



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101270344 B

(45) 授权公告日 2010.08.04

(21) 申请号 200810047655.9

A01N 63/02(2006.01)

(22) 申请日 2008.05.12

A01N 37/18(2006.01)

(83) 生物保藏信息

A01P 3/00(2006.01)

CCTCC NO:M208067 2008.04.28

C12R 1/125(2006.01)

(73) 专利权人 华中农业大学

审查员 廖雅静

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街  
1号

(72) 发明人 喻子牛 张吉斌 何进 孙明

刘子铎 郑世学 李明顺 徐爱章

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12P 21/04(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 6 页

(54) 发明名称

防治油菜菌核病的枯草芽胞杆菌及抗菌物质  
分离

(57) 摘要

本发明属于农业微生物学技术领域,具体涉及一株对油菜菌核病有抑制作用的拮抗菌 X-01 菌株的分离筛选,抗菌活性物质的分离与应用。本发明的 X-01 菌株已经保藏在中国典型培养物保藏中心(保藏号为 CCTCC NO:M 208067)。通过形态学观察、生理生化分析和 16S rDNA 同源性分析,鉴定 X-01 菌株为枯草芽胞杆菌(Bacillus subtilis)。该菌株能够分泌一种脂肽类抗生素 iturinA,其分子量为 1042.9Da。本发明还公开了利用 X-01 菌株制备脂肽类抗生素 iturinA 的方法。离体生防试验表明,本发明制备的脂肽类抗生素 iturinA 对油菜菌核病菌具有明显的抑制效果,脂肽类抗生素 iturin A 浓度为 100 μg/ml 时防治油菜菌核病的效果达 100%,浓度为 10 μg/ml 时的防治效果达到 40.7%。

1. 一株防治油菜菌核病的枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌株 X-01, 保藏在中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 其保藏编号是 :CCTCC NO:M 208067。

2. 根据权利要求 1 所述的菌株, 其特征在于, 该菌株分泌一种抗油菜菌核病的脂肽类抗生素 iturin A, 其分子量为 1042.9Da。

3. 一种制备脂肽类抗生素 iturin A 的方法, 其特征在于:

1) 将保藏编号为 CCTCC NO:M 208067 的枯草芽胞杆菌菌株 X-01 进行液体振荡活化, 并接种于液体培养基中, 培养温度 30℃; 摇床转数 150rpm; 培养时间 48h, 得到含脂肽类抗生素 iturin A 的发酵液;

2) 将步骤 1) 得到的发酵液在相对离心力为  $10000\times g$  的离心机上离心 15min 除去菌体, 取上清, 用截留分子量为 100KDa 的超滤管超滤, 滤过液再用截留分子量为 30KDa 的超滤管浓缩至原体积的 1/20, 弃去滤过液, 取截留液上圆相萃取柱分离, 依次用 0%, 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 的甲醇 / 水溶液 (V/V) 梯度洗脱, 收集 60%, 80%, 100% 洗脱组分, 用旋转蒸发器于 65℃ 水浴条件下浓缩得到含脂肽类抗生素 iturin A 的粗提物;

3) 将步骤 2) 得到的粗提物用 1ml 甲醇溶解得到样品处理液 -1, 将样品处理液 -1 用高效液相色谱仪分离, 色谱柱的参数为: 填料: Hypersil BDS  $C_{18}$ , 4.6mm $\times$ 20mm, 5 $\mu$ m 粒径, 高效液相色谱条件: 流动相 35% 乙腈 / 水溶液 (V/V); 流速 1ml/min, 检测波长 210nm, 进样量 20 $\mu$ l; 运行时间 50min, 收集保留时间为 10 分钟的色谱峰, 于 65℃ 水浴下旋转蒸发浓缩至 1ml 后转移到离心管中, 用氮气吹干, 得到脂肽类抗生素 iturin A;

其中步骤 1) 所述的液体培养基的组分为: 每 1000ml 培养基中含有胰蛋白胨 10g, 葡萄糖 5g,  $K_2HPO_4$  2.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g, pH7.2。

4. 权利要求 1 所述的菌株在制备防治油菜菌核病的抗菌产物中的应用。

## 防治油菜菌核病的枯草芽胞杆菌及抗菌物质分离

### 技术领域

[0001] 本发明属于农业微生物学技术领域,具体涉及一株防治油菜菌核病的枯草芽胞杆菌的分离筛选,抗菌活性物质的分离及应用。

### 背景技术

[0002] 油菜菌核病是由核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 引起的真菌病害,居油菜三大病害之首,轻病年减产 10%~20%,重病年减产达 50%左右。在油菜菌核病的抗病油菜品种筛选上仍未找到免疫材料,目前缺乏高效的抗病品种(双桑等,油菜菌核病及抗病育种研究进展, CROP RESEARCH, 2006, 5 :552-556)。长期以来其防治大多用苯并咪唑类杀菌剂在花期喷雾进行化学防治。由于长期单一用药,病原菌对杀菌剂已广泛产生抗药性,防治效果并不理想,并且长期使用上述药剂,给生态环境、人类健康带来严重危害。使得人们对该病的生物防治寄予了厚望。在目前研究的菌核病生防菌中,国外有通过真菌盾壳霉 (*Coniothyriumminitans*) 进行防治的报道,该菌通过寄生核盘菌菌核,使其丧失产生子囊盘的能力。1999年德国的 Prophyta 公司用 *C. minitans* 开发出第一个用于防治核盘菌的生防真菌产品,其商品名为 CONTANS (Hedke K 等, Contans-first biocontrol agent against *Sclerotium sclerotiorum* in oilseed rape [R]. Canberra, Australia :Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, 1999)。目前国内还没有专门用于防治油菜菌核病的生防产品。

[0003] 枯草芽胞杆菌是一种在自然界广泛存在的微生物,革兰氏阳性,产生耐热、抗逆的芽胞,在芽胞形成初期分泌各种抗菌物质,对病原真菌有特异性的防治作用,具有显著的生防潜力。目前已确定来自枯草芽胞杆菌的抗菌物质有低分子抗菌肽,有环状肽或环状脂肽,也有些为线状肽等,这些物质能使病原真菌菌丝发生断裂、解体、胞质消解等现象。脂肽类抗生素是由枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) 产生的具有潜在的植物病害防治和医学应用价值的抗菌物质,包括 surfactin、iturin 和 fengycin。脂肽类生物表面活性剂一般是以内酯或酰胺键结合而成的环状脂肽。脂肽分子中多个氨基酸组成的肽链形成亲水基,脂肪烃链形成亲油基,亲水的氨基酸能和烃链上的羧基、羟基或氨基结合形成环状。由于氨基酸组成和脂肪酸侧链长度的差异形成多种同分异构体,这些脂肽的结构相似,性质相近,从细菌发酵液中分离纯化得到纯的单分子类抗生素非常困难,这给进一步的结构鉴定带来相当大的难度。酸沉淀是分离纯化脂肽类物质最常用的方法,但酸沉淀后很多杂质也一起被沉淀下来了,分离纯化的效果并不理想 (Mukherjee S 等, Towards commercial production of microbial surfactants. TRENDS in Biotechnology, 2006, 24(11) :509-515)。固相萃取 (Solid-phase extraction, SPE), 又称固液微处理小柱技术。它是利用对某些成分的选择性吸附与选择性洗脱的液相色谱分离原理,使液体样品通过吸附剂小柱,特异性地保留其中某些组分,再选用适当的溶剂冲洗杂质,然后用少量溶剂迅速洗脱,从而达到快速分离净化与浓缩的目的。特别适合从各类复杂样品中提取净化微量待测组分,具有分离速度快、操作简单、萃取效率高、无乳化等特点,在环境分析、药物分析等

方面有广泛应用。能起到将被分离物质与杂质分开和浓缩样品的作用,尤其适用于色谱分析样品前处理。

## 发明内容

[0004] 本发明的第一个目的是克服现有技术存在的缺陷,从自然环境中分离筛选出一株对油菜菌核病菌有抑制能力的枯草芽胞杆菌菌株;本发明的第二个目的是从所述的枯草芽胞杆菌菌株的发酵液中分离出对油菜菌核病菌有抑制能力的脂肽类抗菌物质;本发明的第三个目的是利用所分离的脂肽类抗菌物质用于油菜菌核病的防治。

[0005] 本发明是这样实现的:

[0006] 申请人于 2007 年 11 月从中国湖北省武汉市华中农业大学油菜基地的土壤中分离得到一株对油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 有抑制能力的生防菌 X-01 菌株;经形态观察,生理生化和 16S rDNA 鉴定,该 X-01 菌株在分类学上属于枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*),申请人于 2008 年 4 月 28 日将该菌株送交湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心 (CCTCC) 保藏,其保藏编号为:CCTCC NO:M 208067。

[0007] 进一步的发酵试验证明,该菌株能分泌一种脂肽类抗生素 iturin A,测定其分子量为 1042.9Da。

[0008] 一种制备脂肽类抗生素 iturinA 的方法,其特征在于:

[0009] 1) 将保藏编号为 CCTCC NO:M 208067 的枯草芽胞杆菌菌株 X-01 液体振荡活化,接种到装有液体培养基(每 1000ml 中含有胰蛋白胨 10g,葡萄糖 5g,  $K_2HPO_4$  2.5g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g, pH7.2) 的三角瓶中,培养温度 30℃;摇床转数 150rpm;培养时间 48h,得到含脂肽类抗生素 iturin A 的发酵液;

[0010] 2) 将步骤 1) 得到的含脂肽类抗生素 iturin A 的发酵液在相对离心力为  $10000 \times g$  的离心机上离心 15min 除去菌体,取上清,先用截留分子量为 100KDa 的超滤管超滤,滤过液再用截留分子量为 30KDa 的超滤管浓缩到原体积的 1/20,弃去滤过液,取截留液上固相萃取柱分离,依次用 0%,20%,40%,60%,80%,100% 的甲醇/水溶液 (V/V) 梯度洗脱,收集 60%,80%,100% 洗脱组分,用旋转蒸发器于 65℃ 水浴条件下浓缩得到含脂肽类抗生素 iturin A 的粗提物;

[0011] 3) 将步骤 2) 粗提物用 1ml 甲醇溶解得到样品处理液 -1,将样品处理液 -1 用高效液相色谱仪分离,色谱柱的参数为:填料为 Hypersil BDS  $C_{18}$ , 4.6mm $\times$ 20mm, 5  $\mu$ m 粒径,高效液相色谱条件:流动相 35% 乙腈/水溶液 (V/V);流速 1ml/min,检测波长 210nm,进样量 20  $\mu$ l;运行时间 50min,收集保留时间为 10min 的色谱峰,于 65℃ 水浴下旋转蒸发浓缩至 1ml 后转移到离心管中,用氮气吹干,得到脂肽类抗生素 iturin A。

[0012] 基于以上的发明,申请人已经从该枯草芽胞杆菌的发酵液中成功地分离得到防治油菜菌核病的脂肽类抗生素 iturinA,并将这种类抗生素成功地应用在防治油菜菌核病上。当分离得到的脂肽类抗生素 iturin A 的浓度为 100  $\mu$ g/ml 时防治油菜菌核病的效果达 100%,浓度为 10  $\mu$ g/ml 时的防治效果达到 40.7%。

[0013] 本发明具有以下优点:

[0014] 本发明分离的 X-01 菌株能产生脂肽类抗生素,具有很强的抑制油菜菌核病菌的能力,为油菜菌核病的防治提供了新的生防产品。

## 附图说明

[0015] 图 1 :本发明的技术流程图。

[0016] 图 2 :X-01 菌株发酵滤液对核盘菌的抑制实验结果。图中 :

[0017] CK :未接种的培养基 ( 对照 ) ;滤液 :X-01 菌株的除去菌体后的发酵液。

[0018] 图 3 :X-01 菌株的 16S rDNA 序列。

[0019] 图 4 :X-01 菌株的系统发育树。

[0020] 图中括号内为相应菌株在 Genbank 的编号。

[0021] 图 5 :本发明的菌株的抗菌活性组分经固相萃取后各洗脱组分的抗核盘菌效果图。图中 :

[0022] a :超滤截留液 ;b,c,d,e,f,g 分别为 0%,20%,40%,60%,80%,100% 的甲醇水溶液洗脱液 ;由于样品浓度过大以及上样量过多,仍有部分活性组分未被固相萃取柱吸附,因此,最初的纯水洗脱液 (b) 具有部分抗菌活性。甲醇无拮抗效果。

[0023] 图 6 :本发明的菌株的抗菌活性组分经固相萃取后的高效液相色谱图。图中色谱峰上的数字表示各色谱峰编号。

[0024] 图 7 :各液相色谱峰抗核盘菌的效果图。图中数字分别对应于图 6 中的色谱峰。

[0025] 图 8 :纯化后的脂肽类抗生素 iturin A 的基质辅助激光诱导解吸附电离飞行时间质谱图。图中 :质荷比 (M/Z) 为 1043.9,1065.9,1081.9 的离子峰分别为活性物质的  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  峰。

[0026] 图 9 :X-01 菌株产生的脂肽类抗生素 iturin A 的电喷雾碰撞活化解离质谱图。图中表示了 iturin A 肽段断裂后的部分 b 离子和 y 离子质谱峰 ; $[M+H]^+$  表示 iturin A 的质子化峰。

## 具体实施方式

[0027] 下述实施例中的实验方法,如无特别说明,均为报道的微生物学常规操作方法。

[0028] 实施例 1 :油菜菌核病拮抗菌株 X-01 的分离、筛选与鉴定

[0029] 第一步 :菌株的分离 ( 稀释平板法,参照 :赵斌等,微生物学实验 ( 第一版 )。北京 :科学出版社,2002 年介绍的方法 )。

[0030] 从湖北省武汉市华中农业大学油菜基地采取土样 10g,加入内装 100ml 无菌水和玻璃珠的三角瓶中,于 150rpm 摇床上振荡 30min,得到土壤悬液。将土壤悬液在 80℃ 加热处理 30min,使芽胞杆菌得到富集,取 1ml 富集培养液加入 9ml 无菌水中,依次按照  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  稀释,取 0.1ml 不同梯度的稀释液在牛肉膏蛋白胨培养基 ( 牛肉膏 5g,蛋白胨 10g,NaCl 5g,琼脂 15g,用蒸馏水定容至 1L, pH7.2) 上涂布均匀,倒转平板,30℃ 保温培养 2-3 天,得到长有单菌落的平板。

[0031] 第二步 :拮抗菌株 X-01 的筛选

[0032] 在土豆培养基 ( 新鲜去皮土豆 20g,葡萄糖 20g,琼脂 15g,用自来水定容至 1L, pH6.5) 平板上接种核盘菌,株号 :Let-27,参见 :姜道宏等,盾壳霉控制油菜菌核病菌再侵染及其叶面存活的动态研究,植物病理学报,2000 年 2 月第 30 卷第 1 期第 60-65 页,20℃ 培养 2 天后,用直径为 5mm 的打孔器在菌丝边缘打孔获得带该核盘菌 (Let-27) 菌丝的琼脂

块。挑第二步分离培养得到的单菌落,接种在土豆培养基平板上,每个平板上接4株菌。然后在平板中央接种一块带核盘菌菌丝的琼脂块。20℃培养2天,观察拮抗效果,测量抑菌带直径。共获得有拮抗效果的菌株13株。选抑菌带直径最大的菌株,在牛肉膏蛋白胨液体培养基(牛肉膏5g,蛋白胨10g,NaCl 5g,用蒸馏水定容至1L,pH7.2)中摇瓶发酵。培养温度30℃;摇床转数150rpm;培养时间24h。发酵液离心后经细菌过滤器(0.2 μm, Millipore, USA)过滤除菌。在土豆培养基平板中央放置带核盘菌菌丝的琼脂块,用打孔器在平板周围距中心2.5cm处均匀地打上直径为5mm的小孔,滴入过滤液20 μl,每处理2次重复,对照滴加牛肉膏蛋白胨液体培养基,置20℃培养箱黑暗条件下培养2天,测量抑菌带直径。按上述方法,最后得到一株对油菜菌核病菌有良好抑制能力的菌株X-01(见图2)。

[0033] 第三步:X-01菌株的常规鉴定和分子辅助鉴定

[0034] 将X-01菌株接种在如上所述的牛肉膏蛋白胨培养基上,30℃培养24h,观察记录单菌落形态,同时进行革兰氏染色、过氧化氢酶试验、淀粉水解试验、硝酸盐还原试验等(参照:赵斌等,微生物学实验(第一版)。北京:科学出版社,2002年介绍的方法)。16S rRNA鉴定,采用上游引物27F 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' 和下游引物1492R5' GGTTACCTGTTACGACTT3' 扩增16S rDNA片段(Suzuki K等,Agromyces mediolanus sp. nov., nom. rev., comb. nov., a species for "Corynebacterium mediolanum" Mamoli 1939 and for some aniline-assimilating bacteria which contain 2,4-diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan. Int J Syst Bacterio, 1996, 46:88-93)。采用20 μl反应体系:1 μl上游引物27F, 1 μl下游引物1492R, 0.2 μl dNTP, 0.2 μl TaqE, 1 μl Template, 2 μl 10×Buffer, 14.6 μl ddH<sub>2</sub>O。PCR反应条件:94℃, 1min; 55℃, 1min; 72℃, 2min, 30次循环, 72℃延伸5min, PCR产物经电泳纯化后克隆到pMD18-T载体(购自大连宝生物公司)上,送上海生物工程有限公司测序。将得到的16SrDNA序列提交GenBank(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>)和RDP(Ribosomal Database Project)数据库(<http://rdp.cme.msu.edu/>),采用Blastn程序进行序列的同源性分析,用Clustal X进行多序列比对(Thompson JD等, The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res, 1997, 25:4876-4882),用MEGA3.0软件按Neighbor-Joining法构建系统发育树(Kumar S等, MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5:150-163)。

[0035] 第四步:X-01菌株的菌学特征及分类命名

[0036] 参照第三步中赵斌等,微生物学实验(第一版)。北京:科学出版社,2002年介绍的方法,对分离的X-01菌株的菌学特征进行了研究,特征如下:X-01菌株菌体大小为0.7-1.0×1.6-2.5,菌体杆状,中生芽胞,革兰氏反应阳性;在牛肉膏蛋白胨平板上形成的菌落乳白色、边缘整齐、表面在开始2天有光泽,随培养时间延长变皱折;具有运动性,不产色素,在牛肉膏蛋白胨液体培养基中产菌膜;淀粉水解,柠檬酸盐试验,硝酸盐还原, V.P. 试验,接触酶试验,酪素水解,石蕊牛奶还原试验为阳性;明胶水解,过氧化氢酶,甲基红试验,产吡啶试验和卵磷脂酶试验为阴性;X-01菌株能利用葡萄糖产酸,不能利用葡萄糖产气;X-01菌株的最适宜生长温度为30℃。根据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版,中译本,

科学出版社,1984 年)的检索表检索,X-01 菌株的形态和生理生化特征与枯草芽胞杆菌的性状相吻合。经过 PCR 扩增得到 X-01 菌株的 16S rDNA 片段(片段长度为 1511bp,见图 3),测序后与 GenBank 数据库中已知的 13 个枯草芽胞杆菌的 16S rDNA 同源性的 99%。因此选取 X-01 菌株和 RDP 中相似性大的其它代表性菌株的 16S rDNA 序列进行遗传距离计算,并根据遗传距离计算结果绘制系统发育树(见图 4),根据系统发育分析可以确认本发明筛选得到的 X-01 菌株是枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)。

[0037] X-01 菌株的保藏培养基为常规牛肉膏蛋白胨培养基(如上所述),培养温度 30℃。

[0038] 实施例 2:X-01 菌株脂肽类抗菌活性物质的纯化和结构鉴定

[0039] 挑 X-01 菌株单菌落在牛肉膏液体培养基(成分见上所述)中以 30℃,150rpm 振荡培养 16h,得种子液,然后将 1ml 的种子液接种到装有 100ml 发酵培养基(见后)的 500ml 三角瓶中。所用发酵培养基组分为:胰蛋白胨 10g、酵母抽提物 2.5g、葡萄糖 5g、 $K_2HPO_4$  2.5g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2g,用蒸馏水定容至 1000ml,pH 7.2。培养温度 30℃;摇床转速 150rpm;培养时间 48h。将 X-01 发酵液在相对离心力为  $10000 \times g$  的离心机上离心 15min 除去菌体,取上清经截留分子量(MWCO)为 100KDa 的超滤管(Amicon ultra-15 devices,Millipore,USA)超滤,滤过液再经截留分子量为 30KDa 的超滤管浓缩至原体积的 1/20,弃去滤过液,取截留液上固相萃取柱(DIKMAProelut  $C_{18}$ ,北京迪科玛公司生产)在固相萃取装置(Supelco,USA)上分离(操作方法按照仪器厂家的操作说明进行),依次用 0%,20%,40%,60%,80%,100%的甲醇/水溶液(V/V)梯度洗脱,收集活性组分(60%,80%,100%甲醇/水洗脱组分,见图 5),经旋转蒸发仪(上海红叶生化仪器厂)于 65℃水浴条件下浓缩(按照仪器厂家的操作说明进行)得到含脂肽类抗生素 iturin A 的粗提物,粗提物用 1ml 甲醇溶解得到样品处理液-1,将样品处理液-1 经高效液相色谱(HPLC)分离(色谱柱为大连依利特分析仪器有限公司产品:Hypersil BDS  $C_{18}$ ,4.6mm $\times$ 20mm,5 $\mu$ m 粒径;高效液相色谱系统为美国 Waters 公司生产的 515 泵和 2487 双波长检测器),流动相:35%乙腈/水溶液(V/V);流速 1ml/min,检测波长 210nm,进样量 20 $\mu$ l;运行时间 50min。色谱图见附图 6,收集保留时间为 10 分钟的色谱峰(见图 6、图 7),于 65℃水浴下旋转蒸发浓缩至 1ml 后转移到离心管中,用氮气吹干,得到脂肽类抗生素 iturin A。

[0040] 将得到的脂肽类抗生素 iturin A 进行基质辅助激光诱导解吸附电离飞行时间质谱分析(仪器为美国应用生物公司生产的 Voyager-DESTR MALDI-TOF),方法是: $N_2$  激光源、波长 337nm、正离子方式检测、反射方式(加速电压 20KV,反射电压 23KV)、基质为  $\alpha$ -腈-4-羟肉桂酸( $\alpha$ -Cyno-4-hydroxycinnamic acid,CHCA)。质荷比(M/Z)为 1043.9,1065.9,1081.9 的离子峰分别为活性物质的  $[M+H]^+$ ,  $[M+Na]^+$ ,  $[M+K]^+$  峰。结果表明本发明分离的脂肽类抗生素 iturin A 的分子量分别为 1042.9Da(见图 8)。将分离得到的脂肽类抗生素 iturinA 用电喷雾碰撞活化解离质谱技术分析(仪器为美国应用生物公司生产的 Qtrap 3200ESI-MS),电喷雾条件为:喷雾电压 2.6kV、去簇电压 60V、正离子方式检测、碰撞气体为氮气。本发明分离得到的脂肽类抗生素 iturinA 产生的离子片断见图 9,图 9 中各峰是实验测定的质子化离子片断( $[M+H]^+$ )质荷比。根据 b 型碎片( $b_2 = 212.3$ ,  $b_3 = 299.2$ ,  $b_4 = 524.4$ ,  $b_5 = 638.5$ ,  $b_6 = 8014.1$ ,  $b_7 = 915.4$ )和 y 型离子碎片( $y_1 = 129.1$ ,  $y_2 = 243.4$ ,  $y_3 = 406.2$ ,  $y_4 = 520.4$ ,  $y_5 = 745.7$ ,  $y_6 = 832.4$ )的质荷比得到该脂肽类抗生素 iturin A 的肽段结构为 Pro-Asn-Tyr- $\beta$  AA-Asn-Tyr-Asn-Gln(Yu GY 等,Production of iturin A

by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. *Soil Biol Biochem*, 2002, 34 :955-963); 根据  $\beta$  AA ( $\beta$  氨基脂肪酸) 的质荷比  $M/Z = b_4 - b_3 = 225.2$ , 可以推断脂肪酸链的长度应为 14 个碳原子, 其质子化结构为  $-H_2N^+ = CH-C_{12}H_{25}-CO-$ , 根据以上分析, 本发明分离的枯草芽胞杆菌 X-01 产生的分子量为 1042.9Da 的抗生素属于 iturin A。

[0041] 实施例 3: 纯化的脂肽物质对油菜菌核病的离体防治实验

[0042] 用无菌水将从 X-01 菌株发酵液中纯化得到的脂肽类抗生素 iturin A 分别配成 100  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml 和 1  $\mu$ g/ml 的溶液后喷雾于油菜叶片 (油菜品种为 Westar, 五叶期) 上。方法是将油菜叶片置于垫有滤纸 (用无菌水浸湿) 的大玻璃平皿 (直径 20cm) 中, 每平皿 3 张叶片, 每处理 3 次重复, 每张叶片中央接种一个核盘菌菌丝块 (Let-27), 置 28℃、光/暗为 14h/10h 条件下培养 96h 后测量各处理的发病斑直径, 分别以清水和多菌灵 (市场上购买) 为阴性和阳性对照。按计算公式: 抑制率 (%) = (清水对照病斑直径 - 处理病斑直径) / 清水对照病斑直径  $\times$  100% 计算抑制率。实验重复 3 次, 取平均值。X-01 菌株产生的脂肽类抗生素 iturinA 浓度为 100  $\mu$ g/ml 时对油菜菌核病的防治效果达 100%, 浓度为 10  $\mu$ g/ml 时的防治效果达到 40.7%, 明显优于多菌灵, 说明本发明分离的 X-01 菌株产生的脂肽类抗生素 iturinA 对核盘菌有很强的抑制作用, 参见表 1。

[0043] 表 1 X-01 菌株产生的脂肽类抗生素 iturin A 对油菜菌核病的离体防治效果

	使用浓度	病斑直径	抑制率
	( $\mu$ g/ml)	(mm)	(%)
[0044]	100	0	100
	10	23.7	40.7
	1	35	12.5
	多菌灵(100 $\mu$ g/ml)	25.5	36.3
	清水对照	40	



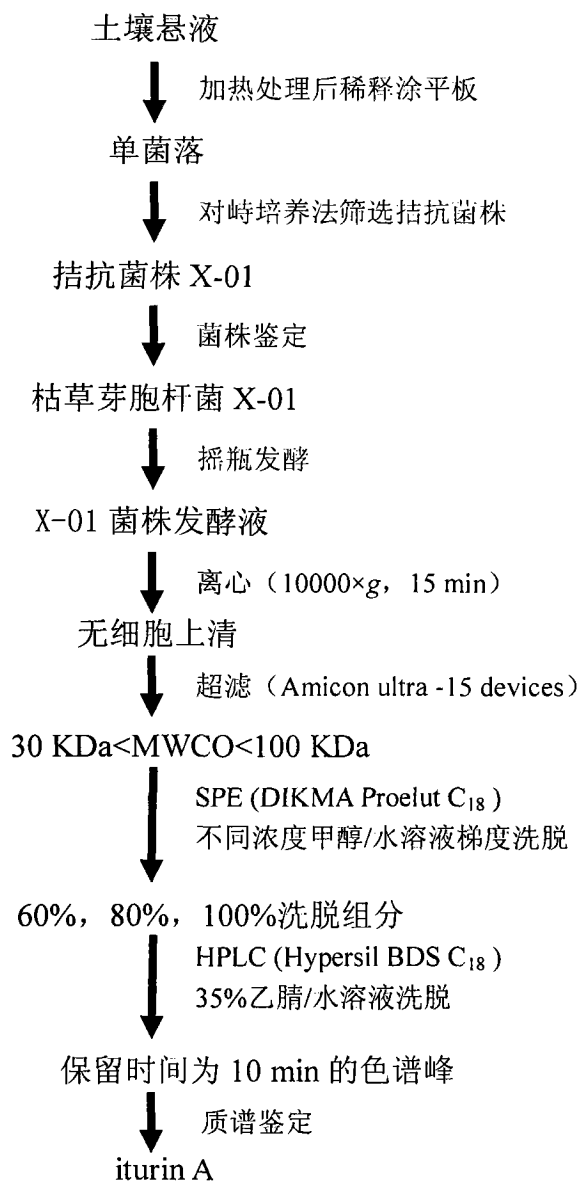


图 1

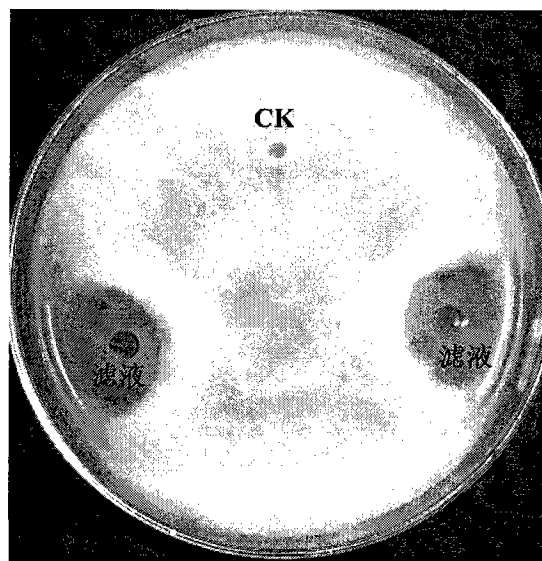


图 2

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGA  
GCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTG  
GGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGT  
TGTTTGAACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGA  
CCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGC  
CGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG  
GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCG  
TGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCCGT  
TCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGG  
CTCGCAGGCGGTTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCA  
TTGGAAACTGGGGAACCTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAGCGGT  
GAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAA  
CTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCC  
ACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCT  
AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAAT  
TGACGGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGA  
ACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTCGGGGG  
CAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAG  
TCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAG  
GTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC  
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGC  
GAGGTAAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGAC  
TGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC  
GGGCCTTGTAACACCCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACCCCGAAGTCGGTG  
AGGTAACCTTTTAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGT  
AACAAGGTAACC

图 3

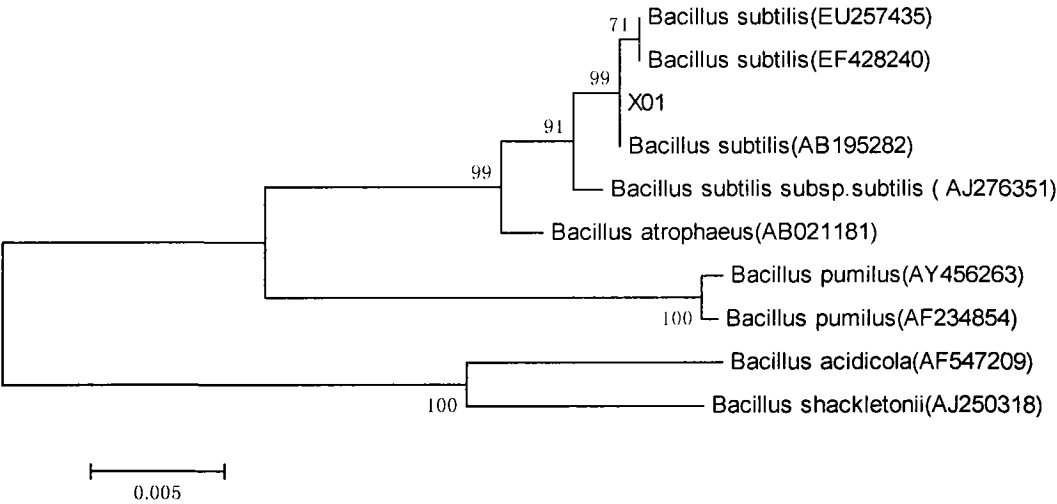


图 4

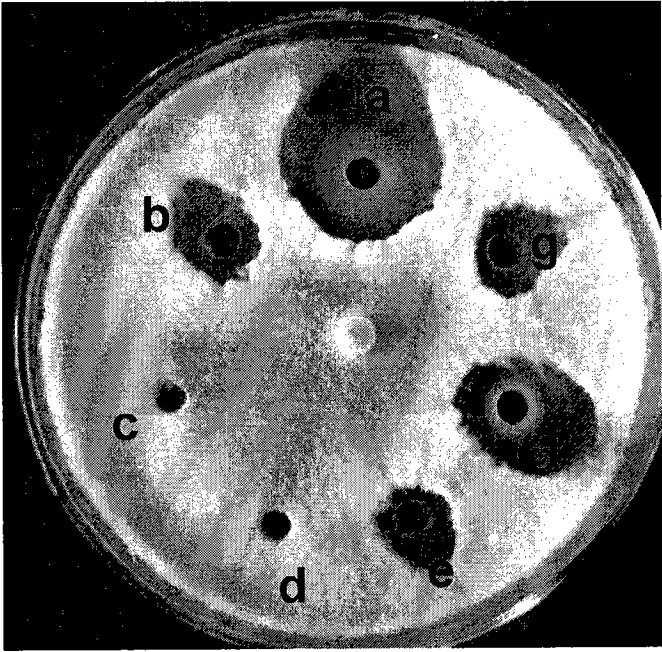


图 5

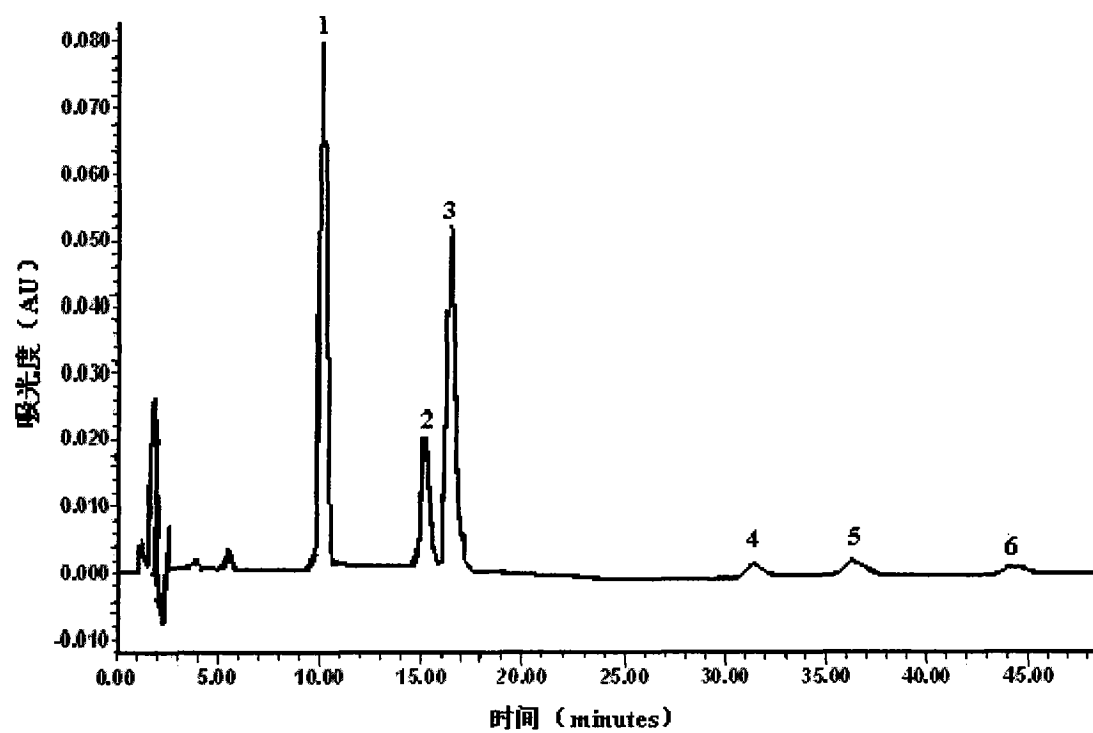


图 6

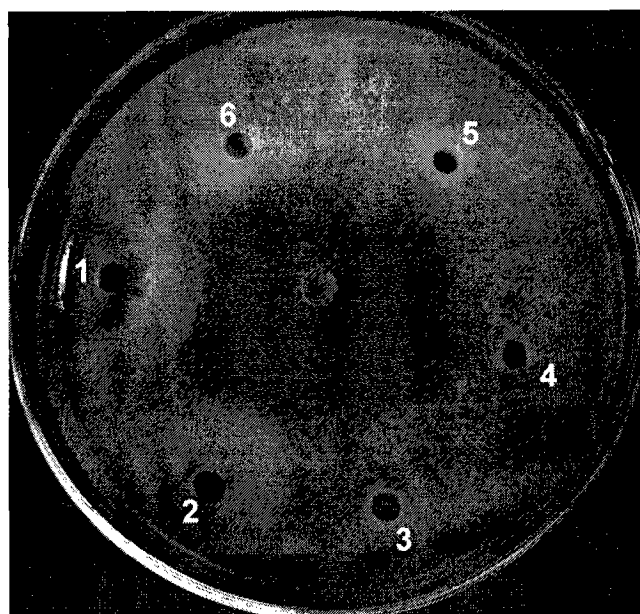


图 7

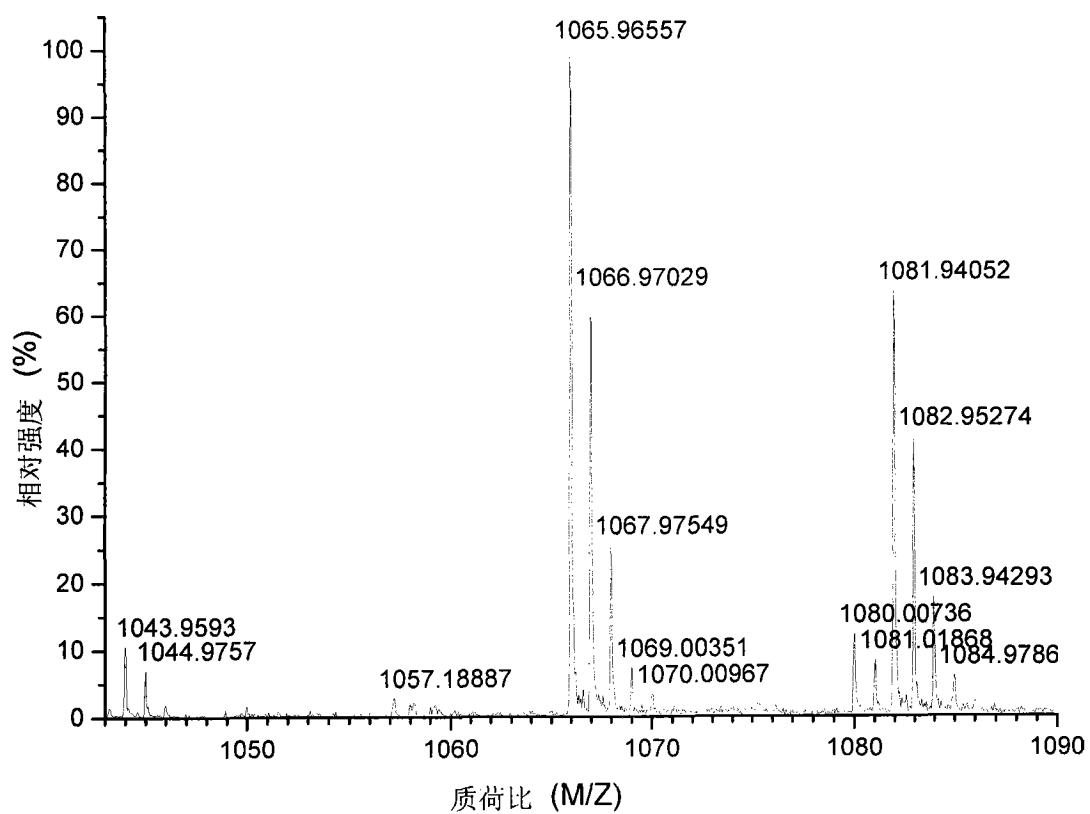


图 8

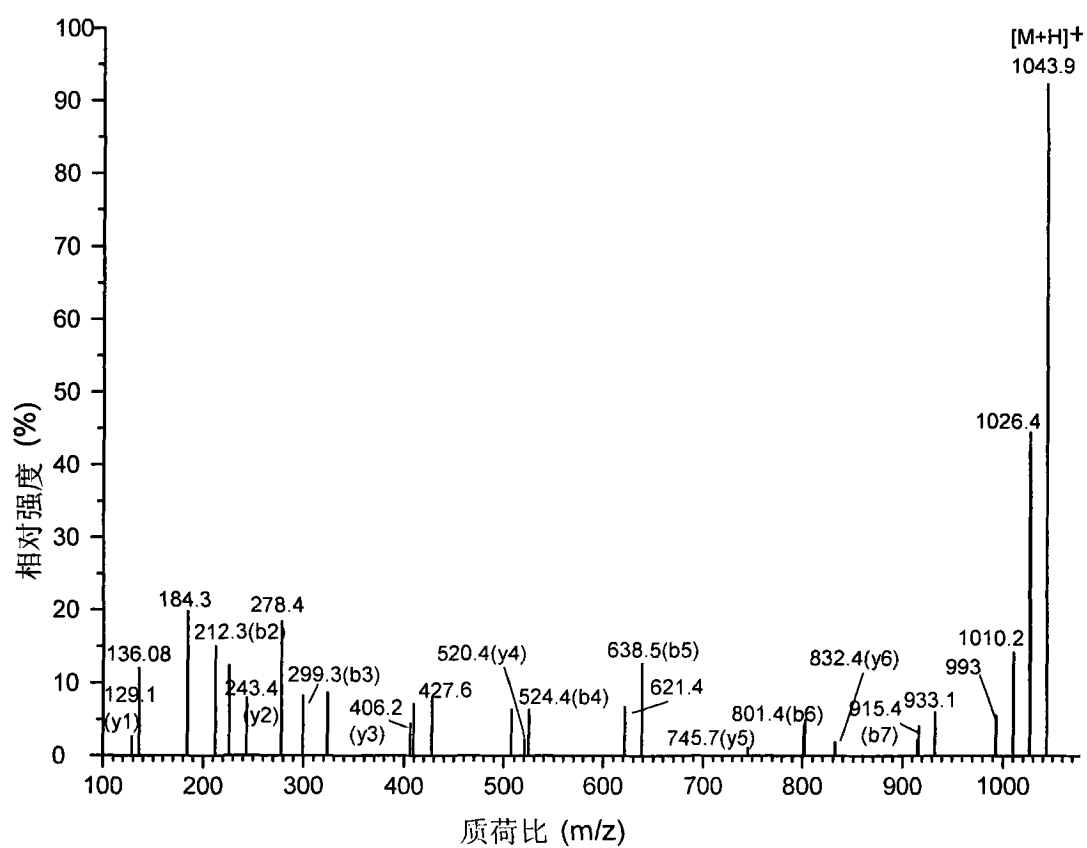


图 9