

田孟凡,戴威威,周佳慧,等. 大蒜内生贝莱斯芽孢杆菌促进蒜氨酸积累[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(12): 2283-2291.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2024.12.011

大蒜内生贝莱斯芽孢杆菌促进蒜氨酸积累

田孟凡^{1,2}, 戴威威^{1,2}, 周佳慧¹, 薛妍¹, 冯昭中¹, 王军娟^{1,2}

(1.江苏师范大学生命科学学院,江苏 徐州 221000; 2.江苏师范大学药用植物生物技术国家重点实验室培育点,江苏 徐州 221000)

摘要: 内生菌与植物之间存在着互利共生关系,它可以促进宿主植物中活性物质的积累。为探究大蒜内生菌能否促进大蒜活性物质蒜氨酸的积累,以贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) KLBMP108 和蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*) KLBMP81 为供试菌株,测定其对 3 个不同地区不同品种大蒜叶片中蒜氨酸含量的影响。结果表明,与对照相比,处理后第 6 d,菌株 KLBMP108 能使其宿主改良大蒜的蒜氨酸含量提高至 1.68 mg/mL,蒜氨酸裂解酶表达量显著提高;而对非宿主品种河南紫蒜以及云南苔蒜的蒜氨酸含量没有显著影响。分离自红豆杉的菌株 KLBMP81 处理的 3 种大蒜蒜氨酸含量均较低。本研究证实菌株 KLBMP108 能够提高其宿主改良大蒜叶片中蒜氨酸含量,是大蒜品种改良的宝贵微生物资源。

关键词: 大蒜; 大蒜素; 蒜氨酸; 蒜氨酸裂解酶; 内生菌; 贝莱斯芽孢杆菌

中图分类号: S633.4;S182 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)12-2283-09

Promotion of alliin accumulation by endogenous *Bacillus velezensis* in garlic

TIAN Mengfan^{1,2}, DAI Weiwei^{1,2}, ZHOU Jiahui¹, XUE Yan¹, FENG Zhaozhong¹, WANG Junjuan^{1,2}

(1.School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221000, China; 2.State Key Laboratory of Medicinal Plant Biotechnology, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221000, China)

Abstract: A mutually beneficial symbiotic relationship happens between endophytic bacteria and plants, which can promote the accumulation of active substances in the host plant. To investigate whether endophytic bacteria of garlic promote the accumulation of alliin, an active substance in garlic, *Bacillus velezensis* KLBMP108 and *Bacillus cereus* KLBMP81 were used as the test strains to determine their effects on the alliin content in leaves of three different varieties of garlic in different regions. The results showed that compared with the control, on the 6th day after treatment, the strain KLBMP108 could increase the alliin content of the improved garlic to 1.68 mg/mL, and the expression of alliinase was significantly increased. However, there was no significant effect on the alliin content of non-host varieties Henan purple garlic and Yunnan moss garlic. The alliin content of three kinds of garlic treated by strain KLBMP81 isolated from *Taxus chinensis* was low. In conclusion, strain KLBMP108 can increase the alliin content in its host Gailiang garlic leaves, and is a valuable microbial resource for garlic variety improvement.

Key words: garlic; allinin; alliin; alliinase; endophytic bacteria; *Bacillus velezensis*

收稿日期:2023-12-06

基金项目:徐州市科技计划项目基础研究计划青年科技人才项目(KC2022);国家自然科学基金青年科学基金项目(31801720)

作者简介:田孟凡(2000-),女,四川会理人,硕士研究生,主要从事内生菌与植物互作研究。(E-mail)Tianmengfan0526@163.com

通讯作者:王军娟,(E-mail)wj1139@jsnu.edu.cn

大蒜(*Allium sativum* L.)是仅次于洋葱的第二大广泛种植的蔬菜^[1],中国是全球大蒜产量以及出

口量最高的国家^[2]。大蒜是中国传统中药,具有抑菌消炎^[3]、强力杀菌^[4]、防癌抗癌^[5]、增强体质^[6]等功效,除含有丰富的甾体萜类、挥发性硫醚类化合物以及氨基酸类等物质之外,还含特殊的活性物质(有机含硫化合物),总称大蒜素^[7]。 γ -谷氨酰胺-S-烯丙基-L-半胱氨酸作为这些特殊的含硫物质的原始化合物,会被水解氧化生成蒜氨酸^[8]。当大蒜组织受到破坏时,液泡内的蒜氨酸裂解酶便会释放出来,导致蒜氨酸被分解,进而生成大蒜素^[8]。大蒜素性质较不稳定,容易被分解成各种挥发性含硫化合物,比如:S-反式-1-丙基-L-半胱氨酸亚砷(PECSO, 异蒜素)等^[8]。这些挥发性含硫化合物是味觉前体,调控着大蒜生长过程中鳞茎的味道和气味^[9]。大蒜素是大蒜中的关键生物活性分子^[10-11]。相关研究表明,大蒜素具有抗细胞凋亡和抗氧化的潜能^[12]。大蒜素不稳定,其前体物质为蒜氨酸(分子式为 $C_6H_{11}NO_3S$, 相对分子量为 177.22, 具有水溶性)^[1], 因此蒜氨酸含量对大蒜的品质有重要影响^[13]。

大蒜内除了有多种活性物质外,还具有丰富的内生菌资源。韦智钟等^[14]从大蒜中分离得到 28 株内生菌,其中 20 株为内生细菌。研究者对来自中国 10 个不同地区的大蒜鳞茎进行处理,分离出了 102 株大蒜内生菌,其中 92 株为内生细菌^[15]。Wang 等^[16]从生长在中国不同地点的健康大蒜鳞茎中共分离出 194 株内生菌,其中,暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)为优势菌。这些研究结果表明大蒜内生菌多为细菌,而芽孢杆菌属占绝大部分。已有研究表明植物内生细菌可以促进植物中次级代谢产物的合成,甚至它们自身也能产生与其宿主植物相同或相近的活性物质,比如从人参(*Panax ginseng* C.A.Meyer)根中分离的高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*) KX230132.1 可以作为一种有效的激发剂,促进人参中人参皂苷的合成和积累,与对照相比,人参皂苷含量增加了 4 倍^[17]。此外,内生细菌还可以直接参与人参中活性成分的生物转化,比如从人参中分离出 1 株内生菌 GE17-7,它能够将人参皂苷 Rb1 经人参皂苷 Rd 转化为人参植株内含量较低的 Rg3,这对于开发抗肿瘤化合物人参皂苷 Rg3 具有重要意义^[18]。Cao 等^[19]从红豆杉(*Taxus yunnanensis*)中分离出 1 株假双孢菌(*Pseudodidymocyrtis lobariellae*) KL27, 并发现 *P. lobariellae* 可以诱导参与紫

杉醇生物合成相关的多个关键基因的表达,进而提高红豆杉针叶中紫杉醇的积累,与对照相比,紫杉醇含量增加了 3.26 倍。李艳冰等^[20]从滇重楼(*Paris polyphylla* var. *yunnanensis*) 中分离到 23 株内生菌,通过筛选发现,人参生柱隔孢(*Cylindrocarpon* sp.) 和木霉菌(*Trichoderma viride*) 能够促进滇重楼组培苗中皂苷含量的积累,与对照相比,皂苷含量分别提高了 79.9% 和 75.7%。但是目前关于内生菌与大蒜之间的相互作用的研究较少。

实验室前期在对大蒜内生菌拮抗大蒜白腐病及其促进大蒜生长的研究中,发现 1 株不仅具有潜在的抗真菌活性,还能使大蒜产生浓郁辛辣味的菌株,经鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)^[16], 编号 KLBMP108。本研究拟以此为着手点,选用课题组前期从红豆杉中分离出的蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*), 编号 KLBMP81, 设置 LB 培养液(对照)、菌株 KLBMP108 发酵液、菌株 KLBMP81 发酵液 3 个处理,通过对改良大蒜、河南紫蒜、云南苔蒜 3 个不同地区、不同品种的大蒜茎基部处理后,采集处理后第 6 d(萌芽期)、第 20 d(幼苗期)、第 30 d(鳞茎膨大期)的大蒜叶片,初步探究菌株 KLBMP108 和菌株 KLBMP81 对不同地区、不同品种大蒜蒜氨酸含量的影响,以期对未来揭示内生菌促进宿主活性成分的积累提供一定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 改良大蒜由西北农林科技大学程智慧教授提供。河南紫蒜和云南苔蒜分别采集于中国河南开封和云南大理的大蒜种植基地。

1.1.2 供试菌株 贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis* KLBMP108 和蜡状芽孢杆菌 *B. cereus* KLBMP81 由江苏师范大学生命科学学院重点实验室保存和提供。

1.2 内生菌 KLBMP108 的形态学观察

挑取菌株 KLBMP108 于 LB 培养基上, 37 °C 恒温过夜培养 24 h, 随后观察菌株 KLBMP108 的菌落形态、颜色等特征; 挑取单菌落置于 LB 培养液中, 使用摇床 37 °C、180 r/min 培养 36 h, 培养好的菌液于离心机中 5 000 r/min 离心 10 min, 将收集的菌体用 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液反复漂洗 3 次, 确保漂洗干净。漂洗后的菌体用 2.5% 的戊二醛在 4 °C 冰箱中避光放置 12 h, 然后收集菌体,

再用 0.1 mol/L pH 7.2 磷酸缓冲液连续漂洗 3 次,漂洗后的沉淀物用体积分数为 25%、50%、75%、95% 的乙醇逐级洗脱,每梯度洗脱时间为 10 min,将洗脱后得到的沉淀冻干 24 h 以上,冻干完成后,采用离子溅射仪对制备好的样品进行真空镀金,最后使用扫描电子显微镜 (SEM) 观察菌株 KLBMP108 的表面形态。

1.3 内生菌 KLBMP108 16S rDNA 的序列比对分析

采用 TIANamp 细菌 DNA 试剂盒,对内生菌 KLBMP108 基因组 DNA 进行提取。然后使用细菌通用引物 [27F: 5'-AGAGTTTGATC (A/C) TGGCT-CAG-3'; 1492R: 5'-TACGG (C/T) TACCTTGT-TACGACTT-3'] 以及 Taq 酶 [宝日医生物技术(北京)有限公司产品] 进行 16S rDNA 扩增。反应条件为 95 ℃ 3 min; 随后 95 ℃ 30 s, 56 ℃ 30 s, 72 ℃ 45 s 进行 35 次循环; 最终 72 ℃ 7 min。使用 Sanger 测序对引物 27F 和 1492R 扩增出的产物进行测序,最后对测序结果进行序列比对分析。

1.4 内生菌 KLBMP108 系统发育树构建

采用 MEGA11 软件中的最大似然法构建内生菌 KLBMP108 系统发育树。通过总结、归纳、分析目的菌株和已知菌株之间的进化关系,确定所测菌株的种属。

1.5 内生菌的处理及植物样品采集

1.5.1 大蒜的种植 大蒜鳞茎表面消毒方法: 首先用自来水冲洗,待冲洗干净后,将大蒜鳞茎浸泡于 70% 乙醇中,持续 1 min,以去除表面杂质。然后,转入 0.3% 次氯酸钠溶液持续浸泡 20 min,以实现进一步的灭菌效果。随后,将大蒜鳞茎从上述溶液中取出,用无菌水冲洗 20 min,彻底去除残留消毒剂,然后用无菌滤纸吸干表面水分,此步骤重复 3 遍。随后,将大蒜鳞茎种植在装满消毒泥炭的花盆 (22 cm×15 cm×15 cm) 中。花盆定期浇水,并在 22~25 ℃ 的温室条件下培养,光照 16 h/黑暗 8 h 循环^[16]。

1.5.2 内生菌的处理 将内生菌 KLBMP108 和 KLBMP81 于 LB 培养液中培养 16 h 获得发酵液,然后将发酵液调整为 1.0 mL 1×10^8 个细胞的处理液,对照用等量 LB 培养液接种。分别将 0.5 mL 的 LB 培养液、菌株 KLBMP108 和 KLBMP81 发酵液滴在大蒜幼苗的茎基部周围,用无菌土覆盖,在 25 ℃ 条

件下黑暗保存 24 h,然后光照 16 h/黑暗 8 h 循环,持续处理 3 d^[16]。

1.5.3 样品的采集 于处理后第 6 d (萌芽期)、第 20 d (幼苗期)、第 30 d (鳞茎膨大期) 随机采集大蒜叶片,保存于超低温冰箱中备用。

1.6 实时荧光定量 PCR 检测大蒜叶片蒜氨酸裂解酶的表达水平

按照试剂盒所附说明书,运用 Plant RNA 试剂盒 (南京诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 从大蒜叶片组织中提取总 RNA。随后,使用定量 PCR 专用反转录试剂盒 [宝日医生物技术(北京)有限公司产品] 将已提取的 RNA 逆转录为 cDNA 备用。以大蒜的蒜氨酸裂解酶基因 (*Alliinase*) 为目的基因,以大蒜 α -微管蛋白基因 (*TUA*) 作为内参基因。采用 Primer Premier 5 设计相关引物,然后由生工生物工程(上海)股份有限公司合成相应引物 (表 1)。关于实时荧光定量 PCR,按照 RT-PCR 试剂盒 (北京聚合美生物科技有限公司产品) 配置反应体系如下: 5.0 μ L 的 2×M5 HiPer Realtime PCR Super mix (SYBR green, with antiTaq), 0.2 μ L 上游引物 (F) 以及 0.2 μ L 下游引物 (R), 1.0 μ L cDNA 模板和 4.5 μ L 无菌水。数据从 3 个独立的生物重复中收集,并评估无任何模板的阴性对照,以确保没有污染。反应条件包括 95 ℃ 加热 3 min; 然后 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 40 次循环,在 72 ℃ 30 s 处收集荧光,最后 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 1 min, 95 ℃ 15 s^[21]。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物列表

Table 1 The list of primers used in real-time fluorescent quantitative PCR

引物名称	引物序列 (5'→3')
<i>Alliinase</i>	F: TTTTGTAAAGACTCCACCATAGCC
	R: TTCTGCTGCCTTCATAGTCC
<i>TUA</i>	F: CCTAGAGCACGGTATTTCAG
	R: GCGGTAAGTTCAGTCTCT

1.7 高效液相色谱法测定大蒜叶片中的蒜氨酸含量

1.7.1 样品溶液的制备 进行试验前,用 m_1 表示 1.5 mL 离心管的重量。将存于超低温冰箱的样品取出,用液氮研磨后,装在对应的离心管中,称取重

量,用 m_2 表示。研磨的大蒜叶片重量为 $m = m_2 - m_1$ 。往离心管中注入样品体积 2 000 倍的无菌蒸馏水,振荡后,于常温放置至少 30 min。然后离心,用注射器吸取 500 μL 上清液,通过 0.22 μm 水相膜过滤到新的离心管中,封口后保存于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中^[22]。

1.7.2 检测方法: 高效液相色谱-质谱联用 (LC-MS/MS) 样品采用 Angilent1200 高效色谱仪 (Angilent, 美国) 串联 TripleTOF4600 质谱 (AB SCIEX, 美国) 进行分离,色谱柱为 Phenomenex C18 100 mm \times 2 mm, 色谱条件分别为: 柱温 $25\text{ }^\circ\text{C}$, 流速 0.4 mL/min, 进样量 20 μL 。流动相组成, A: 水, B: 乙腈。洗脱程序如下: 0 min, 100% A, 0 B; 20 min, 30% A, 70% B; 30 min, 30% A, 70% B; 40 min, 100% A, 0 B^[23]。

1.7.3 蒜氨酸含量计算 以蒜氨酸标准品的不同浓度为 X 轴, 吸收峰的峰面积为 Y 轴, 画出标准曲线, 得到两者间的线性关系^[13]。在此基础上, 按上述方法制备样品溶液进行高效液相色谱分析, 测出其对应的吸收峰面积, 将其代入到线性回归公式中, 进而计算出对应浓度。最后, 根据大蒜水分含量, 计算大蒜叶片中蒜氨酸的含量 (mg/mL)^[24]。

1.8 数据处理与分析

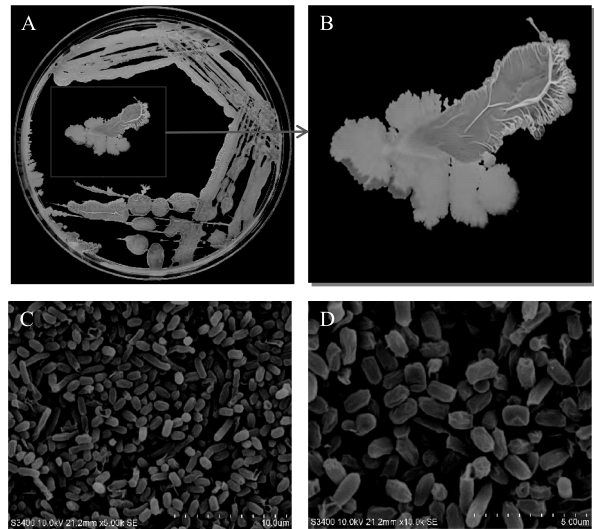
采用 Excel 2016 以及 GraphPad Prism 8.0 绘制图表。此外, 数据采用 SAS19.0 软件进行分析, 以单因素方差分析对组间差异进行显著性检验。通过比较, 标注不同小写字母用以区分相同时间点不同菌株处理组间的显著差异, 其中 $P < 0.05$ 即认为具有统计学意义, 以此确保研究结果的严谨性与可靠性。

2 结果与分析

2.1 内生细菌 KLBMP108 的形态及分子鉴定

菌株 KLBMP108 具有典型的芽孢杆菌形态特征, 其在 LB 培养基上为乳白色不透明菌落, 表面有褶皱, 边缘较不规则 (图 1A、图 1B)。通过扫描电子显微镜观察, 菌株 KLBMP108 的菌体呈杆状 (图 1C、图 1D)。

扩增后的 PCR 产物经纯化后测序, 用 BLAST 程序进行比对。结果 (表 2) 表明, 菌株 KLBMP108 的 16S rDNA 序列长度为 1 404 bp, 在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中与其最相关菌株为 *Bacillus velezensis* KKLW, 该相关菌株在 GenBank 的



A、B: 菌株 KLBMP108 的菌落; C、D: 扫描电子显微镜照片。

图 1 菌株 KLBMP108 的菌落和菌体形态

Fig.1 The colony and cell morphology of strain KLBMP108

序列登录号为 GP054714, 菌株 KLBMP108 与该相关菌株相似度为 99.93%; 菌株 KLBMP81 的 16S rDNA 序列长度为 1 456 bp, 在 NCBI 数据库中与其最相关菌株为 *Bacillus cereus* ATCC 21281, 该相关菌株在 GenBank 的序列登录号为 FJ501984, 两者相似度为 99.75%。

对菌株 KLBMP108 和 KLBMP81 的 16S rDNA 进行系统发育树分析, 结果 (图 2) 表明, 菌株 KLBMP108 和 KLBMP81 均隶属于芽孢杆菌属, 其中, 菌株 KLBMP108 与贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 形成一个分支, 进化距离最近, 反映出它们遗传关系最接近; 菌株 KLBMP81 与蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 同源性最接近。

2.2 不同菌株处理后改良大蒜叶片中蒜氨酸含量变化

对改良大蒜幼苗的茎基部分别进行菌株 KLBMP108 发酵液、菌株 KLBMP81 发酵液及 LB 培养液处理, 并于处理后第 6 d (萌芽期)、第 20 d (幼苗期)、第 30 d (鳞茎膨大期) 采集大蒜叶片, 测定标准样品和改良大蒜叶片中的蒜氨酸含量, 标准样品和改良大蒜叶片中蒜氨酸的高效液相色谱图如图 3 所示, 标准样品峰型较好, 出峰时间为 7.5 min, 改良大蒜叶片提取物也在该时间点下有相应的吸收峰。

表 2 16S rDNA 基因测序鉴定菌株 KLBMP108 和菌株 KLBMP81
Table 2 16S rDNA gene sequencing identification of strain KLBMP108 and strain KLBMP81

菌株	16S rDNA 序列长度 (bp)	NCBI 最相关菌株	最相关菌株 GenBank 序列登录号 (%)	相似度
贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i>) KLBMP108	1 404	贝莱斯芽孢杆菌 (<i>Bacillus velezensis</i> KKLW)	GP054714	99.93
蜡状芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>) KLBMP81	1 456	蜡状芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i> ATCC 21281)	FJ501984	99.75

NCBI;美国国家生物技术信息中心。

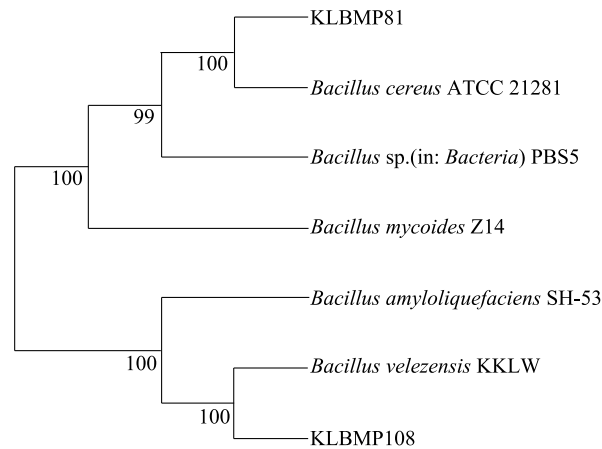


图 2 菌株 KLBMP108 和菌株 KLBMP81 的系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain KLBMP108 and strain KLBMP81

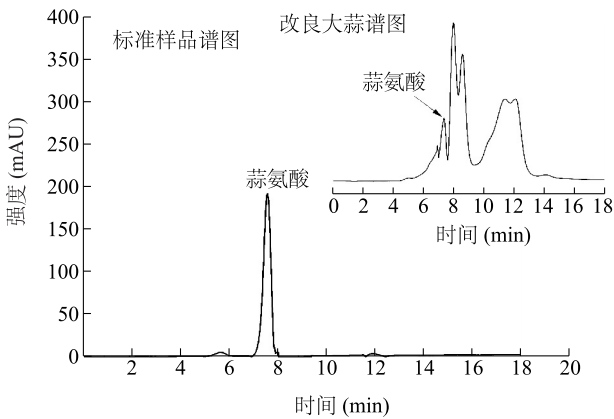
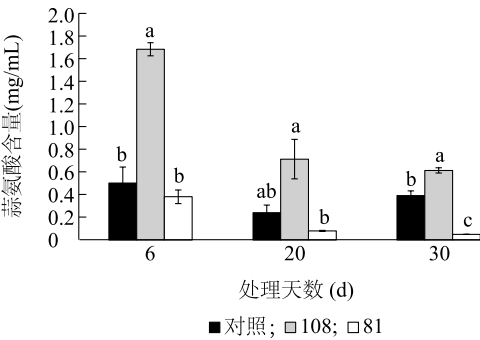


图 3 蒜氨酸标准样品和改良大蒜叶片样品的高效液相色谱图
Fig.3 High performance liquid chromatography of alliin standard and Gailiang garlic leaves

由图 4 可知,在处理第 6 d,菌株 KLBMP108 处理的改良大蒜叶片中的蒜氨酸含量达到峰值,约为 1.68 mg/mL,显著高于对照与菌株 KLBMP81 处理 ($P<0.05$)。处理后第 30 d,菌株 KLBMP108 处理后改良大蒜叶片中的蒜氨酸含量约为 0.61 mg/mL,但仍显著高于对照和菌株 KLBMP81 处理后的改良

大蒜蒜氨酸含量(图 4)。从处理后第 6 d 到处理后第 30 d,菌株 KLBMP81 处理后改良大蒜蒜氨酸含量从 0.38 mg/mL 减少到 0.05 mg/mL(图 4)。这些结果表明,菌株 KLBMP108 的处理,能促进其宿主改良大蒜的蒜氨酸含量积累,而菌株 KLBMP81 处理的改良大蒜蒜氨酸含量较低。



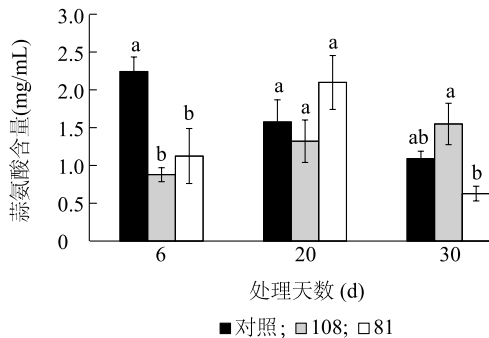
对照;LB 培养液处理组;108:菌株 KLBMP108 处理组;81:菌株 KLBMP81 处理组。图中不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P<0.05$)。

图 4 在不同菌株处理下改良大蒜叶片中蒜氨酸含量变化
Fig.4 Changes of alliin content in Gailiang garlic leaves under different treatments

2.3 不同菌株处理后河南紫蒜和云南苔蒜叶片中蒜氨酸含量变化

因改良大蒜在菌株 KLBMP108 处理后其叶片中的蒜氨酸含量整体高于对照,而菌株 KLBMP81 处理后其蒜氨酸含量变化不显著。在此基础上,采集了来自 2 个地区的不同品种的大蒜,进一步探究来自相同属但分离自不同宿主植物的内生菌是否会影响不同地区大蒜的蒜氨酸含量。图 5 表明,在对河南紫蒜处理后第 6 d,2 个菌株处理后的河南紫蒜叶片中的蒜氨酸含量均显著低于对照,均约为对照的 1/2,但菌株 KLBMP108 和 KLBMP81 处理之间无显著差异。而在处理后第 30 d,菌株 KLBMP108 处理的河南紫蒜叶片中的蒜氨酸含量高于菌株 KLBMP81 处理组,达到 1.55 mg/mL,但与对照无显著差异。菌株

KLBMP81 处理后的河南紫蒜叶片中的蒜氨酸含量于处理后第 20 d 达到峰值,为 2.10 mg/mL。以上结果表明,菌株 KLBMP108 和 KLBMP81 均不能提高非宿主植物河南紫蒜蒜氨酸的含量。



对照;LB 培养液处理组;108:菌株 KLBMP108 处理组;81:菌株 KLBMP81 处理组。图中不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

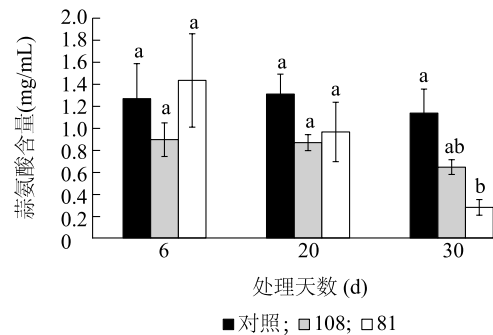
图 5 在不同菌株处理下河南紫蒜叶片中蒜氨酸含量变化

Fig.5 Changes of alliin content in Henan purple garlic leaves under different treatments

由图 6 可知,在处理后第 6 d 和第 20 d,菌株 KLBMP108 和 KLBMP81 处理后的云南苔蒜叶片中蒜氨酸含量与对照相比无显著变化(图 6)。但处理后第 30 d,菌株 KLBMP108 处理后云南苔蒜叶片中蒜氨酸含量为 0.64 mg/mL;而菌株 KLBMP81 处理后的云南苔蒜叶片中的蒜氨酸含量降低到 0.28 mg/mL,约为对照 1.13 mg/mL 的 1/4,与对照具有显著差异(图 6)。这些结果表明,内生菌 KLBMP108 对宿主植物改良大蒜和非宿主植物河南紫蒜和云南苔蒜的效果不同,这可能依赖于宿主植物和内生菌的关系。

2.4 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测改良大蒜叶片中蒜氨酸裂解酶的表达水平

为进一步探究菌株 KLBMP108 处理后改良大蒜中蒜氨酸裂解酶的表达情况,本研究运用实时荧光定量 PCR 检测改良大蒜叶片中蒜氨酸裂解酶的表达水平。结果(图 7)表明,菌株 KLBMP108 处理后的第 6 d,改良大蒜叶片中的蒜氨酸裂解酶的表达水平显著高于对照和菌株 KLBMP81 处理,约为对照的 36 倍,为菌株 KLBMP81 处理的 4.8 倍。菌株 KLBMP108 处理后第 20 d,改良大蒜叶片的蒜氨酸裂解酶表达量高于对照,但低于 KLBMP81 处理。最终,菌株 KLBMP108 处理第 30 d 后改良大蒜叶片

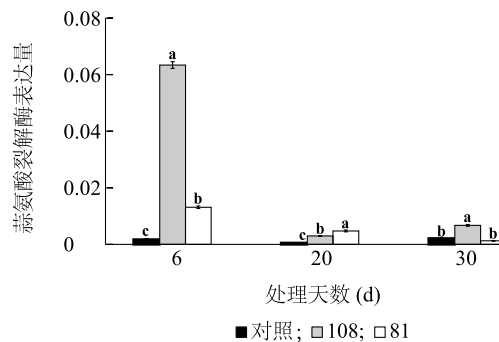


对照;LB 培养液处理组;108:菌株 KLBMP108 处理组;81:菌株 KLBMP81 处理组。图中不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 6 在不同菌株处理下云南苔蒜叶片中蒜氨酸含量变化

Fig.6 Changes of alliin content in Yunnan moss garlic leaves under different treatments

的蒜氨酸裂解酶表达量高于对照和菌株 KLBMP81 处理。在一定程度上,菌株 KLBMP108 处理后改良大蒜中蒜氨酸裂解酶表达量的变化趋势与其蒜氨酸含量变化趋势类似。



对照;LB 培养液处理组;108:菌株 KLBMP108 处理组;81:菌株 KLBMP81 处理组。图中不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

图 7 在不同菌株处理下改良大蒜叶片中蒜氨酸裂解酶表达水平

Fig.7 Expression levels of alliinase in Gailiang garlic leaves under different treatments

3 讨论

大蒜素作为大蒜中具有独特辛辣气味的物质,是国际上公认的大蒜活性物质^[25]。蒜氨酸作为大蒜素的前体物质,当大蒜组织受到破坏时,蒜氨酸便在蒜氨酸裂解酶的作用下被分解生成大蒜素^[8]。大蒜素性质极不稳定,容易分解^[26]。而蒜氨酸作为

它的前体物质,性质较为稳定,因此多采用稳定的蒜氨酸含量作为大蒜中的成分指标进行大蒜质量的监控^[8]。此外,蒜氨酸作为新鲜大蒜中含量最多的非蛋白质含硫氨基酸,安全无毒性、无刺激性气味,占大蒜含硫化合物的90%以上^[27]。蒜氨酸不仅具有抗炎^[28]、抗氧化^[29]、抗肿瘤^[30]、免疫调节^[31]等多种药理活性,还具有增强免疫力等保健功能^[32],在医药研制方面具有较大的应用前景。

相关研究结果表明,大蒜素在叶片中合成,为防止它们遭受微生物和食草动物的攻击,会将其转移到鳞茎以及芽中^[33-35]。在本研究中,菌株KLBMP108处理改良大蒜的第6 d(萌芽期),其叶片中蒜氨酸含量达到峰值,随着处理天数的增加,其叶片中的蒜氨酸含量逐渐下降,处理后第30 d(鳞茎膨大期)蒜氨酸含量最低。这可能是由于萌芽期大蒜素在大蒜叶片中合成,待大蒜生长至鳞茎膨大期,叶片中的大蒜素被运输至其鳞茎而造成的。

内生菌与宿主植物之间存在着一种互利共生关系。当宿主植物为内生菌提供养分的同时,内生菌不仅能够调节宿主植物的激素水平以及次生代谢物的合成,甚至这些内生菌本身也可以产生与其宿主植物相同或相近的生物活性物质,进而调控宿主植物生长以及协助宿主植物对抗逆境^[36]。本研究中,菌株KLBMP108处理后,促进其宿主改良大蒜叶片中蒜氨酸的积累;在qRT-PCR检测改良大蒜叶片蒜氨酸裂解酶表达量中,我们发现菌株KLBMP108处理同样提高了蒜氨酸裂解酶的表达水平。相关研究结果表明,对待不同的宿主植物,内生菌会通过调整其特有的微生物菌群的丰度,使其更好地适应宿主植物内部的微环境,从而维持其自身的竞争优势^[37]。本研究结果表明,与对照相比,菌株KLBMP81处理后改良大蒜、河南紫蒜和云南苔蒜叶片中的蒜氨酸含量并没有提高,这可能与菌株KLBMP81分离自红豆杉,本研究中3个地区的大蒜并非是其原始宿主,从而其与3种大蒜之间并未形成共生关系,或者与菌株KLBMP81自身调整有关。同样,菌株KLBMP108对河南紫蒜和云南苔蒜进行处理后,与对照相比,蒜氨酸含量几乎无显著变化。这可能与菌株KLBMP108在处理河南紫蒜和云南苔蒜2种非宿主植物时,菌株KLBMP108自身调整有关。以上结果表明,虽然菌株KLBMP81与KLBMP108同属芽孢杆菌属,但不同宿主来源的内

生菌其调控植物次级代谢产物的能力是有差异的。

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)是植物相关芽孢杆菌的模式物种^[38],因其可以产生种类丰富的具有特异性和互补性生物活性次级代谢物,在防治植物病害、促进作物生长发育中有较好的应用前景^[39]。近年来,国内外对贝莱斯芽孢杆菌的研究越来越多,主要针对其促进植物生长^[40]、拮抗病原菌^[39]、抑菌机理^[41]等方面,关于其促进植物活性物质的积累也有报道,比如*Bacillus velezensis* JB0319的接种显著增加了生菜(*Lactuca sativa* L.)中渗透调节物质脯氨酸(Pro)的积累^[42]。本研究中的菌株KLBMP108是1株贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*),我们发现该菌株能够促进其宿主改良大蒜叶片中蒜氨酸的积累。这说明贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)在促进植物活性物质积累方面具有较好的应用前景。

4 结 论

本研究发现,分离自红豆杉的菌株KLBMP81处理后的改良大蒜蒜氨酸含量较低,而分离自改良大蒜的菌株KLBMP108处理后改良大蒜叶片中的蒜氨酸含量较对照总体显著升高,同时,我们发现改良大蒜叶片中蒜氨酸裂解酶的表达水平也与其蒜氨酸含量变化趋势类似,以上结果表明,菌株KLBMP108能够促进其宿主改良大蒜叶片中的蒜氨酸的积累。综上,KLBMP108菌株作为既能拮抗大蒜白腐病病原菌,还能提高改良大蒜叶片中蒜氨酸含量的多功能菌株,是大蒜品种改良的宝贵微生物资源。

参考文献:

- [1] YANG X Q, SU Y R, WU J Y, et al. Parallel analysis of global garlic gene expression and alliin content following leaf wounding [J]. BMC Plant Biology, 2021, 21: 174.
- [2] 苏美琼, 杨柏崇, 成密红, 等. 大蒜的功效及综合利用研究进展 [J]. 西北农业学报, 2003, 12(4): 151-156.
- [3] SOLOMON K U, SOLOMON T D, ABEBE B G. Green synthesis method of ZnO nanoparticles using extracts of *Zingiber officinale* and Garlic Bulb (*Allium sativum*) and their synergetic effect for antibacterial activities [J]. Journal of Nanomaterials, 2023, 7036247. DOI:10.1155/2023/7036247.
- [4] SUNAINA S, RAGHAVENDRA S, BETUL R, et al. Comparison of time-kill assay to evaluate the antimicrobial efficacy of garlic (*Allium sativum*) and guava (*Psidium guajava*) extracts on perio-

- dontal pathogens[J]. Contemporary Clinical Dentistry, 2021, 12(4):389-395.
- [5] SAIKAT M, RAJIB D, TALHA B E, et al. Diallyl disulfide: a bioactive garlic compound with anticancer potential[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13:943967.
- [6] 杨燕, 王慧, 吕慎金. 不同比例大蒜皮对沂蒙黑山羊血清生化、免疫力及抗氧化功能的影响[J]. 饲料研究, 2021, 44(8):1-5.
- [7] 蒋茂婷, 黄雪松. 蒜氨酸生物活性的研究现状[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(16):264-269.
- [8] 许珂珂. 高效液相色谱法测定大蒜中蒜氨酸和大蒜素的含量[D]. 郑州: 郑州大学, 2015.
- [9] JONES M G, JILL H, ANGELA T, et al. Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(404):1903-1918.
- [10] KUBEC R, VELISEK J, MUSAH R A. The amino acid precursors and odor formation in society garlic (*Tulbaghia violacea* Harv.) [J]. Phytochemistry, 2002, 60(1):21-25.
- [11] LOU Z, WEI Q Q, WANG D W, et al. Effect of allicin on proliferation and apoptosis of KG-1 cells and its molecular mechanism[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2018, 43(12):2612-2617.
- [12] WU X M, LI X F, SONG Y D, et al. Allicin protects auditory hair cells and spiral ganglion neurons from cisplatin-induced apoptosis[J]. Neuropharmacology, 2017, 116:429-440.
- [13] 夏陈, 朱永清, 杨开俊, 等. 高效液相色谱法测定甘孜州大蒜有效成分蒜氨酸的含量[J]. 化学与生物工程, 2017, 34(9):67-70.
- [14] 韦智钟, 刘梦雅, 李真, 等. 大蒜内生菌的分离及其抑菌作用的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2013(12):5-9.
- [15] 李乐溪, 李丹, 张亮, 等. 大蒜内生菌的分离及拮抗菌株的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(5):97-101.
- [16] WANG J, SHI L, WANG D, et al. White rot disease protection and growth promotion of garlic (*Allium sativum*) by endophytic bacteria[J]. Plant Pathology, 2019, 68(8):1543-1554.
- [17] SONG X L, WU H, YIN Z H, et al. Endophytic bacteria isolated from panax ginseng improves ginsenoside accumulation in adventitious ginseng root culture[J]. Molecules, 2017, 22(6):837.
- [18] FU Y, YIN Z H, YIN C Y. Biotransformation of ginsenoside Rb1 to ginsenoside Rg3 by endophytic bacterium *Burkholderia* sp. GE17-7 isolated from Panax ginseng[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(6):1579-1586.
- [19] CAO X Y, XU L X, WANG J Y, et al. Endophytic fungus *Pseudodidymomyces lobariellae* KL27 promotes taxol biosynthesis and accumulation in *Taxus chinensis* [J]. BMC Plant Biology, 2022, 22(1):1-18.
- [20] 李艳冰, 林亮, 廖秋红, 等. 促进滇重楼皂苷类活性成分积累的内生真菌筛选[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2019, 34(1):132-137.
- [21] 吴家莹, 高玉忠, 宛雯, 等. *AsNAC570* 基因的克隆分析与调控蒜氨酸合成的初步探究[J/OL]. 分子植物育种, 2022; 1-8 [2023-11-06]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220715.1426.004.html>.
- [22] 王伟, 乔旭光, 李福伟. 高效液相色谱法测定大蒜中蒜氨酸含量[J]. 食品与发酵工业, 2006(4):115-117, 121.
- [23] 刘进玺, 何妮, 王亚平, 等. 高效液相色谱法测定大蒜中蒜素含量[J]. 食品工业科技, 2014, 35(23):286-289, 53.
- [24] 孙小鑫, 苗青, 王瑞海, 等. 大蒜冻干粉指纹图谱的建立及蒜氨酸含量测定[J]. 中国中医基础医学杂志, 2022, 28(2):291-296.
- [25] LAWSON L D, HUNSAKER S M. Allicin bioavailability and bioequivalence from garlic supplements and garlic foods[J]. Nutrients, 2018, 10(7):812.
- [26] WANG J, CAO Y P, SUN B G, et al. Effect of ultrasound on the activity of alliinase from fresh garlic[J]. Ultrasonics Sonochemistry, 2011, 18(2):534-540.
- [27] ZHAI B Q, ZHANG C H, SHENG Y, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effect of S-allyl-cysteine sulfoxide (alliin) in DIO mice[J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):3527.
- [28] LI X W, LUO J M, ZHANG C, et al. Alliin protects against inflammatory bowel disease by preserving the gene expression in colonic epithelial cells rather than altering gut microbiota[J]. Journal of Functional Foods, 2019, 59(1):309-318.
- [29] 梁哲瑞. 洋葱及其活性成分蒜氨酸对糖基化反应的抑制研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2019.
- [30] VASANTHI A R, MANSINGH D, DALPATI N, et al. Alliin the precursor of allicin in garlic extract mitigates proliferation of gastric adenocarcinoma cells by modulating apoptosis[J]. Pharmacognosy Magazine, 2018, 14(55):84-91.
- [31] ZHANG C, XIE J L, LI X W, et al. Alliin alters gut microbiota and gene expression of colonic epithelial tissues[J]. Journal of Food Biochemistry, 2019, 43(4):e12795.
- [32] ARDITTI F D, RABINKOV A, MIRON T, et al. Apoptotic killing of B-chronic lymphocytic leukemia tumor cells by allicin generated in situ using a rituximab-alliinase conjugate[J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2005, 4(2):325-331.
- [33] JONES M G, COLLIN H A, TREGOVA A, et al. The biochemical and physiological genesis of alliin in garlic[J]. Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology, 2007, 1(1):21-24.
- [34] YOSHIMOTO N, SAITO K. S-Alk(en)ylcysteine sulfoxides in the genus *Allium*: proposed biosynthesis, chemical conversion, and bioactivities[J]. Journal of experimental botany, 2019, 70(16):4123-4137.
- [35] NASIM S A, DHIR B, SAMAR F, et al. Sulphur treatment alters the therapeutic potency of alliin obtained from garlic leaf extract[J]. Food Chemical Toxicology, 2009, 47(4):888-892.
- [36] 刘圣越, 王跃飞, 何永志, 等. 内生真菌对宿主植物生长和次级代谢产物影响研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2021, 40(1):128-136.
- [37] WU W, CHEN W H, LIU S Y, et al. Beneficial relationships be-

- tween endophytic bacteria and medicinal plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12:646146.
- [38] SOFIJA A, AUGUSTIN R, ANTHONY A A, et al. Plant-associated *Bacillus* mobilizes its secondary metabolites upon perception of the siderophore pyochelin produced by a *Pseudomonas* competitor[J]. *The ISME Journal*, 2022, 17(2):263-275.
- [39] 马 爽. 贝莱斯芽孢杆菌 K-9 的筛选及其对马铃薯疮痂病生防机制的研究[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2023.
- [40] 迟惠荣, 张亚惠, 曾 欣, 等. 多花黄精内生贝莱斯芽孢杆菌的分离鉴定及其抗菌与促生作用分析[J]. *植物保护*, 2019, 45(4):122-131.
- [41] 周一凡. 罗氏沼虾病原非 O1/O139 群霍乱弧菌基因组特征及贝莱斯芽孢杆菌抑菌机理初探[D]. 扬州:扬州大学, 2023.
- [42] BAI Y S, ZHOU Y F, YUE T, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus velezensis* JB0319 promotes lettuce growth under salt stress by modulating plant physiology and changing the rhizosphere bacterial community[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2023, 213:105451.

(责任编辑:陈海霞)