



研究报告

草酸青霉中新型线性五肽的发现及对柑橘采后致腐菌拮抗活性研究

杨宇纯 肖梅 刘呈雄 程凡 刘士平 薛艳红*

三峡大学生物与制药学院 湖北 宜昌 443002

摘要:【背景】柑橘是我国南方农村地区的一种重要经济作物,每年因采后真菌感染导致大量柑橘腐烂和劣变,造成了巨大的经济损失,严重影响柑农的积极性。【目的】丝状真菌 SG-4 对柑橘采后致腐菌橘青霉(*Penicillium citrinum*)和指状青霉(*Penicillium digitatum*)具有很强的拮抗作用,为明确其抑菌的物质基础,对该菌进行了生物学鉴定和活性成分分析。【方法】将 SG-4 菌株的核糖体 DNA 的内转录间隔区进行测序,结合菌株形态进行鉴定;对其菌体相和培养液进行抑菌活性追踪,利用醇沉淀和反相高效液相色谱分离得到主效物质,通过高分辨质谱和核磁共振等波谱分析方法确定结构;采用离体的牛津杯抑菌圈法和柑橘的体内接种试验来评价其抑菌活性;通过液相分析测定了活性物质在发酵液中的含量。【结果】分子和形态鉴定表明 SG-4 是一株草酸青霉(*Penicillium oxalicum*),其抑制柑橘采后致腐菌的活性物质位于培养液的水相提取物中,且具有强极性。进一步研究表明其活性成分为一种新型线性醇溶五肽,含 3 个具羟基的氨基酸,并且富含甲基化修饰,构成寡肽的第一个氨基酸为 β -氨基丁酸(beta-aminobutyric acid, BABA),其结构为 O-Me-BABA-N-Me-Thr-Thr-N-Me-Val-Ser。该五肽对柑橘致腐菌的抑制效果明显优于正对照,且在培养液中的初始含量为 90 mg/L,达到了工业化生产的水平。【结论】来自于草酸青霉的新型线性五肽具有较强的拮抗柑橘致腐菌的作用,其结构和活性在国内外均属首次报道,未来可作为抑制真菌的抗生素在农业、食品领域进行开发。

关键词:草酸青霉,线型五肽,柑橘,采后致腐菌,拮抗

A novel linear pentapeptide from *Penicillium oxalicum* and its antagonism against postharvest decay mold of citrus

YANG Yu-Chun XIAO Mei LIU Cheng-Xiong CHENG Fan LIU Shi-Ping

XUE Yan-Hong*

College of Life Science and Pharmacy, China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China

Abstract: [Background] Citrus is an important economic crop in rural areas of South China. Due to the influence of the postharvest fungi, a large number of fruits are rotted and deteriorated annually resulting in huge economic losses and seriously affecting the enthusiasm of citrus farmers. [Objective] The filamentous fungus SG-4 exhibited strong antagonism to the postharvest decay mold *Penicillium citrinum* and *Penicillium*

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31540065, 31270389)

*Corresponding author: E-mail: xyh1231977@163.com

Received: 12-04-2019; Accepted: 14-06-2019; Published online: 10-07-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31540065, 31270389)

*通信作者: E-mail: xyh1231977@163.com

收稿日期: 2019-04-12; 接受日期: 2019-06-14; 网络首发日期: 2019-07-10

digitatum. In order to figure out the fungicidal substance, here we performed biological identification and active ingredient analysis. **[Methods]** The internal transcribed spacer (ITS) of strain SG-4 nuclear ribosomal DNA was sequenced to identify the strain together with the morphology. The antifungal activities of the mycelium phase and culture liquid were traced and the main active substance was separated by alcohol precipitation and reverse high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The structure was determined by high resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The antimicrobial activity was evaluated both by Oxford cup method as *in vitro* and by inoculation test of citrus as *in vivo*. The content of the fungicidal substance in fermentation broth was determined by RP-HPLC. **[Results]** Molecular and morphological identification showed that the strain SG-4 was a *Penicillium oxalicum*. The active substance inhibiting postharvest decay mold of citrus in the aqueous extract was highly polar. Further studies showed that the substance was a novel linear alcohol-soluble pentapeptide, which contained three hydroxyl amino acids and was rich in methylation modification. The first amino acid was beta-aminobutyric acid (BABA), and the linear structure was O-Me-BABA-N-Me-Thr-N-Me-Val-Ser. The inhibitory effect to postharvest decay mold is significantly better than the positive control, and the initial content in the culture liquid got to 90 mg/L, reached the level of industrial production. **[Conclusion]** The new linear pentapeptide from *P. oxalicum* showed strong antagonism to citrus decay fungi. Since it is the first time to report both the structure and the activity at home and abroad, the pentapeptide can be developed as an antibiotic to inhibit fungi in agriculture and food industry in the future.

Keywords: *Penicillium oxalicum*, Linear pentapeptide, Citrus, Postharvest decay mold, Antagonism

柑橘是我国南方农村地区的支柱产业之一, 具有重大的经济价值和社会效益。但柑橘在采收后由于霉菌的影响会迅速发生腐烂和变质, 常造成巨大的经济损失和食品安全危机^[1]。这些霉菌主要包括意大利青霉(*Penicillium italicum*)、指状青霉(*Penicillium digitatum*)、橘青霉(*Penicillium citrinum*)等^[2-4]。传统的化学杀菌剂虽然可以抑制上述霉菌的生长并延长柑橘的储藏期, 但由于其本身的毒性正逐渐被市场淘汰, 因此安全高效的生物杀菌剂的筛选引起了人们的广泛关注^[5]。

肽类抗生素为解决这一问题提供了新的选择, 它们结构多样、分子量小、溶解度高、广谱高效、稳定性好且不易引起耐药性, 被广泛应用于医药、食品、农业等领域^[6]。但是, 近年来随着以链霉菌(*Streptomyces*)为代表的丝状细菌发掘新骨架抗生素的难度越来越大, 复筛率越来越高, 因此人们在发现青霉素近 90 年之后, 重新将目光投向丝状真菌(filamentous fungi)的发掘^[7]。

草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)是一种无性型丝状真菌, 广泛分布在土壤、根际、食物及动植物体内^[8]。作为一种重要的植物生防菌, 草酸青霉既可以直接抑制植物病原真菌的生长, 又可激发植物的抗病害能力。据报道, 草酸青霉对油菜菌

核病(*Sclerotinia sclerotiorum*)、黄瓜黑星病(*Cladosporium cucumerinum*)、棉花炭疽病(*Colletotrichum dematium*)、玉米大斑病(*Exserohilum turcicum*)、稻瘟病(*Pyricularia grisea*)、柑橘绿霉病(*Penicillium digitatum*)、小麦赤霉病(*Fusarium graminearum*)等多种植物病原菌具有显著抑制作用^[8-9]。但是, 迄今为止关于其抑制真菌的活性物质或激发子的结构还未见详细报道。

为了筛选合适的抑制柑橘采后致腐菌的物质, 本实验室在分析了三峡地区柑橘的优势采后致腐菌的基础上^[4], 在该地域特异性分布的灌木疏花水柏枝(*Myricaria laxiflora*)中, 筛选到一株对柑橘采后致腐菌具有强拮抗作用的内生真菌 SG-4。本研究对该菌进行了菌株鉴定、活性物质的分离及鉴定, 对于理解柑橘腐烂症状的生防机理、开发新型的肽类抗生素和柑橘的生物保鲜等具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 菌株及培养基

SG-4 菌株: 从三峡地区特异分布的灌木疏花水柏枝(*Myricaria laxiflora*)根部分离得到的内生真

菌, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为: CCTCC M2015270。

橘青霉和指状青霉: 从三峡地区自然腐烂的柑橘果实上分离出两株优势致腐菌, 分别鉴定为橘青霉 (*Penicillium citrinum*), 命名为 PC-1 (GenBank 登录号: MK953483) 和指状青霉 (*Penicillium digitatum*), 命名为 PD-1 (GenBank 登录号: MK976917)。

PDA 培养基(g/L): 新鲜的去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 自然 pH, 0.1 MPa 灭菌 20 min。固体培养基再添加 20.0 g 琼脂。

1.2 主要试剂和仪器

乙腈、甲醇, Tedia 色谱纯试剂; 蔗糖、琼脂, 国产生物试剂; 无水乙醇、丙酮等均为国产或进口试剂; Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; PCR 纯化试剂盒, 宝日医生物技术(北京)有限公司。超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; 低温冷冻高速离心机, 贝克曼库尔特有限公司。

1.3 菌株的分子鉴定

序列测定: 将活化后的 SG-4 菌株接种到 200 mL PDA 液体培养基中, 28 °C、120 r/min 培养 7 d。10 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体进行液氮研磨, 利用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取总 DNA。用真菌 ITS 特异性引物 ITS1 (5'-TCCGT AGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3') 对核 rDNA (nrDNA) 的内转录间隔区进行 PCR 扩增^[10]。PCR 反应体系(20 μL): 模板 DNA 1.0 μL, 正、反向引物(10 pmol/L)各 1.0 μL, dNTP mixture (2.5 mmol/L) 2.0 μL, Taq DNA 聚合酶(2 U/μL) 0.2 μL, 10×Buffer 2.0 μL, ddH₂O 12.8 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 30 s, 72 °C 1 min, 33 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存^[10]。将扩增获得的 DNA 片段用 PCR 纯化试剂盒回收, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 重复 2 次, 然

后在 GenBank 中进行 BLAST 比对分析。

系统发育学分析: 将 ITS 序列在 GenBank 中经 BLAST 检索后, 下载相似性大于 95% 的草酸青霉菌株及其相关种属的菌株 ITS 序列, 用 MEGA 7.0 软件进行比对, 构建 SG-4 菌株的系统发育树。

1.4 SG-4 菌株培养液粗提物的制备

预制备: 将 SG-4 菌株在 PDA 液体培养基培养 7 d 后, 通过真空抽滤将其分为菌体相和发酵液。菌体相用等体积 70% 丙酮溶液浸提 24 h, 重复 3 次后过滤收集滤液, 0.1 MPa 下旋转蒸发进行浓缩后冻干备用; 培养液用等体积乙酸乙酯萃取后, 分别收集水相和酯相旋蒸、浓缩、冻干后检测活性。

批量制备: 通过预制备发现活性物质主要在水相中, 极性很强且溶于乙醇, 将分离方法做以下调整: 在进行真空抽滤后, 弃掉菌丝体, 收集培养液, 加入等体积的无水乙醇进行沉淀去杂, 将余液进行旋蒸、浓缩后冻干备用。

1.5 对柑橘采后致腐菌的抑菌能力测定

为了评价 SG-4 菌株的分离物对柑橘采后致腐菌的抑制能力, 采用牛津杯法测定离体条件下物质对橘青霉 PC-1 和指状青霉 PD-1 生长的影响, 采用柑橘体内接种法来评价其对柑橘致腐的抑制作用。牛津杯法: 分别取生长 3–4 d 的橘青霉和指状青霉, 用无菌水洗下菌苔后过滤掉菌丝体, 显微镜下进行计数后, 稀释成 10⁶ CFU/mL 的孢子悬液备用, 均匀涂布 400 μL 孢子悬液于 PDA 固体平板中, 将无菌的牛津杯竖立于培养基表面, 每个牛津杯中滴入 200 μL 的样品溶液, 28 °C 下培养 4–5 d 后, 观察抑菌效果并测定抑菌圈直径。实验中以市售的柑橘生物保鲜剂百可得(40% 双胍三辛烷基苯磺酸盐)为正对照。

柑橘的体内防治实验: 挑选果形大小一致、无病虫果和机械损伤的鄂柑 2 号柑橘, 洗净后用接种针在果实赤道处刺出直径 3 mm、深 3 mm 的伤口。取生长 3–4 d 的橘青霉 PC-1, 用无菌水洗下菌苔后过滤掉菌丝体, 显微镜下进行计数后, 稀释成 10⁶ CFU/mL 的孢子悬液, 接种 100 μL 于伤口

处, 然后分别用浓度为 1 mg/mL 的水相提取物和正对照百可得保鲜剂涂抹柑橘表面, 在室温自然条件下放置 7 d 后观察抑制效果。

1.6 物质的特征颜色反应

为了分析抑菌活性物质的特点, 明确可能的结构成分, 将粗提物分别进行了肽与氨基酸的特征性颜色反应, 即双缩脲反应和茚三酮反应, 具体方法按照《基础生物化学实验》进行^[11]。

1.7 活性物质的分离、鉴定与含量测定

采用岛津高效液相色谱仪紫外-可见光检测器(SPD-16), YMC-Triart C8 250×4.6 mm、粒径 5 μm 的 C8 色谱柱进行反相高效液相分析。流动相 A 为乙腈, 流动相 B 为纯水, 超声脱气后使用; 检测波长为 210 nm; 进样体积为: 100 μL ; 洗脱梯度为: 10%流动相 A-100%流动相 A 变梯度洗脱; 分析时间为 25-30 min。收集样品中不同出峰时间的部分, 冻干备用, 供抗菌活性分析和结构鉴定使用。

具有抗菌活性的 RP-HPLC 分离物经质谱

(MS)、 ^1H 和 ^{13}C 核磁共振(NMR)等波谱分析确定其成分。采用 Bruker AV 400 核磁共振波谱仪进行核磁共振分析; 高分辨质谱(HR-ESI-MS)委托中山大学分析测试中心完成, 是在快速原子轰击模式下使用 VG AUTO Spec-300 质谱仪进行测定。

利用高效液相色谱测定不同浓度样品液, 建立目标物峰面积(Y)和样液浓度(X)之间的函数关系, 测定原始菌株中抗菌活性物质的含量。

2 结果与分析

2.1 SG-4 菌株的鉴定

SG-4 菌株分离自三峡河岸带植物疏花水柏枝根部, 菌落在 PDA 培养基上生长较快, 呈蓝绿色绒毛状, 近圆形、扁平, 边缘整齐泛白(图 1A、B); 基质颜色和发酵液均为暗黄色(图 1B、C); 菌丝有分枝有隔, 菌丝体先呈白色, 后逐渐形成灰绿色, 孢子呈椭圆形(图 1D-F); 上述形态和《真菌鉴定手册》^[12]中描述的草酸青霉形态特征一致。

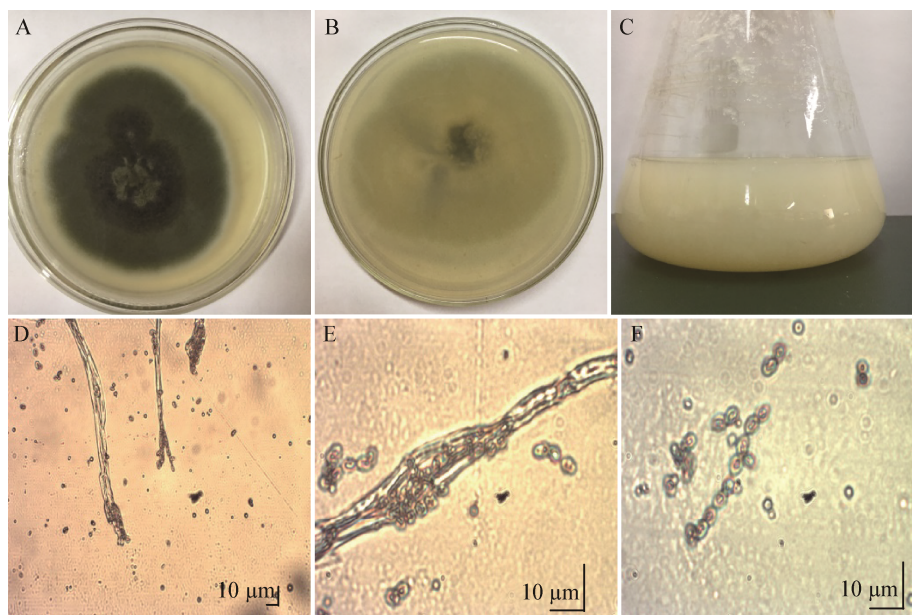


图 1 SG-4 菌株的形态特征

Figure 1 Morphological characterization of strain SG-4

注: A: 菌落形态; B: 背面形态; C: SG-4 菌株培养液; D: 菌丝体(40×); E: 分生孢子梗(100×); F: 分生孢子(100×).

Note: A: Morphology of colony; B: Back of the dish; C: Culture of strain SG-4; D: Morphology of hyphae (40×); E: Morphology of conidiophore (100×); F: Morphology of conidia (100×).

SG-4 菌株基于 18S rDNA-ITS 测序列(GenBank 登录号: MK450299.1)构建的系统发育树(图 2)显示, 该菌与分离自韩国淡水环境中的草酸青霉 W357^[13](GenBank 登录号: MH567091.1)的一致性达到 100%, 说明 SG-4 是一株草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。

2.2 SG-4 培养液对柑橘采后致腐菌的抑制作用

为了分析 SG-4 菌株对柑橘采后致腐菌的抑制效果, 将菌株在 PDA 液体培养基进行摇瓶发酵后, 分别收集菌体相、培养液酯相和水相粗提

物, 配制成浓度为 1 mg/mL 样品液备用。采用牛津杯抑菌圈法分别分析其对柑橘采后致腐指状青霉和橘青霉的离体抑制效应。实验结果表明, SG-4 菌株的菌体相和培养液酯相提取物对导致柑橘腐烂的指状青霉和橘青霉没有明显的抑制活性(结果未显示), 可培养液的水相提取物却有极强的抑制能力(图 3), 对指状青霉(图 3A、B)、橘青霉(图 3C、D)的抑菌圈直径分别为 37.2 ± 1.3 mm 和 36.0 ± 2.8 mm, 分别达到正对照杀菌剂百可得的 85%和 82%。

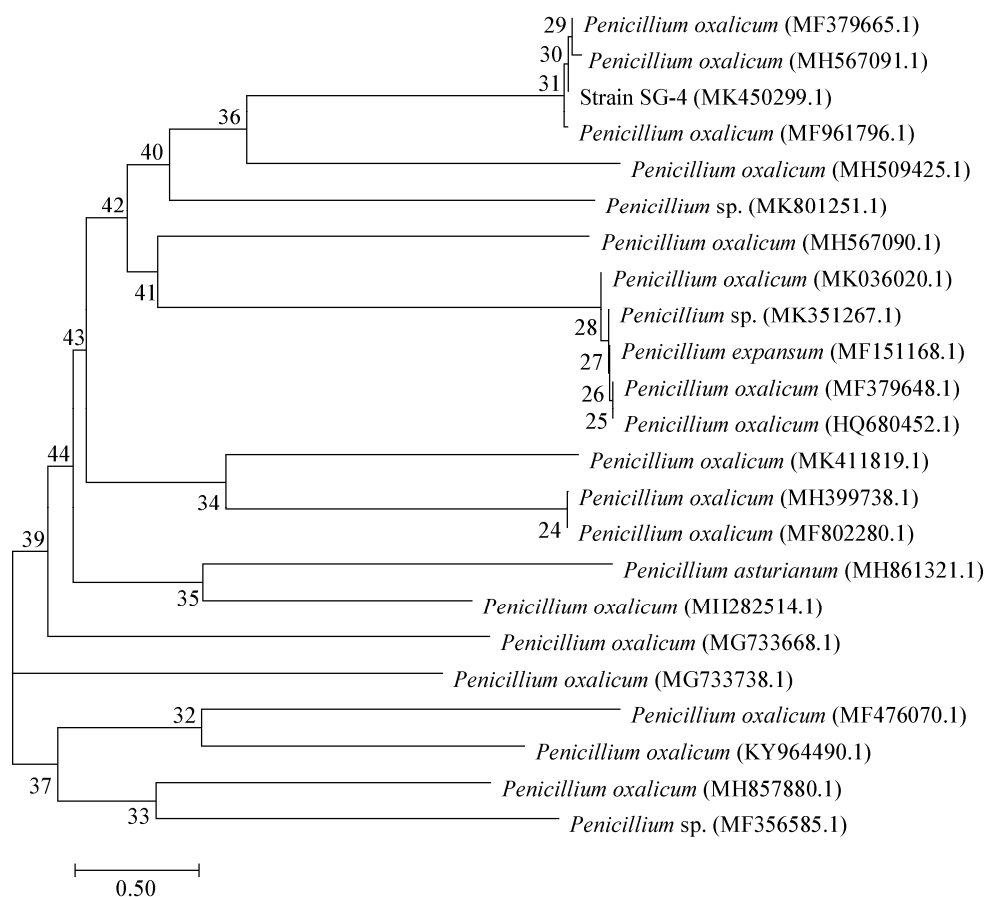


图 2 SG-4 菌株基于 18S rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain SG-4 based on 18S rDNA-ITS sequence

注: 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中; 分支处标注有自展值; 标尺所示长度为 0.5 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets; The bootstrap values are shown at the node; Bar 0.5 means the nucleotide substitution rate of 0.5.

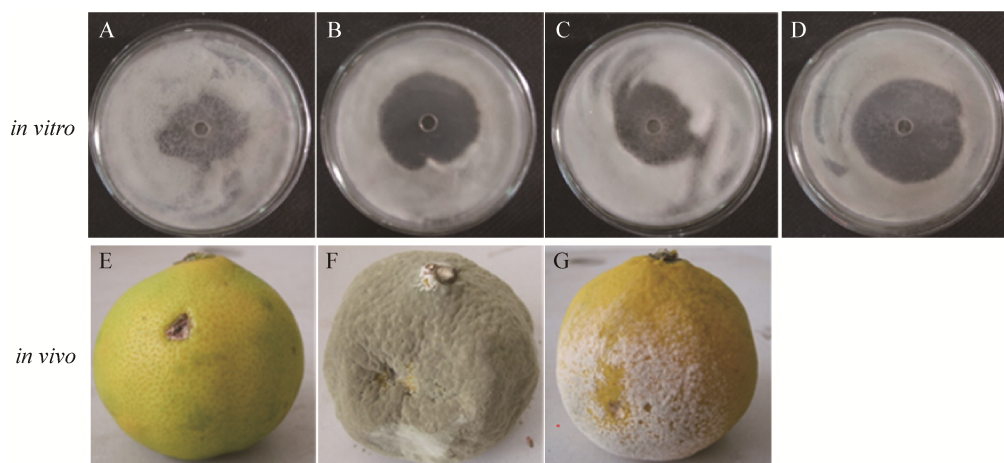


图3 SG-4菌株的水相提取物对柑橘采后致腐菌的离体和体内抑制作用

Figure 3 Inhibitions on postharvest decay fungi of citrus *in vitro* and *in vivo* by the aqueous extracts of strain SG-4

注：A、B：水相提取物(A)和正对照百可得(B)对指状青霉 PD-1 的抑制作用；C、D：水相提取物(C)和百可得(D)对橘青霉 PC-1 的抑制作用；E：接种橘青霉当天；F：接种+清水涂抹 7 d 后；G：接种+水相提取物涂抹 7 d 后。

Note: A, B: Inhibition on *P. digitatum* PD-1 by the aqueous extracts (A) and Bellkute (B); C, D: Inhibition on *P. citrinum* PC-1 by the aqueous extracts (C) and Bellkute (D); E: The same day inoculating *P. citrinum* PC-1; F: 7 d after inoculation and spread over the surface with water; G: 7 d after inoculation and treatment with the aqueous extracts.

在明确 SG-4 菌株的水相提取物可在离体条件下抑制柑橘致腐菌之后，分析了其对柑橘体内致腐菌的抑菌效果。鉴于 SG-4 菌株的提取物对指状青霉和橘青霉的抑菌效果比较相似，在后续实验中选择橘青霉 PC-1 作为指示菌。柑橘果实在接种橘青霉 7 d 后，全果变软，表皮上布满灰绿色霉层，果皮变为褐色，果实皱缩腐烂(图 3E、F)。可是在涂抹了 SG-4 菌株水相提取物的柑橘中，接种橘青霉 7 d 后仅在伤口周围形成少许白色菌体(图 3G)，说明 SG-4 菌株水相提取物能有效抑制柑橘体内采后致腐菌的生长。

2.3 活性物质的初步分离与性质分析

为了方便抑菌活性物质的分离制备，探索合适的分离方法，先将 SG-4 菌株的水相提取物经过大孔树脂浸泡，然后用不同浓度梯度的乙醇进行洗脱，以橘青霉 PC-1 作为指示菌对收集的产物进行抑菌活性分析。结果发现，纯水或者是低浓度乙醇洗脱条件下，分离物的抗菌活性更高，这充分说明 SG-4 菌株中抑制真菌的活性物质极性高，水溶性良好。由于在培养液中极性强的物质可能

是多糖或多肽类成分，于是对纯水洗脱物分别进行了双缩脲和茚三酮的颜色反应。结果发现，该物质的双缩脲反应呈阳性，说明活性物质中含有肽键(图 4A)；而茚三酮显色呈阴性反应，说明活性物质中 α -氨基与 α -羧基没有同时出现(图 4B)，因此推测 SG-4 菌株中抑制真菌的活性物质为一种环肽或者是 α -氨基或 α -羧基缺失的线性肽。

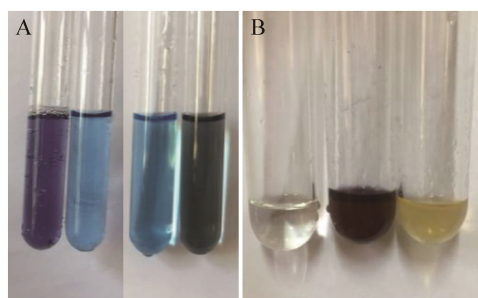


图4 呈色反应

Figure 4 The color reaction

注：A：双缩脲反应，从左到右分别是卵清蛋白、水的比较和水、水洗脱物的比较；B：茚三酮反应，从左到右分别是水、半胱氨酸、水洗脱物。

Note: A: Biuret reaction, ovalbumin, water and water eluents are arranged from left to right; B: Ninhydrin reaction, they are water, cysteine and water eluents, respectively.

2.4 活性物质的分离纯化

根据活性物质的性质, 采用体积比为 1:1 的乙醇来沉淀培养液, 将上清液和沉淀物分别浓缩冻干, 以期获得活性肽的沉淀物。抑制橘青霉的实验结果发现, 在醇沉淀后活性物质主要位于上清液中(图 5A-D), 说明 SG-4 菌株的活性物质具有醇溶性。于是在后期重新调整分离方法, 去掉乙酸乙酯萃取的繁琐步骤, 直接用乙醇将培养液沉淀纯化。

将上清液冻干物溶解后, 用 C8 分析柱进行 RP-HPLC, 收集不同出峰时间的样品, 冻干后进行抑菌活性追踪, 结果发现在 6-7 min 之间出现一个能抑制橘青霉生长的主效物质峰(图 5F、G), 在浓度为 1 mg/mL 时其活性优于正对照百可得(图 5E), 即使稀释 1 000 倍在浓度 1 μ g/mL 时还存在明显的抑菌作用(图 5F)。根据 RP-HPLC 的峰面积和样品浓度的关系, 计算出主效物质在 SG-4 菌株培养液中的含量为 90 mg/L。

2.5 活性物质的结构鉴定

分离纯化的物质呈浅黄色粉末状(图 6A), 经过核磁分析及高分辨质谱分析, 结果为: HR-ESI-MS (negative): m/z 548.2931 $[M-1]^-$ ($C_{23}H_{42}N_5O_{10}$, 计算值: 548.293 2)结合核磁数据得到其平面结构为线性 5 肽。 ^{13}C NMR (in DMSO- d_6 100 MHz)中显示有 23 个碳信号, 包括 4 个肽键信号和 5 套氨基酸数据, 物质结构中富含具羟基的氨基酸; 第一套氨基酸信号 δ 35.1 (C-8), 55.2 (C-10) 和 61.8 (C-14)根据数据库查询确定为丝氨酸(Ser); 第二套氨基酸信号 δ 18.9 (C-2), 19.8 (C-4), 26.4 (C-6), 30.9 (C-7), 61.5 (C-13)和 171.1 (C-21), 确定为缬氨酸(Val), 且其成肽键的氮原子发生了甲基化; 第三套氨基酸信号 δ 19.7 (C-3), 57.8 (C-12), 67.1 (C-15)和 171.6 (C-22), 确定为苏氨酸(Thr); 第四套氨基酸信号 δ 19.9 (C-5), 54.9 (C-9), 67.2 (C-16), 169.6 (C-19)和 172.3 (C-23), 确定为苏氨酸(Thr), 其构成肽键的

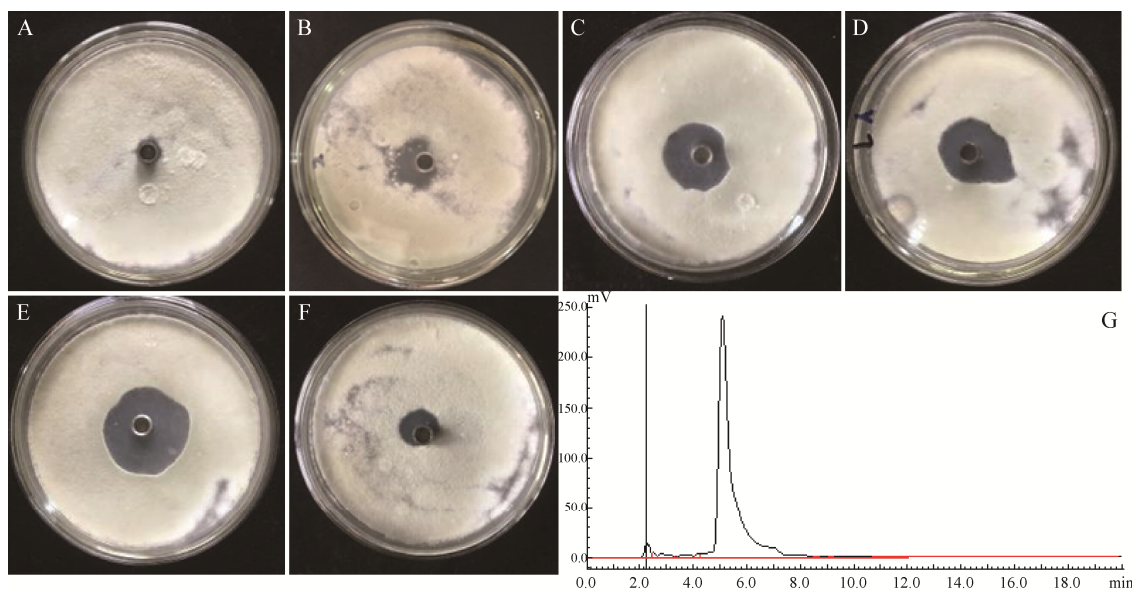


图 5 抑制橘青霉活性物质的分离与追踪

Figure 5 Separation and tracking of active substances inhibiting *P. citrinum*

注: A-F: 乙醇沉淀后不同部位及单体的抑菌效果. A: 水; B: 沉淀物; C: 正对照百可得; D: 上清液; E: 1 mg/mL 的活性物质; F: 1 μ g/mL 的活性物质; G: 活性部位的 RP-HPLC 分析.

Note: A-F: Antifungal effects of ethanol precipitation parts and the main substance. A: Water; B: Precipitates; C: Bellkute as a positive control; D: Supernatant extracts; E: Active substance at 1 mg/mL; F: Active substance at 1 μ g/mL; G: RP-HPLC analysis of active components.

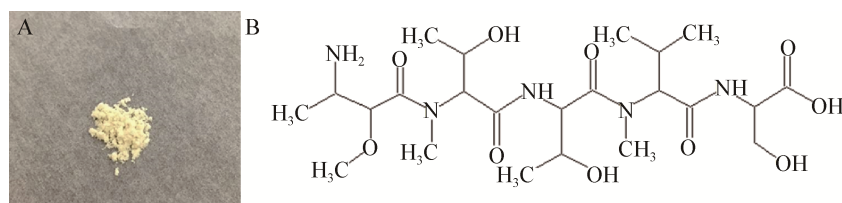


图6 活性物质的结构鉴定

Figure 6 Structural identification of the active substance

注: A: 活性物质形态; B: 物质的结构.

Note: A: Appearance of the active substance; B: Structure of the substance.

碳原子也发生了甲基化; 剩下的信号 δ 16.1 (C-1), 56.5 (C-11), 68.9 (C-17), 77.4 (C-18) 和 170.2 (C-20), 确定为 β -氨基丁酸(BABA), 且其 α -碳原子连接着一个甲氧基。以上数据表明, 该物质结构式为: O-Me-BABA-N-Me-Thr-Thr-N-Me-Val-Ser, 分子式 $C_{23}H_{43}N_5O_{10}$ (图 6B), 因为缺乏 α -氨基, 因此不与茚三酮显色。经检索, 该化合物的结构和活性在世界范围内属首次报道。

3 讨论与结论

本研究首次报道了三峡河岸带的内生菌 SG-4 对柑橘致腐菌的抑制作用。经形态观察和序列分析, SG-4 是一株草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)。但在构建进化树的过程中发现, 其与扩展青霉(*Penicillium expansum*) 和 简青霉 (*Penicillium asturianum*) 的亲缘关系较近, 但是在形态上有明显的区别: 与扩展青霉相比较, 草酸青霉菌落背面颜色偏黄, 菌丝体大多为灰绿色, 而扩展青霉菌落表面更平坦光滑; 与简青霉相比较, 最大的差别在于草酸青霉菌丝有隔, 而简青霉的菌丝却没有。

草酸青霉广泛分布在土壤、根际、食物及动植物体内, 除了作为生防菌, 它还可以导致玉米、谷物等多种贮粮发生霉变, 产生对人体有害的真菌毒素黑麦酮酸^[14], 因此存在安全隐患, 有必要对其活性物质进行解析。

虽然草酸青霉作为生防菌具有多年的历史^[9], 但关于其抑制植物病原真菌的机理还缺乏系统报道。本研究在 SG-4 的培养液中分离到一种线性醇溶五肽, 经过高分辨质谱(HR-ESI-MS)和一维

NMR、二维 NMR (包括 1H - 1H COSY、HSQC、HMBC、NOESY)波谱数据分析, 确定其结构为 O-Me-BABA-N-Me-Thr-Thr-N-Me-Val-Ser。活性实验研究表明, 在离体条件柑橘体内, 该寡肽对柑橘致腐菌株中的橘青霉和指状青霉有极强的抑制能力, 同等浓度下优于正对照化学杀菌剂百可得。组成该五肽的第一个氨基酸是甲氧基化的 β -氨基丁酸(BABA), 通过检索数据库, 我们发现 α -氨基丁酸(Abu)、 α -氨基异丁酸(Aib)和 γ -氨基丁酸(GABA)是几种常见的参与寡肽合成的氨基酸; 可是 BABA 参与寡肽的报道很少^[14]。大量文献研究表明, BABA 是一种提高抗真菌病害能力的激发子^[15], 在高浓度时有直接的抑菌能力^[16], 因此我们推测该线性五肽是草酸青霉作为植物生防菌的物质基础。

由于构成该线性五肽的两个肽键均发生了甲基化, 意味着此物质结构可能相对稳定^[17]。同时 Thr-Thr-Val-Ser 的肽段是大麦醇溶蛋白的高度重复序列^[18], 因此推测多羟基氨基酸的存在是导致该抗菌五肽具醇溶性的原因之一, 但由于大部分功能肽不溶于乙醇, 研究者往往把注意力集中在醇沉淀部位中, 这可能造成该物质在分离提取中容易被忽略^[19]。本研究采用预制备和批量制备的方法, 在明确活性物质的极性和醇溶性之后对分离方法进行了及时调整, 对于其他醇溶寡肽的研究有一定的借鉴意义。

由于草酸青霉 SG-4 的活性五肽抑制真菌的能力强, 培养液中的含量达到 90 mg/L, 而且提取工艺简单, 成本较低廉, 未来可进一步开发为柑橘保鲜剂或农用抗生素等。在后期的研究中, 还需明确

活性五肽的空间结构, 解析氨基酸的绝对构型及手性碳原子的空间排布; 进行发酵工艺优化, 进一步提高物质的产量; 分析其抑菌范围, 探索其抑菌机理; 探讨其结构稳定性, 明确活性肽对高温、酶碱度和有机溶剂的耐受范围; 分析该物质的安全性及对水果或其他农产品品质的影响; 评价活性五肽的构效关系, 明确 BABA 和其他修饰物在抑菌中起的作用; 对非核糖体多肽合成酶开展研究, 解析物质的生物合成途径等。

REFERENCES

- [1] Zhao Y, Liang KL, Jia JC, et al. Fungal community diversity in citrus fruit at different ripening stage[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2017, 47(3): 389-397 (in Chinese)
赵莹, 梁克力, 贾纪春, 等. 不同时期的柑橘果实中真菌种类分析[J]. *植物病理学报*, 2017, 47(3): 389-397
- [2] Xie SH, Shao XF, Wang K, et al. Isolation and identification of dominant pathogen on citrus fruit and the antifungal effect of clove oil on these fungi[J]. *Journal of Fruit Science*, 2013, 30(1): 134-139 (in Chinese)
解淑慧, 邵兴锋, 王可, 等. 柑橘采后腐烂主要致病菌的分离鉴定及丁香精油对其抑制作用研究[J]. *果树学报*, 2013, 30(1): 134-139
- [3] Min XF. Study on separation, identification and biological characteristics of *Penicillium* spp. causing diseases of citrus[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese)
闵晓芳. 柑橘采后致病青霉的分离鉴定及其生物学特性研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2007
- [4] Kong YS, Qin TM, Xue YH, et al. Antimicrobial effect of endophytes from *Myricaria laxiflora* on the fungus causing citrus rot in Three Gorges area[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(8): 175-177 (in Chinese)
孔玉珊, 秦田明, 薛艳红, 等. 疏花水柏枝内生真菌对三峡地区柑橘致腐菌的拮抗作用研究[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(8): 175-177
- [5] Song YY, He LM, Chen LL, et al. Baseline sensitivity and control efficacy of antibiosis fungicide tetramycin against *Botrytis cinerea*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2016, 146(2): 337-347
- [6] Smits THM, Duffy B, Blom J, et al. Pantocin A, a peptide-derived antibiotic involved in biological control by plant-associated *Pantoea* species[J]. *Archives of Microbiology*, 2019. DOI: 10.1007/s00203-019-01647-7
- [7] Pan YY, Liu G. Research advances on molecular regulation of filamentous fungal secondary metabolism in China[J]. *Hereditas (Beijing)*, 2018, 40(10): 874-887 (in Chinese)
潘园园, 刘钢. 中国丝状真菌次级代谢分子调控研究进展[J]. *遗传*, 2018, 40(10): 874-887
- [8] Yang LP, Xie JT, Jiang DH, et al. Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1—potential antibiotics against plant pathogenic fungi[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24(7): 909-915
- [9] Larena I, Sabuquillo P, Melgarejo P, et al. Biocontrol of fusarium and verticillium wilt of tomato by *Penicillium oxalicum* under greenhouse and field conditions[J]. *Journal of Phytopathology*, 2003, 151(9): 507-512
- [10] Wäli PR, Ahlholm JU, Helander M, et al. Occurrence and genetic structure of the systemic grass endophyte *Epichloë festucae* in fine fescue populations[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 53(1): 20-29
- [11] Bai L, Huang J. Basic Biochemistry Experiment[M]. Shanghai: Fudan University Press, 2004 (in Chinese)
白玲, 黄健. 基础生物化学实验[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2004
- [12] Wei JC. Fungi Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 90-121 (in Chinese)
魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 90-121
- [13] Heo I, Hong K, Yang H, et al. Diversity of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Talaromyces* species isolated from freshwater environments in Korea[J]. *Mycobiology*, 2019, 47(1): 12-19
- [14] Tanaka M, Oba M, Ichiki T, et al. Solid-state conformation of a hybrid tripeptide between β -amino acid; 8-aminocyclooct-4-enecarboxylic acid and 2-aminoisobutyric acid[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2001, 49(9): 1178-1181
- [15] Cohen YR. β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens[J]. *Plant Disease*, 2002, 86(5): 448-457
- [16] Liao YX, Fei LH, Xia MX, et al. Different modes of disease resistance response induced by β -aminobutyric acid at different concentrations in grape berries[J]. *Food Science*, 2018, 39(17): 221-228 (in Chinese)
廖云霞, 费良航, 夏明星, 等. 不同浓度 β -氨基丁酸处理对葡萄果实抗病性的诱导模式[J]. *食品科学*, 2018, 39(17): 221-228
- [17] van der Velden NS, Kälén N, Helf MJ, et al. Autocatalytic backbone N-methylation in a family of ribosomal peptide natural products[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(8): 833-835
- [18] Schmitt JM, Svendsen IB. Amino acid sequences of hordein polypeptides[J]. *Carlsberg Research Communications*, 1980, 45(2): 143-148
- [19] Yang LP. Identification of antagonistic fungus strain PY-1 and evaluation of suppression of *Sclerotinia sclerotiorum*[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2007 (in Chinese)
杨丽萍. 拮抗菌 PY-1 菌株的鉴定及对油菜菌核病防治潜能的评估[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2007