

# 甘蔗黑穗病菌拮抗性芽孢杆菌的抗菌 作用与伊枯草菌素 A 的产生有关\*

## The Antifungal Mechanism of Antagonistic *Bacillus subtilis* to *Ustilago scitaminea* is Related to Iturin A Producing

张桂英

廖咏梅\* \*

张君成

Zhang Guiying

Liao Yongmei\* \*

Zhang Juncheng

(广西大学农学院, 南宁市大学路 100号 530004)

(Agric. College, Guangxi Univ., 100 Daxuelu, Nanning, Guangxi, 530004, China)

**摘要** 选择对甘蔗黑穗病菌有拮抗作用的 5 个革兰氏阳性芽孢杆菌拮抗菌株和 3 个革兰氏阴性拮抗细菌菌株, 用 PCR 技术, 扩增抗霉菌枯草杆菌素操纵元中 *mycB* 基因。结果是, 5 个革兰氏阳性芽孢杆菌拮抗菌株均扩增出一条大小为 2.0 kb 左右的特异带, 革兰氏阳性芽孢杆菌基因组的 PCR 产物和伊枯草菌素 A 合成酶操纵元中的 *ItuB* 基因的同源性为 97% ~ 98%, 说明其抗菌作用机制和 Iturin 类群脂肽抗生素的产生有关。3 个革兰氏阴性拮抗细菌中, 没有扩增到基因, 其抗菌作用机制有待进一步研究。

**关键词** 甘蔗黑穗病菌 拮抗细菌 伊枯草菌素 A

中图法分类号 S435.661

**Abstract** 5 gram-positive *Bacillus* strains and 3 gram-negative bacteria strains which are antagonistic to *Ustilago scitaminea* were selected to be amplified the *mycB* gene of iturin A operon by PCR. A band of about 2.0 kb appeared among all strains of 5 gram-positive *Bacillus*. The PCR product is 97% ~ 98% homologous to *ItuB* gene of iturin A operon. This result shows that the antifungal mechanism of antagonistic *Bacillus* is related to Iturin group lipopeptin producing. There are no any PCR products appearing among 3 gram-negative bacteria. More research on their antifungal mechanism need to be done in the future.

**Key words** *Ustilago scitaminea*, antagonistic bacteria, Iturin A

芽孢杆菌 (*Bacillus*) 是植物病害生物防治中被广泛应用并取得成功的一种高效生防微生物<sup>[1]</sup>。陈志谊等<sup>[2]</sup>分离到的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) B916 菌株, 连续 4 年防治水稻纹枯病的大田示范试验, 防治效果达 50.0% ~ 81.9%, 相当或略好于井冈霉素的防治效果, 应用累计面积为 2000 hm<sup>2</sup> 以上。黎起秦等<sup>[3]</sup>分离到的芽孢杆菌 B11 和 B14 菌株对水稻纹枯病的室内防治效果分别为 60.5% 和 67.4%, 在大田的防治效果分别为 54.6% 和 52.5%; 吴连举等<sup>[4]</sup>用拮抗性芽孢杆菌 Bc009 Bc011 Bc022 等菌株防治人参锈腐病, 田间小区防治效果明显高于化学药剂, 其防治效果达到 64.7% ~ 73.9%。芽孢杆菌的抗菌防病机制包括竞争作用、拮抗作用和诱导植物抗

病性等, 其中拮抗作用是通过产生抗菌物质抑制病原生长或直接杀灭病原。芽孢杆菌产生的拮抗物质主要有抗生素、细菌素、细胞壁降解酶类和其它抗菌蛋白及挥发性抗菌物质等。其中抗生素包括脂肽抗生素、多肽抗生素和次生代谢产生的其它抗菌活性物质等<sup>[5]</sup>。脂肽抗生素一般分为 3 个类群: Surfactin 类群、Plipastatin-Fengycin 类群和 Iturin 类群<sup>[6]</sup>, 其中 Iturin 类群包括伊枯草菌素 A、C; 芽孢菌素 L、D、F 和抗霉菌枯草杆菌素等<sup>[5]</sup>。

脂肽抗生素中的 Iturin, 由亲脂的 C14 或 C15 $\beta$ -氨基脂肪酸通过  $\beta$ -氨基和羧基与 7 个氨基酸短肽的 N-端氨基和 C-端羧基形成内脂, 该类抗生素一般对真菌具有强烈的拮抗作用<sup>[5,7]</sup>。抗霉菌枯草杆菌素操纵元包括 4 个开放阅读框, 分别为 *fenF* *mycA* *mycB* 和 *mycC* 基因, 共同编码脂肽抗生素的七肽<sup>[8]</sup>。本文根据枯草芽孢杆菌 ATCC6633 菌株的肽合成酶 *mycB* 基因的核酸序列设计引物, 用 PCR 技术扩增待

2004-03-31 收稿, 2004-06-22 修回。

\* 广西自然科学基金资助项目 (桂科自 9912015)。

\*\* 通讯联系人, Email: liaoy@ gxu.edu.cn

拮抗抗性细菌的基因组 DNA,检测其是否含有 *mycB* 基因,以推测其抗性作用与脂肽抗生素产生的关系,为进一步开发应用其抗性活性物质打基础。

## 1 材料与方法

选择对甘蔗黑穗病菌有拮抗作用的细菌代表性菌株,即 5个革兰氏阳性的芽孢杆菌拮抗菌株 ( $A_{34}$   $A_{46}$   $A_{61}$   $A_{66}$   $B_{14}$ )和 3个革兰氏阴性拮抗细菌菌株 ( $B_{11}$   $B_{24}$   $B_{30}$ ),用 PCR技术,扩增抗霉菌枯草杆菌素操纵元中 *mycB* 基因

### 1.1 拮抗细菌的培养

将待测细菌菌株于 NA (肉汁胨琼胶培养基)<sup>[9]</sup> 平板培养基上,28°C下复壮培养 1 d;然后移植单菌落到 200ml NB (肉汁胨液体培养基)<sup>[9]</sup> 培养液中,28°C下振荡培养 24~36 h,离心并收集细菌。

### 1.2 拮抗细菌基因组 DNA的提取

用 10% SDS (十二烷基硫酸钠)裂解细胞,蛋白酶 K降解蛋白质,酚/氯仿抽提去除溶液中的杂质,无水乙醇沉淀获取细菌基因组 DNA,具体步骤见文献 [10]

### 1.3 引物的设计

根据 Erwin H. Duitman 1999年设计的用于扩增枯草芽孢杆菌 ATCC6633菌株 *mycB* 基因的引物<sup>[8]</sup>,分别在上游引物及下游引物的 5'端加上 *Bam* H 和 *Hind* III 酶切位点。

上游引物:

5' CGC GGATCC ATGTCGGTGT T TAAAAATCAAGTAACG 3'

下游引物:

5' CCC AAGCTT TT AGGACGCCAGCAGTTCTTCTATTGAG 3'

引物由 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 技术有限公司合成。

### 1.4 PCR扩增

在 25 $\mu$ l 的 PCR反应体系中,模板 DNA (10ng)  $\mu$ l, 上下游引物 (20 $\mu$ M) 各  $\mu$ l, Taq DNA聚合酶 (5U  $\mu$ l) 0.4 $\mu$ l, dNTP复合物 (10mM) 1.25 $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub>

```

1   t t c e g c g g g g   c t a t g t a t t c   g t a t t c e g c c   c g e g t a t t t t   c g t c a g c a g c   a g g c a a a g e t   t t c a g a t c a a   t e t t c c a t t
81  g g a a g t g a g c   g g a a t g c g t t   c c a a t g g g a t   a a a g c g g g a g   g g a a t c a t a t   a a t t g g g c a g   t t c c e g g g a t   a a t t c t t t t c
161 t g a a c t g c g c   t g c t g t c a a a   g a a g g c t c g c   c g a c a t a a t a   g g c a t a c a a t   t g t t t g g a c c   c g t c t g c g t c   t t c c e g c g c g
241 a c g a c t g c g g   c t t c a c g a a c   g t t t t c c a g a   t t g a a c a t g g   c t g c c t c t a c   c t e g c c g a t c   t c a a t c e g g t   a g c c g c g a a t
321 t t t t a c t t g a   t g a t c a a t c c   g g c c t a a a t a   t t e g a t t e t t   c c a t e c g g e a   a c c a t c t g g c   g a g a t e c c c c   g t t t t a t a c a
401 t e t t t t g a t e   a g g g a c a t g c   a g a t g e t c c a   c a a a t t t t t c   c t c e g t c a a t   t c a g g g e g a t   t g a g g t a g c c   g e g g g c c a c t
481 c e e g t c t e c t e   c g a e a t a c a g   c t c t c e e g g t   a c g c e g a t e g   g e t g g a t t t g   a t g g t g e g e t   c c t a a a a t a t   a a g e t t g a t g
561 g t t g g c c a c c   g g g c t g c e g a   t t g t g a t c t g   t t e a t c a g c g   g a c t g a a c a g   g g t g a a a t g t   a g a t a c c a c g   c t g t t t t c t g
641 t e g g t e c g t a
    
```

图 2  $A_{34}$  菌株 PCR产物 3'端的核苷酸序列

Fig. 2 The 3' end DNA sequence of PCR product of  $A_{34}$  strain

(25mM) 1. 675 $\mu$ l, 10 $\times$  PCR反应缓冲液 3. 325 $\mu$ l, 加 15. 35 $\mu$ l 双蒸水至总体积为 25 $\mu$ l 反应程序为: 95°C 变性 2 min; 共 32个循环; 接着 92°C 变性 30s, 50°C 退火 1 min, 65°C 延伸 8min, 65°C 延伸 8min; 取 5 $\mu$ l PCR产物于 0. 75% 琼脂糖凝胶上电泳, 溴化乙锭染色后在紫外光下检测和拍照。

### 1.5 PCR产物的核苷酸序列测定

取  $A_{34}$  菌株的 PCR产物, 由联合基因科技 (集团) 有限公司和上海联合基因科技研究院测序服务中心, 测定其核苷酸序列, 用 BLAST程序进行同源性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同菌株基因组 DNA的 PCR结果

不同菌株基因组 DNA的 PCR结果见图 1 所选择的 5个革兰氏阳性的拮抗性芽孢杆菌, 均可扩增出一条 2. 0kb左右的带, 而 3个革兰氏阴性的拮抗性细菌菌株, 均未扩增到任何带。

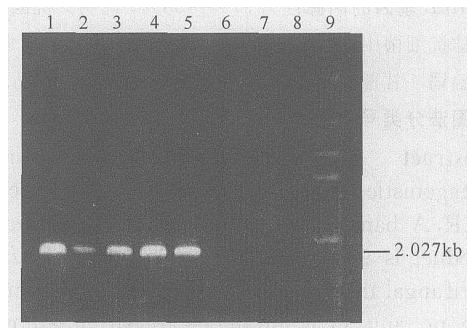


图 1 拮抗性细菌基因组 DNA的 PCR扩增产物分析

Fig. 1 Analysis of PCR product from antagonistic bacteria genomic DNA

1.  $A_{34}$ ; 2.  $A_{46}$ ; 3.  $A_{61}$ ; 4.  $A_{66}$ ; 5.  $B_{14}$ ; 6.  $B_{24}$ ; 7.  $B_{30}$ ; 8.  $B_{11}$ ; 9.  $\lambda$  / *Hind* III DN A分子大小 (bp) 标记 (片段长度: 23, 130, 9, 416, 6, 557, 4, 361, 2, 322, 2, 027, 564) DN A molecular size (bp) standard (fragment length: 23, 130, 9, 416, 6, 557, 4, 361, 2, 322, 2, 027, 564).

### 2.2 $A_{34}$ 菌株 PCR产物的测序结果

$A_{34}$  菌株 PCR产物 3'端的核苷酸序列见图 2

1 tacctgggaa aacctgtttg atgaagaaga cggactaagc gcattccctt actttaagc agcggataaa ggcgtgttgg  
81 cccgtaccgg ctaccaggaa aatgcatct gccgttcctt atctccggaa gta tctcaaa gaatcatgac aatggcgat  
161 cattccgata tggcgcccta tctgatttta ttggcgggta ttgaatgctt gttataaaa tatacggatc aaacgagcct  
241 gattcttggc attccgacgg tatcgaagca aaaagccggc cagtcagccg ttaacaacat tgtcctctta aaaaatacgc  
321 ttccaacga gagtacaatt aaaaaccgat tggggcagct gaaagaagcc gttaatgatt ctctgaaaa tcaaaacctg  
401 ccgtttagaa aatggttca gcatctgagc gtgcaataca atgacgagca tctgccgttg attcataccg tegtctcct  
481 taacgaaatt cattccttgc aatttaaaga agatactgca gccgatacgc tgtttcactt tgatttggag aacaacgggg  
561 ttcaattttaa gcttttttat aacggcaatc tgaacgatga gcctatatt aatcaaatg tateccattt ggatcagctg  
641 ctgtctgtga

图 3 A<sub>34</sub>菌株 PCR产物 5'端的核苷酸序列

Fig. 3 The 5-end DNA sequence of PCR product of A<sub>34</sub> strain

经 BLAST 的同源性分析, 3'末端 650nt 的序列, 和枯草芽孢杆菌伊枯草菌素 A 合成酶操纵元的 *ituB* 基因的同源性为 98%, 5'末端 650nt 的序列, 和该基因的同源性为 97% (GenBank 登录号: AB050629. 1<sup>[6]</sup>) 枯草芽孢杆菌 *ituB* 基因的产物是伊枯草菌素 A 的合成酶 B, 伊枯草菌素 A 为 Iturin 类群脂肽抗生素的成员之一。此外, 3'末端 650nt 的序列, 和枯草芽孢杆菌抗霉菌枯草杆菌素操纵元中的 *mycB* 基因的同源性仅为 84%, 5'末端 650nt 的序列, 和该基因的同源性为 82% (GenBank 登录号: AF184956. 1<sup>[8]</sup>)。

伊枯草菌素 A 和抗霉菌枯草杆菌素同为 Iturin 类群的脂肽抗生素。伊枯草菌素 A 和抗霉菌枯草杆菌素几乎有相同的结构, 伊枯草菌素 A 合成酶操纵元有 4 个开放阅读框, *ituD* *ituA* *ituB* 和 *ituC*, 和抗霉菌枯草杆菌素操纵元的 4 个开放阅读框 *fenR* *mycA* *mycB* 和 *mycC* 均有很高的同源性, 其同源性分别为 79%、79%、79% 和 64%; 抗霉菌枯草杆菌素和伊枯草菌素 A 的不同之处只是 7 肽中的第 6 第 7 位的氨基酸排序刚好相反, 前者为 D-Ser (D 型丝氨酸) → L-Asn (L 型天冬氨酸), 而后者为 L-Asn → D-Ser<sup>[6]</sup>。

A<sub>34</sub>菌株 PCR 产物和伊枯草菌素 A 合成酶操纵元中的 *ituB* 基因的同源性为 97% ~ 98%, 说明 A<sub>34</sub>菌株对甘蔗黑穗病菌的拮抗作用和 Iturin 类群脂肽抗生素中的伊枯草菌素 A 合成有关; 在所检测的另外 4 个革兰氏阳性芽孢杆菌菌株 (A<sub>46</sub>; A<sub>61</sub>; A<sub>66</sub>; B<sub>4</sub>), 均获得相同大小的 PCR 产物, 说明该 4 个菌株对甘蔗黑穗病菌的拮抗作用和 A<sub>34</sub>菌株相同。但 A<sub>34</sub>菌株 PCR 产物和 *mycB* 基因的同源性仅为 82% ~ 84%, 一般核苷酸的同源性在 86% 以下, 视为不同的基因。因此, 认为 A<sub>34</sub>菌株产生的抗生素和抗霉菌枯草杆菌素无关。

### 3 讨论

枯草芽孢杆菌产生的脂肽抗生素, 对多种真菌具

有拮抗作用, 如禾镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、禾谷丝核菌 (*Rhizoctonia cerealis*) 和灰梨孢菌 (*Pyricularia grisea*) 等<sup>[11]</sup>, 脂肽抗生素由短肽和脂肪酸链组成, 在土壤比持久性的化学药剂更易于被土壤中的生物降解<sup>[7]</sup>; 芽孢杆菌能产生耐热抗逆的芽孢, 利于生防菌剂的生产、剂型加工及在环境中存活、定殖与繁殖<sup>[5]</sup>; 由于这些特性, 芽孢杆菌被广泛用于植物病害的生物防治中<sup>[12]</sup>。在进行甘蔗黑穗病菌拮抗细菌的筛选过程中, 从根际土壤、芽茎、叶组织中, 共分离到 928 个菌株, 18 个菌株对甘蔗黑穗病菌有强的拮抗作用, 其中 12 个为革兰氏阳性细菌中的芽孢杆菌, 包括本试验中检测的 5 个菌株; 同时, 经多项生理生化特性测定, 鉴定 A<sub>34</sub>菌株为枯草芽孢杆菌 (待发表)。本试验中, 经对 8 个拮抗性菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增, A<sub>34</sub> A<sub>46</sub> A<sub>61</sub> A<sub>66</sub> B<sub>4</sub> 等 5 个革兰氏阳性芽孢杆菌菌株均可产生大小为 2.0 kb 左右的特异带, 而革兰氏阴性细菌未扩增到任何带。对 PCR 产物的测序结果表明, 所检菌株对甘蔗黑穗病菌的拮抗作用和脂肽抗生素的产生有关。鉴于芽孢杆菌的稳定性和脂肽抗生素对植物病原真菌的强拮抗性, 有必要进一步开展拮抗细菌田间防治甘蔗黑穗病的试验。

### 致谢

本试验在南京农业大学王金生教授的指导下完成, 谨表谢意!

### 参考文献

- 1 蒋琳, 马承铸. 生物农药研究进展 (综述). 上海农业学报, 2000, 16(增刊): 73~77.
- 2 陈志谊, 许志刚, 高泰东, 等. 水稻纹枯病拮抗细菌的评价与利用. 中国水稻科学, 2000, 14(2): 98~102.
- 3 黎起秦, 林纬, 陈永宁, 等. 芽孢杆菌对水稻纹枯病的防治效果. 中国生物防治, 2000, 16(4): 160~162.
- 4 吴连举, 杨依军, 武侠, 等. 利用土壤拮抗性微生物防治人参锈腐病. 中国生物防治, 1999, 15(4): 166~168.
- 5 陈中义, 张杰, 黄大明. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制

与遗传改良研究. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97~ 103.

- 6 Tsuge K, Akiyama T, Shoda M. Cloning, sequencing, and characterization of the Iturin A operon. Journal of Bacteriol, 2001, 183(21): 6265~ 6273.
- 7 Soo-Jin Cho, Sam Keun Lee, Byeong Jin Cha, et al. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. FEMS Microbiology Letters, 2003, 223: 47~ 51.
- 8 Erwin H Duitman, Leendert W Hamoen, Martina Rembold, et al. The mycosubtilin synthetase of *Bacillus subtilis* ATCC6633: A multifunctional hybrid between a peptide synthetase, an amino transferase, and a fatty acid synthase. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(23): 13294~ 13299.

- 9 方中达编著. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1998. 182.
- 10 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1999. 39.
- 11 Yao S, Gao X, Fuchsbaue N, et al. Cloning, sequencing, and characterization of the genetic region relevant to biosynthesis of the lipopeptides iturin A and surfactin in *Bacillus subtilis*. Curr Microbiol, 2003, 47(4): 272~ 277.
- 12 Chitarra G S, Breeuwer P, Nout M J R. An antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* YM 10-20 inhibits germination of *Penicillium roqueforti* conidiospores. Journal of Applied Microbiology, 2003, 94, 159~ 166.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 268 页 Continue from page 268)

### 致谢

本研究承蒙华南农业大学蔡燕飞博士的大力协助, 在此致谢。

### 参考文献

- 1 曹焕生, 徐明芳, 李定坚. 大苞栝楼的药用价值分析. 药物生物技术, 2002, 9(5): 292~ 296.
- 2 陈书坤. 中国植物志. 第 73 卷 1 分册. 北京: 科学出版社, 1986. 218~ 257.
- 3 任静, 何家庆. 栝楼子资源的利用及其价值. 中国野生植物资源, 2001, (6): 21~ 22.
- 4 黄美兰, 贝伟剑. 大子栝楼和栝楼的药理作用比较. 广东药学, 2000, (1): 36~ 38.
- 5 吴伸, 陈毓荃, 吕志强, 等. 栝楼籽核糖体失活蛋白的纯化、性质及晶体生长研究. 中国生物化学与分子生物学报, 1998, (4): 24~ 27.
- 6 李喜文, 佟宏霞, 李青山. 栝楼愈伤组织和块根中天花粉蛋白相对含量的比较研究. 中国药学杂志, 1999, (2): 34~

36.

- 7 孙兴龙, 段崇英. 瓜蒌的药理作用及临床应用. 中国药师, 2003, (10): 26~ 28.
- 8 黄伟坤. 食品检验与分析. 北京: 中国轻工业出版社, 1998. 8~ 250.
- 9 林文群, 陈忠. 六种唇形科种子营养成分比较分析. 天然产物研究与开发, 2003, 15(3): 239.
- 10 中国油脂植物编写委员会. 中国油脂植物. 北京: 科学出版社, 1987. 570~ 580.
- 11 柴之芳, 祝汉民. 微量元素概论. 北京: 原子能出版社, 1994. 220~ 216.
- 12 张仲平, 陈俊英, 马勇. 不同季节开花座果的栝楼种子脂肪酸含量. 中药材, 1996, (8): 42~ 44.
- 13 何志廉. 人类营养学. 北京: 人民卫生出版社, 1988. 242~ 248.

(责任编辑: 邓大玉)