

研究报告

贝莱斯芽孢杆菌 6W1 挥发性有机物对禾谷镰刀菌的抑菌抑毒作用

周萍^{1,2}, 王赤恒³, 仇剑波^{1,2}, 高弢^{*2}

1 江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013

2 江苏省食品质量安全重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地 农业农村部农产品质量安全控制技术
与标准重点实验室 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014

3 新乡医学院 三全学院, 河南 新乡 453000

周萍, 王赤恒, 仇剑波, 高弢. 贝莱斯芽孢杆菌 6W1 挥发性有机物对禾谷镰刀菌的抑菌抑毒作用[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3484-3496.

ZHOU Ping, WANG Chiheng, QIU Jianbo, GAO Tao. Volatile organic compounds of *Bacillus velezensis* 6W1 inhibit the growth and toxin production of *Fusarium graminearum*[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3484-3496.

摘要: 【背景】由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)复合种引起的小麦赤霉病和镰刀菌毒素污染严重影响小麦的产量和质量, 生防菌产生的挥发性有机物(volatile organic compound, VOC)可作为植物病害生物防治因子。【目的】为生防菌株在病害生物防治上的更深层次应用提供理论依据。

【方法】对前期分离得到的拮抗菌贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) 6W1 产生的 VOC 进行抑菌作用测定和组分分析, 利用二分格平皿研究其对菌丝生长的影响, 利用培养皿对扣熏蒸法研究对孢子萌发及脱氧雪腐镰刀烯醇(deoxynivalenol, DON)毒素产生的影响, 再利用气相色谱-离子迁移谱(gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS)技术对该菌株的体外挥发性抑菌物质进行定性分析。【结果】菌株产生的 VOC 能够显著抑制禾谷镰刀菌丝的生长及 DON 毒素的产生, 但不影响孢子的萌发。GC-IMS 分析结果显示, 菌株所产的 VOC 种类主要包括酯类、醇类、醛类、烯类和酮类。选取各物质的纯品进行体外抑菌控毒研究, 结果表明这几种物质对禾谷镰刀菌的生长和 DON 毒素的产生都能有较强的抑制作用。【结论】菌株 6W1 能够产生具有抑菌控毒活性的 VOC, 这种微生物资源在开发为生防产品方面具有巨大的潜力, 其 VOC 在植物病害防治等方面也具有较高的研究和应用价值。

关键词: 禾谷镰刀菌; 贝莱斯芽孢杆菌; VOC; 拮抗作用

资助项目: 农业农村部农产品质量安全风险评估项目(GJFP20230102); 江苏省农业自主创新项目[CX(23)1002]

This work was supported by the Safety Risk Assessment of Agricultural Product Quality by Ministry of Agriculture and Rural Affairs (GJFP20230102) and the Agricultural Independent Innovation Program of Jiangsu Province [CX(23)1002].

*Corresponding author. E-mail: gaotao8806@jaas.ac.cn

Received: 2024-01-08; Accepted: 2024-03-01; Published online: 2024-04-28

Volatile organic compounds of *Bacillus velezensis* 6W1 inhibit the growth and toxin production of *Fusarium graminearum*

ZHOU Ping^{1,2}, WANG Chiheng³, QIU Jianbo^{1,2}, GAO Tao^{*2}

1 School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

2 Jiangsu Key Laboratory for Food Quality and Safety-State Key Laboratory Cultivation Base, Ministry of Science and Technology, Key Laboratory for Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu, China

3 Sanquan College of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453000, Henan, China

Abstract: [Background] Wheat scab and *Fusarium* toxin pollution caused by *Fusarium graminearum* complex seriously affect the yield and quality of wheat. Volatile organic compounds (VOC) produced by biocontrol strains can be used for the biocontrol of plant diseases. [Objective] To provide a theoretical basis for the full application of biocontrol strains. [Methods] We collected VOC from *Bacillus velezensis* 6W1, an antagonistic strain isolated in the previous study. The two-tier culture dish was employed to study the effects of VOC on the mycelial growth of *F. graminearum*. The plate confrontation-fumigation assay was employed to examine the effects of VOC on the spore germination and deoxynivalenol (DON) production of *F. graminearum*. The components of VOC were qualitatively analyzed by gas chromatography-ion mobility spectrometry (GC-IMS). [Results] The VOC produced by *B. velezensis* 6W1 inhibited the growth and DON production but had no effect on the spore germination of *F. graminearum*. The results of GC-IMS showed that the VOC produced by the strain mainly included esters, alcohols, aldehydes, alkenes, and ketones. The inhibitory effect of the standard substance of each component was tested. The results showed that these substances inhibited the growth and DON production of *F. graminearum*. [Conclusion] In summary, *B. velezensis* 6W1 can produce VOC capable of inhibiting the growth and toxin production of *F. graminearum*. This strain demonstrates great potential in the development of biocontrol products, and its VOC also have high research and application values in the prevention and control of plant diseases.

Keywords: *Fusarium graminearum*; *Bacillus velezensis*; volatile organic compounds; antagonistic effect

禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)为主要的多种镰刀菌侵染小麦会引发小麦赤霉病(*Fusarium head blight*, FHB), 导致小麦产量和品质下降^[1]。在我国, 小麦赤霉病的发病率逐渐上升, 这主要受气候等多因素的影响。在中国长江

中下游和江淮地区, 小麦赤霉病的发病情况尤为严重, 有时发病面积甚至超过了种植区域的25%, 带来了巨大的经济损失^[2]。镰刀菌在侵染小麦过程中, 会产生多种有毒次生代谢产物, 如脱氧雪腐镰刀烯醇(deoxynivalenol, DON)、玉米

赤霉烯酮(zearalenone, ZEN)和雪腐镰刀烯醇(nivalenol, NIV)等。这些生物毒素会直接残留和积累在小麦籽粒中,对人畜健康构成了严重威胁^[3],其中 DON 毒素污染范围最大、污染情况最严重。在生产实践中,使用化学药剂进行防控是控制该病害和镰刀菌毒素产生的一种最有效的方法^[4]。然而,在长期使用化学农药中,不仅对环境生态健康产生重大威胁,还可能导致田间的禾谷镰刀菌产生抗药性,同时促进病原菌毒素的合成和积累,进一步加重了镰刀菌毒素的污染问题^[5]。因此,研究面向禾谷镰刀菌的生物防治方法对于确保小麦的质量安全具有重要意义^[6]。这不仅可以确保小麦的质量安全,还可以减少对环境的负面影响,促进农业可持续发展。

在防治植物真菌病害方面,利用植物共生微生物及产生的代谢产物进行防治具有优良的防治效果和极大的发展潜力^[7]。通过拮抗微生物抑制病害是植物体、病原菌和生防菌株共同作用的结果,其中还包括了植物及其他生物所生存的自然环境,这些因素最终使得植物对病原真菌的耐受性增强,改善植物病害。同时,使用生物防治相较化学手段有效减轻了对环境的影响,因此在农业中有广阔的应用前景^[8]。目前,细菌、真菌等多个种属是主要用来防治小麦赤霉病的生防菌种类,细菌主要为芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)、假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)、放线菌(*Actinomycetes* sp.)等,真菌主要为粉红粘帚霉(*Gliocladium roseum*)和球孢子菌(*Coccidioides* spp.)等^[9],这些生防菌主要是可以产生能够抑制病原菌生长及其代谢产物活性的微生物拮抗物质。近年来,生防菌产生的挥发性有机物(volatile organic compound, VOC)已逐渐成为关注的重点,研究发现大部分拮抗细菌可以产生多种挥发性物质,并且能够抑制病原菌生长和繁殖,在防效试验中也有较好效果,可以减少病害的发生以

及病害造成的经济损失^[10]。Rybakova 等^[11]认为,拮抗菌产生的挥发性抑菌物质才是抑制病原菌的主要原因,这些 VOC 不仅具有拮抗作用,也可以作为一种化学信号分子作用于病原菌,或者促进植物的生长和发育,激活植物的防御机制,增强植物对病原菌的抵抗能力。因此,生防菌产生的 VOC 是一种具有广泛应用前景的生物防治手段。

VOC 通常以自由扩散的形式分布在大气和土壤中,具有分子质量小的特点^[12]。VOC 在植物-细菌相互作用中起着重要作用,VOC 能有效抑制病原菌的生长、促进植物生长并提高作物的产量^[13]。VOC 主要是细菌和真菌产生,目前发现的种类大约有 1 000 种^[14]。细菌和真菌产生的 VOC 具有一定差异,细菌主要产生醇、酸、烯烃、酮、酯等,而真菌主要产生醛、醇、酸、烯烃及芳香族化合物等^[15]。这些化合物在微生物的代谢过程中被释放出来,对植物健康和土壤生态系统发挥着重要作用。微生物产生的 VOC 与自身的生长调节有着密切关系,因此,通过人为干预微生物生长条件,可以得到人类所需的有益挥发性代谢产物^[16]。其中,对微生物生产 VOC 影响较大的因素主要包括培养基成分、营养条件、温度、溶氧量、水分和 pH 等^[17]。研究表明,VOC 是碳基固体和液体,在 20 °C 和 0.01 kPa 条件下可快速挥发成气体,具有良好的细胞膜穿透性,能够快速扩散到空气中及渗透到土壤充满空气的孔隙中,从而提高对靶标微生物的抑制作用^[18]。目前在拮抗菌领域,芽孢杆菌属细菌具有广泛的应用前景,其产生的挥发性物质正逐步成为生防领域研究热点。20 世纪 90 年代,Fiddaman 等^[19]研究表明培养基对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)分泌抗真菌挥发性物质过程中的重要性,添加 D-葡萄糖、复合碳水化合物和蛋白胨增强了营养琼脂上的体外抗真菌挥发物活

性,这证实了微生物的生长条件会影响其挥发性物质。

近年来,Gotor-Vila 等^[20]研究了解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) CPA-8 挥发性物质对甜樱桃果实采后 *Monilinia laxa*、*M. fructicola* 及 *Botrytis cinera* 这 3 种病原菌的抑制作用,探究其在果实病害防治中的应用。微生物 VOC 是一种有效的工具,可用于对不同作物上由真菌引起的疾病进行生物防治,为农业和环境中的农药和化肥提供了可持续和生态友好的替代品。本课题组前期分离的贝莱斯芽孢杆菌菌株 6W1 对禾谷镰刀菌具有较好的拮抗活性^[21],当菌株 6W1 和禾谷镰刀菌在不接触的情况下共培养时,也能够抑制禾谷镰刀菌的生长,推测菌株 6W1 可以产生具有拮抗活性的 VOC。本研究旨在深入分析菌株 6W1 挥发性物质对禾谷镰刀菌的菌丝生长、分生孢子萌发及 DON 毒素产生的抑制作用,并且利用气相色谱-离子迁移谱(gas chromatography-ion mobility spectrometry, GC-IMS)明确其主要挥发性成分,为该菌株在植物病害生物防治上的更深层次应用提供理论依据,尤其是利用其产生的 VOC 进行生物防治。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 样品

禾谷镰刀菌(*F. graminearum*) PH-1 和贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) 6W1 均由江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所保存。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 琼脂 20.0, 葡萄糖 20.0; 酵母提取物蛋白胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YEPD)培养基

(g/L): 葡萄糖 20.0, 酵母粉 3.0, 胰蛋白胨 10.0; 单端孢霉烯生物合成诱导(trichothecene biosynthesis induction, TBI)培养基(g/L): 蔗糖 30.00, KH_2PO_4 1.00, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50, KCl 0.50, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, trace elements 200.00, 腐胺 0.80; TBI trace elements (g/mL): $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.20, H_3BO_3 1.10, $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.50, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.16, $\text{CoCl}_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.16, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.16, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.11, Na_4EDTA 5.00。

1.1.3 主要试剂和仪器

TRIzol®试剂,南京希宝生物科技有限公司; TaKaRa 反转录试剂盒和 2×TB Green Premix Ex Taq II, 宝日医生物技术(北京)有限公司。二分格培养皿,比克曼生物科技有限公司; 血球计数板,江苏汇达医疗器械有限公司。光学显微镜,南京翼飞科技有限公司; HPLC-MS/MS, AB SCIEX 公司; 实时荧光定量 PCR 仪,罗氏控股股份有限公司; 气相色谱-离子迁移谱联用仪(GC-IMS), GAS 公司。

1.2 菌株 6W1 挥发性有机物对禾谷镰刀菌菌丝生长的抑制作用

利用二分格培养皿测定菌株 6W1 产生的 VOC 对禾谷镰刀菌菌丝生长的抑制作用。在其中一格中倒入 LB 培养基;另一格中倒入 PDA 培养基。将菌株 6W1 单菌落接种于 20 mL 的 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养 24 h,取 100 μL 菌液($OD_{600}=2.0$)接种至 LB 培养基上,用灭菌的涂布棒涂布均匀,37 °C 恒温培养 24 h。对照组为不接菌的 LB 培养基。取禾谷镰刀菌标准菌株 PH-1 菌碟置于 PDA 培养基边缘,用封口膜密封,25 °C 恒温培养,3 d 后测量菌落半径,计算抑制率,每处理 4 个重复。

抑制率(%)=

$$\frac{\text{对照菌落半径(cm)} - \text{处理菌落半径(cm)}}{\text{对照菌落半径(cm)}} \times 100 \quad (1)$$

1.3 菌株 6W1 挥发性有机物对禾谷镰刀菌分生孢子萌发的抑制作用

利用平板对扣法测定菌株 6W1 产生的挥发性有机物对禾谷镰刀菌孢子萌发的影响。菌株 6W1 生长条件与 1.2 一致,将禾谷镰刀菌分生孢子接种到 30 mL YEPD 培养基中,孢子终浓度为 1×10^5 个/mL,将涂布培养 24 h 的菌株 6W1 培养皿扣在含有已接种分生孢子的 YEPD 培养基的培养皿上,以不加菌的 LB 固体培养基为对照,封口膜密封,25 °C 恒温培养,在培养 4、8、12 h 后取 1 μ L 孢子液至血球计数板,于普通光学显微镜下计量孢子总数及萌发孢子数,计算孢子萌发率。

$$\text{孢子萌发率(\%)} = \frac{\text{萌发孢子数(个)}}{\text{孢子总数(个)}} \times 100 \quad (2)$$

1.4 菌株 6W1 挥发性有机物对 DON 毒素产生的影响

将禾谷镰刀菌 PH-1 分生孢子接种到 30 mL TBI 培养基中,孢子终浓度为 1×10^5 个/mL,将涂布培养 24 h 的菌株 6W1 培养皿扣在含有已接种分生孢子的 TBI 培养基的培养皿上,以不加菌的 LB 固体培养基为对照,封口膜密封,每个处理 3 个重复,25 °C 避光环境下培养 7 d,用于产生 DON 毒素,7 d 后用双层纱布过滤,分别收集滤液和菌丝,液氮速冻后进行冷冻干燥,称重菌丝,用 1 mL 甲醇复溶滤液,将滤液过 0.22 μ m 有机相滤膜后用 HPLC-MS/MS 测定样品中 DON 毒素的含量,计算单位菌丝的毒素产生能力^[22]。

使用 TRIzol® 试剂提取冻干后的菌丝总 RNA 并利用 DNA 酶去除基因组 DNA,随后利用 TaKaRa 反转录试剂盒将其反转成 cDNA。实时荧光定量 PCR 在 Roche Molecular Systems 上完成,引物参照表 1。反应体系:2 \times TB Green

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
<i>Tri5F</i>	GAGTGTTTCATGCATGGCTACGTC
<i>Tri5R</i>	CTGAGCCTCCTCACATCGTCC
<i>Tri6F</i>	TATCGAAAATTATATAACCACATC
<i>Tri6R</i>	CTGAGGGCATTCTGAGTAGCGACA
<i>GADPH-F</i>	CTTACTGCCTCCACCAACTG
<i>GADPH-R</i>	TGACGTTGGAAGGAGCGAAG

Premix *Ex Taq* II 10 μ L, 正、反向引物(10 μ mol/L) 各 1 μ L, cDNA (100 μ g/mL) 1 μ L, ddH₂O 7 μ L。所有获得的数据以 *GADPH* 基因进行校准。实时荧光定量 PCR 反应条件: 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 56 °C 20 s, 72 °C 20 s, 45 个循环; 95 °C 10 s, 65 °C 60 s, 97 °C 1 s。

1.5 GC-IMS 分析菌株 6W1 挥发性有机物组分

GC-IMS 是一种结合气相色谱和离子迁移谱两种方法的技术,可实现 VOC 的快速分析。GC-IMS 用于检测空气、液体或固体中的 VOC。该技术具有高灵敏度、非破坏性分析、即时反馈、高可靠性、易用性和成本效益等优点。GC-IMS 的分析原理是基于样品中 VOC 在气相色谱柱中的分离和在离子迁移谱中的离子化及其运动的过程。

培养条件:将菌株 6W1 接种于 20 mL 的 LB 液体培养基中,37 °C、180 r/min 培养 24 h 后吸取 10 mL 菌液于进样瓶中,对照为等体积的 LB 培养基,60 °C、500 r/min 孵育 10 min 后测定。每个处理 3 个重复。

检测条件: 色谱柱型号 FS-SE-54-CB-1 (15 mm \times 0.53 mm, 1 μ m), 柱温 60 °C, 采用自动顶空进样,进样体积为 100 μ L, 进样针温度为 85 °C, 载气/漂移气为高纯 N₂。载气流速程序:

初始为 2 mL/min, 保持 2 min, 10 min 线性增加至 100 mL/min, 20 min 线性增加至 150 mL/min, 总运行时间为 20 min。

数据处理: 通过 GC-IMS Library Search 软件内置的 NIST 数据库和 IMS 数据库对检测到的 VOC 进行定性分析。采用 GC-IMS 仪器配套的分析软件 Laboratory Analytical Viewer (LAV) 对菌株产生的挥发性气味进行采集和分析, 使用 Reporter 插件构建 VOC 差异图谱, 运用 Gallery 插件生成 VOC 指纹图谱, 比较不同样品间挥发性成分的差异。

1.6 VOC 纯标准品体外抑菌控毒活性验证

筛选出经 GC-IMS 分析鉴定的 VOC, 利用熏蒸的方法单独测定其抑制禾谷镰刀菌菌丝生长的效果。将禾谷镰刀菌标准菌株 PH-1 菌碟置于 PDA 培养基中央, 在培养皿盖放置一张无菌滤纸, 在滤纸中央滴入纯 VOC 纯品, 每种物质各滴加 50、100、200 μL , 浓度分别为 0.59、1.19、2.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 以滴入 50、100、200 μL 无菌水为对照^[17], 立即用封口膜密封以防物质挥发,

于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温倒置培养, 3 d 后测量菌落直径, 通过公式(1)计算抑制率, 每处理 3 个重复。

取禾谷镰刀菌 PH-1 分生孢子接种到 30 mL TBI 培养基中, 孢子终浓度为 1×10^5 个/mL, 在培养皿盖放置一张无菌滤纸, 在滤纸中央滴入 50 μL 纯 VOC 纯品, 以滴入 50 μL 无菌水的为对照, 封口膜密封后放入 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗环境下静置培养 7 d。毒素提取及测定方法见 1.4。

2 结果与分析

2.1 VOC 对禾谷镰刀菌及分生孢子萌发的抑制效果

结果显示, 菌株 6W1 的 VOC 能够明显抑制禾谷镰刀菌菌丝生长, 在培养 3 d 后菌落生长严重迟缓, 而对照菌落生长正常(图 1A)。测量处理组和对照组的菌丝半径并计算抑制率, 结果表明 VOC 处理后的菌落半径抑制率达到 59.69% (图 1B)。相较于对照组, 禾谷镰刀菌分生孢子经抑菌 VOC 处理后萌发率并无明显变化(图 1C), 表明菌株 6W1 产生的 VOC 不影响分生孢子的萌发。

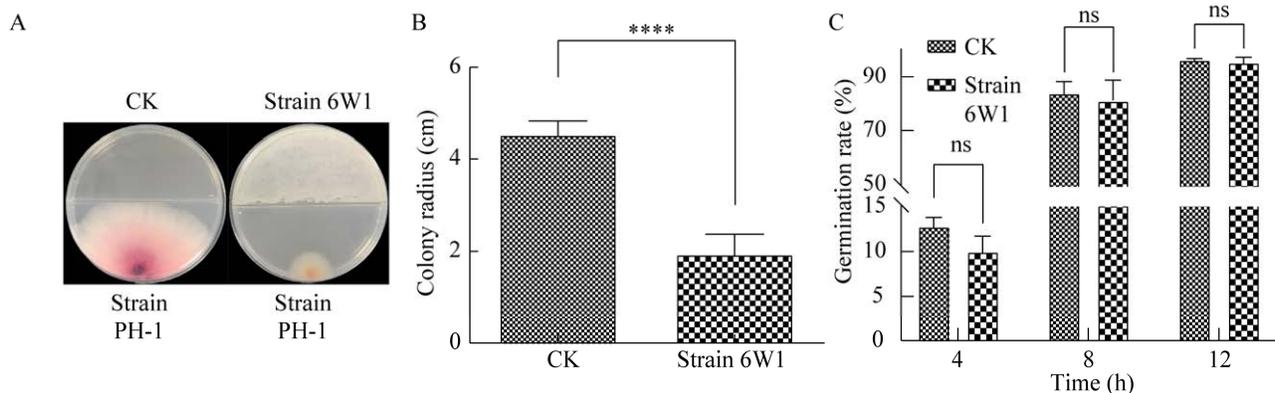


图 1 挥发性有机物对禾谷镰刀菌生长(A)及对孢子萌发的影响(B) ****: $P < 0.0001$; ns: 无显著差异
Figure 1 Effects of volatile organic compound on *Fusarium graminearum* growth (A) and spore germination (B). ****: $P < 0.0001$; ns: No significant difference.

2.2 挥发性有机物对 DON 毒素产生的影响

图 2A 显示了菌株 6W1 产生的 VOC 能够明显抑制 DON 毒素的产生。黑暗培养 7 d 后对照组中菌丝 DON 毒素含量为 18.5 $\mu\text{g/g}$, 而 VOC 处理的菌丝中未检测出 DON 毒素。合成 DON 毒素的生物合成酶和直接调节蛋白是由位于染色体 3 个位点的 15 个不同基因编码的, 其中 *Tir5* 和 *Tri6* 基因的表达在毒素合成过程中至关重要^[23]。利用实时荧光定量 PCR 对 *Tir5*、*Tir6* 基因的表达量进行分析, 结果如图 2B 所示。*Tir5* 和 *Tri6* 基因表达水平在菌株 6W1 VOC 的处理下显著下调, 几乎不表达, 结合图 2A 的毒素积累结果分析, 说明菌株 6W1 的 VOC 能显著抑制 DON 产毒相关基因的表达, 最终影响 DON 毒素的积累。

2.3 挥发性有机物组分的测定

选取 LB 培养基作为 CK 的背景参照, 用菌株 6W1 菌液的谱图扣减参比, 比较两组样品间的差异。在 GC-IMS 光谱的地形图中(图 3), 纵坐标表示气相色谱的保留时间, 横坐标表示离子迁移时间; 横坐标 0.5 处的红色垂直线表示归一化的反应离子峰(reaction ion peak, RIP)。RIP 两

侧的每个点代表一种 VOC。点的颜色反映了物质的浓度, 白色表示较低的浓度, 红色表示较高的浓度, 较深的颜色表示较高的浓度。然而, 在通过漂移区的过程中, 由于分析离子与中性分子(如二聚体和三聚体)之间加合物形成的发生, 某些单个化合物产生了多重信号, 如 2-戊酮、己醛和正丁醇各出现 2 个峰, 分别归属于单体和二聚体的存在。

通过 Gallery Plot 插件将对应的可视化图谱并排组合, 生成菌株 6W1 挥发性化合物的指纹图谱(图 4), 图谱展示了每个样品的完整 VOC 信息及样品之间 VOC 的差异。图 4 可以看出, 菌株 6W1 的菌液能产生多种 VOC。共鉴定出 60 余种物质, 将其主要分为 A、B、C 这 3 个区域。A 区域中的物质在 CK 和样品 6W1 中都存在, 但含量有所不同。B 区域的物质只在空白培养基中存在, 有可能是由于拮抗菌的生长消耗了这些物质, 拮抗菌把这些物质当作了营养物质, 也有可能是拮抗菌生长抑制这些物质的挥发。而 C 区域中的 17 种物质仅在样品菌株 6W1 中存在, 这 17 种物质主要包括醇类、酯类、醛类等物质, 可作为其特征性抑菌 VOC 进行进一步研究(表 2)。

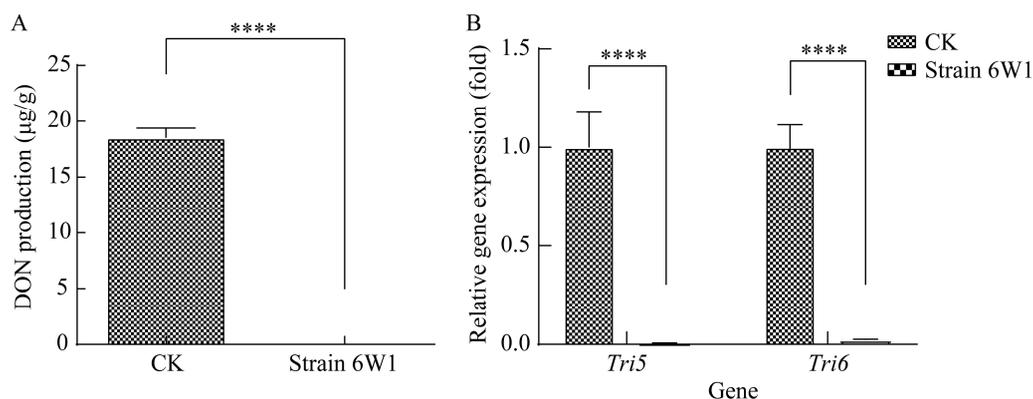


图 2 挥发性有机物对 DON 毒素(A)及产毒基因表达(B)的影响

Figure 2 Effects of volatile organic compound on DON toxin (A) and toxin-producing gene expression (B). ****: $P < 0.0001$.

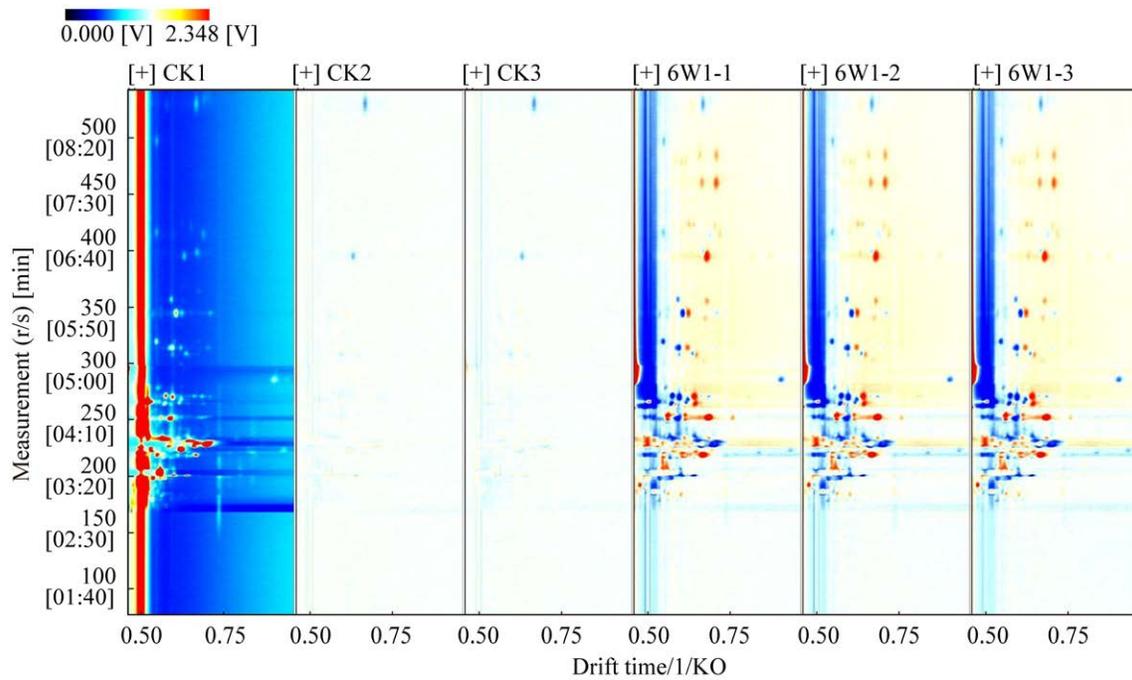


图 3 菌株 6W1 的气相色谱离子迁移谱差异图

Figure 3 Gas chromatography ion mobility spectrum difference diagram of strain 6W1.

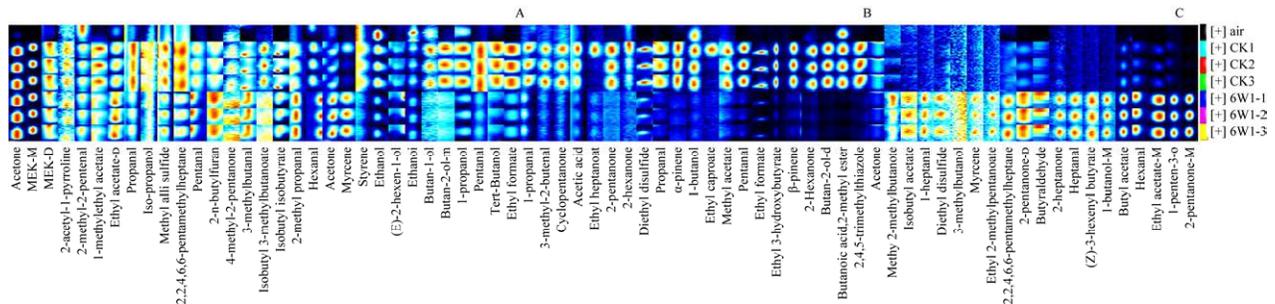


图 4 挥发性有机物的气相色谱-离子迁移谱指纹图谱

Figure 4 Gas chromatography-ion mobility spectrometry fingerprint of volatile organic compound.

2.4 挥发性有机物的纯标准品对禾谷镰刀菌及 DON 毒素的抑制效果

结合 GC-IMS 测试结果、成分安全性分析及市场采购情况,选取其中 10 余种物质进行拮抗活性验证,每种物质使用 3 种浓度:0.59、1.19、2.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 。从图 5A 可知,浓度为 0.59 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,庚醛、2-庚酮等 8 种物质能够严重抑制禾谷镰刀菌菌丝生长,菌丝生长抑制率达到 100%;乙酸乙酯、正丁醇、月桂烯和 2-甲基丁酸丁酯的抑菌效果较差,菌丝生长抑制率为 6.69%–25.05%。

当浓度达到 1.19 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,1-戊烯-3-醇、正丁醇的抑制率达到 95%以上,乙酸乙酯、2-甲基丁酸丁酯、母菊酯、月桂烯抑制率也在 50%–80%。当浓度达到 2.39 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时,所有纯品均能完全抑制禾谷镰刀菌的生长。进一步分析 VOC 纯品对禾谷镰刀菌 DON 毒素合成的影响,结果表明控毒活性的趋势与抑菌活性一致,己醛、庚醛等 8 种物质完全抑制了 DON 毒素的产生,而乙酸乙酯和 2-甲基丁酸丁酯的控毒效果较差, DON 含量为 4.6–6.4 $\mu\text{g}/\text{g}$ (图 5B)。

表 2 气相色谱-离子迁移谱联用仪检测的挥发性有机物组分

Table 2 Volatile organic compound components detected by gas chromatography ion mobility spectrometry

编号 No.	化合物 Compounds	化学式 Chemical formula
1	2-戊酮 2-pentanone	C ₅ H ₁₀ O
2	1-戊烯-3-醇 1-penten-3-ol	C ₅ H ₁₀ O
3	乙酸乙酯 Ethyl acetate	C ₄ H ₈ O ₂
4	己醛 Hexanal	C ₆ H ₁₂ O
5	乙酸丁酯 Butyl acetate	C ₆ H ₁₂ O ₂
6	正丁醇 1-butanol	C ₄ H ₁₀ O
7	顺-3-己烯基丁(z)-3-hexenyl butyrate	C ₁₀ H ₁₈ O ₂
8	庚醛 Heptanal	C ₇ H ₁₄ O
9	2-庚酮 2-heptanone	C ₇ H ₁₄ O
10	正丁醛 Butyraldehyde	C ₄ H ₈ O
11	2,2,4,6,6-五甲基庚烷 2,2,4,6,6-pentamethylheptane	C ₁₂ H ₂₆
12	母菊酯 Ethyl 2-methylpentanoate	C ₈ H ₁₆ O ₂
13	月桂烯 Myrcene	C ₁₀ H ₁₆
14	3-甲基丁醇 3-methylbutanol	C ₅ H ₁₂ O
15	二乙基二硫醚 Diethyl disulfide	C ₄ H ₁₀ S ₂
16	乙酸异丁酯 Isobutyl acetate	C ₆ H ₁₂ O ₂
17	2-甲基丁酸丁酯 Methyl 2-methylbutanoate	C ₉ H ₁₈ O ₂

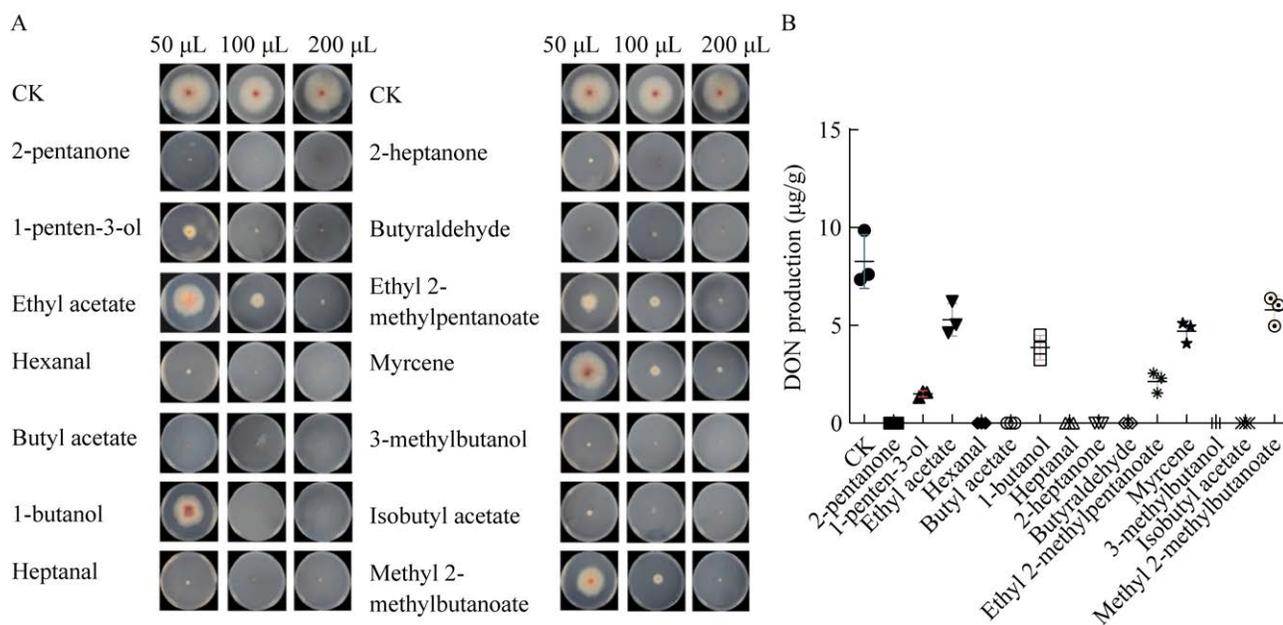


图 5 VOC 对禾谷镰刀菌生长(A)及 DON 毒素(B)的影响

Figure 5 Effects of VOC on the growth of *Fusarium graminearum* (A) and DON toxin (B).

3 讨论与结论

利用生防菌来防治由禾谷镰刀菌复合种引起的小麦赤霉病已有大量研究,微生物产生的抗菌物质分非挥发性和挥发性,非挥发性包括抗生素类、抗菌蛋白及细胞壁降解酶类,在抗菌研究领域一直备受关注,多数研究致力于发掘这些非挥发性抗菌物质^[24],而关于对挥发性抗菌物质的研究相对较少。近年来,关于生防菌 VOC 的研究逐渐增多,已有研究证明微生物能够产生具有影响其他微生物生长发育特性的 VOC,如链霉菌属(*Streptomyces*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)等细菌及真菌都可以产生这种抑菌性挥发性物质^[25-27]。Zou 等^[28]在测试的 1 018 种细菌中发现 328 株细菌可以产生抗真菌挥发物,可以抑制淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)和厚垣普可尼亚菌(*Pochonia chlamydosporia*)的菌丝生长及孢子萌发,通过 GC-MS 鉴定菌株产生的挥发性物质。Dilantha 等^[29]在筛选的 197 株细菌中发现有 14 株细菌能够产生挥发性抗真菌化合物,在体外和土壤试验中,这些物质抑制了核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)菌核萌发和菌丝的生长,其中菌株 DF200、DF209 对孢子萌发的抑制率分别为 88% 和 90%,菌株 DF35、PA-23 的抑制率最低,分别为 32%和 34%。Bu 等^[30]发现从柑橘类中分离出的枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) L1-21 对灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)有强烈的拮抗作用,抑制率为(39.63±4.73)%。Mu 等^[31]发现从土壤中分离到的萎缩芽孢杆菌(*B. atropheus*) J-1 对多种植物病原真菌表现出广谱抗真菌活性,该菌株可以有效控制苹果轮纹病。在本研究中,通过二分格平皿发现贝莱斯芽孢杆菌 6W1 产生的挥发性物质能够有效抑制禾谷镰刀菌菌丝的生长,抑制率达到 59.69%,并且能抑制菌丝中 DON 毒素的产生及产毒相关基因的表达,而不影响孢子萌发。这表

明贝莱斯芽孢杆菌 6W1 产生的挥发性物质具有潜在的生物防治应用价值,可能对控制小麦赤霉病具有重要作用。

VOC 是一种成分复杂的混合物,是由微生物所产生的,目前已经鉴定出来的物质,来源于真菌的超过 250 种,而来源于细菌的超过 340 种,这种 VOC 提供了具有抑菌和促进植物生长特性的化合物的新来源^[32-33]。Kai 等^[34]通过顶空收集法和 GC-MS 分析不同细菌产生的挥发性物质,这些细菌挥发性物质分布图显示了不同的组成和复杂性,从 1 种到近 30 种化合物,发现不同的细菌能产生组分不同的 VOC。Arrebola 等^[35]在体内和体外研究枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) PPCB01、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) PPCB04 及混菌(PPCB01+PPCB04)对青霉(*Penicillium* spp.)的拮抗作用,通过 GC-MS 分析 2 种菌株产生的 VOC,经过检测分析菌株 PPCB01 (21 种)产生的物质种类比菌株 PPCB04 (8 种)要多,但 2 种菌株产生的主要抑菌成分都是 3-羟基-2-丁酮,含量分别为 45.98%和 97.52%。刘元元等^[36]从向日葵根际和苦豆子植株内分离得到芽孢杆菌(*Bacillus* spp.) X4 和 N4,菌株 X4 及其挥发性物质、菌株 N4 及其挥发性物质对大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*) VD-278 的抑制率分别为 67.83%、42.74%、65.03%和 36.75%,利用 GC-MS 分析菌株 X4 和 N4 的挥发性物质,测定 4 种主要挥发性物质(3-甲基丁酸、2,3-丁二醇、异丁酸和 2-甲基丁酸)的抑菌活性,只有 2,3-丁二醇对棉花黄萎菌无抑菌活性。王恩召^[37]通过气相色谱-质谱分析仪对菌株产生的 VOC 进行检测分析,发现每株细菌产生的挥发性物质都不相同且含量也各不相同;从中选取 5-甲基-2-己酮和 3-甲基丁酸进行体外活性验证,发现两种物质均能抑制小孢根霉(*Rhizopus microsporus*)的生长。另外,冯福山等^[38]发现枯草芽孢杆菌(*B.*

subtilis) Y13 产生的挥发性物质能够抑制 10 种病原菌生长, 对果生炭疽菌 (*Colletotrichum fructicola*) 抑制效果最好; 通过顶空固相微萃取技术和气相色谱-质谱联用仪分析菌株 Y13 产生的 VOC, 共检测出 13 种物质, 其中壬醛、苯甲醛、3-甲基-4-苯基吡唑和苯丙噻唑能够抑制 7 种油茶病原菌生长; 检测出 10 种挥发性物质纯品, 在研究枯草芽孢杆菌 Y13 产生的 VOC 时也发现了 2-庚酮对果生炭疽菌的生长有一定的抑制作用。本研究通过 GC-IMS 对菌株 6W1 产生的 VOC 进行分析检测, 发现其 VOC 主要分为酯类、醇类、醛类、烯类和酮类, 进一步分析主要 VOC 对禾谷镰刀菌菌丝生长的抑制效果, 结果表明庚醛、己醛、2-庚酮等抑制效果较强, 当浓度为 0.59 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时能够完全抑制禾谷镰刀菌菌丝的生长。

VOC 可以作为生物防治剂来控制病原菌的生长, 减少化学防治剂的使用, 也可以促进植物生长并且通过诱导植物的防卫反应来抑制病原菌, Ryu 等^[39]发现枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) GB03 和解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) IN937a 产生的 VOC 可以降低拟南芥幼苗由胡萝卜软腐欧式杆菌 (*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*) 引起的腐烂病的严重程度, 而 2,3-丁二醇是赋予植物抗性的关键化合物。然而, 暴露于细菌挥发性物质 4 d 就可以激活拟南芥幼苗的诱导系统抗性。本研究仅测定了贝莱斯芽孢杆菌 6W1 产生的挥发性物质对病原菌的抑制效果及特征性 VOC 对病原菌的抑制效果, 对于防效试验和植物的促生长作用、诱导抗病作用还有待进一步的研究。

REFERENCES

- [1] RAMPERSAD SN. Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants[J]. *Pathogens*, 2020, 9(5): 340.
- [2] 蒋翊宸, 刘馨, 方欣, 冯建茹, 李露, 徐剑宏, 史建荣. 单端孢霉烯族毒素的产生及分子调控机制[J]. *菌物学报*, 2020, 39(3): 521-538.
- JIANG YC, LIU X, FANG X, FENG JR, LI L, XU JH, SHI JR. Recent advances on trichothecene mycotoxins: their biosynthesis and regulation[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(3): 521-538 (in Chinese).
- [3] 马玉彤, 刘太国, 文才艺, 刘博, 高利, 陈万权. 我国不同麦区小麦镰刀菌毒素检测及毒素污染分析[J]. *植物保护学报*, 2019, 46(2): 266-273.
- MA YT, LIU TG, WEN CY, LIU B, GAO L, CHEN WQ. Determination and contamination of *Fusarium* mycotoxins in different wheat planting regions of China[J]. *Journal of Plant Protection*, 2019, 46(2): 266-273 (in Chinese).
- [4] QIU JB, XU JH, SHI JR. Molecular characterization of the *Fusarium graminearum* species complex in Eastern China[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2014, 139(4): 811-823.
- [5] DUAN YB, LU F, ZHOU ZH, ZHAO HH, ZHANG J, MAO YS, LI MX, WANG JX, ZHOU MG. Quinone outside inhibitors affect DON biosynthesis, mitochondrial structure and toxosome formation in *Fusarium graminearum*[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 398: 122908.
- [6] 陈文华, 殷宪超, 武德亮, 徐剑宏, 赵凤春, 杨正友, 史建荣. 小麦赤霉病生物防治研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2020, 48(4): 12-18.
- CHEN WH, YIN XC, WU DL, XU JH, ZHAO FC, YANG ZY, SHI JR. Research progress on biological control of fusarium head blight[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(4): 12-18 (in Chinese).
- [7] 宗英, 赵月菊, 刘阳, 杨庆利. 一株贝莱斯芽孢杆菌抑制禾谷镰刀菌的研究[J]. *核农学报*, 2018, 32(2): 310-317.
- ZONG Y, ZHAO YJ, LIU Y, YANG QL. Study on the inhibitory effect of *Bacillus velezensis* on *Fusarium graminearum*[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(2): 310-317 (in Chinese).
- [8] HANDELSMAN J, STABB EV. Biocontrol of soilborne plant pathogens[J]. *The Plant Cell*, 1996, 8(10): 1855-1869.
- [9] 周晴晴, 路艳琴, 陆景倩, 李松伟. 小麦赤霉病生防机制研究进展[J]. *江苏农业科学*, 2023, 51(3): 1-8.
- ZHOU QQ, LU YQ, LU JQ, LI SW. Research progress on biological control mechanism of wheat scab[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2023, 51(3): 1-8 (in Chinese).

- [10] 王恩召, 范分良, 李艳玲, 刘雄舵, 卢玉秋, 宋阿琳. 水稻根系细菌 VOC 对小孢根霉的非接触性抑制作用[J]. 中国农业科学, 2020, 53(10): 1986-1996.
WANG EZ, FAN FL, LI YL, LIU XD, LU YQ, SONG AL. Noncontact Inhibitory of Volatile Organic Compounds from Rice Root Bacteria on *Rhizopus microsporus*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2020, 53(10): 1986-1996 (in Chinese).
- [11] RYBAKOVA D, CERNAVA T, KÖBERL M, LIEBMINGER S, ETEMADI M, BERG G. Endophytes-assisted biocontrol: novel insights in ecology and the mode of action of *Paenibacillus*[J]. Plant and Soil, 2016, 405(1): 125-140.
- [12] 宋晓宇. 内生真菌裂褶菌和间座壳菌活性挥发物抑菌作用及其机制初探[D]. 北京: 中国林业科学研究院硕士学位论文, 2020.
SONG XY. Antifungal activity and preliminary mechanism of active volatiles from endophytic fungal *Schizophyllum commune* and *Diaporthe* spp.[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Forestry, 2020 (in Chinese).
- [13] RATH M, MITCHELL TR, GOLD SE. Volatiles produced by *Bacillus mojavensis* RRC101 act as plant growth modulators and are strongly culture-dependent[J]. Microbiological Research, 2018, 208: 76-84.
- [14] LEMFACK MC, GOHLKE BO, TOGUEM SMT, PREISSNER S, PIECHULLA B, PREISSNER R. mVOC 2.0: a database of microbial volatiles[J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(D1): D1261-D1265.
- [15] PIECHULLA B, DEGENHARDT J. The emerging importance of microbial volatile organic compounds[J]. Plant, Cell & Environment, 2014, 37(4): 811-812.
- [16] GARBEVA P, HORDIJK C, GERARDS S, De BOER W. Volatiles produced by the mycophagous soil bacterium *Collimonas*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2014, 87(3): 639-649.
- [17] 史璐欣. 暹罗芽孢杆菌 YJ15VOC 抑菌成分解析及对灰葡萄孢的抑菌作用[D]. 太谷: 山西农业大学硕士学位论文, 2022.
SHI LX. Analysis of antifungal composition and inhibition effects of VOC produced by *Bacillus siamensis* YJ15 on *Botrytis cinerea*[D]. Taigu: Master's Thesis of Shanxi Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [18] AUDRAIN B, FARAG MA, RYU CM, GHIGO JM. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2015, 39(2): 222-233.
- [19] FIDDAMAN PJ, ROSSALL S. Effect of substrate on the production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*[J]. The Journal of Applied Bacteriology, 1994, 76(4): 395-405.
- [20] GOTOR-VILA A, TEIXIDÓ N, Di FRANCESCO A, USALL J, UGOLINI L, TORRES R, MARI M. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry[J]. Food Microbiology, 2017, 64: 219-225.
- [21] 王雨婷. 基于基因组信息的镰刀菌生防菌株挖掘与拮抗机制研究[D]. 连云港: 江苏海洋大学硕士学位论文, 2022.
WANG YT. Genome-based exploration of biocontrol strains against phytopathogen *Fusarium* and their antagonism mechanisms[D]. Lianyungang: Master's Thesis of Jiangsu Ocean University, 2022 (in Chinese).
- [22] DONG F, QIU JB, XU JH, YU MZ, WANG SF, SUN Y, ZHANG GF, SHI JR. Effect of environmental factors on *Fusarium* population and associated trichothecenes in wheat grain grown in Jiangsu province, China[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 230: 58-63.
- [23] YAZAR S, OMURTAG GZ. Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(11): 2062-2090.
- [24] ZHOU X, QIAN GL, CHEN Y, DU LC, LIU FQ, YUEN GY. PilG is involved in the regulation of twitching motility and antifungal antibiotic biosynthesis in the biological control agent *Lysobacter enzymogenes*[J]. Phytopathology, 2015, 105(10): 1318-1324.
- [25] 张清华, 黄丽丽, 连鑫坤, 詹振亮, 冯丽贞. 微生物源挥发性物质及其生物防治作用研究进展[J]. 生态学杂志, 2017, 36(7): 2036-2044.
ZHANG QH, HUNG Lili, LIAN XK, ZHAN ZL, FENG LZ. Research advances in microbial volatiles and their biocontrol potential[J]. Chinese Journal of Ecology, 2017, 36(7): 2036-2044 (in Chinese).
- [26] XIE SS, ZANG HY, WU HJ, UDDIN RAJER F, GAO XW. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(1): 49-58.
- [27] KADDES A, FAUCONNIER ML, SASSI K, NASRAOUI B, JIJAKLI MH. Endophytic fungal

- volatile compounds as solution for sustainable agriculture[J]. *Molecules*, 2019, 24(6): 1065.
- [28] ZOU CS, MO MH, GU YQ, ZHOU JP, ZHANG KQ. Possible contributions of volatile-producing bacteria to soil fungistasis[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(9): 2371-2379.
- [29] DILANTHA FERNANDO WG, RAMARATHNAM R, KRISHNAMOORTHY AS, SAVCHUK SC. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(5): 955-964.
- [30] BU SW, MUNIR S, HE PF, LI YM, WU YX, LI XY, KONG BH, HE PB, HE YQ. *Bacillus subtilis* L1-21 as a biocontrol agent for postharvest gray mold of tomato caused by *Botrytis cinerea*[J]. *Biological Control*, 2021, 157: 104568.
- [31] MU YP, YUE Y, GU GR, DENG YM, JIN H, TAO K. Identification and characterization of the *Bacillus atropheus* strain J-1 as biological agent of apple ring rot disease[J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2020, 127(3): 367-378.
- [32] SCHULZ S, DICKSCHAT JS. Bacterial volatiles: the smell of small organisms[J]. *Natural Product Reports*, 2007, 24(4): 814-842.
- [33] VESPERMANN A, KAI M, PIECHULLA B. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(17): 5639-5641.
- [34] KAI M, EFFMERT U, BERG G, PIECHULLA B. Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. *Archives of Microbiology*, 2007, 187(5): 351-360.
- [35] ARREBOLA E, SIVAKUMAR D, KORSTEN L. Effect of volatile compounds produced by *Bacillus* strains on postharvest decay in citrus[J]. *Biological Control*, 2010, 53(1): 122-128.
- [36] 刘元元, 庞学兵, 李国, 刘珊珊, 余彬彬, 王爱英. 棉花黄萎病生防菌的筛选及挥发性抑菌物质检测[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(5): 820-829.
- LIU YY, PANG XB, LI G, LIU SS, YU BB, WANG AY. Screening for bio-control bacteria against cotton *Verticillium* wilt and detection of volatile antimicrobial substances[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2019, 28(5): 820-829 (in Chinese).
- [37] 王恩召. 水稻根区细菌 VOC 对病原菌的抑制作用[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2020.
- WANG EZ. The Inhibitory of volatile organic compounds from rice zone bacteria on pathogens[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020 (in Chinese).
- [38] 冯福山, 刘君昂, 胡廉成, 文瑞芝, 周国英. 枯草芽胞杆菌 Y13 挥发性物质的分析及抑菌活性[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(4): 597-604.
- FENG FS, LIU JA, HU LC, WEN RZ, ZHOU GY. Analysis of volatile compounds from *Bacillus subtilis* Y13 and its antimicrobial activity[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2019, 35(4): 597-604 (in Chinese).
- [39] RYU CM, FARAG MA, HU CH, REDDY MS, KLOEPPER JW, PARÉ PW. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*[J]. *Plant Physiology*, 2004, 134(3): 1017-1026.