩展青霉菌( <i>P. expansum</i> )	陕西省微生物研究所	青霉病致病菌
大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> ) DH5 $\alpha$	TaKaRa 公司	用于构建基因的工程菌
pMAD	TaKaRa 公司	温度敏感型穿梭质粒,携带 <i>lac</i> 基因
pMAD- $\Delta$ <i>fen</i>	本试验构建	含有删除 <i>fenC</i> 及其启动子结构的解淀粉芽孢杆菌,其上也携带 pMAD

表 2 主要试剂及厂家

试剂	厂家
基因组提取试剂盒	NEB 公司
<i>Taq</i> DNA 聚合酶、dNTP、限制性内切酶、DNA 连接酶、DNA marker、T 载体 pEASY-T1	NEB 公司
PCR 产物纯化试剂盒	TaKaRa 公司
质粒抽提试剂盒	Promega 公司
乙腈、三氟乙酸、甲醇	SIGMA 公司

1.1.4 引物 本试验所用扩增解淀粉芽孢杆菌的 *fenC* 基因(7 647 bp)上下游臂的引物根据 NCBI 上的解淀粉芽孢杆菌 Q426 菌株基因组序列设计,抗性基因 *spc* 的引物根据质粒

PUS19 设计,设计工作由 Primer premier 5.0 软件完成,具体信息如表 3 所示,引物合成及序列测定由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

表 3 试验所用引物的信息

目标片段	片段长度(bp)	引物名称	引物序列(5'→3')	限制性内切酶
<i>fenC</i> 上游臂	1 844	P1	CGCGGATCCGCAGATACGCCGAAGCAC	<i>Bam</i> H I
		P2	CGCACGCGTCCGCAACGACGCCATTAG	<i>Mlu</i> I
<i>fenC</i> 下游臂	1 645	P3	CGC <u>ACGCGT</u> AAAAACAGGTCTGCGCTAT	<i>Mlu</i> I
		P4	CGCGAATTCTGGTGACAAACGCAGTGAAT	<i>Eco</i> R I
<i>spc</i> 基因	1 146	P5	CGCACGCGTTAGTCACTGTTTGCCACATTCTG	<i>Mlu</i> I
		P6	CGCGAATTCTGGTTCAGCAGTAAATGGTGG	<i>Eco</i> R I
<i>fenC</i> 基因	7 647	P7	TCTAATACGAATCGATACAC	
		P8	AAAGGACTGATTATGGCTCT	

注:引物序列下划线是限制性酶切位点,用于基因连接。

1.1.5 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基(BEP)的具体配方参照文献[9],BEPa 为固体培养基,BEPb 为液体培养基,该培养基主要用于拮抗菌的培养。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)及马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB)的具体配方参照文献[9],该培养基主要用于病原菌的培养。

1.2 试验方法

1.2.1 解淀粉芽孢杆菌丰原素基因的生物信息学分析 根据解淀粉芽孢杆菌 Q426 全基因组序列(JQ271536),找到丰原素基因 *fenC* 及其编码的蛋白序列,采用 Blast 在线软件对编码蛋白丰原素合成酶 C 的同源性及其蛋白功能域进行分析。

1.2.2 穿梭质粒 pMAD 构建缺失突变株 BA-16-8 $\Delta$ *fen*

1.2.2.1 突变载体的构建 采用基因组 DNA 提取试剂盒提取解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 的基因组 DNA,以其为模板以 P1、P2 为引物扩增 *fenC* 上游片段。扩增片段长度约为 1 844 bp,将其作为上游同源臂;以 P3、P4 为引物扩增下游片段,扩增长度约为 1 645 bp,将其作为下游同源臂。参照文献[10-12],以质粒 PUS19 序列为模板,设计壮观霉素抗性基因的引物 P5、P6,并扩增壮观霉素抗性基因 *spc*,扩增长度约为 1 146 bp,将 PCR 扩增所得到的产物经限制性内切酶酶切后用琼脂糖凝胶电泳回收,连入 pMAD 质粒的相关限制性酶

切位点,将其转入大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$ ,经筛选最终获得 pMAD- $\Delta$ *fenC*,将其进行测序分析,并验证所构建突变体序列的正确性,同源重组过程如图 1 所示。

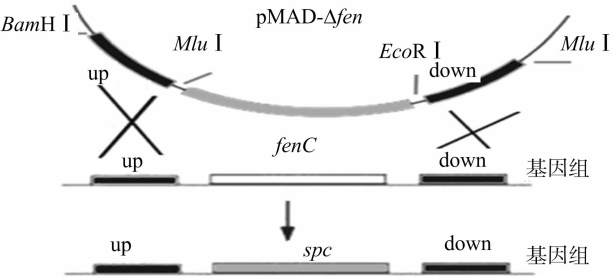


图 1 同源重组过程示意

1.2.2.2 突变子的筛选 所得 pMAD- $\Delta$ *fenC* 突变子经测序验证其正确性后,参照 Arnud 的方法<sup>[12]</sup>,采用电转化法(条件为电压 2 kV,电容 25  $\mu$ F,电阻 100  $\Omega$ )将其转入解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 中,并筛选 *fenC* 基因缺失突变体。pMAD 是温度敏感型穿梭质粒,可同时在大肠杆菌和芽孢杆菌中复制,该质粒中含有用来编码  $\beta$ -半乳糖苷酶的 *LacZ* 基因,它可以分解 5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷(X-

gal)产生蓝色菌落。此外,质粒中存在温度敏感复制子,当温度低于 30 ℃时,该质粒可以稳定存在于革兰氏阳性菌的细胞中,质粒上所携带的基因可以通过菌株染色体上的同源序列进行交换甚至双交换;而当温度升高至 40 ℃及以上时,该质粒就容易丢失,因此,阳性突变子的筛选先经过 30 ℃的基因交换,再经过 40 ℃的质粒丢失。

当基因敲除突变载体 pMAD-Δ*fen* 转入感受态细胞大肠杆菌 DH5α 后,将其涂布于含有 100 μg/mL X-gal 的 BEP 平板,30 ℃培养 24 h,此时 pMAD-Δ*fen* 或是游离在细胞中或是发生了单交换,感受态细胞可以表达 *LacZ* 基因,因此平板上长出的蓝色菌落就是转化成功的转化子。

将选出的蓝色菌落转接入解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 的液体培养基中,42 ℃、180 r/min 摇床振荡培养 24 h;将培养菌液转接至新鲜的含 50 μg/mL 壮观霉素的 BEP 液体培养基中,42 ℃、180 r/min 摇床振荡培养 12 h;将温度降至 30 ℃,180 r/min 继续摇床振荡培养 12 h。将培养菌液转接至含有 100 μg/mL X-gal 和 50 μg/mL 壮观霉素的 BEP 平板中,30 ℃培养 24 h,选取白色菌落分别接于含 3 μg/mL 红霉素的 BEP 平板上,挑选红霉素敏感菌株,即为构建的 *fenC* 基因缺失突变的突变菌株,为 BA-16-8Δ*fen* 菌株。

表 4 高效液相色谱洗脱条件

时间 (min)	表面活性素			丰原素		
	乙腈含量 (含 0.1% 三氟乙酸)	水含量 (含 0.1% 三氟乙酸)	流速 (mL/min)	乙腈含量 (含 0.1% 三氟乙酸)	水含量 (含 0.1% 三氟乙酸)	流速 (mL/min)
0	20%	80%	0.8	60%	40%	1
5	50%	50%	0.8	60%	40%	1
15	65%	35%	0.8	90%	10%	1
25	65%	35%	0.8	90%	10%	1

1.2.3.3 野生菌株 BA-16-8 和突变菌株 BA-16-8Δ*fen* 对扩展青霉菌抑制活性的检测 取野生菌株和突变菌株经 HPLC 分离纯化的浓缩液各 200 μL,采用牛津杯法检测野生菌株 BA-16-8 和突变菌株 BA-16-8Δ*fen* 的脂肽拮抗扩展青霉菌的能力,培养温度为 28 ℃,培养时间为 5 d,测量并记录牛津杯周围出现的抑菌圈直径,以无菌水作为对照,每个处理重复 3 次。

1.2.4 野生菌株 BA-16-8 和突变菌株 BA-16-8Δ*fen* 对苹果青霉病的防效测定

1.2.4.1 扩展青霉菌孢子液的制备 参照文献[13],制备扩展青霉菌孢子液。

1.2.4.2 防效测定 采用果实生防试验<sup>[14-15]</sup>,对野生菌株 BA-16-8 和突变菌株 BA-16-8Δ*fen* 防治苹果青霉病的效果进行测定。试验样本为 100 个红富士苹果,所选苹果大小及成熟度均一致。将苹果经 75% 乙醇消毒并经清水洗净后,用无菌打孔器在每个苹果表面打孔,孔径 6 mm,孔深 5 mm。试验共分为 5 组:处理 1 为 10 μL 野生菌株 BA-16-8 菌悬液+10 μL 扩展青霉菌孢子液,处理 2 为 10 μL 野生菌株 BA-16-8 脂肽粗提液+10 μL 扩展青霉菌孢子液,处理 3 为 10 μL 突变菌株 BA-16-8Δ*fen* 菌悬液+10 μL 扩展青霉菌孢子液,处理 4 为 10 μL 突变菌株 BA-16-8Δ*fen* 脂肽粗提液+10 μL 扩展青霉菌孢子液,处理 5(对照)为 10 μL 无菌水+10 μL 扩展青霉菌孢子液。将各组处理液分别加于苹

1.2.2.3 突变子的鉴定 以 BA-16-8Δ*fen* 菌株为模板,分别以 P1/P4、P7/P8 为引物进行 PCR 扩增,并以 BA-16-8 菌株为阴性对照,把所得产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,比对目的条带的大小是否与预测的大小一致,若一致,则说明 *spc* 基因成功替代了 *fenC* 基因,即构建突变子成功,反之,则不成功。最后,将 PCR 扩增产物回收并进行测序验证。

1.2.3 野生菌株 BA-16-8 和突变菌株 BA-16-8Δ*fen* 的 HPLC 分析

1.2.3.1 菌株代谢产物脂肽粗提液的制备 将培养 24 h 的野生菌株和突变菌株的菌体发酵液于常温下 8 000 r/min 离心 20 min,弃沉淀,将所得上清液置于无菌锥形瓶中,用 7 mol/L HCl 溶液将其 pH 值调为 2.0,无菌条件下分装至 10 mL 的无菌离心管中(每管 10 mL),4 ℃过夜,10 000 r/min 离心 20 min,取沉淀,在沉淀中加入 0.5 mL 中性甲醇溶液,以此方法操作 2 次,将所得萃取液合并,并将其浓缩至 5 倍浓度,经 0.2 μm 滤膜过滤后即菌株代谢产物的脂肽粗提液。

1.2.3.2 HPLC 分离纯化脂肽类抗生素 本试验检测波长为 280 nm,柱子温度为 30 ℃,进样量为 10 μL,等梯度洗脱进行样品分析,洗脱条件如表 4 所示,手动收集各组分,将收集液经旋转蒸发仪浓缩待用。

果的孔洞中,每个处理重复 20 次。将处理后的苹果分别装入培养箱中,温度为 28 ℃,湿度为 95%,96 h 后观察苹果的染病情况,并统计菌丝生长情况。

2 结果与分析

2.1 解淀粉芽孢杆菌的丰原素合成酶生物信息学分析

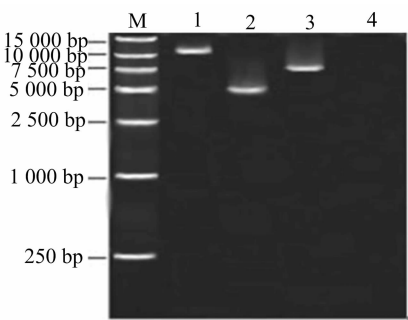
通过对解淀粉芽孢杆菌 Q426 菌株全基因组序列(JQ271536)分析,发现 Q426 的丰原素合成酶基因簇序列与解淀粉芽孢杆菌 DSM7 菌株(FN597644)的丰原素合成酶基因序列的同源性高达 96%,与解淀粉芽孢杆菌 Y2 菌株(NC17912)的同源性达 93%,与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)168 的丰原素合成酶操纵子(AL009126)序列的同源性为 88%。丰原素操纵子包含 5 个开放阅读框,它们分别是 *fenC* *fenD* *fenE* *fenA* *fenB*,这 5 个操纵子分别编码合成酶的 5 个单体酶,即 FenC、FenD、FenE、FenA、FenB<sup>[16]</sup>。

2.2 解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 *fenC* 基因缺失突变子的构建筛选

2.2.1 *fenC* 基因缺失突变载体 pMAD-Δ*fen* 的构建 根据 NCBI 上已知菌株解淀粉芽孢杆菌 Q426 的第 1 个丰原素合成酶操纵子 *fenC* 基因的上下游序列,设计出 4 条引物,并以解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 菌株的基因组为模板,对 *fenC* 的上下游序列(上游臂)和下游序列(下游臂)进行扩增。测序结果表明,PCR 扩增分别获得长度约为 1 844 bp 的上下游序列、

1 645 bp 的下游序列。为构建缺失突变载体,选用壮观霉素抗性基因 *spc* 取代 *fenC* 基因,通过设计 *spc* 基因的引物并进行 PCR 扩增,得到 1 条大小为 1 146 bp 的条带,将 PCR 扩增得到的这 3 个条带分别用限制性内切酶酶切,并用连接酶逐一按上游臂、*spc*、下游臂的顺序连接至 pMAD 载体上,构建 *fenC* 基因缺失突变载体 pMAD -  $\Delta fen$ 。分别以 pMAD -  $\Delta fen$ 、pMAD 为模板,以 P1/P2、P3/P4、P5/P6 为引物对载体进行 PCR 鉴定,结果显示,以 pMAD -  $\Delta fen$  为模板的 PCR 产物中有上游臂、下游臂和 *spc* 抗性基因,而以 pMAD 为模板的 PCR 产物中没有,说明构建载体成功。

2.2.2 菌株 BA - 16 - 8 的 *fenC* 基因缺失突变体 BA - 16 - 8 -  $\Delta fen$  的构建与鉴定 参照 Arnuad 的方法<sup>[12]</sup>,采用电转化法将其转入解淀粉芽孢杆菌 BA - 16 - 8 中,经过抗生素筛选和蓝白斑筛选,挑选阳性菌株,对其进行质粒提取和酶切鉴定,经 30 ℃ 双交换及高温质粒丢失,最终筛选出 *fenC* 基因缺失突变体。为鉴定突变子的构建是否成功,以 BA - 16 - 8 $\Delta fen$  菌株为模板,以 P1/P4、P7/P8 为引物,分别进行 PCR 扩增,并以 BA - 16 - 8 菌株为阴性对照,所得产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。由图 2 可知,采用引物 P1/P4,在 BA - 16 - 8 菌株上得到大小约为 11 kb (*up - fenC - down*) 的片段,在 BA - 16 - 8 $\Delta fen$  菌株上得到大小约为 4.6 kb (*up - spc - down*) 的片段;采用引物 P7/P8,在 BA - 16 - 8 菌株上得到大小约为 7.6 kb (*fenC*) 的片段,在 BA - 16 - 8 $\Delta fen$  菌株上没有扩增出片段。上述结果初步表明,突变菌株 BA - 16 - 8 $\Delta fen$  的 *fenC* 基因已经被敲除,将 PCR 产物纯化并测序,所得结果进一步证实



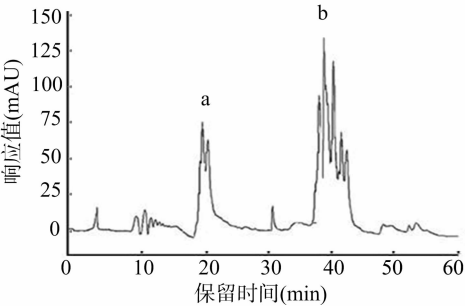
M为DNA marker; 1 是以 P1/P4 为引物,以菌株 BA-16-8 为模板扩增出的片段; 2 是以 P7/P8 为引物,以菌株 BA-16-8 为模板扩增出的片段; 3 是以 P1/P4 为引物,以突变子 BA-16-8 $\Delta fen$  为模板扩增出的片段; 4 是以 P7/P8 为引物,以突变子 BA-16-8 $\Delta fen$  为模板扩增出的片段

图2 突变菌株 BA-16-8 $\Delta fen$  的 PCR 检测结果

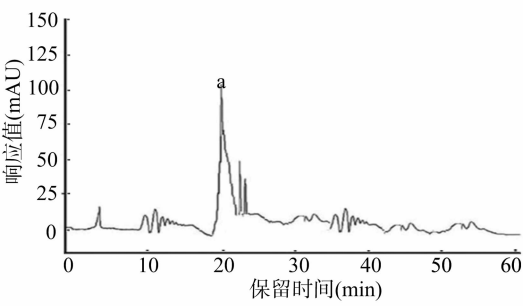
了 BA - 16 - 8 菌株中的 *fenC* 基因已经被 *spc* 基因所替代。

2.3 解淀粉芽孢杆菌 BA - 16 - 8 野生型及突变子的 HPLC 分析结果

对野生菌株 BA - 16 - 8 和突变菌株 BA - 16 - 8 $\Delta fen$  的粗提液进行 HPLC 分离纯化。由图 3 可知,野生菌株 BA - 16 - 8 主要分离出 2 组物质, a 物质的保留时间为 21.360 min, b 物质的保留时间为 41.260 min; 突变菌株 BA - 16 - 8 $\Delta fen$  主要分离出 1 组物质,其保留时间为 21.370 min。对照同一洗脱条件下的表面活性素、丰原素样,推测野生菌株 BA - 16 - 8 中分离出的物质为表面活性素、丰原素,突变菌株 BA - 16 - 8 $\Delta fen$  中分离出的物质为丰原素。



野生菌株 BA-16-8 的 HPLC 分析结果



突变菌株 BA-16-8 $\Delta fen$  的 HPLC 分析结果

图3 野生菌株 BA-16-8及突变菌株 BA-16-8 $\Delta fen$  的 HPLC 分析结果

将 HPLC 分离纯化出的物质分别经收集、浓缩并定容至 1 mL,用牛津杯法检测各片段的抑菌活性。由表 5 可知,只有 b 物质有明显的拮抗活性。与野生株相比,失去了丰原素合成能力的突变株抑制扩展青霉菌的能力显著下降,它的无细胞发酵液几乎丧失了抑菌性能。

表 5 野生菌株及突变子的脂肽蛋白抗扩展青霉菌效果

菌株	抑菌圈直径 (mm)	
	物质 a	物质 b
BA - 16 - 8	0.10 ± 0.25	6.68 ± 0.12
BA - 16 - 8 $\Delta fen$	0.10 ± 0.17	—

2.4 解淀粉芽孢杆菌 BA - 16 - 8 野生型及突变子脂肽类物质质谱分析结果

BA - 16 - 8 经飞行时间质谱检测分析,获得了粗提液中各脂肽的相对分子质量,所得质谱图如图 4 所示,所得分析结果如表 6 所示。图 4 - a 中有 2 个系列的离子峰,结合表 6 中

的  $[M + H]^+$ 、 $[M + Na]^+$ 、 $[M + K]^+$  离子分析结果,可知它们分别为表面活性素、丰原素家族的同系物。图 4 - b 中只有 1 个系列的离子峰,结合表 6 中的  $[M + H]^+$ 、 $[M + Na]^+$ 、 $[M + K]^+$  离子分析结果,可知它们是表面活性素家族的同系物。将质谱分析结果、PCR 检测结果和 HPLC 结果结合起来可知,野生菌株 BA - 16 - 8 的发酵液中提取的抗菌性脂肽为丰原素、表面活性素,而突变子 BA - 16 - 8 $\Delta fen$  的发酵液中提取的抗菌性脂肽为表面活性素,这说明突变子没有产生丰原素,说明 *fenC* 基因缺失突变子构建成功。综合 HPLC、MS 和抑菌性能分析结果,可以确定丰原素在 BA - 16 - 8 菌株抑制扩展青霉菌的过程中发挥着关键作用。

2.5 野生菌株 BA - 16 - 8 和突变菌株 BA - 16 - 8 $\Delta fen$  对苹果青霉病的防效测定

由表 7 可知,96 h 后,野生菌株 BA - 16 - 8 的菌悬液及无细胞发酵液均可以对扩展青霉菌在苹果表面的生长产生较

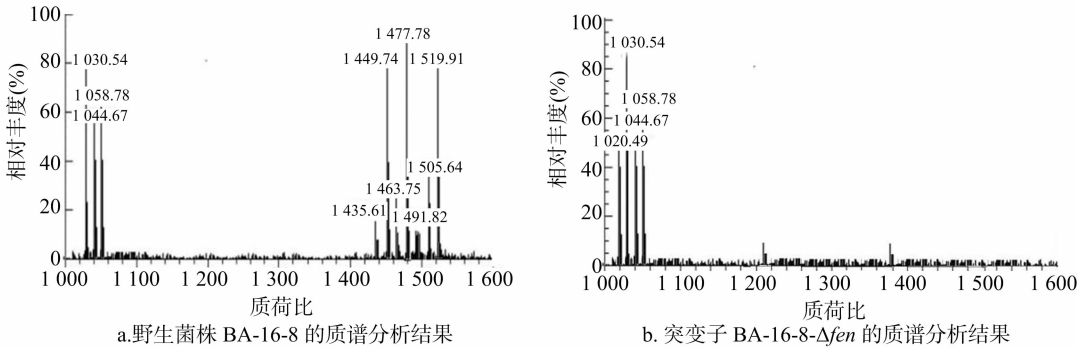


图4 BA-16-8 野生型及突变子的质谱分析结果

表 6 野生菌株及突变子的质谱分析结果

菌株	片段	实测质荷比	理论质荷比	强度 (%)	结构判断
BA - 16 - 8	表面活性素	1 030.54	1 030.40	47	C13 - Surfactin, [ M + Na ] <sup>+</sup>
		1 044.67	1 044.56	24	C14 - Surfactin, [ M + Na ] <sup>+</sup>
		1 058.78	1 058.88	49	C15 - Surfactin, [ M + Na ] <sup>+</sup>
	丰原素	1 435.61	1 435.58	36	C14 - FengycinA, [ M + Na ] <sup>+</sup>
		1 449.74	1 449.74	74	C15 - FengycinA, [ M + Na ] <sup>+</sup>
		1 463.75	1 463.78	56	C16 - FengycinA, [ M + H ] <sup>+</sup>
		1 477.78	1 477.82	58	C17 - FengycinA, [ M + H ] <sup>+</sup>
		1 491.82	1 491.83	66	C16 - FengycinB, [ M + H ] <sup>+</sup>
		1 505.64	1 505.65	40	C17 - FengycinB, [ M + H ] <sup>+</sup>
		1 519.91	1 519.90	16	C18 - FengycinB, [ M + H ] <sup>+</sup>
BA - 16 - 8Δfen	表面活性素	1 030.54	1 030.40	55	C13 - Surfactin, [ M + Na ] <sup>+</sup>
		1 044.67	1 044.56	45	C14 - Surfactin, [ M + Na ] <sup>+</sup>
		1 058.78	1 058.88	58	C15 - Surfactin, [ M + Na ] <sup>+</sup>

强的抑制作用。然而被敲除了 *fenC* 基因的突变菌株 BA - 16 - 8Δ*fen* 的防治效果明显低于野生菌株,特别是突变菌株BA - 16 - 8Δ*fen* 的无细胞发酵液处理组,其病斑直径几乎和对照一致,这表明野生菌株 BA - 16 - 8 的菌株细胞和脂肽提取物可以较好地防治苹果采后青霉病,而突变子

BA - 16 - 8Δ*fen* 在丧失了丰原素合成能力之后,对青霉病的防治能力也显著降低,该结论再次表明了解淀粉芽孢杆菌 BA - 16 - 8 拮抗扩展青霉菌病原菌及防治青霉病的主要物质是丰原素。

表 7 不同处理对苹果青霉病的抑制效果

处理	病斑直径 (cm)	病原菌生长状况
10 μL 野生菌株 BA - 16 - 8 菌悬液 + 10 μL 扩展青霉菌孢子液	0.01 ± 0.002	无菌丝
10 μL 野生菌株 BA - 16 - 8 脂肽粗提液 + 10 μL 扩展青霉菌孢子液	0.02 ± 0.006	无菌丝
10 μL 突变菌株 BA - 16 - 8Δ <i>fen</i> 菌悬液 + 10 μL 扩展青霉菌孢子液	1.36 ± 0.011	有明显菌丝
10 μL 突变菌株 BA - 16 - 8Δ <i>fen</i> 脂肽粗提液 + 10 μL 扩展青霉菌孢子液	1.48 ± 0.024	有明显菌丝
对照	1.50 ± 0.036	有明显菌丝

3 结论与讨论

芽孢杆菌属是重要的生防菌,其模式菌株是枯草芽孢杆菌,而解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌的亲缘关系极为接近,同枯草芽孢杆菌一样,它也可以表达多种抗菌性多肽,包括核糖体合成途径合成肽和非核糖体合成途径合成肽<sup>[17]</sup>。这些多肽或是协同或是独立发挥着抑制病原菌的作用。

针对苹果采摘后青霉病的生物防治,笔者所在实验室前期选育出 1 株可以高效抑制青霉病致病菌扩展青霉菌的解淀粉芽孢杆菌 BA - 16 - 8,通过分离纯化该菌株的抑菌活性物质并对比其抑菌活性,了解到丰原素对扩展青霉菌的抑制效果显著高于表面活性素,因此,推测丰原素可能是解淀粉芽孢

杆菌抑制扩展青霉菌的主要物质。为证实该推测,本研究以菌株 BA - 16 - 8 为试验对象,根据同源重组原理,借助温度敏感型质粒 pMAD 构建了 1 个丰原素合成酶基因功能缺陷突变菌株 BA - 16 - 8Δ*fen*,经 PCR 扩增、电泳分析及序列测定,最终确定 *fenC* 基因被成功敲除。通过检测突变菌株和野生菌株所产脂肽蛋白体内和体外的抑菌活性,结果显示,解淀粉芽孢杆菌的突变子 BA - 16 - 8Δ*fen* 不仅丧失了合成丰原素的能力,也失去了抑制扩展青霉菌和防治苹果青霉病的能力,因此确定抑制扩展青霉菌的主要物质是丰原素。

报道显示,丰原素可以抑制多种植物病原菌特别是丝状真菌<sup>[18]</sup>,但其具体作用机制仍是众说纷纭。Tanaka 等的研究表明,丰原素可以破坏细菌胞膜的结构及渗透性,丰原素可以

通过破坏病原真菌细胞壁的一类脂类,从而使其细胞结构遭到破坏<sup>[19]</sup>。Tao 等的研究表明,丰原素可以作用于病原真菌的胞内物质,如核酸等<sup>[20]</sup>。这些说法尚有待于进一步考察、确定。

据报道,解淀粉芽孢杆菌的基因组中有大量成簇的基因用于编码抗菌肽等抑菌物质,包括细菌素和脂肽类抗生素等<sup>[21]</sup>。但是,这并不代表同一种菌在生长代谢过程中就可以同时产生所有抑菌物质,某些用来编码或启动抗生素合成的基因必须在某种特定的条件或阶段才会正常表达<sup>[22]</sup>。解淀粉芽孢杆菌基因组中就存在多种编码脂肽类抗生素的基因簇,如编码表面活性素的 *sfp*、编码伊枯草菌素的 *itu*、编码丰原素的 *fen* 等。

通过检测解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 的脂肽抗菌性,结果显示,丰原素对扩展青霉菌有明显的抑制效果,然而由于菌株细胞本身也具有抑菌性,因此,单纯通过 HPLC 分离纯化的片段很难明确丰原素在解淀粉芽孢杆菌抑制扩展青霉菌的过程中发挥的作用。因此,采用分子遗传学手段,构建丰原素表达缺失突变菌株,通过对比野生型和突变型的抗菌性能及防治青霉病的效果,最终确定解淀粉芽孢杆菌 BA-16-8 在抑制扩展青霉菌过程中发挥关键作用的物质是丰原素。除了扩展青霉菌感染所致的苹果青霉病,丰原素也是抑制桃褐腐病和番茄枯萎病的主要物质。丰原素究竟是如何发挥其抑菌作用的?这种抑菌作用有没有作用对象的特异性?在确定了丰原素防治扩展青霉菌所致的青霉病中的主导地位之后,接下来将就丰原素对扩展青霉菌的抑菌机制展开研究,以期对抗生素脂肽的开发及利用提供理论依据。

## 参考文献:

- [1] Palou L, Montesinos - Herrero C, Taberner V, et al. First report of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold of fresh date palm fruit (*Phoenix dactylifera*) in Spain[J]. Food Control, 2013, 97(6): 846 - 847.
- [2] Al - Rawashdeh Z B, Al - Ramamneh A D M, Karajeh M R. Efficacy of non - chemical alternatives on blue mold of apple under controlled cold storage conditions[J]. Journal of Agricultural Science, 2015, 7(5): 112 - 113.
- [3] Spadaro D, Droby S. Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit; the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists[J]. Trends in Food Science & Technology, 2016, 47(1): 39 - 49.
- [4] Spadoni A, Neri F, Mari M. Physical and chemical control of postharvest diseases[J]. Advances in Postharvest Fruit and Vegetable Technology, 2015(1): 89 - 90.
- [5] Walia N K, Cameotra S S. Lipopeptides; biosynthesis and applications [J]. Journal of Microbiology and Biochemical Technology, 2015, 7(2): 103 - 107.
- [6] Malmsten M. Interactions of antimicrobial peptides with bacterial membranes and membrane components [J]. Current Topics in Medicinal Chemistry, 2016, 16(1): 16 - 24.
- [7] Wu S, Jia S, Sun D, et al. Purification and characterization of two novel antimicrobial peptides subpeptin JM4 - A and subpeptin JM4 - B produced by *Bacillus subtilis* JM4[J]. Current Microbiology, 2005, 51(5): 292 - 296.
- [8] 付瑞敏, 邢文会, 谷亚楠, 等. 苹果采后青霉病拮抗菌株的分离、鉴定和低能 N<sup>+</sup> 注入诱变[J]. 北方园艺, 2015(21): 116 - 120.
- [9] Afsharmanesh H, Ahmadzadeh M, Javan - Nikkha M, et al. Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma - irradiation[J]. Crop Protection, 2014, 60(1): 83 - 92.
- [10] Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(4): 1084 - 1090.
- [11] Avrahami D, Shai Y. Bestowing antifungal and antibacterial activities by lipophilic acid conjugation to D, L - amino acid - containing antimicrobial peptides; a plausible mode of action[J]. Biochemistry, 2003, 42(50): 14946 - 14956.
- [12] Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low - GC - content, gram - positive bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(11): 6887 - 6891.
- [13] 石建龙, 李玉权, 胡琨敏, 等. 贵州半夏块茎腐烂病原菌的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2015, 42(2): 289 - 299.
- [14] 汪 茜, 胡春锦, 柯仿钢, 等. 生防细菌 T132 的鉴定及其对采后柑橘炭疽病的抑制效果[J]. 微生物学通报, 2012, 39(9): 1260 - 1271.
- [15] Zhang N, Yang D, Wang D, et al. Whole transcriptomic analysis of the plant - beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates[J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 685.
- [16] Chen X Y, Zhang Y Y, Fu X, et al. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 115(1): 113 - 121.
- [17] Yuan J, Raza W, Shen Q, et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN - 6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(16): 5942 - 5944.
- [18] Wachendorf - Neumann U, Andersch W, Springer B, et al. Composition comprising a biological control agent and a fungicide selected from inhibitors of amino acid or protein biosynthesis and inhibitors of cell wall synthesis[J]. Patent Application, 2014, 318(1): 130 - 131.
- [19] Tanaka K, Ishihara A, Nakajima H. Isolation of anteiso - C17, iso - C17, iso - C16, and iso - C15 bacillomycin D from *Bacillus amyloliquefaciens* SD - 32 and their antifungal activities against plant pathogens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(7): 1469 - 1476.
- [20] Tao Y, Bie X M, Lv F X, et al. Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer* [J]. Journal of Microbiology, 2011, 49(1): 146 - 150.
- [21] Lemmer K, Mielke M, Pauli G, et al. Control of fruit postharvest diseases; old issues and innovative approaches [J]. Stewart Postharvest Review, 2014, 10(1): 3805 - 3816.
- [22] Ji S H, Paul N C, Deng J X, et al. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases [J]. Mycobiology, 2013, 41(4): 234 - 242.