



# 特基拉芽孢杆菌 XK29 挥发物 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌的抑制作用研究

李腾杰, 梁孙妍, 郭健衡, 徐悦, 张春媚, 秦盛, 邢珂\*

江苏师范大学生命科学学院, 江苏 徐州 221116

李腾杰, 梁孙妍, 郭健衡, 徐悦, 张春媚, 秦盛, 邢珂. 特基拉芽孢杆菌 XK29 挥发物 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌的抑制作用研究. 微生物学报, 2022, 62(12): 5018–5028.

Li Tengjie, Liang Sunyan, Guo Jianheng, Xu Yue, Zhang Chunmei, Qin Sheng, Xing Ke. Inhibitory effects of volatile 2-methylbutyric acid produced by *Bacillus tequilensis* XK29 on *Ceratocystis fimbriata*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 5018–5028.

**摘要:**【目的】研究特基拉芽孢杆菌挥发物 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌的抑制作用, 评价 2-甲基丁酸对甘薯黑斑病的防治效果。【方法】采用 I-分隔皿和气相抑菌体系, 研究不同剂量的 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用; 使用乳酸酚棉蓝染色观察 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌显微形态的影响; 利用荧光探针钙荧光白和溴化丙锭检测 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌细胞壁结构与细胞膜通透性的影响; 使用荧光探针 2,7-二氯荧光素二乙酸酯检测甘薯长喙壳菌胞内活性氧含量变化; 测定谷胱甘肽含量分析病原菌应对氧化损伤能力的改变; 通过线粒体脱氢酶活力和丙酮酸含量的检测, 分析 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌线粒体功能和能量代谢的影响; 评价 2-甲基丁酸在甘薯黑斑病防治中的使用效果。【结果】2-甲基丁酸显著抑制甘薯长喙壳菌菌丝生长和孢子萌发, 降低其产孢能力, 导致菌丝折叠弯曲并形成不连续的空腔。2-甲基丁酸使甘薯长喙壳菌的细胞壁结构改变, 细胞膜通透性增加, 胞内活性氧含量升高, 谷胱甘肽含量显著降低, 使病原菌应对氧化损伤的能力下降, 线粒体脱氢酶活力和丙酮酸含量显著降低, 诱发线粒体功能障碍, 干扰细胞能量代谢, 最终导致细胞死亡。此外, 2-甲基丁酸对甘薯黑斑病也具有良好的防治作用。【结论】2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌具有显著的抑制作用, 可作为安全高效的气相抑菌材料用于新型熏蒸制剂的研发。

**基金项目:** 徐州市科技计划项目(KC21141); 国家自然科学基金(31900110); 江苏高校“青蓝工程”项目(2019)

Supported by the Science and Technology Project of Xuzhou City (KC21141), by the National Natural Science Foundation of China (31900110) and by the Qing Lan Project of Jiangsu Province (2019)

\*Corresponding author. E-mail: xingke@jsnu.edu.cn

Received: 2 April 2022; Revised: 22 April 2022; Published online: 21 June 2022

关键词: 挥发性有机物; 2-甲基丁酸; 甘薯长喙壳菌; 线粒体; 活性氧

## Inhibitory effects of volatile 2-methylbutyric acid produced by *Bacillus tequilensis* XK29 on *Ceratocystis fimbriata*

LI Tengjie, LIANG Sunyan, GUO Jianheng, XU Yue, ZHANG Chunmei, QIN Sheng, XING Ke\*

School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China

**Abstract:** [Objective] To investigate the inhibitory effects of 2-methylbutyric acid produced by *Bacillus tequilensis* XK29 on *Ceratocystis fimbriata*, and to evaluate its control effects on sweet potato black rot. [Methods] I-plates (2-section) and gas-phase antimicrobial system were used to study the inhibitory effects of 2-methylbutyric acid on mycelial growth and spore germination of *C. fimbriata*, and its effect on the micro-morphology of *C. fimbriata* was observed by lactophenol cotton blue staining. Fluorescent probes calcofluor white and propidium iodide were adopted to detect the influences of 2-methylbutyric acid on cell wall structure and cell membrane permeability of *C. fimbriata*, and the change of intracellular reactive oxygen species of *C. fimbriata* was explored by fluorescence probe 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate. Additionally, the content of glutathione was determined to analyze the ability of the pathogenic fungus to deal with oxidative damage, and the activity of mitochondrial dehydrogenase and the content of pyruvic acid were determined to clarify the effects of 2-methylbutyric acid on mitochondrial function and energy metabolism of *C. fimbriata*. In the end, we evaluated the application of 2-methylbutyric acid to the control of sweet potato black rot. [Results] 2-methylbutyric acid significantly inhibited the mycelial growth and spore germination of *C. fimbriata*, thus reducing the sporulation ability of *C. fimbriata* and resulting in folded mycelia and discontinuous cavities. The cell wall structure was changed, and the membrane permeability and the content of intracellular reactive oxygen species were increased. 2-methylbutyric acid markedly reduced the content of glutathione, thereby decreasing the ability of pathogens to deal with oxidative damages. Furthermore, the activity of mitochondrial dehydrogenase and the content of pyruvic acid dropped, which induced mitochondrial dysfunction and interfered with cell energy metabolism, thus leading to cell death. In addition, 2-methylbutyric acid controlled the sweet potato black rot. [Conclusion] 2-methylbutyric acid had remarkable inhibitory effects on *C. fimbriata*. It could be used as a safe and efficient gas-phase antimicrobial material for the development of new fumigants.

**Keywords:** volatile organic compounds; 2-methylbutyric acid; *Ceratocystis fimbriata*; mitochondria; reactive oxygen species

甘薯 [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] 不仅是我国重要的粮食作物, 还含有丰富的胡萝卜素、活性多糖和膳食纤维等成分, 营养和保健功能突出<sup>[1]</sup>。据联合国粮农组织统计, 2019 年中国

甘薯种植面积居世界首位, 占世界总产量的 85%<sup>[2]</sup>。由甘薯长喙壳菌 (*Ceratocystis fimbriata*) 侵染引起的甘薯黑斑病, 导致甘薯每年产量损失约 5%–10%, 严重时可达 20%–50%<sup>[3]</sup>。病薯

变为黑色,散发苦臭味,产生甘薯酮等有毒物质<sup>[4]</sup>,无法食用和饲用,造成巨大的经济损失。目前我国登记用于防治该病的化学杀菌剂仅有多菌灵、乙蒜素、甲基硫菌灵等几种<sup>[5]</sup>。化学农药造成的农药残留、环境污染和食品安全风险等问题已成为农业可持续发展的瓶颈,防治药剂的匮乏导致频繁使用单一杀菌剂,进一步增加抗药性风险<sup>[6]</sup>。因此,开发绿色防控新策略具有现实意义。

微生物产生的挥发性有机化合物(volatile organic compounds, VOCs)是一类常温下易挥发的低分子量(通常小于 300 Da)化合物<sup>[7]</sup>。与传统液态杀菌剂相比,产 VOCs 的微生物在不直接接触病原菌和被处理产品的条件下,即可通过 VOCs 的抑菌作用远距离控制植物病害<sup>[8]</sup>,已成为新的研究热点。研究表明,一株芽孢杆菌菌株 D13 释放的 VOCs 对水稻黄单胞菌具有拮抗作用<sup>[9]</sup>;鲑色链霉菌(*Streptomyces salmonis*) PSRDC-09 产生的 VOCs 对辣椒炭疽病有较好的防治效果<sup>[10]</sup>。2006 年,特基拉芽孢杆菌首次从墨西哥一座有 2 000 年历史的墓穴中被分离出来<sup>[11]</sup>。随后,研究人员陆续发现该菌株能够产生脂肽抑制病原体生长<sup>[12]</sup>,促进植物种子萌发和幼苗生长<sup>[13]</sup>,具有优良的生防潜力。然而,关于特基拉芽孢杆菌产 VOCs 的研究鲜有报道。本实验室从甘薯根际分离到一株特基拉芽孢杆菌(*Bacillus tequilensis*) XK29,其产生的 VOCs 能显著抑制甘薯长喙壳菌生长,并有效控制甘薯采后黑斑病的发生;经顶空固相微萃取与气相色谱-质谱联用技术分析,特基拉芽孢杆菌 XK29 在麦粒培养基上产生的 VOCs 主要成分为乙偶姻、2-羟基-5-甲基苯乙酮、异戊酸、异丁酸和 2-甲基丁酸等 21 种挥发性物质,其中微量的 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌具有强烈的抑制作用<sup>[14]</sup>,但具体的作用机制尚不明确。2-

甲基丁酸具有干酪味<sup>[15]</sup>,天然存在于苹果、草莓、辣椒等果蔬中<sup>[16]</sup>,是我国和世界上多个国家均批准使用的食品添加剂<sup>[17]</sup>。在饲料中添加 2-甲基丁酸,可以促进碳水化合物的降解和瘤胃纤维降解菌的生长,有助于消化瘤胃中的纤维,避免饲料浪费<sup>[18]</sup>。2-甲基丁酸良好的生物安全性和高效的抗真菌活性,使其具有进一步研究和开发的巨大潜力。

本研究通过气相抑菌方式,研究 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌的抑制作用,分析甘薯长喙壳菌细胞壁和细胞膜的结构变化,探究甘薯长喙壳菌线粒体功能的改变,初步揭示 2-甲基丁酸的抗真菌作用机制。进一步结合 2-甲基丁酸在甘薯采后黑斑病防治中的效果评价,为 2-甲基丁酸作为新型防腐保鲜手段的开发和应用奠定理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

甘薯长喙壳菌(样本编号:CF1.01127)由江苏省徐州市农业科学院提供。2-甲基丁酸(98%;CAS 号 116-53-0)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。溴化丙锭(propidium iodide, PI)、2,7-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)、甲萘醌、谷胱甘肽含量试剂盒、丙酮酸含量检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。钙荧光白(calcofluor white, CFW)染料购于上海贝博生物科技有限公司。3'-[1-(苯氨酰基)-3,4-四氮唑]-二(4-甲氧基-6-硝基)苯磺酸钠[(2,3)-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sul-phenyl)-(2H)-tetrazolium-5-carboxanilide, XTT]购于上海源叶生物科技有限公司。培养甘薯长喙壳菌使用马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)固体培养基和马铃薯葡萄糖(potato dextrose broth,

PDB)液体培养基。

## 1.2 菌落生长情况

在 I-分隔平皿一侧加入适量 PDA 培养基, 接种甘薯长喙壳菌菌饼(直径 7 mm)。另一侧放置适量无菌滤纸片(直径 8 mm), 滴加相应体积(1、5、10、50  $\mu\text{L}$ )的 2-甲基丁酸(每片滤纸片滴加液体上限为 10  $\mu\text{L}$ )。用 Parafilm 密封后 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 6 d, 每天测量 1 次菌落直径。对照组未加入 2-甲基丁酸。

## 1.3 孢子萌发

在 I-分隔平皿一侧加入适量 PDA(或 PDB)培养基, 接种 60  $\mu\text{L}$  甘薯长喙壳菌孢子悬液( $1 \times 10^6$  个/mL)。另一侧放置适量无菌滤纸片, 滴加相应体积(1、5、10、50  $\mu\text{L}$ )的 2-甲基丁酸。Parafilm 密封平皿后, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d, 观察孢子萌发情况。期间每 3 h 从 PDB 中取样镜检, 每次不少于 200 个孢子, 统计孢子萌发情况(当芽管长度超过孢子自身直径的一半时视为萌发)。

## 1.4 显微形态观察

在 I-分隔平皿一侧加入 PDA 培养基并接种甘薯长喙壳菌菌饼, 在距离菌饼 0.5 cm 处斜插入无菌盖玻片。分隔平皿另一侧放置无菌滤纸片并滴加 1  $\mu\text{L}$  的 2-甲基丁酸。平皿密封后于 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 6 d 后将盖玻片取下, 乳酸酚棉蓝染色液染色 30 min 后进行观察。

## 1.5 CFW 染色

在 I-分隔平皿一侧加入甘薯长喙壳菌孢子的 PDB 悬浮液(5 mL,  $1 \times 10^6$  个/mL), 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 1 d 后, 另一侧放置适量无菌滤纸片, 滴加相应体积(5  $\mu\text{L}$  和 50  $\mu\text{L}$ )的 2-甲基丁酸。Parafilm 密封后 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 6 h 和 12 h, 加入 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CFW 染液, 28  $^{\circ}\text{C}$  下避光孵育 1 min。离心后重悬于 PBS, 用 Lica 荧光显微镜 DM6000B 进行观察。

## 1.6 PI 染色

在 I-分隔平皿一侧加入甘薯长喙壳菌孢子

的 PDB 悬浮液(5 mL,  $1 \times 10^6$  个/mL), 另一侧放置适量无菌滤纸片, 滴加相应体积(5  $\mu\text{L}$  和 50  $\mu\text{L}$ )的 2-甲基丁酸。Parafilm 密封后 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 6 h 和 12 h, 加入 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PI 染液, 28  $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min。离心后将孢子重悬于 PBS, 用荧光显微镜观察<sup>[19]</sup>。

## 1.7 活性氧检测

如 1.6 所述, 在分隔平皿两侧分别加入甘薯长喙壳菌孢子悬液和 2-甲基丁酸, 培养结束后收集孢子, 加入 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  DCFH-DA 染液, 28  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 20 min, 用荧光显微镜进行观察<sup>[20]</sup>。

## 1.8 谷胱甘肽含量测定

如 1.6 所述, 在分隔平皿两侧分别加入甘薯长喙壳菌孢子悬液和 2-甲基丁酸, 培养结束后收集孢子, 按照谷胱甘肽含量试剂盒说明书进行测定。

## 1.9 线粒体总脱氢酶活力

采用 XTT-甲萘醌法测定线粒体脱氢酶总活力<sup>[21]</sup>。如 1.6 所述, 在分隔平皿两侧分别加入甘薯长喙壳菌孢子悬液和 2-甲基丁酸, 培养结束后收集孢子重悬于 500  $\mu\text{L}$  PBS, 取 150  $\mu\text{L}$  加入 96 孔板中, 再加入 50  $\mu\text{L}$  XTT-甲萘醌溶液并混匀。28  $^{\circ}\text{C}$  下避光孵育 2 h 后使用酶标仪测定  $OD_{450}$  值。将每个培养时间点的对照组  $OD_{450}$  定义为 100%酶活力, 计算不同处理组的相对活力。

## 1.10 丙酮酸含量测定

如 1.6 所述, 在分隔平皿两侧分别加入甘薯长喙壳菌孢子悬液和 2-甲基丁酸, 培养结束后收集孢子, 按照丙酮酸含量检测试剂盒说明书进行测定。

## 1.11 甘薯采后黑斑病的防治

选取健康、大小相近的市售天目山香薯, 在 1%次氯酸钠溶液中浸泡 2 min 进行表面消毒。用无菌解剖针在甘薯腰部制造 20 个约 5 mm

深的伤口, 接种 20  $\mu\text{L}$  甘薯长喙壳菌孢子悬液 ( $1 \times 10^6$  个/mL) 后放入无菌餐盒 (150 mm  $\times$  100 mm  $\times$  50 mm, 体积 750 mL)。餐盒中加入含有 10  $\mu\text{L}$  2-甲基丁酸滤纸片的培养皿 (直径 35 mm)。分为 4 组: I-对照组 (接种甘薯长喙壳菌的甘薯)、II-多菌灵组 (接种甘薯长喙壳菌的甘薯, 伤口处涂抹 20  $\mu\text{L}$  的 1 000 倍多菌灵稀释液)、III-先熏蒸组 (2-甲基丁酸熏蒸甘薯 2 d 后, 再接种甘薯长喙壳菌)、IV-同时熏蒸组 (接种甘薯长喙壳菌的甘薯, 立刻用 2-甲基丁酸熏蒸)。每组设置 10 个平行。28  $^{\circ}\text{C}$  培养 20 d 后取出甘薯, 根据 5 级经验性量表对甘薯发病情况进行判定: 1、未有明显症状; 2、半数针刺伤口发病; 3、病斑直径  $\leq 8$  mm; 4、8 mm < 病斑直径  $\leq 14$  mm; 5、14 mm < 病斑直径  $\leq 20$  mm。计算各组甘薯的发病程度 (disease severity, DS)<sup>[22]</sup>。

## 1.12 数据处理

所有试验重复 3 次, 结果以平均值  $\pm$  标准偏差表示。使用 Graphpad Prism 8.0 进行统计分析与图形绘制, 并通过单因素方差分析确定各组间的差异,  $P < 0.05$  时差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 2-甲基丁酸的抑菌活性

#### 2.1.1 菌丝生长

如图 1A、1B 所示, 随着培养时间的延长, 对照组菌落直径逐渐增大, 第 6 天时生长至平皿边缘, 菌落直径为 36.56 mm。而 2-甲基丁酸各处理组中, 甘薯长喙壳菌菌落直径与第 1 天相比均未发生明显变化。这一结果表明, 挥发性物质 2-甲基丁酸显著抑制甘薯长喙壳菌菌丝生长。

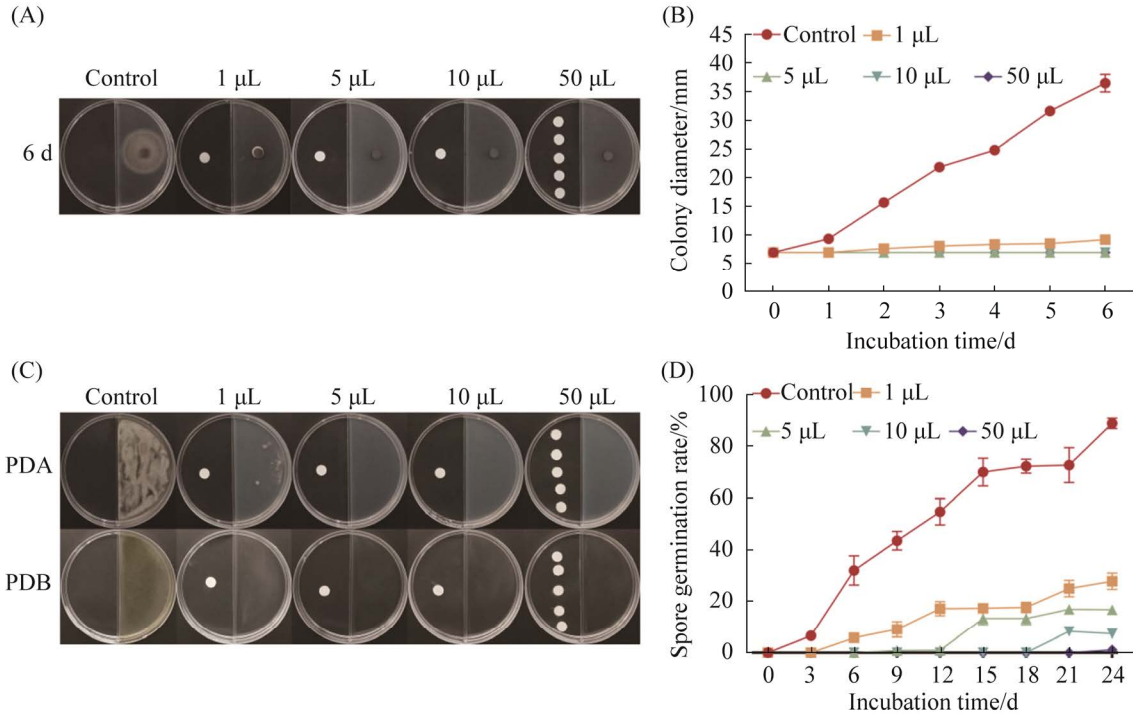


图 1 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌菌丝生长和孢子萌发的影响

Figure 1 Effects of 2-methylbutyric acid on mycelial growth (A–B) and spores germination (C–D) of *C. fimbriata*. Results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation.

### 2.1.2 孢子萌发

如图 1C 所示, 对照组中, 甘薯长喙壳菌孢子萌发形成大量菌丝, 在 PDA 和 PDB 培养基表面均形成致密的菌丝层。2-甲基丁酸处理组中, 仅在 1  $\mu\text{L}$  处理组的 PDA 培养基表面出现零星的白色菌落, PDB 培养基稍显浑浊。2-甲基丁酸 5–50  $\mu\text{L}$  处理组中, PDA 培养基上均未观察到菌落, PDB 培养基清澈透明。如图 1D 所示, 随着培养时间的增加, 对照组孢子萌发率显著上升, 24 h 时萌发率达到 88.86%。2-甲基丁酸 1–50  $\mu\text{L}$  处理组的 24 h 时萌发率分别为 27.90%、16.77%、7.39% 和 1.09%。因此, 2-甲基丁酸显著抑制了甘薯长喙壳菌孢子萌发。

### 2.1.3 显微形态

如图 2 所示, 对照组菌丝和孢子充盈饱满、

细胞内容物丰富、着色较为均匀。而 2-甲基丁酸处理组菌丝折叠变形呈扭曲状, 不规则膨大, 染色较浅并出现未着色的不连续空腔, 未观察到孢子。显微形态观察结果表明, 2-甲基丁酸导致甘薯长喙壳菌菌丝形态畸变和细胞内容物外泄, 抑制孢子的产生。

## 2.2 2-甲基丁酸的抑菌机制

### 2.2.1 细胞壁结构变化

使用 CFW 染色分析 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌细胞壁结构的影响。如图 3 所示, 对照组菌丝整体发出明亮的蓝色, 2-甲基丁酸处理组中菌丝发出的蓝色荧光变弱, 尤其是 50  $\mu\text{L}$  的 2-甲基丁酸处理 12 h 时, 菌丝发出的蓝色荧光明显减弱。这表明 2-甲基丁酸使甘薯长喙壳菌细胞壁结构发生变化。

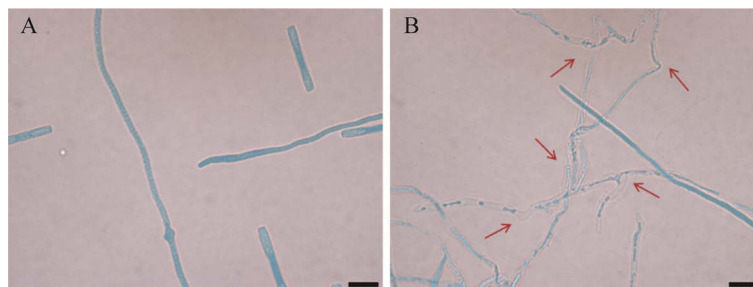


图 2 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌显微形态的影响

Figure 2 Effects of 2-methylbutyric acid on the morphology of *C. fimbriata*. A: control; B: fumigated with 2-methylbutyric acid. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ .

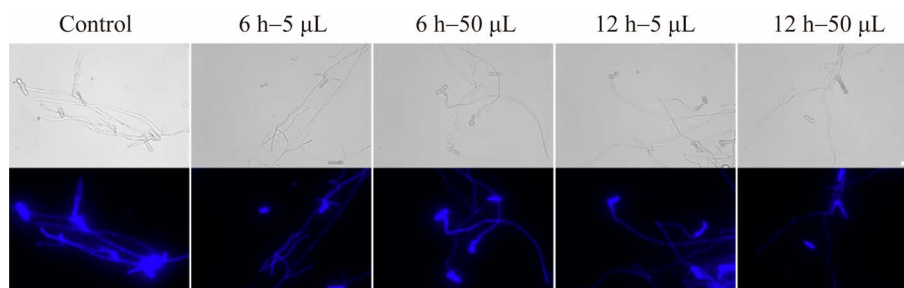


图 3 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌细胞壁结构的影响

Figure 3 Effect of 2-methylbutyric acid on cell wall structure of *C. fimbriata*. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ .

### 2.2.2 细胞膜完整性受损

为进一步探索 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌细胞膜的影响,使用 PI 染色检测细胞膜完整性以及细胞活力。如图 4 所示,对照组未检测到 PI 发出的红色荧光。与对照组相比,随着 2-甲基丁酸剂量和处理时间的增加,发出红色荧光的细胞数逐渐增多,荧光强度也随之增强。以上结果表明,2-甲基丁酸导致甘薯长喙壳菌的细胞膜完整性受损,细胞活力丧失,这种破坏作用存在浓度依赖性和时间依赖性。

### 2.2.3 线粒体生理功能障碍

线粒体是真核生物进行有氧呼吸产生 ATP 的主要场所,对微生物正常的能量代谢具有十分重要的作用。因此我们对与线粒体有关的生理功能进行了分析。

使用荧光探针 DCFH-DA 检测甘薯长喙壳菌胞内是否发生活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累。如图 5A 所示,对照组甘薯长喙壳菌孢子中未检测到荧光。与对照组相比,2-甲基丁酸处理组中的孢子发出绿色荧光。以上结果表明,2-甲基丁酸使甘薯长喙壳菌中积累大量的活性氧,这将会导致胞内重要细胞组分的严重损伤。

谷胱甘肽是生物体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂<sup>[23]</sup>。如图 5B 所示,随着培养时间的增加,对照组谷胱甘肽含量逐渐升高,至 12 h 时达到  $0.55 \mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$ 。经 2-甲基丁酸处理后谷

胱甘肽含量下降,12 h 时  $5 \mu\text{L}$  和  $50 \mu\text{L}$  2-甲基丁酸处理组中的谷胱甘肽含量分别为  $0.10$  和  $0.04 \mu\text{g}/10^6 \text{ cell}$ 。因此,2-甲基丁酸导致甘薯长喙壳菌谷胱甘肽含量下降,从而使机体应对氧化损伤的能力降低。

由图 5C 可以看出,随着 2-甲基丁酸剂量的增加和培养时间的延长,甘薯长喙壳菌的线粒体总脱氢酶活性持续降低。因此,2-甲基丁酸使甘薯长喙壳菌的线粒体总脱氢酶活力显著降低,从而导致三羧酸循环无法正常运转。

如图 5D 所示,培养 12 h 时,2-甲基丁酸处理组中甘薯长喙壳菌的丙酮酸含量显著低于对照组。由此可见,2-甲基丁酸导致甘薯长喙壳菌中丙酮酸含量降低,干扰糖酵解途径的正常代谢。

### 2.3 2-甲基丁酸对甘薯黑斑病的防治效果

如图 6A-I 所示,对照组甘薯针孔处均出现黑色斑点并连接成片,横截面可观察到黑斑病症状。使用甘薯黑斑病常用防治农药多菌灵涂抹后,针孔处有少数孔发病,部分发病孔连接成片,横截面仍有轻微发病症状(图 6A-II)。先熏蒸组甘薯针孔处和横截面均未见黑斑病症状(图 6A-III)。同时熏蒸组甘薯表面和横截面仅少量针孔出现黑色病斑,但均未连接成片(图 6A-IV)。因此,对照组甘薯发病严重,多菌灵组、同时熏蒸组和先熏蒸组均显著降低了甘薯黑斑病的发病程度(图 6B)。

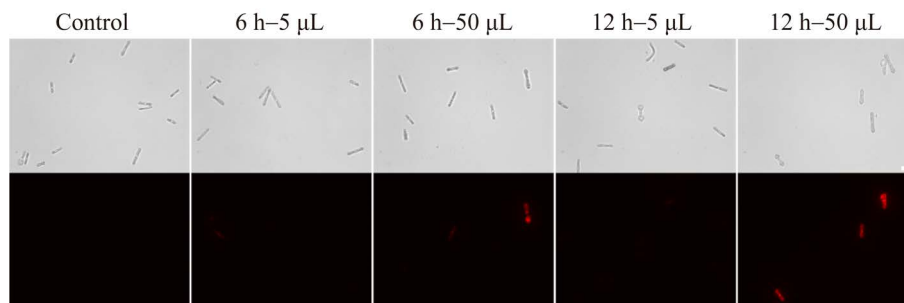


图 4 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌细胞膜完整性的影响

Figure 4 Effect of 2-methylbutyric acid on plasma membrane integrity of *C. fimbriata*. Scale bar: 5  $\mu\text{m}$ .

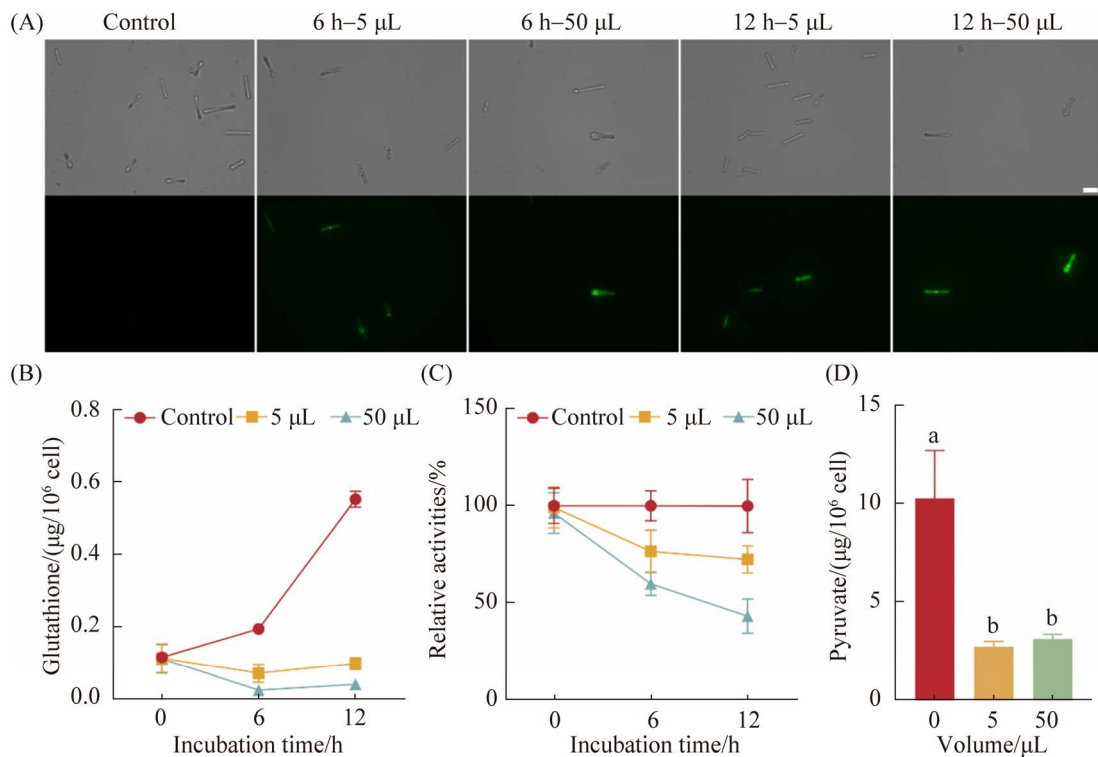


图 5 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌线粒体生理功能的影响

Figure 5 Effects of 2-methylbutyric acid on physiological functions of *C. fimbriata* mitochondria. A: ROS accumulation (scale bar: 5  $\mu$ m); B: glutathione content; C: mitochondrial dehydrogenase activity; D: pyruvate content. Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation. Means with different letters indicated statistical significance at  $P<0.05$ .

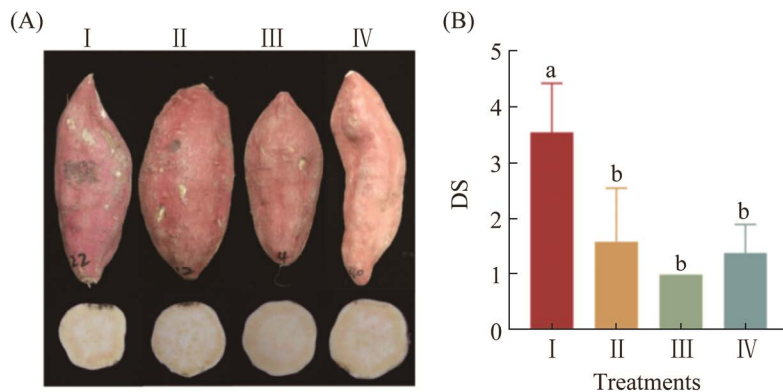


图 6 2-甲基丁酸对甘薯黑斑病的防治作用

Figure 6 The effect of 2-methylbutyric acid on controlling *C. fimbriata* infection in sweet potatoes. A: images of sweet potatoes; B: DS of sweet potatoes. Results were expressed as the mean $\pm$ standard deviation. Means with different letters indicated statistical significance at  $P<0.05$ . DS: disease severity.

### 3 讨论与结论

在果蔬采后贮藏中,病原真菌侵染常导致巨

大的经济损失<sup>[24]</sup>。传统化学农药一般为液态杀菌剂,需直接接触被处理的农产品,液态药剂还容易引起果蔬(如草莓、生菜)软腐等现象。微生物



产生的 VOCs 在土壤、空气中可进行远距离扩散, 并发挥其生物学功能, 其气相抑菌方式不会在被处理产品表面引入活菌, 不会引起公众的生物安全顾虑, 具有良好的应用价值及发展前景<sup>[8]</sup>。

本文研究了特基拉芽孢杆菌 XK29 的挥发物 2-甲基丁酸在气相抑菌条件下对甘薯长喙壳菌的抗真菌作用。结果表明, 微量的 2-甲基丁酸即可有效抑制甘薯长喙壳菌菌丝生长和孢子萌发(图 1), 展现了其在真菌病害防治中极大的应用潜力。一株芽孢杆菌 TM-I-3 产生的 VOCs 抑制烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、枝孢样枝孢霉(*Cladosporium cladosporioides*)和扩展青霉(*Penicillium expansum*), 经鉴定 2-甲基丁酸是其主要挥发性成分之一<sup>[25]</sup>。显微形态观察结果显示, 2-甲基丁酸熏蒸使甘薯长喙壳菌产孢能力丧失, 菌丝发生显著的畸形、扭曲, 形成不连续的空腔(图 2)。这表明, 2-甲基丁酸破坏甘薯长喙壳菌细胞壁和细胞膜的屏障特性, 使大量的细胞质泄露, 细胞形态异常。

作为真菌细胞最外层的屏障, 细胞壁能够固定细胞外形, 维持细胞内环境的稳态<sup>[26]</sup>。CFW 为二苯乙烯类化合物, 与细胞壁中的纤维素和几丁质结合, 产生蓝色荧光。实验结果表明, 2-甲基丁酸减弱了甘薯长喙壳菌菌丝中的蓝色荧光强度(图 3), 细胞壁的结构和组成可能被改变。PI 染色结果表明, 随着 2-甲基丁酸剂量和作用时间的增加, 发出红色荧光的细胞数增多, 且荧光强度增强(图 4), 证明 2-甲基丁酸导致甘薯长喙壳菌细胞膜完整性受损, 丧失细胞活力。因此, 细胞膜和细胞壁可能存在 2-甲基丁酸抑菌作用的潜在靶点。

长期以来, 人们认为不同种类的抗生素通过不同的机制发挥其抗菌作用。但有学者认为, ROS(主要是羟基自由基)的生成是细胞氧化损伤死亡的最终产物, 这是杀菌抗生素诱导细

胞死亡的共同机制<sup>[27]</sup>。高浓度的 ROS 会与脂质、蛋白质和 DNA 发生反应, 造成氧化损伤, 最终导致细胞功能障碍或死亡<sup>[28]</sup>。谷胱甘肽是生物体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂, 具有保护细胞膜和线粒体膜、避免脂质过氧化损伤的作用<sup>[29]</sup>。本研究中, 2-甲基丁酸能提高甘薯长喙壳菌胞内 ROS 水平(图 5A), 抑制谷胱甘肽的合成(图 5B), 打破了 ROS 与抗氧化系统之间的平衡。线粒体是产能与代谢的重要细胞器, 也是真核细胞中 ROS 主要的内源性来源<sup>[30]</sup>。线粒体不可避免地暴露于高水平的 ROS 中, 本研究发现 2-甲基丁酸能降低甘薯长喙壳菌的线粒体脱氢酶活力(图 5C)和丙酮酸含量(图 5D), 干扰线粒体功能和能量代谢。上述结果表明, 2-甲基丁酸破坏甘薯长喙壳菌细胞壁和细胞膜的完整性, 诱导 ROS 积累, 抑制谷胱甘肽合成, 降低线粒体脱氢酶活力和丙酮酸含量, 从而诱发线粒体功能障碍, 干扰细胞能量代谢, 最终导致细胞死亡(图 7)。

甘薯体内试验中, 2-甲基丁酸先熏蒸组和同时熏蒸组对甘薯黑斑病均具有显著的防治作用。先熏蒸组的防治效果好于同时熏蒸组, 这表明 2-甲基丁酸能够诱导甘薯提高对生物胁迫的系统抗性。枯草芽孢杆菌 CF-3 挥发物通过抑制果胶酶和纤维素酶的活性, 增强抗氧化酶活性等, 诱导荔枝产生抵御能力, 从而有效防治胶孢炭疽菌感染所引起的荔枝果实腐烂<sup>[31]</sup>。2-甲基丁酸诱导甘薯系统抗性的具体机制有待进一步研究。

综上所述, 特基拉芽孢杆菌 XK29 挥发物 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌具有显著的抑制作用, 其抑菌机制可能涉及细胞壁和细胞膜完整性的破坏, 损伤线粒体功能并干扰细胞能量代谢, 最终导致细胞死亡。2-甲基丁酸在甘薯采后黑斑病的防治中也展现出良好的应用潜力。因此, 2-甲基丁酸可作为安全高效的气相抑菌材料用于新型熏蒸制剂的研发。

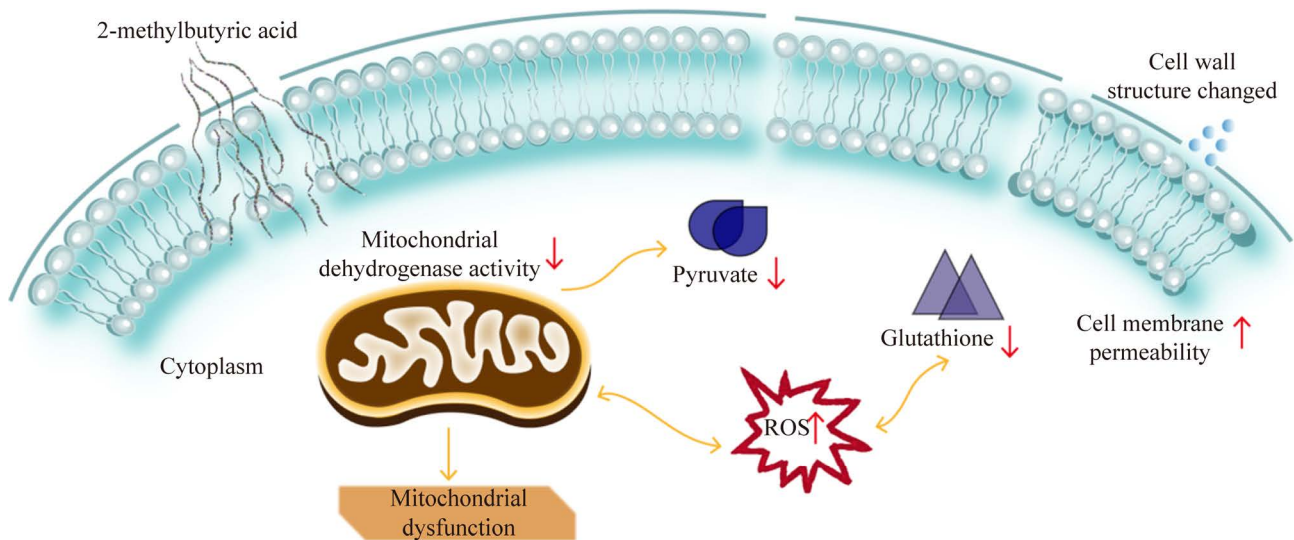


图 7 2-甲基丁酸对甘薯长喙壳菌的潜在抑菌机制

Figure 7 The potential antifungal mechanism of 2-methylbutyric acid against *C. fimbriata*.

## 参考文献

- [1] Mohanraj R, Sivasankar S. Sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam]—a valuable medicinal food: a review. *Journal of Medicinal Food*, 2014, 17(7): 733–741.
- [2] 弋凤蕊, 刘瑞涵, 李仁崑. 中国甘薯产业竞争力区域比较研究. *农业展望*, 2021, 17(7): 61–66.  
Yi FR, Liu RH, Li RK. Competitive regional comparison of China's sweet potato industry. *Agricultural Outlook*, 2021, 17(7): 61–66. (in Chinese)
- [3] 杨冬静, 孙厚俊, 张成玲, 徐振, 赵永强, 谢逸萍. 解淀粉芽孢杆菌菌株 XZ-1 对甘薯黑斑病的生物防治效果研究. *西南农业学报*, 2018, 31(4): 736–741.  
Yang DJ, Sun HJ, Zhang CL, Xu Z, Zhao YQ, Xie YP. Biological control of *Bacillus amyloliquefacien* strain XZ-1 against black rot on sweet potato. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 31(4): 736–741. (in Chinese)
- [4] Wamalwa LN, Cheseto X, Ouna E, Kaplan F, Maniania NK, Machuka J, Torto B, Ghislain M. Toxic ipomeamarone accumulation in healthy parts of sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] storage roots upon infection by *Rhizopus stolonifer*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(1), 335–342.
- [5] 张德胜, 乔奇, 田雨婷, 王爽, 秦艳红, 王永江, 张振臣. 5 种杀菌剂对储藏期甘薯黑斑病的防效及对薯块的安全性评价. *植物保护*, 2015, 41(6): 221–224.  
Zhang DS, Qiao Q, Tian YT, Wang S, Qin YH, Wang YJ, Zhang ZC. Control efficacy of five fungicides to black rot of sweet potato in storage and safety assessment to storage roots. *Plant Protection*, 2015, 41(6): 221–224. (in Chinese)
- [6] Steinberg G, Schuster M, Gurr SJ, Schrader TA, Schrader M, Wood M, Early A, Kilaru S. A lipophilic cation protects crops against fungal pathogens by multiple modes of action. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1608.
- [7] Netzker T, Shepherdson EMF, Zambri MP, Elliot MA. Bacterial volatile compounds: functions in communication, cooperation, and competition. *Annual Review of Microbiology*, 2020, 74: 409–430.
- [8] Sharifi R, Ryu CM. Sniffing bacterial volatile compounds for healthier plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, 44: 88–97.
- [9] Xie S, Zang H, Wu H, Uddin RF, Gao X. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(1): 49–58.
- [10] Boukaew S, Cheirsilp B, Prasertsan P, Yossan S. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Streptomyces salmonis* PSRDC-09 against anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* PSU-03 in postharvest chili fruit. *Journal of Applied Microbiology*, 2021, 131(3): 1452–1463.
- [11] Gatson JW, Benz BF, Chandrasekaran C, Satomi M, Venkateswaran K, Hart ME. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(7): 1475–1484.
- [12] Cuellar-Gaviria TZ, González-Jaramillo LM, Villegas-Escobar V. Role of *Bacillus tequilensis* EA-CB0015 cells and lipopeptides in the biological

- control of black Sigatoka disease. *Biological Control*, 2020, 155: 104523.
- [13] Zhou H, Zhu H, Ren Z, Li X, Zhong J, Liu E. Efficacy of *Bacillus tequilensis* strain JN-369 to biocontrol of rice blast and enhance rice growth. *Biological Control*, 2021, 160: 104652.
- [14] Xu M, Guo J, Li T, Zhang C, Peng X, Xing K, Qin S. Antibiotic effects of volatiles produced by *Bacillus tequilensis* XK29 against the black spot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in postharvest sweet potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2021, 69(44): 13045–13054.
- [15] Forney CF, Jordan MA, Cue KR. Identification of aroma-active compounds of whole and macerated ‘Honeycrisp’ and ‘Ambrosia’ apples. *Acta Horticulturae*, 2016, 1120: 137–142.
- [16] Api AM, Belmonte F, Belsito D, Botelho D, Bruze M, Burton GA, Buschmann J, Dagli ML, Date M, Dekant W, Deodhar C, Fryer AD, Gadhia S, Jones L, Joshi K, La Cava S, Lapczynski A, Lavelle M, Liebler DC, Na M, O’Brien D, Penning TM, Ritacco G, Romine J, Sadekar N, Salvito D, Schultz TW, Sipes IG, Sullivan G, Thakkar Y, Tokura Y, Tsang S. RIFM fragrance ingredient safety assessment, 2-methylbutyric acid, CAS registry number 116-53-0. *Food and Chemical Toxicology*, 2019, 130 Suppl 1: 110574.
- [17] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. GB 2760—2014 食品安全国家标准食品添加剂使用标准. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [18] Roman-Garcia Y, Denton BL, Mitchell KE, Lee C, Socha MT, Firkins JL. Conditions stimulating neutral detergent fiber degradation by dosing branched-chain volatile fatty acids. I: comparison with branched-chain amino acids and forage source in ruminal batch cultures. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(6): 6739–6755.
- [19] Xing K, Xing Y, Liu Y, Zhang Y, Shen X, Li X, Miao X, Feng Z, Peng X, Qin S. Fungicidal effect of chitosan via inducing membrane disturbance against *Ceratocystis fimbriata*. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 192: 95–103.
- [20] Zhang Y, Li TJ, Xu MJ, Guo JH, Zhang CM, Feng ZZ, Peng X, Li ZY, Xing K, Qin S. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 on oxidative stress and mitochondrial dysfunction of *Ceratocystis fimbriata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2021, 173: 104777.
- [21] Ma WB, Zhao LL, Zhao WH, Xie YL. (E)-2-hexenal, as a potential natural antifungal compound, inhibits *Aspergillus flavus* spore germination by disrupting mitochondrial energy metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(4): 1138–1145.
- [22] Zhang Y, Li TJ, Liu YF, Li XY, Zhang CM, Feng ZZ, Peng X, Li ZY, Qin S, Xing K. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 as biological fumigants to control *Ceratocystis fimbriata* in postharvest sweet potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(13): 3702–3710.
- [23] Pócsi I, Prade RA, Penninckx MJ. Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Advances in Microbial Physiology*, 2004, 49: 1–76.
- [24] Hua SST, Beck JJ, Sarreal SBL, Wai GE. The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 2014, 30(2): 71–78.
- [25] Osaki C, Yamaguchi K, Urakawa S, Nakashima Y, Sugita K, Nagaishi M, Mitsuiki S, Kuraoka T, Ogawa Y, Sato H. The bacteriological properties of *Bacillus* strain TM-I-3 and analysis of the volatile antifungal compounds emitted by this bacteria. *Biocontrol Science*, 2019, 24(3): 129–136.
- [26] Walker LA, Munro CA. Caspofungin induced cell wall changes of *Candida* species influences macrophage interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2020, 10: 164.
- [27] Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 2007, 130(5): 797–810.
- [28] Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokoza S, Tsuji N, Yagihashi A, Watanabe N. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002, 46(10): 3113–3117.
- [29] Mari M, Morales A, Colell A, García-Ruiz C, Kaplowitz N, Fernández-Checa JC. Mitochondrial glutathione: features, regulation and role in disease. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1830(5): 3317–3328.
- [30] Li Y, Shao X, Xu J, Wei Y, Xu F, Wang H. Tea tree oil exhibits antifungal activity against *Botrytis cinerea* by affecting mitochondria. *Food Chemistry*, 2017, 234: 62–67.
- [31] Zhao P, Li P, Wu S, Zhou M, Zhi R, Gao H. Volatile organic compounds (VOCs) from *Bacillus subtilis* CF-3 reduce anthracnose and elicit active defense responses in harvested *Litchi* fruits. *AMB Express*, 2019, 9(1): 119.