

李界秋, 宋文欣, 蒙姣荣, 等. 6株贝莱斯芽胞杆菌对土传病原菌的抑制活性及其作用机理 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (3): 371–380.
LI J Q, SONG W X, MENG J R, et al. Inhibitory Activity and Mechanism of *Bacillus velezensis* Strains against Soil-borne Pathogens [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (3): 371–380.

6株贝莱斯芽胞杆菌对土传病原菌的抑制活性及其作用机理

李界秋¹, 宋文欣², 蒙姣荣^{2*}, 王忠文^{2*}

(1. 广西大学农牧产业发展研究院, 广西 南宁 530004; 2. 广西大学农学院, 广西 南宁 530004)

摘要:【目的】明确6株贝莱斯芽胞杆菌 (*Bacillus velezensis*) 对7种土传病原菌的抑制活性, 探究其拮抗机理, 为土传病害的生物防治提供菌种资源和理论依据。【方法】采用平板对峙法测定拮抗菌株对7种土传病原菌的抑菌活性, 用显微镜观察拮抗菌对病原菌菌丝形态的影响; 采用叶片离体接种法测定其防治效果, 鉴别性培养基测定拮抗菌株产生的胞外酶, 并用PCR扩增技术检测拮抗菌携带抗生素相关基因 (*mycB*、*fenB*、*ituA*、*sfp*、*bamC*、*erisA*、*spaS*、*bacA*、*yndJ* 和 *qk*)。【结果】所有测试菌株 (NN01、NN02、NN04、NN05、NN88 和 NN95) 对核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、齐整小核菌 (*Sclerotium rolfsii*) 和烟草疫霉 (*Phytophthora nicotianae*) 等土传病原菌的菌丝生长均具有明显的抑制作用, 其中对齐整小核菌抑制作用最明显; NN01、NN02、NN04 和 NN88 对尖孢镰刀菌菌丝有较好的抑制效果, 菌丝生长抑制率为 40.56%~56.30%; 抑菌带边缘菌丝的形态发生明显改变, 原生质浓缩或外泄、菌丝破裂和颜色加深; 所有拮抗菌株均能较好抑制桑白绢病和莴苣核病病斑的发展, 防治效果分别为 53.40%~71.32% 和 43.57%~65.68%, 高于或与枯草芽胞杆菌对照防治效果相当; 所有拮抗菌都能产纤维素酶和蛋白酶, 除了 NN95 基因组不携带 *fenB*, 其余所有菌株都携带 *mycB*、*ituA*、*fenB*、*bacA* 和 *yndJ* 等脂肽类抗生素相关基因。【结论】所有测定的贝莱斯芽胞杆菌对6种土传病原菌均具有抑菌活性, 能产纤维素酶和蛋白酶, 携带 *mycB*、*ituA*、*fenB*、*bacA* 和 *yndJ* 等5种抗生素相关基因, 具有防治土传病害的潜力。

关键词: 贝莱斯芽胞杆菌; 抑菌活性; 抗生素相关基因; 土传病害; 生物防治

中图分类号: S 476

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 03-0371-10

Inhibitory Activity and Mechanism of *Bacillus velezensis* Strains against Soil-borne Pathogens

LI Jieqiu¹, SONG Wenxin², MENG Jiaorong^{2*}, WANG Zhongwen^{2*}

(1. Agri-animal Industrial Development Institute, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China; 2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530004, China)

Abstract: 【Objective】Inhibitory activities and antagonistic mechanisms of *Bacillus velezensis* (Bv) strains against certain soil-borne pathogens were studied in search for new venues of biological disease control. 【Method】Antagonism of 6 Bv strains, NN01, NN02, NN04, NN05, NN88, and NN95, on 7 soil-borne pathogens, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani*, and *Phytophthora nicotianae*, were studied using a plate confrontation test. Morphological responses of the pathogen mycelia to the Bv strains were observed under an optic microscope, and the control efficacy verified *in vitro* on mulberry and lettuce leaves. Activities of the extracellular enzymes (e.g., cellulase, protease, and β -1,3-glucanase) produced by the Bv strains were identified with differential media, and 10 antibiotic-related genes (i.e., *mycB*, *fenB*, *ituA*, *sfp*, *bamC*, *Erisa*, *spaS*, *bacA*, *yndJ*, and *Qk*) in the bacteria detected by PCR amplification with specific primers. 【Result】To varying extents the 6 Bv strains inhibited the mycelia growth of the 6 target

收稿日期: 2021-11-02 初稿; 2022-02-25 修改稿

作者简介: 李界秋 (1967-), 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 植物病害防控 (E-mail: ljq@gxu.edu.cn)

* 通信作者: 蒙姣荣 (1971-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 植物病害防控 (E-mail: mengjiaorong@163.com); 王忠文 (1963-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 植物病害防控 (E-mail: wangzwen@126.com)

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目 (nycytxgxcd-16-03); 广西创新驱动发展专项 (桂科 AA18118028-7)

pathogens. The strongest effect was shown on *S. rolfii*. NN01, NN02, NN04, and NN88 displayed inhibition rates ranging from 40.56% to 56.30% on *F. oxysporum*. The appearance of mycelia on edge of inhibition rings changed significantly with broken, leaking intracellular substances, and darked color. *In vitro* the Bv strains significantly inhibited disease development on the plant leaves by *S. sclerotiorum* with a control effect of 53.40-71.32% and 43.57-65.68% by *S. rolfii*, which were higher than or equal to the inhibition by *B. subtilis*. All 6 Bv strains secreted proteases and cellulases with the presence of 5 lipopeptide antibiotic-related genes (i.e., *mycB*, *fenB*, *ituA*, *bacA*, and *yndJ*), except no *fenB* found in NN95. 【Conclusion】 All 6 Bv strains had varying inhibitory effects against the 7 soil-borne pathogens. They showed extracellular protease and cellulase activities, and almost all of them carried 5 lipopeptide antibiotic-related genes. These Bv strains could potentially be applied as biocontrol agents for control of diseases caused by the soil-borne pathogens.

Key words: *Bacillus velezensis*; inhibition activity; antibiotic-related genes; soil-borne disease; biological control

0 引言

【研究意义】植物土传病害由生活在土壤中或随植物病株残体残留在土壤中的病原物侵染植物根部或茎部引起,具有危害面积大、病原种类多和病害治理困难的特点^[1-3]。随着集约化农业的发展和高附加值作物的连年栽培,土传病害逐年加重,连年栽种 3~5 年后可造成减产 20%~40%,严重的减产 60% 以上,作物品质也受到严重影响,土传病害已成为我国农业生产可持续发展的主要制约因素^[4-5]。化学药剂防治具有成本低、见效快等优点,在植物土传病害防控中发挥着重要作用^[3]。但是,化学药剂的长期大量使用容易引起药物残留、环境污染和抗药性增强等问题。生物防治以利用拮抗微生物防治为主要手段,通常具有抗病和促生的双重效果,对人体无毒无害、不污染环境及不容易使病原菌产生抗性,符合我国当前农业生物药物与生态农业作为优先发展的主题,是实现植物土传病害绿色防控的有效技术手段^[1, 5-7]。目前应用于植物土传病害生物防治的微生物菌剂中,除了木霉 (*Trichoderma* sp.) 和假单胞杆菌 (*Pseudomonas* sp.), 其余的多为芽胞杆菌属 (*Bacillus* spp.), 如枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*)、解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 和贝莱斯芽胞杆菌 (*B. velezensis*) 等^[1, 8-10]。当前可供选择的拮抗菌株资源仍然很少,可用于作物生产的制剂或产品的种类和数量均有限,现有的菌株难以同时防治种类繁多的病原物引致的病害^[5-6],因此,筛选获得对多种植物土传病害病原菌具有拮抗作用的生防菌株并研究其拮抗机制具有重要意义。【前人研究进展】贝莱斯芽胞杆菌可以产生抗生素、酶、植物激素和抗肿瘤剂,在农业、工业和医学上均有广泛用途^[11-14]。大量的研究表明,贝莱斯芽胞杆菌抑菌谱广,对多种植物病原真菌和细菌均具有良好和抑制效果和防治潜力^[11, 15]。贝莱斯芽胞杆菌 E69 菌株和 E33 菌株是来自水稻叶片的内生菌,对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*)、

尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、烟草疫霉 (*Phytophthora nicotianae*) 和链格孢菌 (*Alternaria alternata*) 等病原菌均具有显著的拮抗作用^[16];赵昱榕等^[17]从黄瓜植株体内分离筛选获得的贝莱斯芽胞杆菌 ZF2,对多主棒孢病菌 (*Corynespora cassiicola*) 在内的 6 种病原真菌和 7 种病原细菌具有显著拮抗效果。以土传病原菌为目标的拮抗贝莱斯芽胞杆菌筛选已有一些报道。崔文会等^[18]土壤中分离筛选获得贝莱斯芽胞杆菌 CX-2 菌株,该菌株对水稻、小麦和大豆等作物的 6 种土传病原真菌均有明显的抑菌活性。罗汉果白绢病与根腐病的病原菌分别为腐皮镰孢菌 (*F. solani*) 和齐整小核菌,王瑞昊等^[19]从罗汉果根际土壤中筛选分离对这 2 种病原菌有拮抗作用的贝莱斯芽胞杆菌 TYX-2 菌株。许帅等^[20]从马铃薯根际土壤分离筛选获得对马铃薯枯萎病菌 (*F. oxysporum*) 有拮抗作用的贝莱斯芽胞杆菌菌株 ZF128,盆栽试验防效为 82.46%。贝莱斯芽胞杆菌 2A-2B 菌株是从杂草 *Sporobolus airoides* 根围土壤分离获得,可显著抑制尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 和腐皮镰孢菌等土传病原菌菌丝的生长^[13, 21]。【本研究切入点】本课题组在前期研究中以桑树细菌性枯萎病菌 (*Enterobacter* spp.) 和桑枝菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 作为目标测试菌,获得一批具有明显拮抗活性的芽胞杆菌菌株,其中 NN01、NN02、NN04、NN05、NN88 和 NN95 等 6 个拮抗菌株被鉴定为贝莱斯芽胞杆菌^[22-23],这些拮抗菌株对尖孢镰刀菌等主要土传病害病原菌是否具有拮抗活性及其抑菌机理均有待明确。【拟解决的关键问题】测定 NN01、NN02、NN04、NN05、NN88 和 NN95 等 6 株贝莱斯芽胞杆菌对核盘菌、灰葡萄孢、立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、齐整小核菌、烟草疫霉和终极腐霉 (*Pythium ultimum*) 的抑菌活性,以期明确其产生的胞外酶及携带的抗生素相关基因种类,为植物常见土传病害的生物防治提供菌种资源,为进一步开发利用这些拮抗菌株提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株及植物材料 6株贝莱斯芽胞杆菌菌株由本实验室前期研究获得, 其中NN01、NN02、NN04分离自桑树品种桂优12的枝条, NN05、NN88、NN95分离自桑树品种桂优62的根部^[22-23]。植物土传病原菌为核盘菌、灰葡萄孢菌、立枯丝核菌、尖孢镰刀菌古巴专化型(*F. oxysporum* f. sp. *cubense*)、齐整小核菌、烟草疫霉和终极腐霉, 其中齐整小核菌从桑白绢病病桑树上分离获得并保存, 其他供试病原菌由广西大学农学院植物病理学研究室提供。用于离体接种的桑树品种为桂桑优62, 由广西蚕业站惠赠; 生菜叶片购于广西大学菜市场, 品种未知。对照枯草芽胞杆菌可湿性粉剂为河北中保绿农作物科技有限公司产品(有效成分含量: 1×10^{11} CFU·g⁻¹)。

1.1.2 培养基 LB培养基(luria-bertani, LB): 酵母提取物5.0 g, 胰蛋白胨10.0 g, NaCl 10.0 g, 去离子水定容到1 000 mL, pH7.0~7.2。枯草芽胞杆菌常用培养基: 葡萄糖20.0 g, 蛋白胨15.0 g, NaCl 5.0 g, 牛肉膏0.5 g, 去离子水定容到1 000 mL, pH7.0~7.2。马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA): PDA粉购自BD公司, 按照说明书配制。V8培养基: V8果汁200 mL, CaCO₃ 3.0 g, 琼脂粉15.0 g, 去离子水定容到1 000 mL, pH 7.0~7.2。蛋白酶检测培养基: 脱脂奶粉12.0 g, 琼脂20.0 g, 去离子水定容至1 000 mL。纤维素酶检测培养基: 羧甲基纤维素钠10.0 g, 蛋白胨10.0 g, 琼脂20.0 g, 酵母粉5.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, NaCl 5.0 g, 去离子水定容到1 000 mL, pH7.0。β-1,3-葡聚糖酶检测培养基: 酵母粉5.0 g, 蛋白胨10.0 g, 刚果红0.4 g, NaCl 5.0 g, 琼脂20.0 g, 去离子水定容至1 000 mL, pH值5.5~6.0。

1.1.3 主要仪器设备 实验室pH计(梅特勒-托利多仪器有限公司)、台式离心机(艾本德中国有限公司)、恒温培养振荡器(上海福玛实验设备有限公司)、电热恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司)、微型分光光度计(Biochrom有限公司)、PCR仪(赛默飞世尔科技中国有限公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗贝莱斯芽胞杆菌抑菌活性的测定 采用平板对峙法测定6株贝莱斯芽胞杆菌对7种供试植物土传病害病原菌的抑制作用: 待测拮抗菌用LB培养基, 在28℃条件下振荡培养至OD₆₀₀值为1.0; 各种病原菌在PDA培养平板或V8培养基平板上(烟草疫霉)培养, 菌落直径约为8.00 cm时, 用打孔器

在菌落边缘取直径0.6 cm的菌饼, 倒置接种于PDA平板中央, 在其周围距离2.0 cm对称的4个点上接种1.0 μL拮抗菌菌液, 以LB培养基作为对照, 每株拮抗菌3次重复。对照(CK)平板上病原菌菌落直径约为8.00 cm时, 测量各个处理与对照的菌落直径, 按如下公式计算菌丝生长抑制率: 菌丝生长抑制率/%=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100。

1.2.2 拮抗贝莱斯芽胞杆菌对病原菌菌丝形态的影响

取上述对峙培养中抑菌带边沿的菌丝进行形态观察, 以不接种拮抗菌只接种病原菌的培养平板为对照。

1.2.3 拮抗贝莱斯芽胞杆菌无菌发酵液对病原菌抑制活性的测定 各供试拮抗菌株接种于枯草芽胞杆菌常用培养基(液体培养基), 28℃、200 r·min⁻¹培养48 h, 得到拮抗菌发酵液; 将发酵液在10 000 r·min⁻¹条件下离心10 min, 吸取上清, 用0.22 μm的细菌过滤器过滤获得无菌发酵上清液; 制作双层PDA平板(琼脂粉含量, 上层为16 g·L⁻¹, 下层为20 g·L⁻¹), 取直径为0.6 cm的病原菌菌饼置于双层PDA平板中央; 在距离中央2 cm处对称的4个位置将上层的培养基打孔, 取出上层琼脂圆片, 将40 μL无菌发酵上清液加入到打好的孔内, 28℃下进行培养。以加入无菌LB培养基为对照, 每个处理3个重复。其余步骤同“1.2.1”。

1.2.4 叶片离体接种测定拮抗贝莱斯芽胞杆菌的防治效果 选取齐整小核菌和核盘菌为目标菌进行离体防治效果测定。齐整小核菌接种于健康桑叶, 在桑叶沿中线对称的2个位置制造伤口, 在培养至3 d的齐整小核菌菌落边缘打孔, 菌饼接种于右边伤口处, 无菌PDA培养基接种于左边伤口处作为对照, 将叶片置于湿润的滤纸上, 分别无菌水(CK1)、新鲜拮抗菌菌液(1×10^8 CFU·mL⁻¹)和枯草芽胞杆菌可湿性粉剂(稀释1 000倍液)(CK2)喷雾, 至叶片湿润不滴水为止, 每个处理3次重复, 24 h后重复喷雾1次。接种叶片于28℃培养箱中放置72 h, 以十字交叉法测量病斑的直径, 计算防治效果。核盘菌则接种生菜叶片, 培养温度为25℃, 接种48 h后测量病斑的大小, 其他操作步骤与桑叶片接种方法相同。防治效果/%=(对照叶片病斑直径-处理叶片病斑直径)/对照叶片病斑直径×100。

1.2.5 拮抗贝莱斯芽胞杆菌细菌胞外酶活性的测定 蛋白酶活性的检测: 将6株待测拮抗菌接种于LB培养基中, 28℃、200 r·min⁻¹下培养, 至菌液OD₆₀₀值为0.6, 分别吸取1.0 μL拮抗菌菌液, 均匀点在距离蛋白酶检测培养基平板中心约2.0 cm处。设置3个

重复,以无菌 LB 液体培养基作为对照,培养 2 d 后,观察在菌落边缘是否形成透明圈。若形成透明圈,根据透明圈的大小判断菌株产生蛋白酶活性的大小。纤维素酶活性的检测:按上述方法将待测拮抗菌接种于纤维素酶活性检测培养基平板上,经 28 ℃ 培养 3 d 后,用质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ 的刚果红溶液 5.0 mL 染色 15 min,倒掉刚果红溶液加入 5.0 mL 1.0 mol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液,静置 15 min,倒掉 NaCl 溶液,观察是否形成透明圈。 β -1,3-葡聚糖酶活性的检测:在 β -1,3-葡聚糖酶活性检测培养基上进行,操作步骤同蛋白酶活性的检测。

1.2.6 拮抗贝莱斯芽胞杆菌抗生素相关基因的检测 依据文献合成用于检测 *mycB*^[24]、*fenB*^[25]、*ituA*^[25]、*sfp*^[25]、

bamC^[26]、*erisA*^[26]、*bacA*^[27]、*spaS*^[27]、*yndj*^[28] 和 *qk*^[29] 共 10 个目标基因的引物(表 1)。分别以 6 株拮抗菌的基因组 DNA 作为模板对目标基因进行 PCR 检测。PCR 反应体系:总反应体积 50 μ L,其中 *Taq* Mix 25 μ L,上下游引物(10 mmol·L⁻¹)各 2 μ L, DNA 模板(50 ng· μ L⁻¹) 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。反应条件:95 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,退火 30 s,72 ℃ 延伸 2 min,运行 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min,其中 *erisA* 的退火温度为 54 ℃, *bamC*、*bacA* 和 *spaS* 的退火温度为 58 ℃,其余基因的退火温度为 55 ℃。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,将条带大小正确的片段进行回收纯化后测序。

表 1 用于检测拮抗贝莱斯芽胞杆菌抗生素相关基因的引物
Table 1 Primers used to detect antibiotic-related genes in Bv strains

基因 Genes	引物名称及其序列(5'→3') Primers and the sequences	片段大小 Product size/bp	抑菌物质 Antifungal substances
<i>mycB</i>	MycB-F: ATGTCGGTGTTTAAAAATCAAGTAACG MycB-R: TTAGGACGCCAGCAGTCTTCTATTGA	2 024	抗霉枯草菌素 Mycosubtilin
<i>fenB</i>	FenB-F: CTATAGTTTGTTGACGGCTC FenB-R: CAGCACTGGTTCTTGTGCGCA	1 600	丰原素 Fengycin
<i>ituA</i>	ItuA-F: ATGTATACCAGTCAATTCC ItuA-R: GATCCGAAGCTGACAATAG	1 047	伊枯草菌素 Iturin
<i>sfp</i>	Sfp-F: ATGAAGATTACGGAATTTA Sfp-R: TTATAAAAGCTCTTCGTACG	675	表面活性素 Surfactin
<i>bamC</i>	Bamc-F: AGTAAATGAACGCGCCAATC Bamc-R: CCCTCTCTGCCACATAGAG	957	杆菌霉素 Bacillomycin
<i>erisA</i>	Erisa-f: TTCGATGARTTCGATTGGA Erisa-r: GCAGCCCTTTTCTTTTATTTC	357	Ericin
<i>spaS</i>	Spas-f: GGTTTGTTGGATGGAGCTGT Spas-r: GCAAGGAGTCAGAGCAAGGT	375	枯草菌素 Subtilin
<i>bacA</i>	Baca-f: CAGCTCATGGGAATGCTTTT Baca-r: CTCGGTCCTGAAGGGACAAG	498	溶杆菌素 Bacylisin
<i>yndj</i>	147-F: CAGAGCGACAGCAATCACAT 148-147-R: TGAATTTCGGTCCGCTTATC	212	假定蛋白 Yndj
<i>qk</i>	Qk1-F: CTAAACGTCAGAGGCGGAG Qk1-R: ATTGTGCAGTGCTGTGTACG	704	枯草杆菌蛋白酶 Subtilisin

1.2.7 数据统计与分析 用 Excel 计算平均数及标准差,利用 IBM SPSS Statistics V21.0 软件进行统计学分析,利用新复极差测验法(SSR法)进行平均数之间的多重比较,判断不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 6 株贝莱斯芽胞杆菌对土传病害病原菌的抑菌活性 采用对峙培养法测定 6 株贝莱斯芽胞杆菌对 7 种土传病害病原菌抑菌活性,结果显示,6 株拮抗菌株

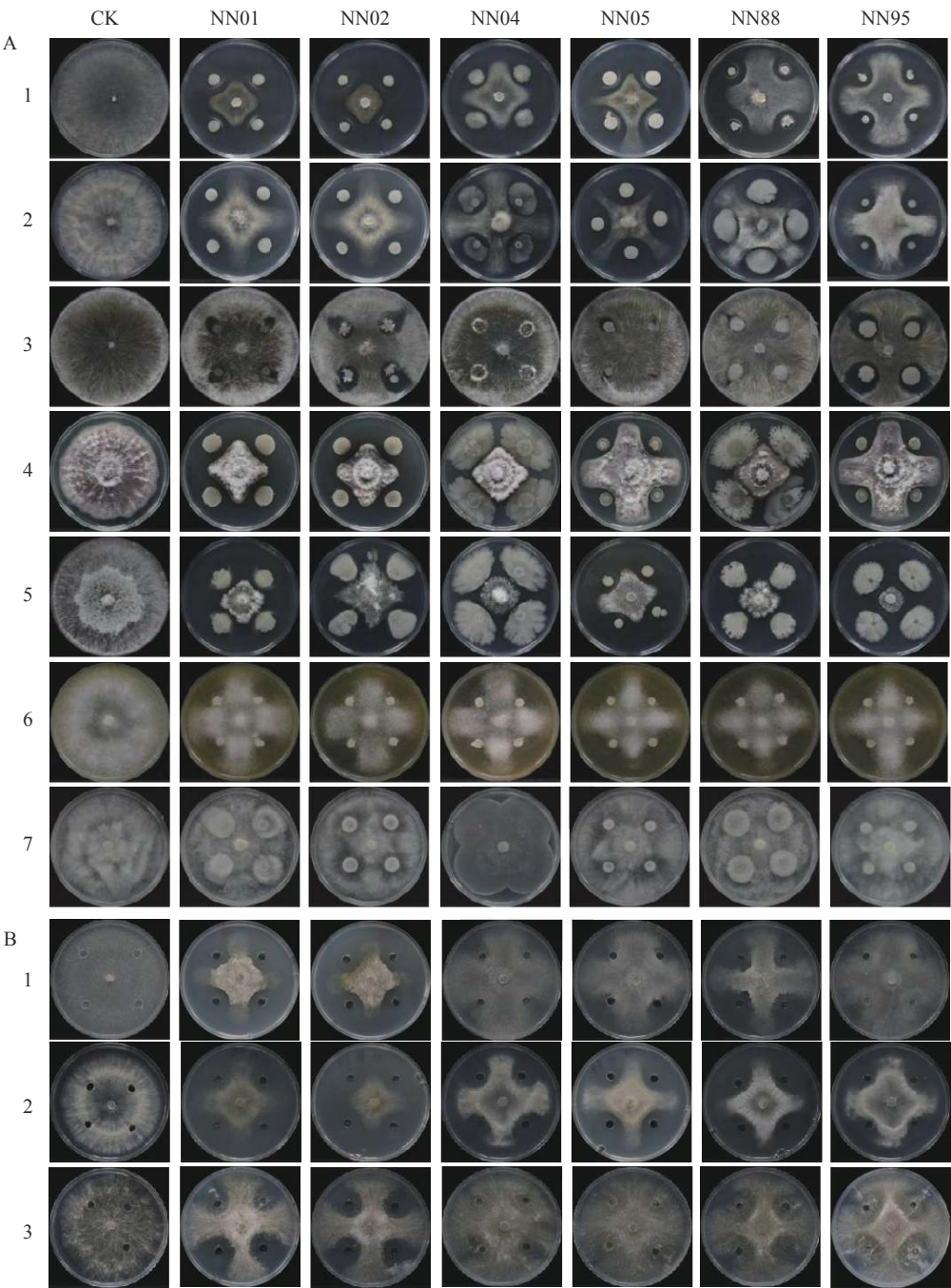
对核盘菌、灰葡萄孢、立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、齐整小核菌和烟草疫霉等 6 种病原菌菌丝生长均有较强的抑制作用,对终极腐霉抑制效果不明显(图 1-A)。不同拮抗菌株对不同病原菌的抑菌活性有明显差异,菌株 NN01 对核盘菌、灰葡萄孢、尖孢镰刀菌和齐整小核菌的抑制效果较好,抑菌率均达 34.07% 及以上;NN02 对齐整小核菌的抑制活性最高,达 76.11%,对核盘菌和尖孢镰刀菌的抑菌率分别为 52.22% 和 46.67%;NN04 对齐整小核菌和尖孢镰刀菌的抑菌活

性较高，分别为 74.81% 和 56.30%；NN88 对齐整小核菌和尖孢镰刀菌的抑菌活性也较高，分别为 62.41% 和 40.56%（表 2）。就病原菌而言，所有拮抗菌株对齐整小核菌具有较强的抑制作用，菌丝抑制率在 28.70% ~ 76.11%；有 4 个拮抗菌株（NN01、NN02、NN04、NN88）有对尖孢镰刀菌具有较强的抑制作用，抑制率在 40.56%~56.30%；所有拮抗菌株对立枯丝核菌和烟草疫霉抑制作用较弱，菌丝抑

制率均未达到 19.26%。采用枯草芽胞杆菌培养基培养所有拮抗菌株，过滤获得无菌发酵液，以核盘菌、灰葡萄孢菌和立枯丝核菌作为指示菌进行对峙培养，结果显示所有菌株的无菌发酵液对病原菌也均具有明显的抑制作用（图 1-B）。

2.2 拮抗贝莱斯芽胞杆菌对核盘菌和灰葡萄孢菌菌丝形态的影响

在 PDA 上对峙培养 48 ~96 h 后，用显微镜观察



注：CK，LB 培养基；1，核盘菌；2，灰葡萄孢；3，立枯丝核菌；4，尖孢镰刀菌古巴专化；5，齐整小核菌；6，烟草疫霉；7，终极腐霉。
Note: CK, LB medium; 1, *S. sclerotiorum*; 2, *B. cinerea*; 3, *R. solani*; 4, *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; 5, *S. rolfsii*; 6, *P. a. nicotianae*; 7, *P. ultimum*.

图 1 贝莱斯芽胞杆菌 (A) 及其无菌发酵液 (B) 对 7 种土传病害病原菌菌丝生长的抑制效果
Fig. 1 Inhibitory effects of Bv culture liquid (A) and cell-free fermentation broth (B) against 7 soil-borne pathogens

表 2 拮抗贝莱斯芽胞杆菌对土传病原菌菌丝生长的影响
Table 2 Effect of Bv strains on *in vitro* growth of soil-borne pathogens

病原菌 Pathogens	菌株及抑制率 <i>B. velezensis</i> strains and Inhibition rate /%					
	NN01	NN02	NN04	NN05	NN88	NN95
齐整小核菌 (<i>S. rolfsii</i>)	67.59±4.12 a	76.11±0.61 a	74.81±6.11 a	46.67±6.70 a	62.41±2.57 a	28.70±3.88 a
核盘菌 (<i>S. sclerotiorum</i>)	34.07±16.19 d	52.22±3.14 b	19.44±8.85 c	14.81±2.18 b	13.50±2.58 d	10.93±3.47 b
灰葡萄孢菌 (<i>B. cinerea</i>)	56.39±1.67 b	11.11±4.16 c	13.056±2.46 c	13.89±5.20 b	12.78±3.20 d	22.78±4.11 ab
尖孢镰刀菌古巴专化型 (<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>)	47.78±1.41 c	46.67±0.99 b	56.30±3.63 b	11.67±1.53 b	40.56±9.65 b	11.67±1.17 b
烟草疫霉 (<i>P. nicotianae</i>)	10.00±4.97 e	12.96±1.67 c	13.70±1.67 c	15.74±1.30 b	19.26±2.69 c	15.37±3.02 b

注：表中数据为 3 次重复的平均值±标准差，同列的相同小写字母表示在 0.05 水平上无显著差异。
Note: Data presented as mean±standard deviations were calculated from three independent experiments. Values followed by the same letter within a row were not significantly different at 0.05 level.

抑菌带中核盘菌和灰葡萄孢菌菌丝形态，结果显示，NN02、NN88 和 NN95 菌株处理的核盘菌菌丝原生质浓缩，颜色加深，局部菌丝破裂，原生质分布不均匀；NN02、NN04、NN05、NN88、NN95 处理的灰葡萄孢菌菌丝也有相似的表现。NN01、NN04 处理的核盘菌菌丝及 NN01 处理下的灰葡萄孢菌菌丝颜色加深，其形态无明显变化（图 2）。

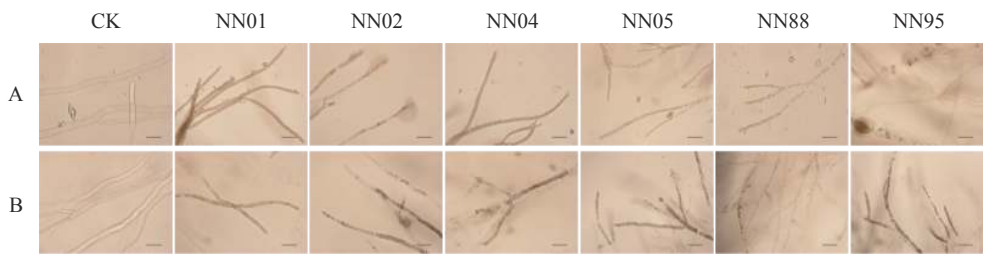
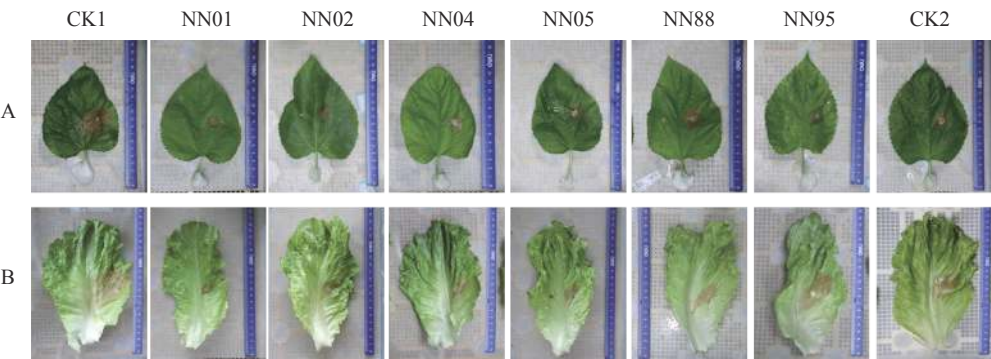


图 2 贝莱斯芽胞杆菌对核盘菌（A）和灰葡萄孢（B）菌丝形态的影响
Fig. 2 Effects of Bv strains on morphology of *S. sclerotiorum* (A) and *B. cinerea* (B) mycelia

2.3 拮抗贝莱斯芽胞杆菌在离体叶片上的防治效果

分别在桑叶片接种齐整小核菌，生菜叶片在接种核盘菌后，用 6 株贝莱斯芽胞杆菌液喷雾处理，48~72 h 后观察发病情况。结果显示，所有拮抗菌株对桑叶

片或生菜叶片的病斑扩展均有不同程度的抑制作用（图 3），对桑白绢病的防治效果都在 53.40% 以上，其中 NN01 防治效果为 71.32%，NN01、NN02、NN05 菌株防治效果分别为 65.65%、65.05% 和 61.46% 高于



注：CK1，无菌水；CK2，枯草芽胞杆菌。
Note: CK1, sterilized water; CK2, *B. subtilis*.

图 3 拮抗贝莱斯芽胞杆菌在离体叶片上对病桑白绢病（A）和生菜菌核病（B）的抑制效果

Fig. 3 *In vitro* inhibitory effects of Bv strains against *S. rolfsii* on mulberry leaves (A) and *S. sclerotiorum* on lettuce leaves (B)

对照枯草芽胞杆菌菌剂（CK2），其余菌株的抑制效果与枯草芽胞杆菌菌剂的相当；所有拮抗菌株对生菜菌核病的抑制效果均优于对照枯草芽胞杆菌菌剂（CK2），其中 NN01 防治效果最好，为 65.68%（表 3）。

表 3 离体条件下 6 株贝莱斯芽胞杆菌桑白绢病和生菜菌核病的防治效果
Table 3 *In vitro* control efficacy of Bv strains against *S. rolfsii* and *S. sclerotiorum*

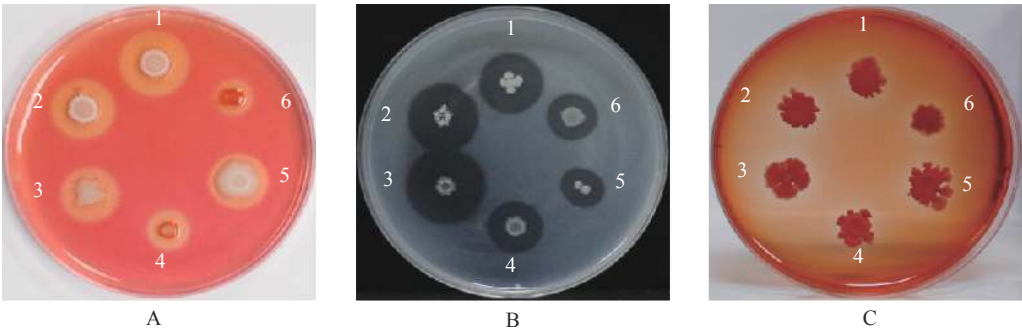
桑叶 mulberry			生菜叶 lettuce		
菌株 Strain	病斑直径 Lesion diameter/cm	防治效果 Control efficacy/%	菌株 Strain	病斑直径 Lesion diameter/cm	防治效果 Control efficacy/%
NN01	1.61±0.12	71.32±2.26 a	NN01	1.97±0.45	65.68±0.08 a
NN05	1.91±0.28	65.65±3.70 b	NN02	2.42±0.75	57.82±0.13 b
NN02	1.95±0.20	65.05±5.12 b	NN05	2.52±0.82	56.08±0.14 b
NN95	2.15±0.10	61.46±1.87 c	NN88	2.77±1.35	51.72±0.23 c
CK2	2.25±0.39	59.67±7.00 c	NN04	2.93±1.02	48.81±0.18 c
NN04	2.33±0.23	58.18±4.19 c	NN95	3.23±0.25	43.57±0.04 d
NN88	2.60±0.26	53.40±4.67 c	CK2	4.05±1.15	29.32±0.20 e
CK1	5.58±0.12	—	CK1	5.73±0.91	—

注：① 表中数据为3次重复的平均值±标准差，同列的相同小写字母表示在 0.05 水平上无显著差异。② CK1：无菌水；CK2：枯草芽胞杆菌。
Note: ① Data presented as mean±standard deviations were calculated from three independent experiments. Values followed by the same letter within a row were not significantly different at 0.05 level. ② CK1: sterilized water; CK2: *B. subtilis*.

2.4 拮抗贝莱斯芽胞杆菌胞外酶活性

胞外酶活性进行检测结果显示，所有菌株在纤维素酶和酶蛋白酶检测培养基上均可产生明显透明圈，表明这些菌株可以产生纤维素酶和蛋白酶，其中 NN01、NN02、NN04 和 NN88 产纤维素酶的能力较强，NN05、NN95 产纤维素酶的能力较弱；NN04 产蛋白酶的能力最强，其次为 NN01 和 NN02 菌株。

在 β-1,3-葡聚糖酶检测平板上，NN02、NN04、NN05、NN88 能够形成透明圈，但是透明圈界限不够明显，说明这些菌株可以产生葡聚糖酶，但是酶活性较弱或者产量较低，而菌株 NN01 和 NN95 在 β-1,3-葡聚糖酶检测平板上不产生可见透明圈，表明在此条件下，这 2 个菌株不产生葡聚糖酶（图 4）。



注：①1: NN01; 2: NN02; 3: NN04; 4: NN05; 5: NN88; 6: NN95。②A：纤维素酶；B：蛋白酶；C：β-1,3-葡聚糖酶。
Note: ①1: NN01; 2: NN02; 3: NN04; 4: NN05; 5: NN88; 6: NN95. ② A: Cellulase; B: Protease; C: β-1,3-glucanase.

图 4 拮抗贝莱斯芽胞杆菌的纤维素酶、蛋白酶和 β-1,3-葡聚糖酶活性检测

Fig. 4 Determination of cellulase, protease, and amylase activities in Bv strains

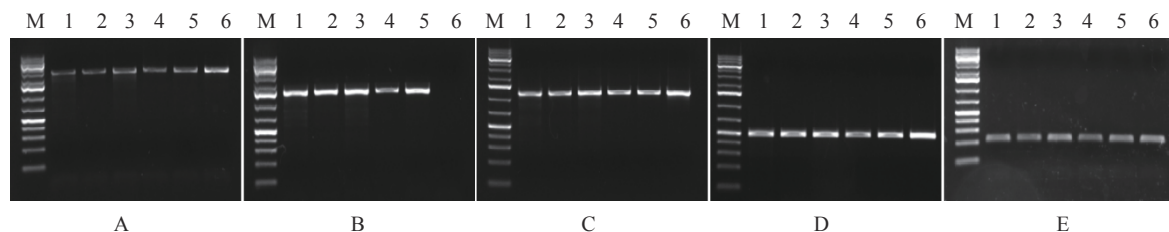
2.5 拮抗贝莱斯芽胞杆菌抗生素合成相关基因的检测

分别以拮抗菌株的总 DNA 作为模板，使用 10 对引物（表 1）对抗生素合成相关基因进行 PCR 扩增。电泳检测显示，除了菌株 NN95 基因组没有扩增

出 *fenB* 基因的特异条带，其余菌株用 5 对基因（*mycB*、*fenB*、*ituA*、*bacA*、*yndj*）的引物均可扩增出特异性单一的条带，条带大小正确（图 5），经测序验证均为对应的目标基因片段，表明这些菌株都具有产生抗霉枯草菌素、丰原素、伊枯草菌素、溶

杆菌素和假定蛋白 Yndj 的潜力, 而 NN95 菌株没有产生丰原素的潜力。另外 5 对基因 (*sfp*、*bamc*、*erisa*、*spaS*、*qk*) 的引物则没有扩增出明显的条带 (图中未

显示), 表明所有拮抗菌株中均没有携带产生表面活性素、杆菌霉素、Ericin、枯草杆菌素和枯草杆菌蛋白酶等抗生素的相关基因。



注: ①M: 1 kb DNA marker; 1: NN01; 2: NN02; 3: NN04; 4: NN05; 5: NN88; 6: NN95。② A: mycB (2 024 bp); B: fenB (1 400 bp); C: ituA (1 150 bp); C: mycB (2 024 bp); D: bacA (498 bp); E: yndj (212 bp)。

Note: ①M: 1 kb DNA marker; 1: NN01; 2: NN02; 3: NN04; 4: NN05; 5: NN88; 6: NN95。② A: mycB (2 024 bp); B: fenB (1 400 bp); C: ituA (1 150 bp); C: mycB (2 024 bp); D: bacA (498 bp); E: yndj (212 bp)。

图 5 贝莱斯芽胞杆菌菌株中抗生素合成基因电泳检测结果

Fig. 5 Detection of antibiotic-related genes in Bv strains by PCR amplification

3 讨论与结论

贝莱斯芽胞杆菌来源广泛, 抑菌谱广且可促进植物生长, 作为植物生防制剂具有良好的应用前景, 开展贝莱斯芽胞杆菌菌种资源的收集、筛选对推进植物病害的生物防治具有重要意义^[13-14, 30]。本研究表明 6 株贝莱斯芽胞杆菌对核盘菌、灰葡萄孢菌、立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、齐整小核菌和烟草疫霉等病原菌菌丝生长均具有明显抑菌活性, 为常见植物土传病害的生物防治提供了菌种资源。作用机理不同的多个菌株混合使用可以提高拮抗菌的防治效果, 可以防治同一作物上不同病害, 甚至防治不同作物上不同病害^[5, 10], 在今后的盆栽试验及大田试验中, 将使用不同菌株混合后进行防治, 评估其用于制备混合菌剂的潜力。

芽胞杆菌可分泌产生多种胞外酶和抗生素等抗菌物质, 参与抑菌过程^[9]。芽胞杆菌分泌的常见胞外酶包括几丁质酶、蛋白酶、纤维素酶和 β -1,3-葡聚糖酶等, 胞外酶的种类及其活性可作为筛选拮抗菌的主要标记, 通常产生胞外酶种类多的拮抗菌株, 均具有较好的生防效果^[12, 31]。脂肽类抗生素 (lipopeptin) 是芽胞杆菌分泌的主要抗菌物质, 以伊枯草菌素家族、表面活性素和丰原素为主, 其中伊枯草菌素家族包括伊枯草菌素、杆菌抗霉素和抗霉枯草菌素等, 可破坏真菌细胞壁、细胞膜, 强烈抑制真菌菌丝生长; 丰原素作用机理与伊枯草菌素家族的相似, 对丝状真菌抑制效果好^[9, 32]; 溶杆菌素可导致微生物细胞壁的结构受损, 细胞溶解死亡, 对真菌和细菌都具有广谱的抗菌活性^[33-34]。本研究中的 6 个拮抗贝莱斯芽胞杆菌菌株均能分泌蛋白酶和纤维素

酶, 4 个菌株可以产生少量的 β -1,3-葡聚糖酶; 除了 NN95 菌株不携带 *fenB*, 所有拮抗菌株都携带 *mycB*、*fenB*、*ituA*、*bacA* 和 *yndj* 等抗生素相关基因, 表明这些菌株都具有产生抗霉枯草菌素、丰原素、伊枯草菌素、溶杆菌素和假定蛋白 Yndj 的潜力。拮抗菌株的无菌发酵液对病原菌具有明显的抑菌作用, 抑菌带边缘的菌丝出现原生质浓缩或外泄、菌丝破裂、颜色变深等, 推测 6 株拮抗菌产生的胞外酶和抗生素参与了它们的抑菌过程。与其他 5 个菌株相比, NN95 菌株在平板上的抑菌效果相对较差, 可能与该菌株缺少 *fenB* 基因有关。

在本研究中拮抗菌株在平板对峙培养显示的抑菌活性与叶片离体防治效果不存在一一对应关系, NN02 和 NN04 对白绢病菌平板测试的抑菌活性分别为 76.11% 和 74.81%, 均比 NN01 菌株的 (67.59%) 高, 但是其离体防治效果比 NN01 菌株的低; NN95 菌株对齐整小核菌平板抑制为 28.70%, 离体防治效果 61.46%, 均优于 NN04 和 NN88 菌株, 推测不同菌株的作用机制存在一定的差异。在平板对峙培养中, 菌株产生拮抗物质的活性和生物量直接影响其抑菌效果, 而离体叶片或田间防治效果则是拮抗菌-病原菌-寄主植物三者的相互作用的结果, 与菌株产生的拮抗物质、定殖能力、能否诱导产生诱导抗性及其寄主的抗病性等均有密切关系^[9, 35]。今后可以利用基因组学、蛋白组学和代谢组学等多种组学方法联合分析, 明确抗生素相关基因及胞外酶在拮抗菌-病原菌-寄主植物三者之间发挥作用的机制。

本研究中的拮抗菌株对立枯丝核菌、烟草疫霉和终极腐霉抑菌活性较低或没有活性。不同的病原菌对不同拮抗物质的反应有所不同, 而培养条件会

影响拮抗菌产生拮抗物质的种类及浓度^[34, 36]。如枯草芽胞杆菌野生型菌株(ATCC 6633)对病原菌并没有明显的抑制活性,其过量表达抗霉枯草菌素基因的工程菌株BBG100则对灰葡萄孢菌、尖孢镰刀菌和瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)有明显的拮抗活性^[37]。后续研究将通过改变培养基配方及培养条件或者构建主要抗生素相关基因的过量表达菌株,重新评估这些菌株产生拮抗物质的活性及其抑菌范围。此外,本研究中6株拮抗贝莱斯芽胞杆菌均携带*bacA*基因,具有产生溶杆菌素的潜力。溶杆菌素对细菌有强的抑制作用^[9, 34],一些贝莱斯芽胞杆菌菌株对植物病原细菌也具有较强的抑制活性^[9, 34, 38]。本研究中的拮抗菌株对茄科青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)等土传细菌性病原是否有抑制作用,值得进一步研究。

6株拮抗贝莱斯芽胞杆菌抑菌谱广,对核盘菌、灰葡萄孢、立枯丝核菌、尖孢镰刀菌、齐整小核菌和烟草疫霉等6种土传病原菌菌丝生长具有抑制作用;所有拮抗菌株均能较好抑制桑白绢病和生菜菌核病病斑的发展,产生纤维素酶和蛋白酶;除了NN95菌株不携带*fenB*,所有拮抗菌株都携带*mycB*、*fenB*、*ituA*、*bacA*和*yndj*等抗生素相关基因,具有产生抗霉枯草菌素、丰原素、伊枯草菌素、溶杆菌素和假定蛋白Yndj的潜力,是植物土传病害潜在的生防菌。

参考文献:

- [1] MARK M, SHIRI F. Prospects for biological soilborne disease control: Application of indigenous versus synthetic microbiomes [J]. *Phytopathology*, 2017, 107 (3): 256–263.
- [2] 黄新琦, 蔡祖聪. 土壤微生物与作物土传病害控制 [J]. 中国科学院院刊, 2017, 32 (6): 593–600.
HUANG X Q, CAI Z C. Soil microbes and control of soil-borne diseases [J]. *Bulletin of Chinese Academy of Sciences*, 2017, 32 (6): 593–600. (in Chinese)
- [3] 李文静, 王秋霞, 李园, 等. 我国防治主要土传病害的农药登记和推广情况 [J]. 农药, 2021, 60 (8): 547–554, 570.
LI W J, WANG Q X, LI Y, et al. Current situation of pesticides for control of mainly soil-borne diseases registration, extension and application in China [J]. *Agrochemicals*, 2021, 60 (8): 547–554, 570. (in Chinese)
- [4] 曹塍程, 刘晓漫, 郭美霞, 等. 作物土传病害的危害及防治技术 [J]. 植物保护, 2017, 43 (2): 6–16.
CAO A C, LIU X M, GUO M X, et al. Incidences of soil-borne diseases and control measures [J]. *Plant Protection*, 2017, 43 (2): 6–16. (in Chinese)
- [5] 李兴龙, 李彦忠. 土传病害生物防治研究进展 [J]. 草业学报, 2015, 24 (3): 204–212.
LI X L, LI Y Z. Research advances in biological control of soil-borne disease [J]. *Acta Prataculurae Sinica*, 2015, 24 (3): 204–212. (in Chinese)
- [6] 高游慧, 郑泽慧, 张越, 等. 根际微生态防治作物土传真菌病害的机制研究进展 [J]. 中国农业大学学报, 2021, 26 (6): 100–113.
GAO Y H, ZHENG Z H, ZHANG Y, et al. Mechanism of rhizosphere micro-ecology in controlling soil-borne fungal diseases: A review [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2021, 26 (6): 100–113. (in Chinese)
- [7] 刘磊, 梁昌聪, 曾迪, 等. 芽胞杆菌次生代谢产物及其在土传病害防控中的应用研究进展 [J]. 热带作物学报, 2017, 38 (4): 775–782.
LIU L, LIANG C C, ZENG D, et al. Research progress on secondary metabolites of *Bacillus* spp. and their applications in biocontrol of soil-borne diseases [J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38 (4): 775–782. (in Chinese)
- [8] BUBICI G, KAUSHAL M, PRIGIGALLO M I, et al. Biological control agents against *Fusarium* wilt of banana [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 616.
- [9] MILJAKOVIC D, MARINKOVIC J, BALESEVIC TUBIC S. The Significance of *Bacillus* spp. in disease suppression and growth promotion of field and vegetable crops [J]. *Microorganisms*, 2020, 8 (7): 1037.
- [10] NIU B, WANG W X, YUAN Z B, et al. Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 585404.
- [11] ADENIJI A A, LOOTS D T, BABALOLA O O. *Bacillus velezensis*: Phylogeny, useful applications, and avenues for exploitation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103 (9): 3669–3682.
- [12] JIANG C H, LIAO M J, WANG H K, et al. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botrytis cinerea* [J]. *Biological Control*, 2018, 126: 147–157.
- [13] 陶永梅, 潘洪吉, 黄健, 等. 新型生防微生物因子贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)的研究与应用 [J]. 中国植保导刊, 2019, 39 (9): 26–33.
TAO Y M, PAN H J, HUANG J, et al. Research and application of a novel bio-control microbial factor *Bacillus velezensis* [J]. *China Plant Protection*, 2019, 39 (9): 26–33. (in Chinese)
- [14] 张彩文, 程坤, 张欣, 等. 贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)分类学及功能研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45 (17): 258–265.
ZHANG C W, CHENG K, ZHANG X, et al. Taxonomy and functions of *Bacillus velezensis*: A review [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45 (17): 258–265. (in Chinese)
- [15] FAN B, WANG C, SONG X F, 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.
- [16] 沙月霞, 隋书婷, 曾庆超, 等. 贝莱斯芽胞杆菌E69预防稻瘟病等多种真菌病害的潜力 [J]. 中国农业科学, 2019, 52 (11): 1908–1917.
SHA Y X, SUI S T, ZENG Q C, et al. Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* strain E69 against rice blast and other fungal diseases [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52 (11): 1908–1917. (in Chinese)
- [17] 赵昱格, 李磊, 谢学文, 等. 贝莱斯芽胞杆菌ZF2对多主棒孢病菌防治效果 [J]. 中国生物防治学报, 2019, 35 (2): 217–225.
ZHAO Y R, LI L, XIE X W, et al. Biocontrol effect of *Bacillus velezensis* strain ZF₂ against *Corynespora cassicola* [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2019, 35 (2): 217–225. (in Chinese)
- [18] 崔文会, 孙雪, 梁承宇, 等. 土传真菌病害拮抗菌的筛选及其生防效果研究 [J]. 工业微生物, 2020, 50 (2): 41–47.

- CUI W H, SUN X, LIANG C Y, et al. Screening of antagonistic bacteria against soil-borne pathogenic fungi and evaluation of their biocontrol effects [J]. *Industrial Microbiology*, 2020, 50 (2): 41–47. (in Chinese)
- [19] 王瑞昊, 邓业成, 陈广桂, 等. 罗汉果土传病害拮抗细菌的筛选及鉴定 [J]. 福建农业学报, 2021, 36 (8): 927–935.
- WANG R H, DENG Y C, CHEN G G, et al. Antagonistic bacteria against soil-borne diseases on *Siraitia grosvenorii* [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 36 (8): 927–935. (in Chinese)
- [20] 许帅, 谢学文, 张昀, 等. 马铃薯枯萎病生防芽胞杆菌筛选及生防效果研究 [J]. 中国生物防治学报, 2020, 36 (5): 761–770.
- XU S, XIE X W, ZHANG Y, et al. Screening of biocontrol *Bacillus* isolate against potato *Fusarium* wilt and its biocontrol effect [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2020, 36 (5): 761–770. (in Chinese)
- [21] MARTÍNEZ-RAUDALES I, DE LA CRUZ-RODRÍGUEZ Y, ALVARADO-GUTIÉRREZ A, et al. Draft genome sequence of *Bacillus velezensis* 2A-2B strain: A rhizospheric inhabitant of *Sporobolus airoides* (Torr.) Torr., with antifungal activity against root rot causing phytopathogens [J]. *Standards in Genomic Sciences*, 2017, 12: 73.
- [22] 蒙月月. 桑树细菌性枯萎病菌生物学特性研究及其拮抗细菌和防治药剂筛选 [D]. 南宁: 广西大学, 2014.
- MENG Y Y. Research on biological characteristics of mulberry bacterial wilt pathogens, and screening of its antagonistic bacterials and bactericides [D]. Nanning: Guangxi University, 2014. (in Chinese)
- [23] 宋文欣, 陈清华, 杨惠贞, 等. 桑枝枯菌核病病菌拮抗芽孢杆菌的筛选和鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2020, 48 (22): 106–110.
- SONG W X, CHEN Q H, YANG H Z, et al. Screening and identification of antagonistic *Bacillus* spp. against *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48 (22): 106–110. (in Chinese)
- [24] 夏京津, 陈建武, 宋怿, 等. 解淀粉芽孢杆菌HE活性成分鉴定及抗菌特性分析 [J]. 南方水产科学, 2019, 15 (3): 41–49.
- XIA J J, CHEN J W, SONG Y, et al. Identification of antibacterial substances from *Bacillus amyloliquefaciens* HE and analysis of antibacterial characteristics [J]. *South China Fisheries Science*, 2019, 15 (3): 41–49. (in Chinese)
- [25] 曲晓旭, 刘洪霞, 高玲, 等. 芽孢杆菌产抗菌脂肽调控基因快速检测 [J]. 南京农业大学学报, 2016, 39 (5): 858–864.
- QU X X, LIU H X, GAO L, et al. Rapid identification of the encoding genes of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus* [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2016, 39 (5): 858–864. (in Chinese)
- [26] 冉军舰, 徐剑宏, 胡晓丹, 等. 1株产脂肽类抗生素芽孢杆菌的鉴定及脂肽类抗生素相关基因克隆 [J]. 食品科学, 2016, 37 (17): 127–132.
- RAN J J, XU J H, HU X D, et al. Identification of a *Bacillus* strain producing lipopeptide and cloning of genes related to lipopeptide [J]. *Food Science*, 2016, 37 (17): 127–132. (in Chinese)
- [27] 武利勤, 尚宏忠, 顾海科. 拮抗匍枝根霉的生防菌R1B的筛选鉴定和抑菌活性分析 [J]. 生物技术通报, 2019, 35 (4): 29–35.
- WU L Q, SHANG H Z, GU H K. Screening, identification of biocontrol bacterium R1B against *Rhizopus stolonifer* and analysis of its antagonistic characteristics? [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35 (4): 29–35. (in Chinese)
- [28] JOSHI R, MCSPADDEN GARDENER B B. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis* [J]. *Phytopathology*, 2006, 96 (2): 145–154.
- [29] 程凯, 江欢欢, 沈标, 等. 棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物防治效果 [J]. 植物营养与肥料学报, 2011, 17 (1): 166–174.
- CHENG K, JIANG H H, SHEN B, et al. Isolation and biological control effects of cotton Verticillium wilt antagonist [J]. *Plant Nutrition and Fertilizer Science*, 2011, 17 (1): 166–174. (in Chinese)
- [30] RABBEE M F, ALI M S, CHOI J, et al. *Bacillus velezensis*: A valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes [J]. *Molecules*, 2019, 24 (6): 1046.
- [31] MARDANOVA AM, FANISOVNA HADIEVA G, TAFKILEVICH LUTFULLIN M, et al. *Bacillus subtilis* strains with antifungal activity against the phytopathogenic fungi [J]. *Agricultural Sciences*, 2017, 8 (1): 1–20.
- [32] 邓永卓, 张家宁, 邓爽, 等. 伊枯草菌素类抗菌肽抑菌活性及机理研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2020, 45 (7): 639–645.
- DENG Y Z, ZHANG J N, DENG S, et al. Progress on the antibacterial activity and antibacterial mechanisms of iturins [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2020, 45 (7): 639–645. (in Chinese)
- [33] NANNAN C, VU H Q, GILLIS A, et al. Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: Gene prevalence versus antagonistic activity against Gram-negative foodborne pathogens [J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 327: 28–35.
- [34] 吴黎明, 李曦, 伍辉军, 等. 芽孢杆菌抗菌二肽溶杆菌素的研究进展 [J]. 南京农业大学学报, 2018, 41 (5): 778–783.
- WU L M, LI X, WU H J, et al. Research advances on bacilysin from *Bacillus* [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2018, 41 (5): 778–783. (in Chinese)
- [35] 杨迪, 杜婵娟, 张晋, 等. 香蕉枯萎病拮抗菌贝莱斯芽孢杆菌的筛选鉴定及其生物学特性 [J]. 中国生物防治学报, 2021, 37 (1): 165–171.
- YANG D, DU C J, ZHANG J, et al. Screening, identification and biological characteristics of *Bacillus velezensis* with antagonist activity against banana *Fusarium* wilt [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37 (1): 165–171. (in Chinese)
- [36] 赵鹏鹏, 雷淑珍, 徐晓光, 等. 培养基组成对贝莱斯芽孢杆菌产抑真菌成分的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2020, 46 (5): 147–151.
- ZHAO P P, LEI S Z, XU X G, et al. Effect of medium compositions on the production of antifungal components by *Bacillus velezensis* [J]. *Food and Fermentation Industries*, 2020, 46 (5): 147–151. (in Chinese)
- [37] LECLÈRE V, BÉCHET M, ADAM A, et al. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (8): 4577–4584.
- [38] 黄伟, 张丽娟, 秦新政, 等. 贝莱斯芽孢杆菌JK19发酵液稳定性及抑菌物质初步分析 [J]. 中国生物防治学报, 2021, 38(1): 73–80.
- HUANG W, ZHANG L J, QIN X Z, et al. Preliminary analysis of stability and antimicrobial substances in fermentation broth of *Bacillus velezensis* JK19[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 38(1): 73–80. .

(责任编辑: 林海清)