

梁丽琼, 黄少莉, 邵杭, 等. 水稻基腐病菌拮抗菌解淀粉芽孢杆菌 E3 菌株的鉴定及抑菌活性 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42(4): 51-62.
LIANG Liqiong, HUANG Shaoli, SHAO Hang, et al. Identification of an antagonistic strain *Bacillus amyloliquefaciens* E3 against *Dickeya zeae* and its antimicrobial activity[J]. Journal of South China Agricultural University, 2021, 42(4): 51-62.

水稻基腐病菌拮抗菌解淀粉芽孢杆菌 E3 菌株的鉴定及抑菌活性

梁丽琼, 黄少莉, 邵杭, 王庆伟, 王鑫, 王俊霞, 徐领会

(华南农业大学 群体微生物研究中心/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】纯化和鉴定从柑橘根际土壤分离得到的可抑制水稻基腐病菌 *Dickeya zeae* EC1 生长的解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*, 并解析其抑菌机制。【方法】采用平板扩散法从根际土壤中筛选出 1 株拮抗 *D. zeae* EC1 的 *B. amyloliquefaciens* E3 菌株; 根据细菌菌落表型、生理生化特征结合 16S rDNA 序列分析等方法对 E3 菌株进行分类鉴定; 检测无菌 E3 培养液对 *D. zeae* EC1 侵染水稻种子能力的影响; 盐酸沉淀结合丙酮抽提法提取 E3 菌株脂肽粗提物; 采用平板对峙法测定 E3 菌株脂肽粗提物对病原真菌的抑菌活性, 琼脂扩散法测定 E3 菌株脂肽粗提物对病原细菌的抑菌活性及最小抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC); 用 Durashell C18 柱对脂肽粗提物进行 HPLC 分离纯化; 通过液相色谱-质谱联用 (LC-ESI-MS) 分析, 鉴定抑菌物质的相对分子质量并推测其化学组成。【结果】*B. amyloliquefaciens* E3 菌株对茄病镰刀菌 *Fusarium solani*、香蕉基腐病菌、茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 等多种植物病原菌生长具有抑制作用, 表现为广谱抗性; *B. amyloliquefaciens* E3 菌株的无菌培养液能够抑制 *D. zeae* EC1 侵染萌发的水稻种子, 显著提高水稻种子的萌芽率; *B. amyloliquefaciens* E3 菌株的脂肽粗提物可以抑制 *D. zeae* EC1 的生长, 其 MIC 为 348.97 $\mu\text{g/mL}$; HPLC 分离纯化结合 LC-ESI-MS 分析发现, *B. amyloliquefaciens* E3 菌株分泌的主要抑菌活性物质包括 Surfactin、Fengycin 和 Iturin 3 类脂肽类抗生素。【结论】*B. amyloliquefaciens* E3 菌株具有作为生防菌的潜力, 它可能通过分泌 Surfactin、Fengycin 和 Iturin 3 种脂肽类抑菌活性物质, 拮抗水稻基腐病菌、茄科劳尔氏菌、茄病镰刀菌等多种植物病原菌。研究结果可为该菌的生物防治应用提供理论依据。

关键词: 水稻基腐病菌; 解淀粉芽孢杆菌; 抑菌活性; 脂肽类粗提物

中图分类号: S476; S435.111.49

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2021)04-0051-12

Identification of an antagonistic strain *Bacillus amyloliquefaciens* E3 against *Dickeya zeae* and its antimicrobial activity

LIANG Liqiong, HUANG Shaoli, SHAO Hang, WANG Qingwei, WANG Xin, WANG Junxia, XU Linghui
(Integrative Microbiology Research Centre, Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】 To isolate and identify *Bacillus amyloliquefaciens* strain which can inhibit the growth of *Dickeya zeae* EC1 from the rhizosphere soil of citrus plants, and analyze its antibacterial mechanism. 【Method】 The *B. amyloliquefaciens* E3 strain antagonizing the growth of *D. zeae* EC1 was screened from the

收稿日期: 2020-09-23 网络首发时间: 2021-04-02 11:08:15

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20210402.0908.002.html>

作者简介: 梁丽琼 (1989—), 女, 硕士, E-mail: 1219446912@qq.com; 通信作者: 王俊霞 (1972—), 男, 副教授, 博士, E-mail: junxiawang@scau.edu.cn; 徐领会 (1971—), 女, 教授, 博士, E-mail: xulinghui@scau.edu.cn

基金项目: 广东省公益研究与能力建设专项 (2017A020208053); 广东省重点领域研发计划 (2018B020205003); 973 计划 (2015CB150600)

rhizosphere soil by plate diffusion method. The E3 strain was classified and identified based on colony phenotype, physiological and biochemical characteristics of bacteria and 16S rDNA sequence analysis. Effects of E3 sterile culture medium on the seeds germination ability of rice infected by *D. zea* EC1 was detected. The crude lipopeptides of E3 strain was extracted by hydrochloric acid precipitation combined with acetone extraction. The antimicrobial activity of crude lipopeptides against pathogenic fungi were determined by plate confrontation method. The antimicrobial activity of crude lipopetides against pathogenic bacteria were determined by agar diffusion method, and the minimum inhibitory concentration (MIC) was obtained. The crude lipopeptides were separated and purified by HPLC with Durashell C18 column. Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-ESI-MS) analysis was used to identify the molecular weights of the antimicrobial substances and speculate its chemical composition. 【Result】 *B. amyloliquefaciens* E3 strain had an inhibitory effect against *Fusarium solani*, *D. zea* MS1 and *Ralstonia solanacearum*, etc, indicating that it had broad-spectrum resistance. The sterile culture medium of *B. amyloliquefaciens* E3 strain inhibited the infection of germinating rice seeds by *D. zea* EC1 and significantly increased the seed germination rate. The crude lipopeptides of E3 strain inhibited the growth of *D. zea* EC1 with the MIC of 348.97 $\mu\text{g/mL}$. HPLC combined with LC-ESI-MS analysis showed that the main antibacterial substances secreted by E3 strain included surfactin, fengycin and iturin. 【Conclusion】 The *B. amyloliquefaciens* E3 strain is potential to be a biocontrol agent. It can antagonize a variety of plant pathogens such as *D. zea* EC1, *R. solanacearum* and *F. solani* by secreting three kinds of lipopeptides including surfactin, fengycin and iturin. The results provide a theoretical basis for the application of *B. amyloliquefaciens* E3 in biological control.

Key words: *Dickeya zea*; *Bacillus amyloliquefaciens*; antibacterial activity; crude lipopeptides

水稻基腐病是由玉米狄克氏菌 *Dickeya zea* 引起的水稻重要病害之一^[1-2]。该病在东南亚一些国家及中国的 15 个省水稻产区均有报道,近年来其在我国有不断蔓延和加重的趋势^[3],是影响我国水稻生产安全的潜在威胁之一。培育抗病品种和喷施化学药剂是目前防控水稻基腐病的主要途径。水稻细菌性基腐病的发生流行快,容易错过最佳防治时间,导致防治效果不佳^[4]。同时化学农药的普遍使用和用量增加也带来了一系列问题,包括病原细菌抗药性增强和环境污染等。近年来有关生防菌防治植物病害的报道方兴未艾,生防菌已成为植物病害生物防治的研究热点^[5]。绝大多数芽孢杆菌属细菌是非致病菌或益生菌,其广泛栖息在自然环境中。该属约 5%~8% 的基因合成次生代谢产物,产生几十种拮抗其他病原菌的活性物质,并具有促进植物生长的作用^[6],有关芽孢杆菌防治水稻细菌性基腐病的研究鲜见报道。芽孢杆菌分泌的抗菌物质主要有脂肽类化合物^[7]、挥发性化合物^[8]和抗菌蛋白^[9]等。研究表明芽孢杆菌产生的 Fengycin 类和 Iturin 类家族的脂肽类化合物在抑制真菌病害中起着重要作用^[10]。Cho 等^[11]研究表明,枯草芽孢杆菌 KS03 产生的主要抗菌化合物 Iturin A 能有效抑制炭疽病菌生长,具有强抗真菌活性。研究表明

Fengycins 能破坏病原真菌菌丝的超微结构, Fengycins 处理后,真菌细胞膜表面的张力降低,形成微孔,细胞壁遭到破坏^[12-13]。Surfactin 是一类强大的生物表面活性剂,能诱导植株产生系统抗性^[14-15]。Cawoy 等^[16]研究发现,枯草芽孢杆菌 S499 产生 Surfactin 的能力与其产生诱导抗性物质能力、对灰霉病 *Botrytis cinerea* 的抵御能力均呈正相关。目前有关水稻基腐病生防菌的研究报道很少,开展对解淀粉芽孢杆菌抗菌物质机理的研究可以为水稻基腐病菌的生物防治提供新的资源,为研制和发掘新型抗菌药物提供理论基础。

本研究从柑橘根际土壤中筛选和鉴定 1 株拮抗水稻基腐病菌 *Dickeya zea* EC1 生长的 *Bacillus amyloliquefaciens* E3 菌株,对其抑菌谱、生防能力、次级代谢产物进行研究,为该菌株的进一步开发应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Dickeya zea EC1 菌株^[17]由华南农业大学群体微生物研究中心张炼辉老师课题组馈赠。黑曲霉 *Aspergillus niger*、黄曲霉 *Aspergillus flavus*、茄病镰刀菌 *Fusarium solani*、雪腐镰刀菌 *Fusarium nivale*、

洋葱伯克氏菌 *Burkholderia cenocepacia* H111、香蕉基腐病菌 *Dickeya zeae* MS1、柑橘溃疡病菌 *Xanthomonas citri* pv. *citri* 菌株 jx-6、水稻基腐病菌 *Dickeya zeae* EC1、茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* GMI1000、大肠埃希菌 *Escherichia coli* DH5 α 均由群体微生物研究中心实验室保存。

NYD 培养基:牛肉膏 8 g/L, 酵母提取物 3 g/L, 葡萄糖 1 g/L; YPG 培养基:酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L; YPD 培养基:酵母提取物 10 g/L, 胰蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L; YSB 培养基:蔗糖 20 g/L, 酵母提取物 20 g/L, 牛肉膏 15 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.06 g/L, FeSO₄·7H₂O 0.009 g/L; BYP 培养基:牛肉膏 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, 葡萄糖 10 g/L, NaCl 5 g/L; LB 培养基:酵母提取物 5 g/L, 蛋白胨 20 g/L, NaCl 20 g/L, 固体培养基则在 1 L LB 液体培养基的基础上加 15 g 琼脂粉。

Bio-RAD C1000 Touch PCR 仪(美国 Bio-rad 公司生产), G154DWS 立式压力蒸汽灭菌锅[致微(厦门)仪器有限公司], LYNX 6000 大型台式冷冻离心机(美国 Thermo 公司生产), Waters 2998 制备型液相色谱(美国 Waters 世公司生产), Agilent 1260 infinity 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司生产), 色谱柱为 Durashell C18 柱(10 mm×250 mm×5 μ m), 多功能酶标仪(BioTek 公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 水稻基腐病菌拮抗菌株筛选 *D. zeae* EC1 拮抗菌的筛选以水稻基腐病菌 *D. zeae* EC1 为指示菌,该菌株全长基因组序列已在 NCBI GenBank 上公开,序列号为 NCBI Reference Sequence: NZ_CP006929 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NZ_CP006929.1),采用平板扩散法筛选拮抗菌株。将 *D. zeae* EC1 单菌落接种于 LB 液体培养基,28 $^{\circ}$ C、200 r/min 震荡培养至 $D_{600\text{ nm}}$ 约 1.0 时,以 1:100 的体积比将 *D. zeae* EC1 菌液加入约 40 $^{\circ}$ C 的 15 g/L 的 LB 琼脂培养基内,混匀后每个培养皿内倒入 15 mL 的培养基,得到含 *D. zeae* EC1 的 LB 固体培养基。

取湖南省 1 个柑橘园的根际土壤 1 g 加到 10 mL 无菌水中,以 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 振荡培养 30 min 后,用水稀释,稀释梯度为 10 \times 、100 \times 和 1000 \times ,取 100 μ L 各梯度的稀释液涂布于已经配制好的含有 *D. zeae* EC1 的 LB 固体培养板上。平板风干后放置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱内静置培养 48 h 后,选取有抑菌圈的单菌落划线于新的 LB 固体培养板上培养至长出单菌落,保存菌种用于进一步的验证。

挑取初筛得到的拮抗菌株单菌落,分别接种于含有 200 μ L LB 液体培养基的 96 孔培养板中,置于 28 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 12 h 后,分别取 10 μ L 菌液,加入含有 *D. zeae* EC1 的 LB 固体培养皿中央的直径 5 mm 的孔内,28 $^{\circ}$ C 培养箱静置培养 24 h,检测是否有抑菌圈,并检测其直径大小。试验共筛选到产生抑菌圈的菌株 19 株,本研究选取其中抑菌圈最大,直径约 20 mm 的菌株为研究对象,保存该菌株,并命名为 E3。

1.2.2 E3 菌株的形态、生理生化特征测定及 16S rDNA 序列分析 将菌株 E3 划线到 LB 培养基上,28 $^{\circ}$ C 条件下培养 24 h 观察菌落形态。按照标准方法参照 MS(i)/C005-C01^[18-19],对菌株 E3 进行生理生化检测。测定的生化指标包括接触酶、苯丙氨酸脱氢酶、氧化酶活性等。

参照文献[20]的方法,以 E3 菌株基因组 DNA 为模板,选用引物 F27(5'-AGAGTTTGATCA TGGCTCAG-3')和 R1492(5'-TACGGTTA CCTTGTTACGACTT-3'),PCR 扩增 16S rDNA 基因片段。PCR 产物用 DNA 凝胶回收纯化试剂盒纯化后,委托北京擎科生物科技有限公司测序。将所得序列通过 NCBI 数据库进行 Blast 同源性分析,并采用 MEGA5.0 软件构建系统发育树。结合菌落菌体形态及其生理生化特征,对 E3 菌株进行分类鉴定。

根据文献[21]的方法合成 2 对引物 Bsu-man-1F:5'-CAGGCTCACACTTTGCTTG-3'、Bsu-man-1R:5'-TGAACACAGTCCTGGGTTAG-3'和 Bam-man-1F:5'-TCGGTTT CACATCCTTCATC-3'、Bam-man-1R:5'-TTTGT CAGCGTGTCTTCTG-3'。引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.2.3 E3 菌株无菌培养液抑菌活性最优培养基的筛选 根据文献[22]的方法,筛选抑菌物质活性最优的培养基。配制了 NYD、YPG、YPD、YSB 和 BPY 5 种培养基。将 E3 接种到含有 20 mL 培养基的 50 mL 三角瓶中,28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 72 h。E3 培养液 8 000 r/min 离心 15 min,弃沉淀收集上清液,上清液用 0.2 μ m 的细菌过滤器过滤,吸取 10 μ L 无菌培养液,采用琼脂扩散法测试抑菌活性,每种培养基重复 3 次,记录抑菌圈直径,用 GraphPad 绘制图表。

1.2.4 E3 菌株无菌培养液对 *D. zeae* EC1 侵染水稻种子能力的影响 采用纸培法^[23]测定 E3 菌株对 *D. zeae* EC1 侵染水稻种子能力的影响。选取健康饱满的水稻种子('金刚 30'),用双蒸水冲洗 4 次备用。首先,准备 9 份水稻种子,每份包含 30 粒种子;其中 8 份用于接种 *D. zeae* EC1 并分为接种对

对照组 (4 份) 和接种试验组 (4 份), 每组的 4 份种子进行相同的接种程序, 分别用 1.4×10^6 、 1.4×10^5 、 1.4×10^4 和 1.4×10^3 CFU/mL 的 *D. zeae* EC1 菌液浸泡, 在 28 °C 条件下浸泡 5 h 后, 用无菌水冲洗种子 3 次; 另外 1 份用无菌水处理作为空白对照。将这 9 份种子分别置于垫有 3~4 张滤纸 (无菌水湿润) 的培养皿中, 放入恒温培养箱, 培养设置参数为: 昼夜温度为 30 °C/20 °C, 光照时间为 16 h。在保湿培养 24 h 后, 接种试验组的种子喷洒 2 mL 无菌 E3 培养液, 使每一粒种子均匀覆盖培养液, 接种对照组和空白对照则采用相同方法用 YPG 培养基处理。置于培养箱保湿培养每天观察种子萌发情况, 4 d 后统计种子萌发情况, 计算萌芽率。试验重复 3 次。

1.2.5 E3 菌株分泌的脂肽类物质提取及活性测定 采用盐酸沉淀结合丙酮抽提的方法来提取脂肽类物质^[24-25]。接种 E3 单菌落至 500 mL YPG 液体培养基, 在 28 °C、200 r/min 条件下, 振荡培养 3 d。取 E3 菌株 YPG 培养液, 于 8 000 r/min 离心 15 min 后, 弃沉淀, 取上清液, 边搅拌边缓慢加入 HCl, 调整 pH 至 2.0, 4 °C 条件下静置过夜。8 000 r/min 离心 15 min, 倒去上清液, 收集沉淀物, 用 5 倍体积的丙酮重悬后, 8 000 r/min 离心 15 min, 收集丙酮有机相, 沉淀再次用丙酮重悬、离心, 重复收集抽提液。混合 2 次丙酮抽提液, 放置于通风橱内风干后, 得到脂肽粗提物干粉。用甲醇溶解后, 采用 0.2 μm 的有机滤膜过滤器除菌, 得到 E3 脂肽粗提物溶液, 采用 Abbkine BCA 蛋白定量试剂盒测量质量浓度。采用琼脂扩散法测定其抑菌活性。

1.2.6 E3 菌株粗提脂肽类物质的抑菌谱测定 参照文献 [26], 采用平板对峙法测定 E3 菌株对真菌的抑菌活性。在 PDA 平板上选取适当的位置放置 2 块菌饼, 在菌饼中间位置用 5 mm 的打孔器打孔, 加 10 μL 粗提脂肽溶液, 质量浓度为 5 583.5 μg/mL, 28 °C 条件下培养 3~5 d 后观测并记录有无抑菌带产生。细菌抑菌活性测试采用琼脂扩散法, 测试粗提脂肽对大肠埃希菌、柑橘溃疡菌、水稻基腐病菌、茄科劳尔氏菌、洋葱伯克氏菌、香蕉基腐病菌的抑菌活性, 在含有相应病原菌的 LB 平板上用 5 mm 的打孔器打孔, 加 10 μL 粗提脂肽溶液, 质量浓度为 5 583.5 μg/mL, 28 °C 条件下培养, 观察有无抑菌圈产生。

1.2.7 E3 菌株抑菌脂肽类物质的最小抑菌浓度 (MIC) 测定 挑取 EC1 单菌落于 10 mL LB 培养基中, 28 °C、200 r/min 培养过夜, 将培养好的 EC1 菌液, 按照 1:100 的体积比接种到新鲜的 LB 培养基

中, 混匀后, 取 100 μL 加入到 96 微孔板中。取 100 μL 脂肽类溶液 (浓度为 5 583.5 μg/mL) 与微孔板的培养基混合均匀, 梯度稀释从 2^0 到 2^{-12} , 设置仅 200 μL LB 培养基和 200 μL 粗提脂肽类物质溶液为阴性对照, 接种 EC1 的 LB 作为阳性对照, 将 96 孔板置于 28 °C、200 r/min 的摇床中培养 24 h, 用酶标仪测量 $D_{600\text{nm}}$, 记录数据并用 GraphPad 作图。

1.2.8 E3 菌株抑菌脂肽类物质的分离纯化 脂肽粗提物经琼脂扩散法抗菌活性检测后, 采用半制备型高效液相色谱 (美国 Agilent 1260 Infinity I 液相色谱系统) 进行进一步的分离纯化。色谱柱为 C18 柱 (5 μm × 10 mm × 250 mm), 流动相 A: 体积分数为 0.1% 的甲酸水溶液, B: 乙腈; 等梯度洗脱: $V(A):V(B) = 20:80$; 检测波长: UV 200~400 nm, 流速: 3 mL/min。每 5 min 收集 1 管, 共收集 8 个组分, 浓缩后进行抑菌活性测定。

1.2.9 E3 菌株抑菌活性物质的鉴定 ESI-MS 技术是分析脂肽化合物复合体中各组分的相对分子质量及分子结构的有效工具。对于相对分子质量小于 1 000 的小分子, ESI-MS 技术会产生 $[M+H]^+$ 或 $[M-H]^-$ 离子, 选择相应的正离子或负离子形式进行检测, 就可得到其相对分子质量^[27]。本研究采用 Thermo UPLC-Q Exactive Focus Orbitrap 液相质谱联用分析仪进行 LC-ESI-MS 分析, 色谱检测条件: 色谱柱: Waters HSS T3 柱 (2.1 mm × 100 mm × 1.8 μm); 流速 0.3 mL/min, 溶剂: 流动相 A 为纯水 (加体积分数 0.1% 的甲酸), 流动相 B 为乙腈, 洗脱程序为: 0~15 min: 80%~100% B, 15~20 min: 100% B。质谱检测条件: 离子源: H-ESI, 喷雾电压 4.0 kV, 鞘气流速: 40 psi, 辅气流速: 10 psi, 离子传输管温度: 320 °C; 电离模式: Positive; 全扫描模式, 扫描范围 m/z : 850~2 000。

2 结果与分析

2.1 水稻基腐病菌拮抗菌株的鉴定

采用平板抑菌法从湖南柑橘果园根际土壤中分离、筛选拮抗水稻基腐病菌生长的细菌, 共筛选到 19 个菌株, 其中, E3 菌株抑菌圈直径最大, 达 20 mm, 因此选其作为研究对象。E3 菌株在 LB 平板划线, 28 °C 条件下培养 2 d 后, 菌落呈白色不透明、圆形、边缘不整齐, 呈锯齿状、表面干燥、有褶皱 (图 1)。对该菌株进行生理生化分析 (表 1) 发现, E3 菌株接触酶、V-P 试验和硝酸盐还原反应呈阳性, 耐高盐, 适宜生长的 pH 范围为 5.7~6.8, 可以利用柠檬酸和酪蛋白作为能量来源, 并能够降解淀

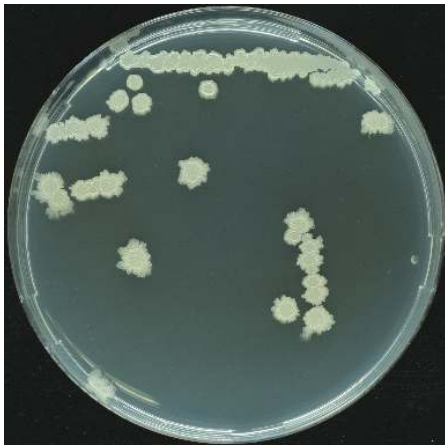


图 1 E3 菌落形态图

Fig. 1 Colony morphology of strain E3

粉、明胶和酪素。

对 E3 菌株的 16S rDNA 序列进行相似性分析以及构建菌株亲缘关系发育树, 发现该菌株与已公布的 *Bacillus amyloliquefaciens* (GenBank 登录号为 MN756640.1) 亲缘关系最近 (图 2)。进一步研究发现 E3 菌株基因组 DNA 可以扩增解淀粉芽孢杆菌而不是枯草芽孢菌特异的 β -甘露聚糖酶基因片段 (图 3)。根据菌株的菌落表型、生理生化特征, 结合 16S rDNA 序列分析和特异扩增解淀粉芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶基因片段结果, 确定菌株 E3 为解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*, 并将该菌株命名为 *B. amyloliquefaciens* E3, 16S rDNA 序列已提交至 NCBI, GenBank 登录号为 MW130122。该菌

表 1 水稻基腐病菌拮抗菌 E3 菌株的主要生理生化特性

Table 1 The main physiological and biochemical characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* E3 strain

测定指标 Detected index	生化反应 Biochemical reaction	测定指标 Detected index	生化反应 Biochemical reaction
接触酶 Contact enzyme	阳性 Positive	苯丙氨酸脱氢酶 Phenylalanine dehydrogenase	阴性 Negative
氧化酶 Oxidase	阴性 Negative	2%(w) NaCl耐盐试验 Salt tolerance test with 2% NaCl	阳性 Positive
明胶水解 Gelatin hydrolysis	阴性 Negative	5%(w) NaCl耐盐试验 Salt tolerance test with 5% NaCl	阳性 Positive
V-P试验 V-P test	阳性 Positive	7%(w) NaCl耐盐试验 Salt tolerance test with 7% NaCl	阳性 Positive
丙酸盐利用 Propionate utilization	阴性 Negative	10%(w) NaCl耐盐试验 Salt tolerance test with 10% NaCl	阳性 Positive
脲酶试验 Urease test	阴性 Negative	淀粉水解 Starch hydrolysis	阳性 Positive
吲哚试验 Indole test	阴性 Negative	葡萄糖产酸 Glucose acidogenesis	阳性 Positive
硝酸盐还原 Nitrate reduction	阳性 Positive	柠檬酸盐利用 Citrate utilization	阳性 Positive
酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	阴性 Negative	酪素水解 Casein hydrolysis	阳性 Positive
pH5.7肉汤 pH5.7 Broth	阳性 Positive	pH6.8肉汤 pH6.8 Broth	阳性 Positive

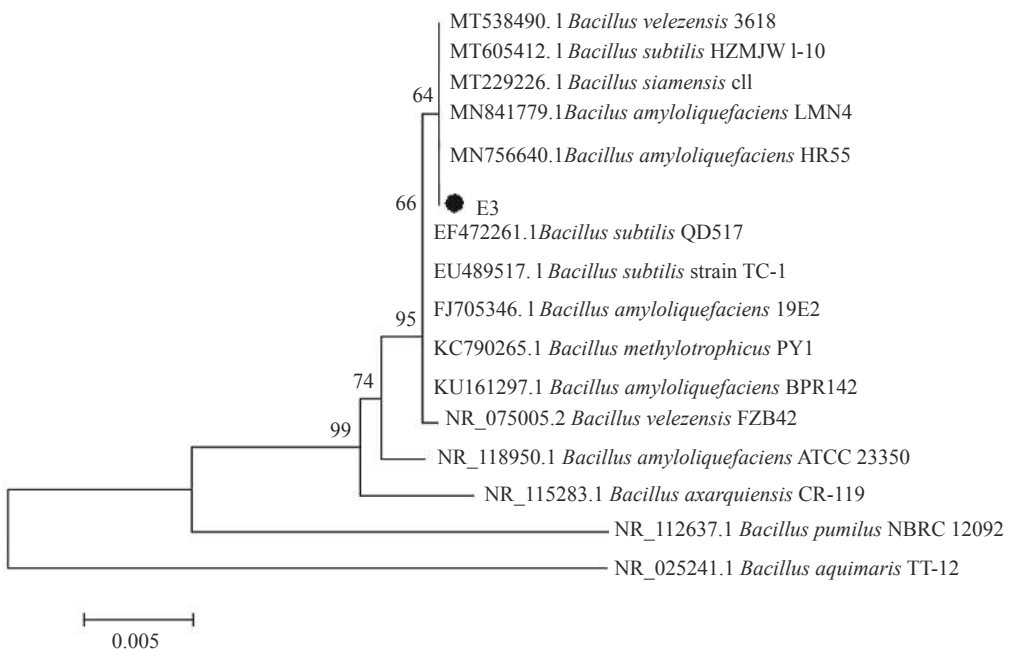
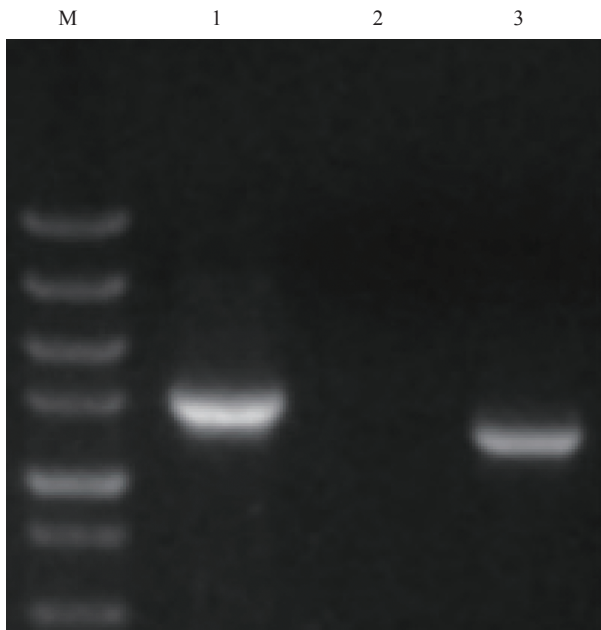


图 2 依据 16S rDNA 序列构建的 E3 菌株系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree of E3 strain based on 16S rDNA sequence



M: DS 5000 marker; 1: 16S rDNA; 2: 枯草芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶基因; 3: 解淀粉芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶基因

M: DS 5000 marker; 1: 16S rDNA; 2: β -mannanase gene from *Bacillus subtilis*; 3: β -mannanase gene from *B. amyloliquefaciens*

图 3 β -甘露聚糖酶基因序列特异性扩增电泳结果

Fig. 3 The electrophoresis results of specific amplification of β -mannanase gene sequence

株于 2017 年 12 月 7 日保藏于中国武汉市武汉大学的中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 保藏编号为 CCTCC No: M 2017768。

2.2 *B. amyloliquefaciens* E3 培养液产抑菌活性的最优培养基

芽孢杆菌可以分泌多种抗菌活性物质到胞外拮抗其他微生物的生长, 而拮抗物质的表达分泌受外界环境条件的诱导和影响^[28]。为确定 E3 产抑菌物质的最优培养基, 通过比较 E3 无菌培养液抑菌圈的大小, 从 5 种常用培养基中筛选了 E3 产抑菌活性物质最多的培养基 (图 4)。从图 4 可以看出, 在营养丰富的 YPG 培养基中, E3 菌株无菌培养液的抑菌圈最大, 表明其分泌到胞外的抑菌活性物质最多, 故选择 YPG 培养基培养 E3 菌株提取抗菌活性物质。

2.3 *B. amyloliquefaciens* E3 降低 *D. zea* EC1 对萌发种子的侵染能力

在水稻种子的萌发阶段, 水稻基腐病菌 *D. zea* EC1 可以成功侵染, 造成种子萌芽腐烂, 使种子萌芽率降低, 甚至完全不萌发^[29]。本研究开展了无菌 E3 培养液拮抗 *D. zea* EC1 侵染水稻种子的防效试验, 以确定 E3 菌株是否可以降低 *D. zea* EC1 对萌发种子的侵染能力。水稻种子接种不同剂量的 *D. zea* EC1, 同时设置无菌水处理种子为空白对照; 每

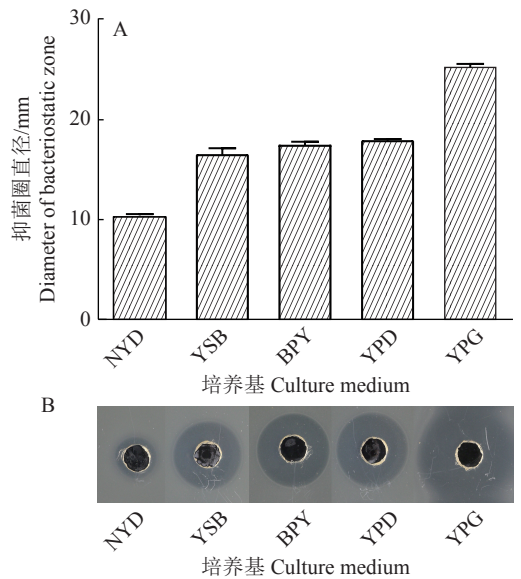
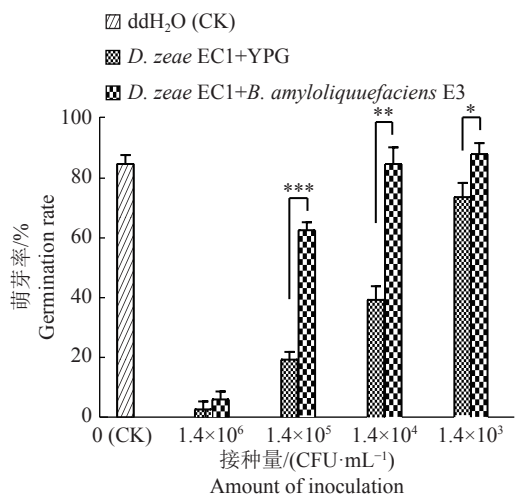


图 4 以无细胞上清液的抗菌活性为指标的培养基优化结果
Fig. 4 Results of medium optimization based on the antibacterial activity of cell-free supernatant

一个浓度处理的试验组种子与无菌 E3 培养液混匀, 而对照组则与等量 YPG 培养基混匀; 种子置于昼夜温度分别为 30、20 °C 的培养箱保湿培养 4 d 后, 比较试验组与对照组的萌芽率。由图 5 可以看出, 与空白对照相比, 接种了 1.4×10^5 和 1.4×10^4 CFU/mL 的 *D. zea* EC1 对照组种子萌芽率分别降低至 20.0% 和 37.8%, 而同时接种了无菌 E3 培养液对应剂量的试验组种子, 萌芽率则大大提高,



“*”、“**”、“***” 分别表示 0.05、0.01 和 0.000 1 水平的差异显著性 (*t* 检验)

“*”, “**”, “***” indicate significance differences at the levels of 0.05, 0.01 and 0.000 1 respectively (*t* test)

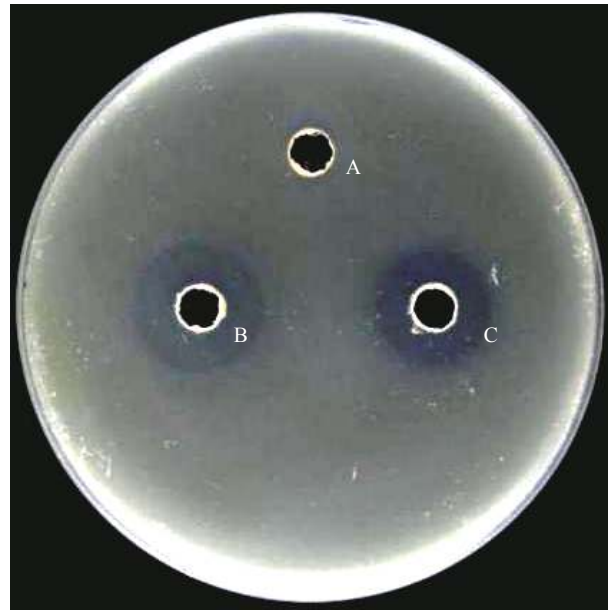
图 5 *Bacillus amyloliquefaciens* E3 菌株无菌培养液对 *Dickeya zea* EC1 抑制水稻种子萌芽率的拮抗效果
Fig. 5 Antagonism effect of the sterile culture medium of *Bacillus amyloliquefaciens* E3 strain on the inhibition of *Dickeya zea* EC1

分别达到 63.3% 和 85.6%, 这表明无菌 E3 培养液可以显著降低 *D. zeae* EC1 抑制水稻种子萌发的能力。这些结果表明 E3 菌株分泌到胞外的抗菌物质可以部分拮抗水稻基腐细菌 *D. zeae* EC1 抑制水稻种子萌发的能力。

2.4 *B. amyloliquefaciens* E3 抑菌活性物质及最小抑菌浓度 (MIC)

采用盐酸沉淀后丙酮抽提的方法, 提取 E3 无菌培养液中的脂肽类物质, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测得脂肽粗提物质量浓度为 5 583.9 mg/mL。对脂肽粗提物进行抑菌活性测定, 以无菌培养液为阳性对照, 以甲醇作为阴性对照, 抑菌效果如图 6 所示。从图 6 可以看出, 脂肽粗提物和无菌培养液均具有较强的抑菌活性, 而对照甲醇没有活性, 表明 E3 的抑菌活性物质主要为脂肽类物质。

为了测定 E3 抑菌脂肽粗提物的 MIC, 将粗提脂肽 (5 583.5 $\mu\text{g/mL}$) 以 2 的倍数进行梯度稀释从 2^0 到 2^{-12} , 与等量的 *D. zeae* EC1 混合加入 96 孔培养板内, 振荡共培养 24 h 后利用酶标仪测定 $D_{600\text{ nm}}$ 。由图 7 可以看出, E3 粗提脂肽质量浓度由 1.36 $\mu\text{g/mL}$ 升到 174.48 $\mu\text{g/mL}$ 时, $D_{600\text{ nm}}$ 与阳性对照 (0 $\mu\text{g/mL}$ +EC1) 无显著差异, 表明其不能抑制 *D. zeae* EC1 的生长; 而当浓度升高到 348.97 $\mu\text{g/mL}$ 及以上时, $D_{600\text{ nm}}$ 与阴性对照 (LB 培养基) 无显著差异, 表明其几乎完全抑制了 *D. zeae* EC1 的生长。阴性对照 LB 培养基 $D_{600\text{ nm}}$ 为 0, 说明 LB 不存在其他微生物



A: 甲醇; B: 无菌上清液; C: 粗提脂肽类物质

A: Methanol; B: Sterile supernatant; C: The crude lipopeptides

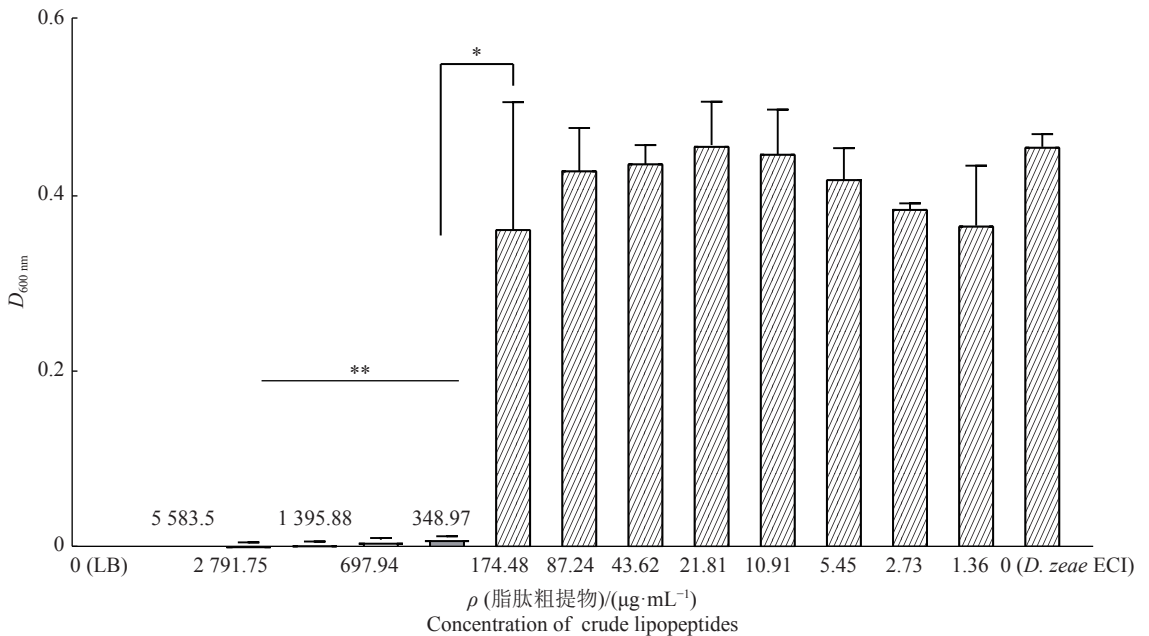
图 6 *Bacillus amyloliquefaciens* E3 菌株粗提脂肽的抑菌活性

Fig. 6 Antimicrobial activity of crude lipopeptides extracted from *Bacillus amyloliquefaciens* E3 strain

的污染。这些结果表明 E3 脂肽粗提物可以有效抑制 *D. zeae* EC1 的生长, 最小抑菌浓度为 348.97 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.5 *B. amyloliquefaciens* E3 抑菌活性物质抑菌谱

采用平板对峙法检测 E3 菌株对真菌的拮抗作用, 采用琼脂扩散法检测 E3 菌株对细菌的拮抗作用。结果 (图 8) 发现, 除了抑制水稻基腐病菌 *D. zeae*

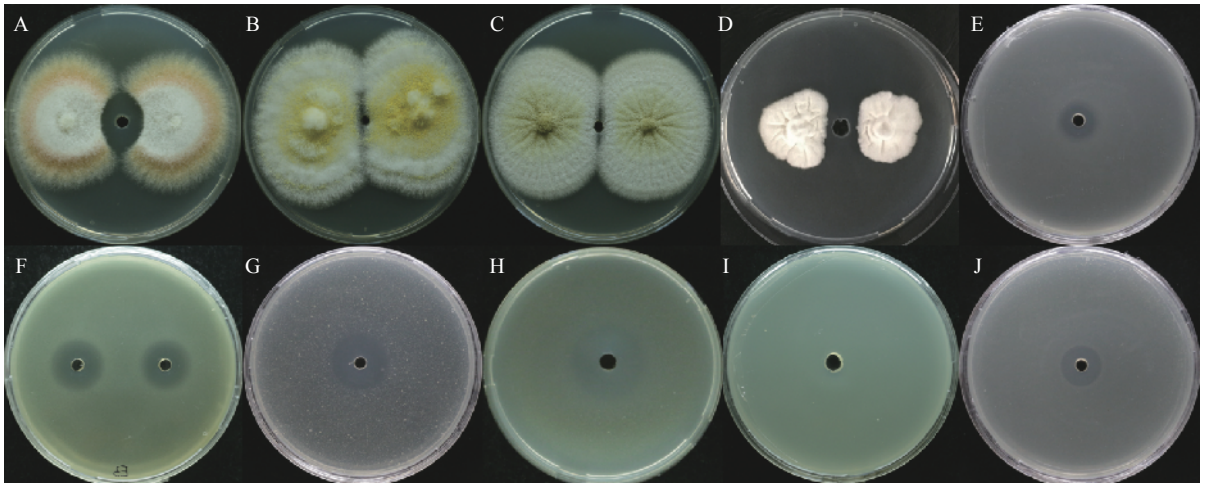


“*”、“**” 分别表示 0.05 和 0.000 1 水平的差异显著性 (t 检验)

“*”, “**” indicate significance differences at the levels of 0.05 and 0.000 1 respectively (t test)

图 7 *Bacillus amyloliquefaciens* E3 菌株脂肽粗提物对 *Dickeya zeae* EC1 的抑制作用

Fig. 7 Inhibitory effect of crude lipopeptides extracted from *Bacillus amyloliquefaciens* E3 strain against *Dickeya zeae* EC1



A: 茄病镰刀菌 *Fusarium solani*; B: 黄曲霉 *Aspergillus flavus*; C: 黑曲霉 *Aspergillus niger*; D: 雪腐镰刀菌 *Fusarium nivale*; E: 大肠埃希菌 *Escherichia coli*; F: 柑橘溃疡病菌 *Xanthomonas citri* pv. *citri*; G: 水稻基腐病菌 *Dickeya zeae* EC1; H: 茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum*; I: 洋葱伯克氏菌 *Burkholderia cenocepacia*; J: 香蕉基腐病菌 *Dickeya zeae* MS1

图 8 *Bacillus amyloliquefaciens* E3 菌株的抗真菌谱

Fig. 8 The antimicrobial spectrum of strain *Bacillus amyloliquefaciens* E3 strain

EC1 的生长外, E3 脂肽粗提物也拮抗茄病镰刀菌、香蕉基腐病菌、柑橘溃疡病菌、茄科劳尔氏菌和大肠埃希菌的生长, 但是对黑曲霉、黄曲霉、雪腐镰刀菌和洋葱伯克氏菌的生长则没有任何抑制作用。由此可见, *B. amyloliquefaciens* E3 粗提脂肽类物质对多种植物细菌和真菌都有一定的抑制作用, 具有广谱的抑菌活性。

2.6 *B. amyloliquefaciens* E3 抑菌活性物质的 HPLC 分离纯化结果

为了进一步分离鉴定 E3 分泌的拮抗 *D. zeae* EC1 的主要抑菌活性物质的化学成分, 将 E3 脂肽粗提物用高效液相色谱柱 C18 柱进行分离, 按时间收集各馏分, 每 5 min 收集 1 管, 共得到 8 个馏分, 采用琼脂扩散法分别检测这 8 个馏分的抑菌活性。根据抑菌圈的大小来判断, 发现馏分 2 (5~10 min) 和馏分 5 (20~25 min) 具有抗菌活性, 而且抑菌活性成分主要集中在馏分 5 (图 9)。将馏分 2 和馏分 5 旋转蒸发浓缩, 进行下一步的 LC-MS 分析。

2.7 *B. amyloliquefaciens* E3 抑菌活性物质的 LC-ESI-MS 鉴定结果

收集具有抗菌活性的馏分 2 和馏分 5, 用 LC-ESI-MS 鉴定各馏分的主要化学成分 (图 10)。馏分 2 中检测到主要的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 1435.77、1449.79、1463.80、1477.82 和 1491.83, 相对分子质量相差 14, 恰好是一个亚甲基— CH_2 的相对分子质量。通过对比抗菌脂肽类化合物的理论相对分子质量, 可以推测该组物质属于 Fengycin 类化合物 (图 10B)。在分析活性馏分 5 的质谱图时发现, 其主要的分子离子峰 $[M+H]^+$ 为 994.64、1008.66、



1~8: HPLC 收集的馏分; 9: 脂肽粗提物; 10: 甲醇
1~8: Fractions collected by HPLC; 9: Crude lipopeptides; 10: Methanol

图 9 HPLC 纯化分离抑菌物质各馏分活性检测图

Fig. 9 Determination of antibacterial activity of each fraction isolated and purified by HPLC

1022.67、1036.69 和 1050.70, 与脂肽物质 Surfactin 的相对分子质量相吻合, 据此推断该组物质为 Surfactin 类化合物或者其同系物 (图 10D); 另外馏分 5 还发现了 $[M+H]^+$ 为 1058.67、1072.69、1086.70, 它们属于 C15~C17 的 Iturin B 类化合物的质子加合峰。脂肽类抗生素质谱峰的分析参考陈华等^[27] 和 Vater 等^[30] 研究。

根据以上质谱分析结果判断, 馏分 2 的主要抑菌物质包括 Fengycin A 和 Fengycin B, 馏分 5 的主要抑菌物质包括 Surfactin 和 Iturin 类化合物。由此

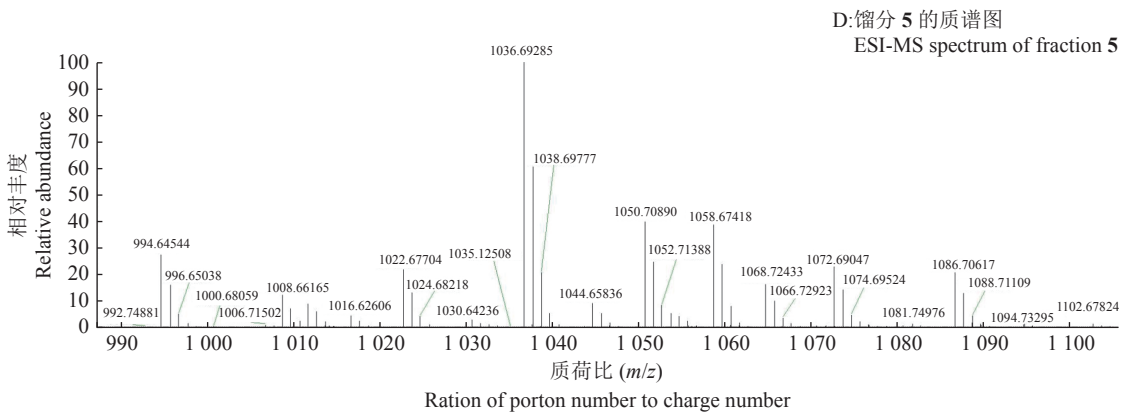
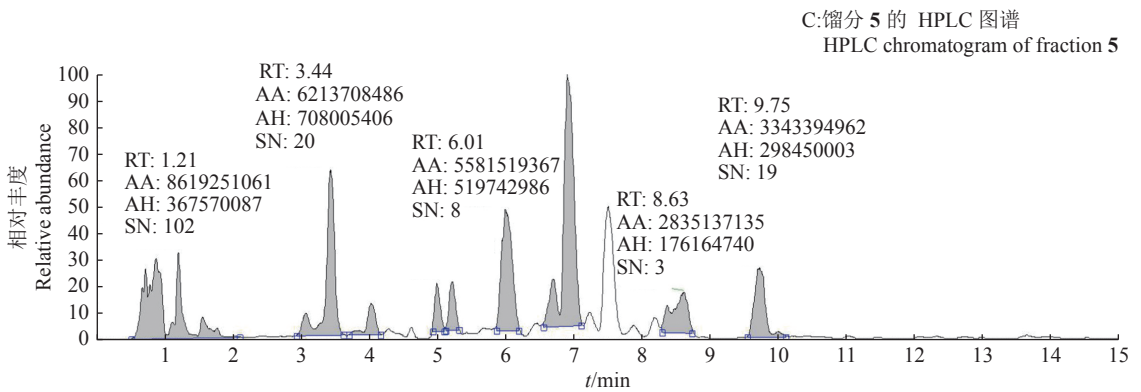
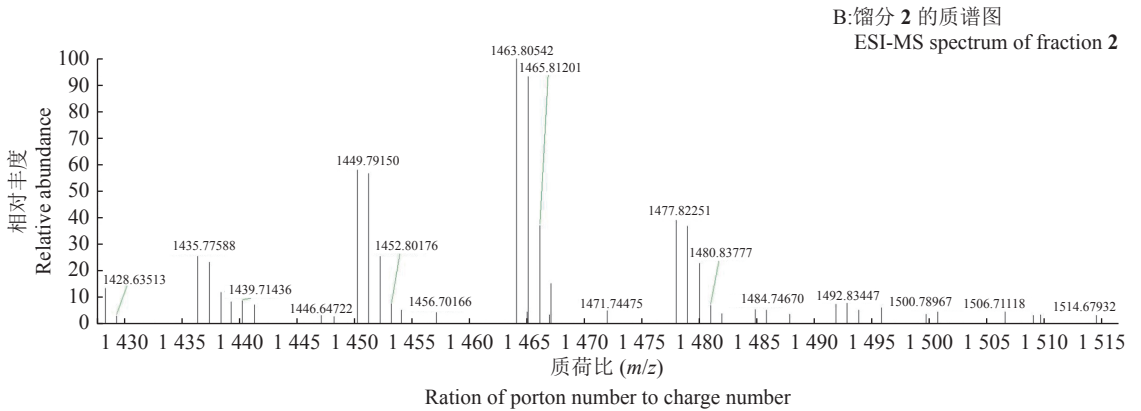
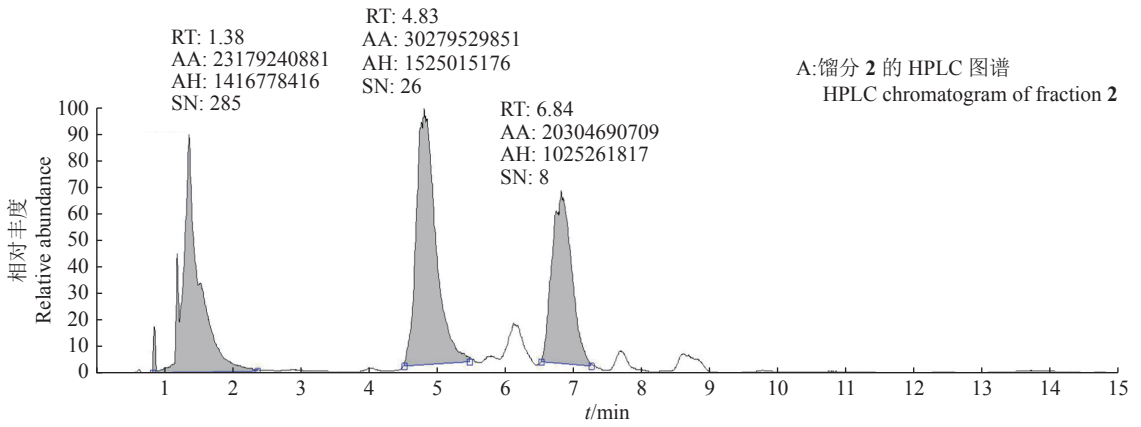


图 10 馏分 2 和馏分 5 的 HPLC-ESI-MS 分析
Fig. 10 HPLC-ESI-MS analysis of fraction 2 and 5

可以推断, *B. amyloliquefaciens* E3 产生的主要抑菌物质为 Fengycin、Surfactin 和 Iturin 3 种脂肽类抗生素, 且馏分 5 鉴定的 Surfactin 可能起主要的抑菌活性。至于是否还有其他的抑菌活性物质, 还需进一步的验证分析。

3 讨论与结论

众多研究表明, 许多根际土壤分离的微生物是根际促生菌 (Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR), 这类微生物在适应环境生长过程中分泌多种具有生物活性的次生代谢物, 具有抗菌、竞争性抑制病原菌生长或诱导植物产生系统抗性等作用, 有效拮抗病原菌的侵染, 并能促进植物生长, 可以作为生防菌防治植物病害, 因而受到植物病理学家的广泛重视^[31-32]。近年来, 有关分离及鉴定根际促生菌并将其用于防治植物病害的研究日趋广泛和深入, 逐渐成为生物防治领域的有效途径^[33]。芽孢杆菌属 *Bacillus* 细菌是一种典型的根际促生菌, 抗逆性强, 能产生环状脂肽、聚酮类、挥发性化合物和抗菌肽等多种抑菌活性物质, 具有很好的生防应用潜力^[34]。解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* FZB42 是研究最深入的根际促生菌模式菌株, 具有广谱抗性, 已经在农业上广泛用于防治番茄、棉花、草莓和马铃薯等多种植物病害^[35]。众多研究表明芽孢杆菌分泌的环状脂肽 Surfactin、Fengycin 和 Iturin 不仅拮抗镰刀菌 *Fusarium*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、海枣曲霉菌 *Aspergillus phoenicis*、禾草离蠕孢菌 *Bipolaris sorokiniana* 等多种植物病原真菌生长, 还具有诱导植物产生抗性的功能。Chowdhury 等^[36] 研究表明, 解淀粉芽孢杆菌 FZB42 能够产生 Surfactin、Fengycin 和 Bacillomycin D, 抑制立枯丝核菌的生长, 在生菜遇到病原菌侵染时还能够介导植株产生防御性反应; 向亚萍等^[37] 从解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* B1619 菌株发酵物中分离出 3 种脂肽类抗生素, 其中, Bacillomycin L 和 Fengycin 是抑制番茄枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* 生长的主要物质。Surfactin 可以抑制丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 和多种黄单胞菌 *Xanthomonas* 等病原菌的生长^[38]。Zeriouh 等^[39] 发现 2 株枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* UMAF6614 和 UMAF6639 可以拮抗黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae* 和果胶杆菌 *Pectobacterium carotovorum* subsp. 生长, 主要抑菌活性成分为 Iturin。Cao 等^[40] 分离得到贝莱斯芽孢

杆菌 *B. velezensis* Y6 菌株, 并发现该菌株分泌的 Fengycin 和 Surfactin 是抑制细菌性青枯菌 *Ralstonia solanacearum* 生长的主要物质, 而 Iturin 则是抑制尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 孢子萌发的主要物质。这些研究进展表明脂肽类物质在生物防治病原细菌方面有巨大的潜力。

玉米狄克氏细菌 *Dickeya zae*, 异名为菊花欧文氏菌 *Erwinia chrysanthemi* pv. *zae*, 除感染水稻引起水稻基腐病外, 还侵染玉米、马铃薯、香蕉等多种双子叶和单子叶植物, 引起茎腐病和软腐病等多种细菌性病害, 给农业生产造成严重的经济损失。Hadizadeh 等^[41] 发现黏性沙雷氏菌 *Serratia plymuthica* A3 菌株可以拮抗 *Dickeya solani* 生长, 可减轻马铃薯在低温贮藏过程中软腐病发病率, 以及田间栽培过程中病原菌从母薯向子薯的传播。Chen 等^[42] 报道解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* D2WM 菌株能够抑制引起软腐病的 *D. chrysanthemi* 生长, 并发现多酮类化合物 Macrolactin 为其主要抑菌活性物质。Li 等^[43] 筛选并鉴定了对 *Dickeya zae* 有拮抗作用的 3 个菌株 *Pseudomonas fluorescens* SC3、*P. parafulva* SC11 和 *B. velezensis* 3-10, 室内接种试验表明 3 个菌株均具有作为生防菌的潜力。本研究从柑橘根际土壤中筛选到 1 株拮抗水稻基腐菌的 *B. amyloliquefaciens* 菌株, 鉴定并命名为 E3。研究发现该菌株培养液可以有效降低水稻基腐病菌对水稻种子的侵染能力, 其分泌的 Surfactin、Fengycin 和 Iturin 3 种脂肽类物质为主要抑菌活性成分。本研究结果进一步丰富了解淀粉芽孢菌拮抗植物病原细菌的资源库, 也为防治水稻基腐病寻找安全、环保新型生物农药提供了新的依据。

参考文献:

- [1] 冯成玉. 水稻细菌性基腐病发生情况与研究进展[J]. *中国稻米*, 2009(4): 21-23.
- [2] 刘琼光, 张庆, 魏楚丹. 水稻细菌性基腐病研究进展[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(14): 2923-2931.
- [3] PU X M, ZHOU J N, LIN B R, et al. First report of bacterial foot rot of rice caused by a *Dickeya zae* in China[J]. *Plant Disease*, 2012, 96(12): 1818.
- [4] 张蝶. 浙江省水稻细菌性基腐病发生因素及化学防治研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2016.
- [5] SANSINENEA E, VACA J, ELENA ROJAS N, et al. A wide spectrum of antibacterial activity of secondary metabolites from *Bacillus amyloliquefaciens* ELI149[J]. *Bioscience Journal*, 2020, 36(1): 235-244.

- [6] BEN ABDALLAH D, TOUNSI S, GHARSALLAH H, et al. Lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as promising biocontrol compounds against the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(36): 36518-36529.
- [7] STEIN T. *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions[J]. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 845-857.
- [8] WU L M, WU H J, CHEN L N, et al. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1). doi: <http://doi.org/10.1038/srep12975>.
- [9] LIU Y F, CHEN Z Y, NG T B, et al. Bacisubin, an anti-fungal protein with ribonuclease and hemagglutinating activities from *Bacillus subtilis* strain B-916[J]. *Peptides*, 2007, 28(3): 553-559.
- [10] TAO Y, BIE X M, LV F X, et al. Antifungal activity and mechanism of fengycin in the presence and absence of commercial surfactin against *Rhizopus stolonifer*[J]. *Journal of Microbiology*, 2011, 49(1): 146-150.
- [11] CHO S J, LEE S K, CHA B J, et al. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 223(1): 47-51.
- [12] CAO H Y, JIAO Y, YIN N, et al. Analysis of the activity and biological control efficacy of the *Bacillus subtilis* strain Bs-1 against *Meloidogyne incognita*[J]. *Crop Protection*, 2019, 122: 125-135.
- [13] ZHAO P, QUAN C, WANG Y, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(5): 448-456.
- [14] ARGUELLES-ARIAS A, ONGENA M, HALIMI B, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens[J]. *Microbial Cell Factories*, 2009, 8: 63.
- [15] ONGENA M, JACQUES P. *Bacillus* lipopeptides: Versatile weapons for plant disease biocontrol[J]. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(3): 115-125.
- [16] CAWOY H, MARIUTTO M, HENRY G, et al. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(2): 87-100.
- [17] ZHOU J, CHENG Y, LV M, et al. The complete genome sequence of *Dickeya zae* EC1 reveals substantial divergence from other *Dickeya* strains and species[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 571.
- [18] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 267-294.
- [19] 布坎南, 等. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1984: 729-758.
- [20] REDBURN A C, PATEL B K. Phylogenetic analysis of *Desulfotomaculum thermobenzoicum* using polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA-specific DNA[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1993, 113(1): 81-86.
- [21] 刘勇, 毛爱军, 李辉, 等. 枯草芽孢杆菌群 β -甘露聚糖酶基因克隆及同源性分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(5): 845-850.
- [22] 韩玉竹, 邓钊, 张宝, 等. 解淀粉芽孢杆菌 H15 产抗菌肽的发酵条件优化和提取方法比较研究[J]. *食品科学*, 2015, 36(15): 135-141.
- [23] 张睿佳, 胡杰, 陆建忠, 等. 不同成熟度对水稻种子萌发的影响[J]. *上海农业科技*, 2017(5): 62-63.
- [24] LI S B, XU S R, ZHANG R N, et al. The antibiosis action and rice-induced resistance, mediated by a lipopeptide from *Bacillus amyloliquefaciens* B014, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 26(4): 748-756.
- [25] 朱弘元, 康健, 范昕, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B15 产脂肽的分离鉴定及抑菌机理[J]. *江苏农业科学*, 2016, 44(5): 186-189.
- [26] 张玉胜, 谭亚男. 油菜核盘菌拮抗菌的筛选及鉴定[J]. *生命科学仪器*, 2009, 7(8): 27-28.
- [27] 陈华, 王丽, 袁成凌, 等. 高效液相色谱-电喷雾质谱法分离和鉴别枯草芽孢杆菌产生的脂肽类化合物[J]. *色谱*, 2008(3): 343-347.
- [28] CHEN M C, WANG J P, ZHU Y J, et al. Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of the lipopeptides secreted from the *Bacillus amyloliquefaciens* strain FJAT-2349[J]. *Journal of General and Applied Microbiology*, 2019, 126(5): 1519-1529.
- [29] 周海亮. 水稻细菌性基腐病病原学及检测技术的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- [30] VATER J, GAO X, HITZEROTH G, et al. "Whole cell"--matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry, an emerging technique for efficient screening of biocombinatorial libraries of natural compounds-present state of research[J]. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2003, 6(6): 557-567.
- [31] AERON A, KHARE E, JHA C K, et al. Revisiting the plant growth-promoting rhizobacteria: Lessons from the past and objectives for the future[J]. *Archives of Microbiology*, 2020, 202(4): 665-676.
- [32] GOUDA S, KERRY R G, DAS G, et al. Revitalization of

- plant growth promoting rhizobacteria for sustainable development in agriculture[J]. *Research in Microbiology*, 2018, 206: 131-140.
- [33] KHAYALETHU N, LESIBA K L, MOLEMI E R, et al. The mode of action of bacillus species against *Fusarium graminearum*, tools for investigation, and future prospects[J]. *Toxins*, 2019, 11(10). doi: <http://doi.org/10.3390/toxins11100606>.
- [34] 严婉荣, 肖敏, 陈圆, 等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌脂肽研究进展[J]. *北方园艺*, 2018(7): 162-167.
- [35] FAN B, WANG C, SONG X, et al. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: The gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2491.
- [36] CHOWDHURY S P, UHL J, GROSCH R, et al. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. plantarum colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(9): 984-995.
- [37] 向亚萍, 周华飞, 刘永锋, 等. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 脂肽类抗生素的分离鉴定及其对番茄枯萎病菌的抑制作用[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(15): 2935-2944.
- [38] FIRA D, DIMKIC I, BERIC T, et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species[J]. *Biotechnology Journal*, 2018, 285: 44-55.
- [39] ZERIOUH H, ROMERO D, GARCIA-GUTIERREZ L, et al. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(12): 1540-1552.
- [40] CAO Y, PI H L, CHANDRANGSU P, et al. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1). doi: <http://doi.org/10.1038/S41598-018-22782-Z>.
- [41] HADIZADEH I, PEIVASTEGAN B, HANNUKKALA A, et al. Biological control of potato soft rot caused by *Dickeya solani* and the survival of bacterial antagonists under cold storage conditions[J]. *Plant Pathology*, 2019, 68(2): 297-311.
- [42] CHEN J, LIU T, WEI M, et al. Macrolactin a is the key antibacterial substance of *Bacillus amyloliquefaciens* D2WM against the pathogen *Dickeya chrysanthemi*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2019, 155(2): 393-404.
- [43] LI J, HU M, XUE Y, et al. Screening, identification and efficacy evaluation of antagonistic bacteria for biocontrol of soft rot disease caused by *Dickeya zeae*[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(6975). doi: [10.3390/microorganisms8050697](https://doi.org/10.3390/microorganisms8050697).

【责任编辑 霍 欢】