

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (7): 778–785; 4 July 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.07.008

解淀粉芽孢杆菌 SWB16 菌株脂肽类代谢产物对球孢白僵菌的拮抗作用

汪静杰¹, 赵东洋¹, 刘永贵¹, 敖翔¹, 范蕊¹, 段正巧¹, 刘艳萍¹, 陈倩茜¹, 金志雄², 万永继^{1*}

¹西南大学生物技术学院无脊椎动物病理及应用微生物学研究室, 重庆 400715

²湖北医药学院基础医学研究所, 湖北 十堰 442000

摘要:【目的】筛选对球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*) 具有较强拮抗作用的细菌菌株及检测菌株脂肽类代谢产物的拮抗活性。【方法】通过形态学观察、生理生化实验、16S rRNA 和 *gyrA* 基因序列分析鉴定目标菌株; 用滤纸片扩散法(K-B 法)测定抑菌圈的直径; 采用甲醇萃取菌株发酵液以提取脂肽类代谢产物, 并显微观察提取物对白僵菌分生孢子及菌丝的拮抗作用; 高效液相色谱-质谱联用方法及靶基因克隆技术检测菌株脂肽类代谢产物的主要成分和基因。【结果】从植物盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 组织内分离得到了一株对球孢白僵菌具有较强拮抗活性的菌株 SWB16, 该菌株属于解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 其脂肽类提取物对球孢白僵菌分生孢子的发芽和菌丝生长均具有明显的抑制作用, 质谱检测表明提取物的主要成分是芬枯草菌素和伊枯草菌素, 从菌株基因组中克隆到编码芬枯草菌素和伊枯草菌素的 *fenB* 基因和 *iturA* 基因。【结论】解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) SWB16 菌株能产生脂肽类抗生素并对球孢白僵菌具有拮抗作用, 拮抗活性显示该菌株对防治家蚕等经济昆虫的白僵病具有潜在的应用价值。

关键词: 盾叶薯蓣, 解淀粉芽孢杆菌, 球孢白僵菌, 拮抗作用, 脂肽类抗生素

中图分类号: Q938 文章编号: 0001-6209(2014)07-0778-08

芽孢杆菌(*Bacillus*) 作为生防菌是一类应用较广的细菌, 主要应用于植物病原菌的防治, 而在动物病原菌的防治方面报道较少^[1], 解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) 是芽孢杆菌属中的重要种类, 研究表明对多种植物病原真菌具有防治作用^[2-6]。芬枯草菌素(fengycin) 和伊枯草菌素(iturin) 是芽孢杆菌分泌的一类重要的抑菌活性物质, 主要由枯草芽孢杆菌分泌产生, 其次是解淀粉芽

孢杆菌, 这 2 种脂肽类抗生素在抑制植物病原真菌方面的研究较多, 而对昆虫病原真菌球孢白僵菌拮抗活性的研究尚未见报道。

球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*) 是一种重要的昆虫病原真菌, 具有寄主广泛以及致病性和适应性很强的特点, 易引起昆虫流行病的发生^[7], 其中许多菌株对经济昆虫家蚕也存在严重的威胁并导致蚕桑产业遭受巨大的经济损失^[8-10]。近年来在深入研究物

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-22)

* 通信作者。Tel: +86-23-68251585; Fax: +86-23-68250191; E-mail: canbl3312@126.com

作者简介: 汪静杰(1987-), 男, 湖北孝感人, 博士研究生, 主要从事有益微生物应用研究。E-mail: jingjiewang06@163.com

收稿日期: 2013-10-30; 修回日期: 2014-03-09

理和化学药物防治措施外,探索对家蚕白僵病的生物防治途径和策略也逐渐受到研究者的关注。盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 为药用植物,其内生菌的研究已取得一些进展^[11-12],最近我们筛选到一株对家蚕具有安全性而对球孢白僵菌具有高拮抗活性的菌株 SWB16,并开展了该菌株的分类、微生物间的拮抗试验以及具有拮抗作用的脂肽类抗生素的活性与基因检测等,期望为防治家蚕白僵病应用微生物制剂探索到一条可能的途径。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 菌株 SWB16 是从植物盾叶薯蓣 (*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright) 中分离得到,与其他试验菌株 SW41、SW82、标准枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)、粘质沙雷氏菌 SCQ1 (*Serratia marcescens*) 均保存于西南大学家蚕病理生理及应用微生物学研究室;球孢白僵菌株 GXtr1009 和 GXtr1010 是生防白僵菌感染家蚕后从蚕体分离得到,球孢白僵菌株 SCsk1006, YNsk1106 和 GXsk1011 分离自不同地区自然感染发病的蚕体,5 株白僵菌菌株经鉴定后保存于本实验室^[10]。

1.1.2 培养基: PDA 培养基; LB 培养基; SDAY 萨氏培养基。

1.1.3 化学药物: 多菌灵(有效含量为 50%),江苏蓝丰生物化工股份有限公司生产,使用时按 1:200 倍稀释,用作抗真菌药物阳性对照。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 菌体特征观察与试验: 参考文献 [13] 的方法对 SWB16 菌株进行形态观察和生理生化实验。

1.2.2 SWB16 菌株分子鉴定: 首先分析保守的 16S rRNA 序列,进一步选择高变异性蛋白酶促旋酶 *gyrA* 基因序列进行分析及构建系统发育树。提取基因组后,根据文献报道的 16S rRNA 序列和 *gyrA* 基因的引物序列合成引物^[14-15],分别进行 PCR 扩增,引物序列如表 1 所示。PCR 反应条件: 94℃ 5 min; 94℃ 40 s, 55℃ 40 s, 72℃ 60 s, 30 个循环, 72℃ 10 min。二者 PCR 产物由 GenScript 公司(南京)测序,序列经 BLAST 比对分析,其中 *gyrA* 基因序列用 MEGA 软件(5.1)进行系统发育树构建应用于芽孢杆菌属种的鉴定。

表 1. 16S rRNA 与 *gyrA* 基因引物列表

Table 1. Primers list of 16S rRNA and *gyrA* gene.

primer	sequence (5'→3')
16S rRNA-F	GAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S rRNA-R	CGGTTACCTTGTACGACTT
p- <i>gyrA</i> -f	CAGTCAGGAAATGCCTACGTCCTT
p- <i>gyrA</i> -r	CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT

1.3 SWB16 菌株的抑菌试验及抑菌圈的测定

用滤纸片法^[16]进行抑菌圈的测定,将含有 SWB16 纸片(φ -6 mm)贴在涂布有 5 种球孢白僵菌的平板培养基上进行拮抗试验,另外 4 种细菌菌株: SW41、SW82、标准枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)、粘质沙雷氏菌 SCQ1 (*Serratia marcescens*) 参与拮抗作用试验,28℃ 培养 72h 后测量抑菌圈直径,同一试验重复 3 组,分别统计抑菌圈平均直径;并以灭菌的 ddH₂O 做阴性对照,多菌灵做阳性对照。

1.4 菌株发酵液中脂肽类产物的提取与抑菌活性的检测

1.4.1 脂肽类产物的提取: 将在 LB 固体培养基上活化的 SWB16 菌株在小试发酵罐中以温度 30℃, 转速 150 r/min 的条件下发酵培养 72 h,根据文献报道芽孢杆菌的脂肽类抗生素对真菌具有抑制作用,并按提取代谢产物中脂肽类抗生素的方法进行活性物质的分离。取培养 72 h 的发酵液在大容量冷冻离心机 9100 × g 离心 20 min,收集上清液;加入 7 mol/L HCl 溶液,调节 pH = 2,4℃ 过夜沉淀;并进行 9100 × g 离心 20 min,去上清液,向每管沉淀中加入 50 mL pH 为 7 的甲醇,合并洗出的沉淀并混合均匀,萃取 8 h。然后将装有萃取物的 50 mL 离心管,4℃,10500 × g 离心 10 min,收集上清液;以同样方法萃取两次,合并上清液。之后用旋转蒸发仪将合并的上清液蒸发浓缩,得到浓缩液 20 mL,将其用 0.2 μm 微孔滤膜(偏氟乙烯膜)过滤,即获得具有活性产物的甲醇粗提液,保存备用。

1.4.2 发酵液提取物抑制孢子萌发的试验: 向六孔板内每个孔中加入 1.5 mL 固体萨氏培养基,使其布满孔底,隔夜待用。分别用移液枪取适量等体积浓度为 10⁶ 个/mL 的五株球孢白僵菌孢子悬液与已制备的甲醇粗提液混合均匀,并分别取 100 μL 不同混合液依次加入到已准备好的六孔板的每一孔内,涂布均匀。对照孔内用无菌甲醇代替活性产物甲醇粗

提液,其他操作同处理组。28℃培养过夜,用倒置显微镜观察孢子萌发情况。每个处理设置3个重复。

1.4.3 发酵液提取物抑制菌丝生长的试验:分别取100 μL孢子浓度为 10^6 个/mL的五种球孢白僵菌孢子悬液依次加入到准备好培养基的六孔板内,涂布均匀。28℃培养过夜,用倒置显微镜观察孢子萌发情况,待孢子大部分都萌发后,加入100 μL活性产物甲醇粗提液到六孔板内,涂布均匀。对照孔加入无菌甲醇。28℃培养过夜,用倒置显微镜观察菌丝生长情况。每个处理设置3个重复。

1.5 发酵液提取物的检测及相关抑菌活性代谢产物基因的克隆

利用HPLC系统(Agilent 1100 HPLC)和MS系统(Agilent 1956B MSD)对SWB16菌株发酵液粗提活性物质进行高效液相色谱-质谱联用的粗定量和定性检测,确定提取物的主要成分和含量。

*fenB*基因是参与芬枯草菌素(fengycin)合成的必须基因,*ituA*基因表达伊枯草菌素(iturin),2种抑菌肽基因存在于可抗真菌的芽孢杆菌DNA基因组中,检测靶基因以证实SWB16菌株是否存在此2种抑菌肽的*fenB*基因和*ituA*基因。引用参考文献[17]克隆*fenB*基因和*ituA*基因的引物,并参考1.2.2的反应体系及反应条件进行PCR扩增,产物送至GenScript公司(南京)测序。

2 结果和分析

2.1 菌株鉴定

2.1.1 形态观察:SWB16菌株在LB培养基上培养48 h后,颜色由乳白逐渐变黄,边缘不规则,菌落表面突起呈峭状或扁平的网格状;革兰氏染色阳性,菌体呈杆状,需氧或兼性需氧,可形成内生芽孢。

2.1.2 生理生化特征:菌株SWB16的生长温度范围是10–50℃,最适温度32℃;耐受NaCl浓度最高可以达到9%;由pH实验得出,菌株SWB16生长pH范围为6.0–9.0;底物实验结果表明,菌株SWB16可以利用麦芽糖、甘露醇、葡萄糖、蔗糖和海藻糖等碳源,不能利用乳糖。

2.1.3 16S rRNA及gyrA基因同源性分析:PCR扩增菌株SWB16的16S rRNA基因,得到1455bp序列(GenBank登录号:JX861885),BLAST结果表明菌株SWB16的16S rRNA序列与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、以及*Bacillus velezensis*和类芽孢杆菌(*Paenibacillus* Ash, Priest & Collin)有99%的相似性,16S rRNA基因序列分析可以确定该菌属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),但难以利用此基因序列进行菌株种间的区分。

扩增菌株SWB16的*gyrA*基因,得到长1003 bp的序列(GenBank登录号:JX861880),BLAST序列

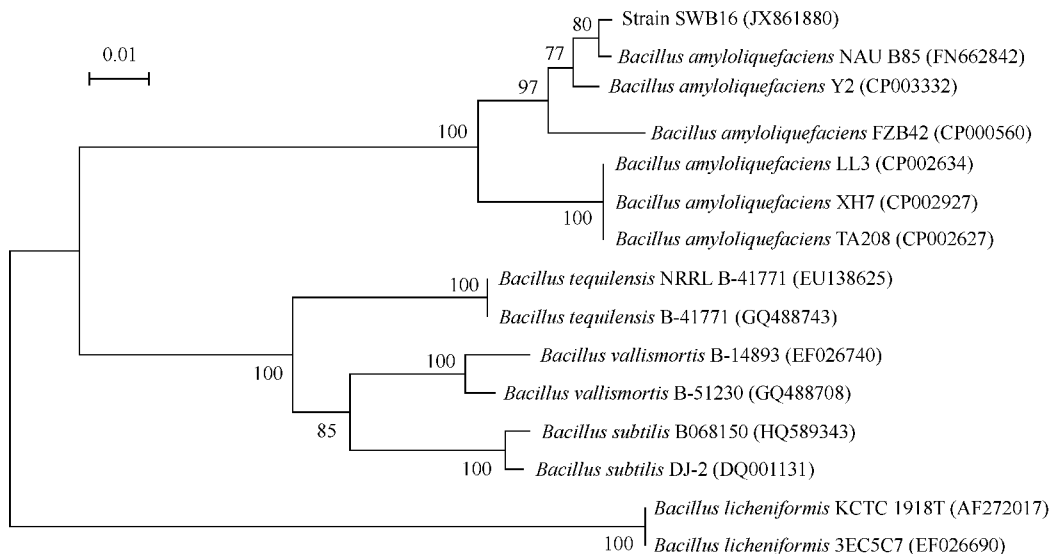


图1. 菌株SWB16基于*gyrA*基因构建的系统发育树

Figure 1. Phylogenetic analysis of the strain SWB16 based on gene *gyrA* nucleotide sequences. Strain SWB16 (JX861880) of phylogenetic tree indicated gene *gyrA* nucleotide sequence obtained from the strain SWB16 in this study. Bootstrap values (>50%) represent nucleotide substitution rate, and the scale bar represents 1% estimated sequence divergence.

比对及系统发育树分析表明该菌株与解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 亲缘关系最近, 与其他芽孢杆菌聚类为不同的分支 (图 1)。

根据该菌的形态、生理生化特征、16S rRNA 序列和 *gyrA* 基因的分析结果, 菌株 SWB16 鉴定为解淀粉芽孢杆菌, 记录为 *Bacillus amyloliquefaciens* SWB16。

2.2 菌株 SWB16 对球孢白僵菌的抑菌活性

菌株 SWB16 对 5 株球孢白僵菌均有抑制作用,

稀释 200 倍的多菌灵溶液对球孢白僵菌也有一定的抑制作用, 但参与试验的另外 4 株细菌菌株 SW41、SW82、标准枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633)、粘质沙雷氏菌 SCQ1 (*Serratia marcescens*) 均不表现抑制球孢白僵菌的作用 (图 2), 抑菌圈大小的测定结果显示 SWB16 菌株对 5 株不同地区分离的球孢白僵菌菌株均有较强的抑制作用, 抑菌圈直径均显著大于抗真菌的化学药物多菌灵 (图 3)。

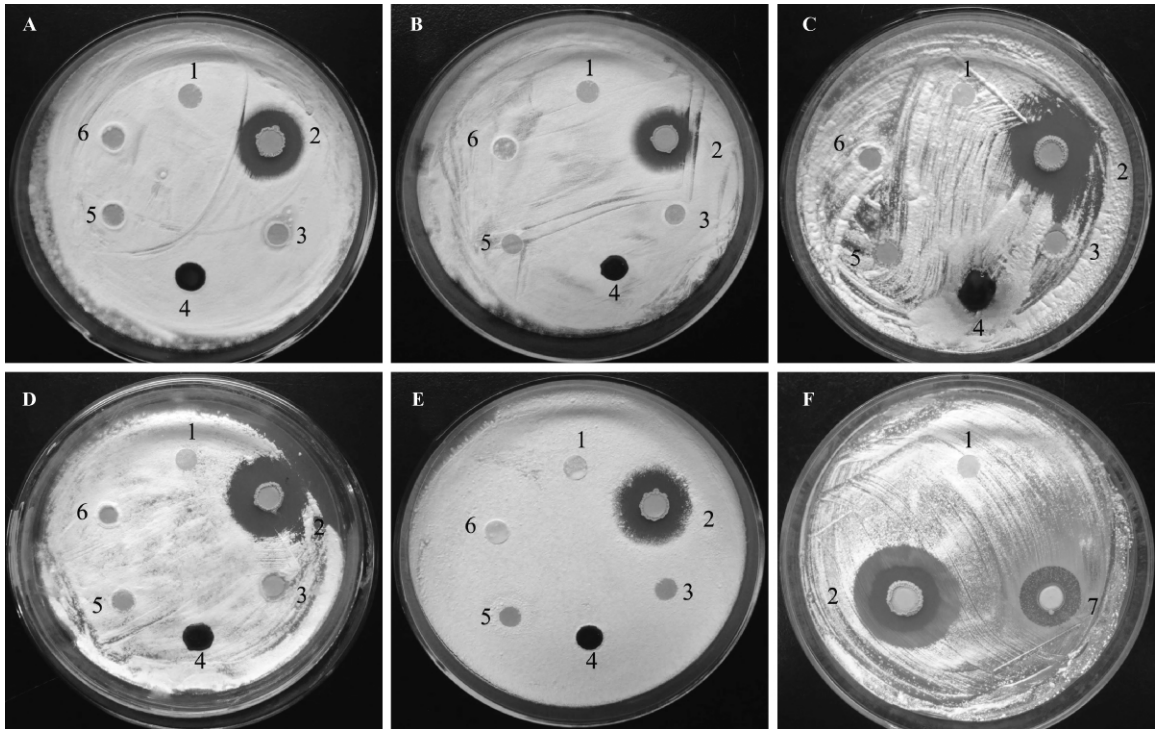


图 2. 菌株 SWB16 及其他试验菌株对 5 株球孢白僵菌的拮抗试验

Figure 2. The antagonism test of strain SWB16 and other testing strains against five *Beauveria bassiana* strains. Five target *Beauveria bassiana* strains, A, B, C, D and E, represent the *Beauveria bassiana* strains GXtr1010, GXtr1009, SCsk1006, GXsk1011 and YNsk1106, respectively; control and tested bacterial strains, 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7, represent sterile ddH₂O control, strain SWB16, strain *Bacillus subtilis* ATCC 6633, strain *Serratia marcescens*, strain SW41, strain SW82 and Carbendazim control, respectively.

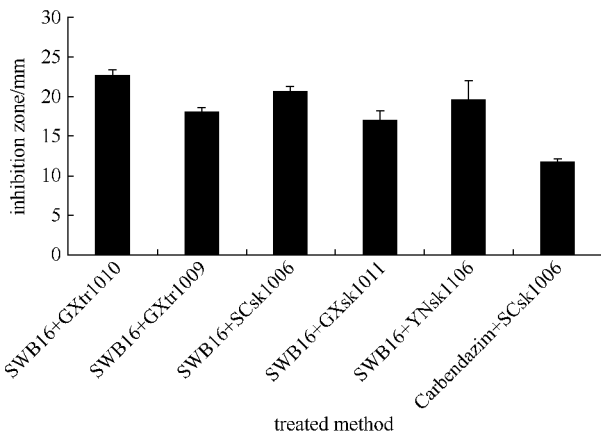


图 3. 菌株 SWB16 及多菌灵对 5 株球孢白僵菌的抑制活性

Figure 3. Inhibition activity of strain SWB16 and Carbendazim to five *Beauveria bassiana* strains.

2.3 菌株发酵液提取物对孢子及菌丝的抑制作用

菌株 SWB16 的脂肽类粗提物对五株球孢白僵菌表现出抑制作用, 如图 4-A 以球孢白僵菌 GXtr1009, GXtr1010 和 YNsk1106 为试验菌株所示, 提取物处理孔内无任何菌落生长。菌株 SWB16 的活性粗提物处理球孢白僵菌菌株分生孢子时, 该粗提物对孢子发芽及生长具有明显的抑制及破坏作用, 绝大多数分生孢子裂解, 出现内容物外溢现象, 均失去原有的细胞形态 (图 4-B), 同时也观察到其分生孢子在出现裂解前的孢子膨大现象, 其中少数的分生孢子虽在显微镜下被观察到可保持其细胞形态, 但呈不发芽状态; 而提取溶剂对照组分生孢子没有发生形态改变, 在 18 h

内均完成萌发,进行正常的生长(图 4-C)。当菌株 SWB16 的活性粗提物作用于球孢白僵菌的菌丝时,显微镜下观察到在一些分生孢子萌发后产生的菌丝

前部生长端出现膨大现象,已生长的菌丝在活性粗提物的处理下菌丝上多处出现瘤状畸形(图 4-D);且其菌丝的生长受到明显抑制。

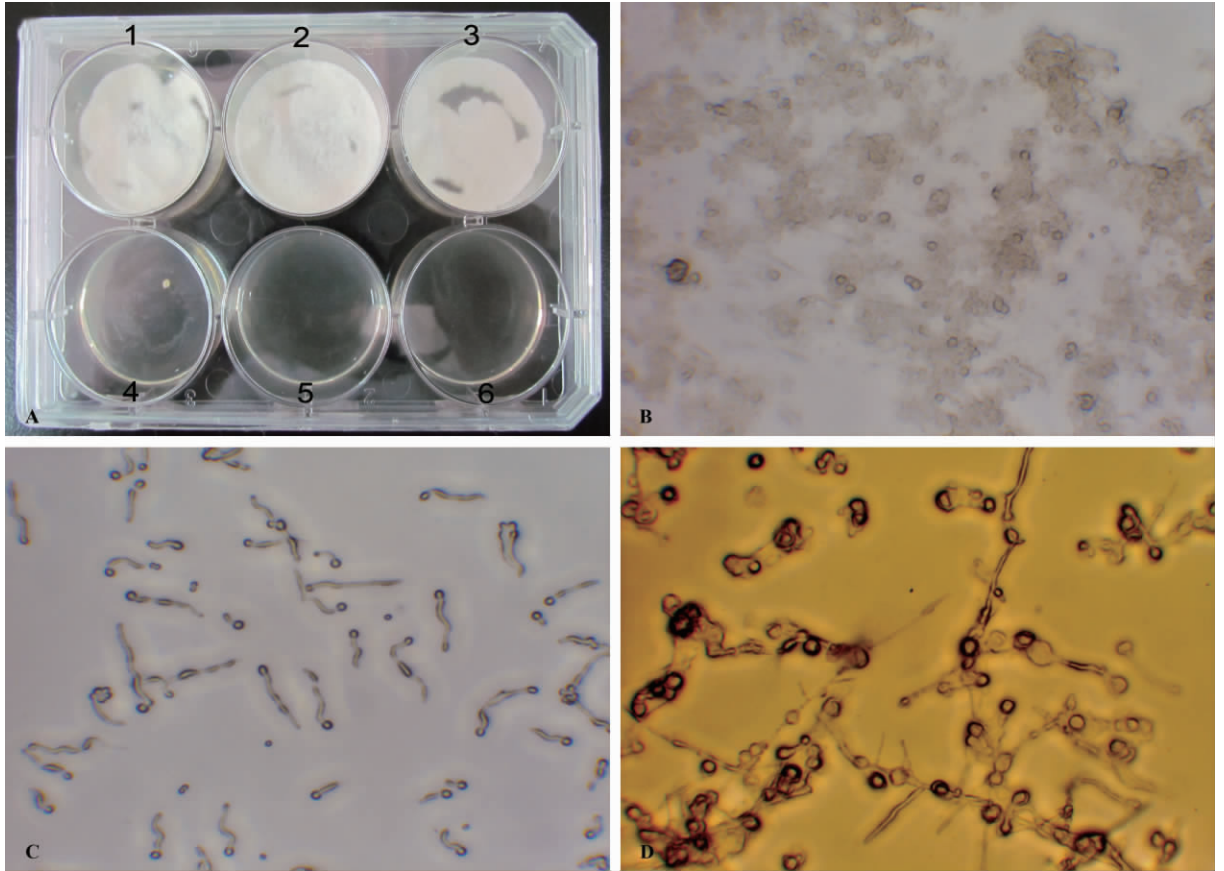


图 4. 菌株 SWB16 活性粗提物对球孢白僵菌的抑制作用

Figure 4. The inhibition of strain SWB16 lipopeptide extracts against the conidia and hyphae of *Beauveria bassiana* strains. A represents the antagonism of SWB16 lipopeptide extracts against three *Beauveria bassiana* strains; B and C, represent the conidia of *Beauveria bassiana* strain GXtr1010 treated with SWB16 lipopeptide extracts and methanol control, respectively; D represents the mycelium of the *Beauveria bassiana* strain YNsk1106 treated with SWB16 lipopeptide extracts; 1, 2, 3 represent *Beauveria bassiana* strains GXtr1009, GXtr1010 and YNsk1106 treated with SWB16 strain lipopeptide extracts, and 4, 5, 6 represent sterile methanol control. The figures B, C and D are micrographs (400 ×).

2.4 抑菌活性产物的检测

将菌株 SWB16 发酵液的粗提物进行高效液相色谱-质谱联用检测,经 HPLC 分析,得到了 3 组主要的物质峰,通过质谱结果确定前 2 组物质峰属于伊枯草菌素及芬枯草菌素的同系物,为含有分子量相差 14Da (CH₂) 的代谢同系物,图 5 所示为脂肽类粗提物的高效液相色谱图,质谱实测值分别为 1042.6, 1056.6, 1070.7, 1084.7, 1449.8, 1463.9, 1477.9, 1491.9, 1505.9, 分别与脂肽类抗生素 C14-C17Iturin A, C15-C18Fengycin A,

C17Fengycin B 分子量的理论预测值 1042.54, 1056.55, 1070.57, 1084.61, 1448.77, 1462.79, 1476.8, 1490.82, 1504.84 相吻合。另一方面,从菌株 SWB16 基因组中分别扩增得到了 1306bp 和 1047bp 的合成芬枯草菌素 B,伊枯草菌素 A 的基因 *fenB* 和 *ituA*, 已提交 NCBI 数据库,登录号分别为: KF765803, KF765804。产物检测与靶基因克隆检测结果表明:菌株 SWB16 可分泌芬枯草菌素和伊枯草菌素,在对球孢白僵菌的抑制作用中发挥了重要作用。

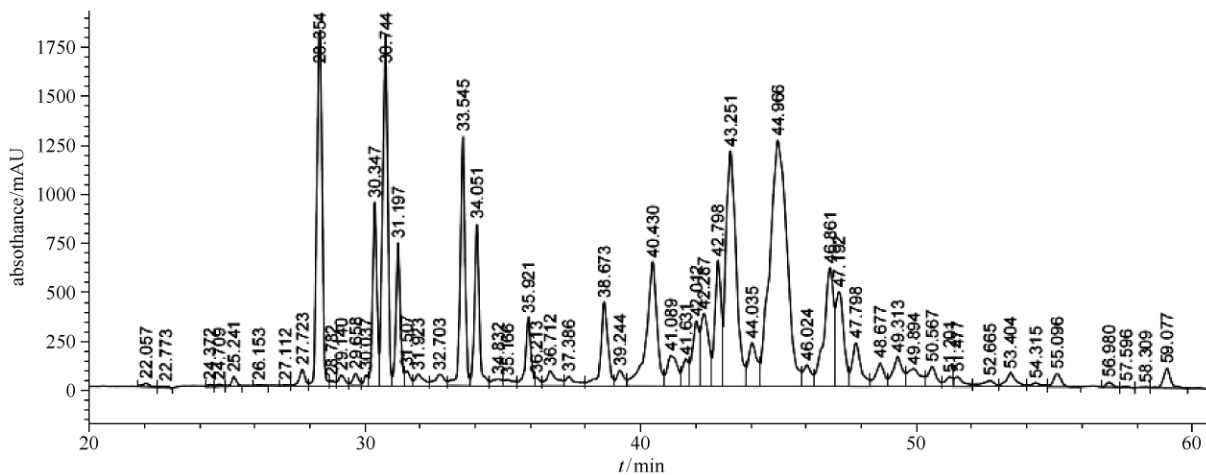


图 5. 菌株 SWB16 活性粗提取物的高效液相色谱图

Figure 5. The figures of liquid chromatography for strain SWB16 lipopeptide extracts.

3 讨论

芽孢杆菌属 *Bacillus* 的分类在形态学上均是基于菌体产生芽孢, 而属种的鉴定主要根据生理生化特性和 16S rRNA 序列分析, 但从具体分类实践看仍然难于区分芽孢杆菌的近缘种, 如枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 以及地衣芽孢杆菌等^[18], 近年来, 高变异性的蛋白编码基因逐渐被研究者作为系统分析的一个有力辅助工具, 如促旋酶亚基 alpha (*gyrA*)^[15] 以及 RNA 核酸聚合酶 beta 亚基 (*rpoB*)^[19] 和超氧化物歧化酶 (*sodA*)^[20] 等, 本研究采用 16SrRNA 序列分析不能对 SWB16 菌株准确鉴定, 但应用促旋酶 *gyrA* 基因序列分析将相关近缘种进行了有效区分, SWB16 菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* SWB16, 我们研究另外提出的 1 个新的分子标尺角鲨烯合酶基因 *ysP* 序列分析也得到了相同的分类结果, 即 SWB16 菌株同样被鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*^[21]。属种的准确鉴定奠定了对分离菌株特性及特殊基因应用分析的基础。

试验表明解淀粉芽孢杆菌 SWB16 菌株对 5 株球孢白僵菌均具有较强的拮抗作用, 从抑菌圈分析菌株所发挥拮抗作用的代谢产物可能有多种物质, 本研究对脂肽类代谢产物的检测显示该产物对球孢白僵菌的孢子发芽及菌丝生长是具有较强抑制作用的, 抑菌效果充分显示该菌株对防治家蚕等经济昆

虫的白僵病存在潜在的应用价值。球孢白僵菌的感染通常是通过分生孢子发芽穿过昆虫体壁侵入体内, 防治实践中一般在体表撒布防僵粉消毒药物予以阻断和杀灭分生孢子^[22], 最近的研究表明球孢白僵菌的分生孢子也有机会通过食下进入肠道感染^[23-24], 防僵粉消毒剂对食下感染的途径难以发挥防治作用, 抗真菌药物的口服使用如多菌灵则存在使用浓度的限制及对昆虫的安全性问题, 而菌株 SWB16 经我们多次试验证实对蚕安全, 即使高浓度使用对蚕也不表现为病理性。

解淀粉芽孢杆菌 SWB16 菌株的粗提取物经高效液相色谱-质谱联用检测及 *fenB* 基因和 *ituA* 基因的扩增结果表明: 菌株 SWB16 的基因组中由 *fenB* 基因及 *ituA* 基因参与编码合成的抗真菌物质芬枯草菌素 (fengycin) 和伊枯草菌素 (iturin) 为 SWB16 菌株脂肽类粗提取物的主要成分, 对球孢白僵菌分生孢子的发芽和菌丝生长具有显著的抑制作用, 与抑制其他植物病原真菌有类似的结果^[25-27], 且从显微观察初步判断芬枯草菌素或伊枯草菌素的活性靶点可能发生在球孢白僵菌孢子及菌丝的胞壁和细胞膜上, 怎样发挥作用尚不得而知。迄今关于芬枯草菌素和伊枯草菌素对病原真菌抑制作用机制的研究还不够深入, 相关作用机制有待于进一步研究。

致谢: 感谢重庆前沿生物技术有限公司技术人员闵文杰博士在高效液相色谱-质谱联用检测技术方面提供的帮助。

参考文献

- [1] Qi A, Zhao X, Liu D. Research of biological control in plant diseases by *Bacillus* spp.. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27 (12) : 277-280. (in Chinese) 齐爱勇, 赵绪生, 刘大群. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究现状. *中国农学通报*, 2011, 27 (12) : 277-280.
- [2] Shoda M. Bacterial control of plant diseases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2000, 89 (6) : 515-521.
- [3] Wu WS, Wu HC, Li YL. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for control of *Alternaria cosmosa* and *A. patula* of *Cosmos sulfurous* (Yellow Cosmos) and *Tagetes patula* (French Marigold). *Journal of Phytopathology*, 2007 (12) : 670-675.
- [4] Sutyak KE, Wirawan RE, Aroutcheva AA, Chikindas ML. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104 (4) : 1067-1074.
- [5] Chao SH, Cheng TH, Shaw CY, Lee MH, Hsu YH, Tsai YC. Characterization of a novel pepF-like oligopeptidase secreted by *Bacillus amyloliquefaciens* 23-7A. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 1 (72) : 968-971.
- [6] Sun LJ, Lu ZX, Bie XM, Lu FX, Yang SH. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2006 (12) : 1259-1266.
- [7] 李增智. 中国虫生真菌研究与应用 (第一卷). 北京: 学术期刊出版社, 1988: 241.
- [8] Zhu F. The causes and prevention measures of muscardine disease epidemic of silkworm in partial areas of Guangxi. *Guangxi Sericulture*, 2008, 45 (3) : 29-32. (in Chinese) 朱方容. 广西部分地区桑蚕僵病流行的原因及防控对策. *广西蚕业*, 2008, 45 (3) : 29-32.
- [9] Gao H, Zhang R, Wan Y. Advance of studies on classification of genus *Beauveria*. *Science of Sericulture*, 2011, 37 (4) : 0730-0736. (in Chinese) 高红, 张冉, 万永继. 白僵菌的分类研究进展. *蚕业科学*, 2011, 37 (4) : 0730-0736.
- [10] Wang JJ, Yang L, Qiu X, Liu YG, Zhou W, Wan YJ. Diversity analysis of *Beauveria bassiana* isolated from infected silkworm in southwest China based on molecular data and morphological features of colony. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29: 1263-1269.
- [11] 金志雄. 盾叶薯蓣内生菌的分离鉴定及2株分离菌代谢产物的研究. 西南大学学位论文, 2011.
- [12] Jin Z, Zhou W, Wang Y, Wang Y, Li W, Shi C, Liu Y, Wan Y. Antibacterial effect and cytotoxicity of β -1, 3-1, 4-glucanase from endophytic *Bacillus subtilis* SWB8. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (11) : 1527-1537. 金志雄, 周围, 王娅, 王燕, 李雯静, 史朝金, 刘永贵, 万永继. 内生枯草芽孢杆菌 β -1, 3-1, 4-葡聚糖酶的抗菌作用及细胞毒性 (英文稿). *微生物学报*, 2011, 51 (11) : 1527-1537.
- [13] 周德庆. 微生物学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1986.
- [14] Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. // Stackebrandt E, Goodfellow M. eds. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley and Son Ltd, 1991: 115-175.
- [15] Chun J, Bae KS. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 78: 123-127.
- [16] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学. 第3版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 1340-1346.
- [17] Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O, Junge H, Voigt B, Jungblut PR, Vater J, Süßmuth R, Liesegang H, Strittmatter A, Gottschalk G, Borriss R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 2007, 25 (9) : 1007-14.
- [18] Gibson T, Topping LE. Further studies of the aerobic sporeforming bacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 1 (1) : 43-44.
- [19] Vos M, Quince C, Pijl AS, de Hollander M, Kowalchuk GA. A comparison of rpoB and 16S rRNA as markers in pyrosequencing studies of bacterial diversity. *PloS One*, 2012, 7: e30600. DOI: 10.1371/journal.pone.0030600.
- [20] Kubo Y, Rooney AP, Tsukakoshi Y, Nakagawa R, Hasegawa H, Kimura K. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* strains applicable to natto (fermented soybean) production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77: 6463-6469.
- [21] 李雯静. 芽孢杆菌 SWB16 的 *ylsP* 基因克隆及下游循环化酶基因 *sqhC* 缺失突变菌株的构建. 西南大学学位论文, 2013.
- [22] 金伟, 鲁兴萌, 万永继, 贡成良, 廖富频. 家蚕病理学. 北京: 中国农业出版社, 2001: 122-145.
- [23] Takeo Y. Oral infection of the silkworm by *Beauveria bassiana*. *Journal of Japanese Silk*, 1987, 56 (4) : 279-284. (in Japanese) 柳田健郎. 白きょう病菌による蚕への経口感染の検討. *日本蚕糸学雑誌*, 1987, 56 (4) : 279-284.
- [24] Allee LL, Goettel MS, Golberg A, Whitney HS, Roberts

DW. Infection by *Beauveria bassiana* of *Leptinotarsa decemlineata* larvae as a consequence of fecal contamination of the integument following per os inoculation. *Mycopathologia*, 1990, 111: 17-24.

[25] Hiradate S, Yoshida S, Sugie H, Yada, H, Fujii, Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. *Phytochemistry*, 2002, 61 (6) : 693-698.

[26] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly R, Dufour S,

Veening J, Arrebola E, Cazorla F, Kuipers O, Paquot M, Perez-Garcia A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20: 430-440.

[27] Thimon L, Peypoux F, Wallach J, Michel, G. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cell. *FEMS Microbiology Letter*, 1995, 128: 101-106.

Antagonism against *Beauveria bassiana* by lipopeptide metabolites produced by entophyte *Bacillus amyloliquefaciens* strain SWB16

Jingjie Wang¹, Dongyang Zhao¹, Yonggui Liu¹, Xiang Ao¹, Rui Fan¹, Zhengqiao Duan¹, Yanping Liu¹, Qianqian Chen¹, Zhixiong Jin², Yongji Wan^{1*}

¹Laboratory of Invertebrate Pathology and Applied Microbiology, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

²Institute of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Abstract: [Objective] We screened bacterial strains that have strong antagonism against *Beauveria bassiana*, an important pathogen of silkworm industry, and detected the antagonistic activity of lipopeptide metabolites. [Methods] We identified bacterium SWB16 by morphological observation, physiological and biochemical experiments, 16SrRNA, and *gyrA* gene sequence analysis, tested antagonistic activity of strain SWB16 against *Beauveria bassiana* by measuring the inhibition zone diameter using filter paper diffusion method (Kirby-Bauer method), obtained lipopeptide metabolites of the strain using methanol extraction and observed the antagonism of strain SWB16 lipopeptide extracts against the conidia and hyphae of *Beauveria bassiana*, detected main ingredients and genes of lipopeptide metabolites by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry and PCR amplification. [Results] SWB16 isolated from tissue of plant *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright belongs to *Bacillus amyloliquefaciens* and showed high antagonistic activity to *Beauveria bassiana*, and the lipopeptide extracts of isolate SWB16 exhibited significant inhibition to conidial germination and mycelial growth of *Beauveria bassiana*. The result of mass spectrometric detection indicated main component of the lipopeptide metabolites were fengycin and iturin, and genes *fenB*, *ituA* involved in the synthesis of them were amplified in the genome. [Conclusion] *Bacillus amyloliquefaciens* strain SWB16 could produce lipopeptide antibiotics with strong antagonism to the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*, and the results suggested that strain SWB16 has potential application value for controlling white muscardine of economic insects including silkworm.

Keywords: *Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright, *Bacillus amyloliquefaciens*, antagonism, *Beauveria bassiana*, lipopeptide antibiotics

(本文责编:王晋芳)

Supported by the China Agriculture Research System (CARS-22)

* Corresponding author. Tel: +86-23-68251585; Fax: +86-23-58250191; E-mail: canbl3312@126.com

Received: 30 October 2013/ Revised: 9 March 2014