

油茶炭疽病拮抗细菌 P-14 的拮抗物质分析

喻锦秀^{1,2}, 何振², 李密², 邬颖³, 彭邵锋^{2,4}, 钟杰¹, 高必达^{1*}

(1. 湖南农业大学, 湖南长沙 410128; 2. 湖南省林业科学院, 湖南长沙 410004;

3. 湖南林科达农林技术服务有限公司, 湖南长沙 410004; 4. 国家油茶工程技术研究中心, 湖南长沙 410004)

摘要: [目的] 探索解淀粉芽孢杆菌 P-14 对油茶炭疽病病原菌的拮抗物质, 以期油茶炭疽病的生物农药开发利用提供理论依据。 [方法] 利用酸沉淀法和高效液相色谱法分离解淀粉芽孢杆菌 P-14 发酵液中的拮抗物质, 通过顶空固相微萃取法和气相色谱-质谱法对解淀粉芽孢杆菌 P-14 的挥发性物质进行了分离鉴定。 [结果] 分离后的组分 a 对油茶炭疽病的病原菌具有良好的抑制作用, 其主要成分为 C15 bacillomycin D (杆菌霉素 D)。此外, 共分离得到 35 种挥发性化合物, 其相对抑菌率为 $(26.19 \pm 3.82)\%$, 其中包含苯类物质 (benzenes) 10 种、烷基类物质 (alkyls) 8 种、醇类物质 (alcohols) 2 种、酮类物质 (ketones) 11 种、醛类物质 (aldehydes) 3 种和 1 种酯类物质 (esters)。 [结论] 解淀粉芽孢杆菌 P-14 能产生对油茶炭疽病的病原菌具有明显的拮抗作用的物质, 并确定了其拮抗物质种类, 为油茶炭疽病的生物农药开发提供了可靠的研究内容。

关键词: 油茶炭疽病; 解淀粉芽孢杆菌; 拮抗物质; 脂肽类抗生素; 挥发性物质

中图分类号: S763.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)01-0118-07

油茶 (*Camellia oleifera* Abel.) 属山茶科 (Theaceae) 山茶属 (Cameuia) 植物, 是我国主要的经济林树种, 也是世界四大木本油料植物之一^[1]。由于油茶具有适应性强、抗逆性好的特性, 十分适宜在相对贫瘠的红壤丘陵地区种植, 因此广泛分布于我国湖南、江西、广西等 17 个省区, 在我国已有超过两千年的种植历史。我国现有油茶林种植面超过 4.3×10^6 hm², 油茶籽年产量达 217 万吨, 产值超过 600 亿元。湖南作为油茶的最大产区和茶油的最大消费区, 油茶资源约占全国 40%^[2]。但是, 油茶的种植生产过程中往往受到多种病虫害的侵袭, 导致油茶的产量和品质大幅下降, 其中以油茶炭疽病对油茶林的危害最为严重。

油茶炭疽病 (*Colletotrichum camellia* Massee) 病菌能够侵染油茶的花芽、叶芽、果实、枝梢和叶片, 通常引起油茶的落花、落果和枝枯现象, 严重时甚至能造成整株死亡; 在我国各油茶产区均有发生, 可导致 20% 左右的平均落果率, 有时可高达 40%~50%, 是油茶种植过程中的最主要病害之一^[3]。尽管化学

农药对油茶炭疽病的防治具有一定效果^[4-7], 但长期滥用化学农药会引起病原菌的抗药性, 造成环境污染, 同时大幅增加成本^[8-9]。因此, 开发出对油茶炭疽病防治效果显著, 无污染、无公害、可持续的生物防治手段显得尤为重要。

芽孢杆菌属中的解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) 在自然界中分布广泛, 对人、畜无毒无害, 具有很高的抗逆能力; 研究表明, 解淀粉芽孢杆菌具有广谱的抑制真菌和细菌活性的作用, 且生长速度快、稳定性强, 是一种理想的生防菌资源^[10-11]。解淀粉芽孢杆菌的主要生防机制包括有定殖、分泌拮抗物质、诱导系统抗性等, 其中分泌拮抗物质如脂肽类抗生素和挥发性物质等, 可显著抑制病原微生物的活性, 抑制病害的发生^[12-13]。因此, 本研究分别通过高效液相色谱法 (HPLC) 和气相色谱-质谱法 (GC-MS) 对前期研究工作中分离得到的解淀粉芽孢杆菌菌株 P-14 中的脂肽类抗生素和挥发性物质分别进行分离、鉴定, 以期获得高效的抑菌物质用于油茶炭疽病的生物防治。

收稿日期: 2017-11-09 修回日期: 2018-03-28

基金项目: 湖南省林业科技计划项目“油茶主要病害、钻蛀性害虫生物防治技术研究”(YC2016001); 湖南省科技重大专项“油茶良种繁育与生态高效培育关键技术研究与示范”(2013FJ1006)

* 通讯作者: 高必达. E-mail: bdgao@public.cs.hn.cn.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

解淀粉芽孢杆菌菌株 P-14 由湖南省林业科学院森林资源保护所分离鉴定,油茶炭疽病原真菌(*C. Camellia*)由湖南省林业科学院森林资源保护所分离保存。

1.2 菌液制备

将保存的解淀粉芽孢杆菌菌株 P-14 划线到 LB 培养基(Luria-Bertani Broth)平板上,37℃下活化 24 h;而后挑取活化菌株的单菌落接种于含 100 mL LB 液体培养基的三角瓶中,37℃、170 r·min⁻¹下培养 24 h 作为种子液。将 5 mL 种子液接种到 100 mL Landy 培养基中,30℃、170 r·min⁻¹下震荡培养,连续培养 60 h 后获得发酵液,将发酵液置于低温条件下 12 000 r·min⁻¹离心初步除去菌体,并用 0.22 μm 无菌微孔滤膜过滤。取 50 μL 滤液均匀涂布于 LB 培养基平板上,37℃下培养 24 h 无杂菌即得无菌滤液。

1.3 脂肽类抗生素的测定

1.3.1 脂肽类抑菌物质的提取 通过酸沉淀法^[14]提取无菌滤液中的脂肽类抑菌物质,加入 6 mol·L⁻¹ HCl 调节无菌滤液 pH 至 2.0,4℃过夜沉淀;8 000 r·min⁻¹离心 10 min,弃上清液,待沉淀自然干燥后加入甲醇抽提两次并将抽提液合并,即得脂肽抗菌物质粗提物;粗提物冷冻干燥后溶于 pH 6.8 的磷酸缓冲液(PBS)中,用 0.22 μm 的无菌滤膜过滤,置于-20℃下备用。

1.3.2 脂肽类抑菌物质的 HPLC 分离及鉴定 脂肽类抑菌物质的纯化分离采用高效液相色谱法,分离柱为 Eclipse XDB-C18 (4.6 × 250 mm, Agilent, USA);流动相 A 为 0.1% 的乙酸溶液, B 为 100% 乙腈, A:B = 60:40;流速设置为 0.4 mL·min⁻¹,柱温为 30℃,进样量为 20 μL。

采用抑菌圈法筛选具有抑菌效果的 HPLC 分离物,用已灭菌的打孔器在 PDA 平板上等距地打四个小孔,分别取 100 μL HPLC 分离物加入小孔中,对照组为无菌水和甲醇溶液;每个分离物重复试验 3 次,培养 7 d 后观察平板上的抑菌圈大小以确定该组分是否具有抑菌作用。

通过抗菌效果实验筛选出的拮抗物质,运用安捷伦高效液相色谱-电喷雾/质谱仪(HPLC-ESI-

MS;HPLC:1200 系列,ESI-MS:6410 Triple Quad LC/MS,USA)进一步鉴定其分子量与结构。分离柱为 MS C18 色谱柱(50 mm × 2.1 mm, 1.8 μm, Agilent, USA)。溶剂 A 为乙腈, B 为水(含 0.1% 乙酸), A: B = 40%:60%。流速设置为 0.3 mL·min⁻¹,柱温为 25℃,210 nm 波长检测。电离方式采用电喷雾离子源,质量检测器为四级质量分析器。电喷雾条件为:喷雾电压 4.5 kV、毛细管温度 300℃,检测方式为正离子模式(ESI+),利用碰撞诱导解离技术(CID)获得化合物的典型碎片离子,碰撞池中碰撞气体为氮气,碰撞能量根据试验需要进行设定。

1.3.3 拮抗物质合成的相关基因检测 采用 CTAB 法提取菌株 P-14 的基因组 DNA,以此为模板扩增脂肽类抗生素 bacillomycin D 合成的相关基因 *bamD*, 其引物(F: 5'-GCTCTTGATGACCTTCTCTGCG-3', R: 5'-ATTTTGTGCGATTGGTCTGT-3')选择参考 Chen et al.^[15]中所述。将扩增的基因片段测序后在 NCBI 上进行 BLAST 同源性分析,判定拮抗菌 P-14 是否能够合成期望的拮抗物质。

1.4 挥发性有机物质(VOCs)的测定

1.4.1 挥发性抑菌物质的平板检测 在二分格培养皿的两侧分别倾倒 LB 固体培养基和 PDA 固体培养基,划线接种 P-14 菌株到二分格培养皿一侧的 LB 培养基中央,另一侧同时接种的油茶炭疽病的病原菌菌饼于 PDA 培养基中央,重复试验 3 次,对照组中不接种 P-14 菌株。置于 25℃下培养 3 d,逐日记录每天病原菌的菌落直径。

1.4.2 挥发性抑菌物质的离体叶片抑菌试验 在二分格培养皿的一侧倾倒 LB 固体培养基,划线接种 P-14 菌株,另一侧放置灭菌滤纸,滴入适量无菌水保湿;对照组中不接种 P-14 菌株。取油茶健康叶片用无菌水冲洗晾干后置于灭菌滤纸一侧,用无菌针头在叶片中央划出一条伤口,并将油茶炭疽病的病原菌菌块接种于伤口处,重复试验 3 次,在 28℃下培养 3 d,观察油茶叶片的发病情况。

1.4.3 挥发性抑菌物质的收集及检测 采用顶空固相微萃取法(head-space solid-phase micro-extraction, HS-SPME)收集 P-14 菌株产生的挥发性物质。挑取 P-14 菌株的菌块接种于含 200 mL PDA 培养基的锥形瓶中,而后将 50/30 μm DVB/PDMS 萃取头(Supelco, Vienna, Austria)置于锥形瓶的顶部空间,并暴露于 P-14 菌株产生的挥发性物质(VOCs, vola-

tile organic compounds) 中,以不接种 P-14 菌块的 PDA 液体培养基作为空白对照。将锥形瓶置于 30℃ 下培养 7 d,而后取出含 VOCs 的萃取头,注入气相色谱-质谱联用仪(GC-MS, Gas Chromatography-Mass Spectrometry) 中进行检测。将含 VOCs 的萃取头在 220℃ 下加热 1 min 释放 VOCs,而后以 He 作为载气,恒速 1 mL · s⁻¹ 进行监测,首先将萃取柱在 220℃ 加热 1 min 将 VOCs 释放于 HP-5MS 色谱柱(Agilent, Waldbronn, Germany) 中,然后再用 He 作为载气恒速 1 mL · min⁻¹ 进行检测。检测程序为初始温度 40℃,保持 2 min,而后以 10℃ · min⁻¹ 的速率升温到 200℃;接着以 25℃ · min⁻¹ 的速率升温到 260℃,保持 5 min。质谱检测参数参考 Yuan et al. [16],将测定的各物质质谱信息与 Mainlib 和 Replib 质谱数据库条目进行比较,如果匹配度达 ≥ 90% 即可认定为该种物质。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌 P-14 脂肽类物质的分离与鉴定

通过 HPLC 分析,从解淀粉芽孢杆菌 P-14 发酵液中纯化收集到 5 种主要组分,其分析图谱如图 1 所示;对收集的 5 种组分进行冷冻干燥后,溶于一定量的甲醇中备用。运用牛津杯法分别测定 5 种组分的抗菌活性,抗菌效果如图 2 所示,结果表明 5 种主要成分中仅有 a 号峰有抑菌活性。将收集的 a 号峰进行 HPLC-ESI-MS 分析,得到分子量分别为 1 045.5 和 1 067.5 的物质,其质谱图如图 3 所示。对比芽孢杆菌脂肽物质的分子量数据可知:组分 a 中主要是含有 C15 bacillomycin D(杆菌霉素 D)。

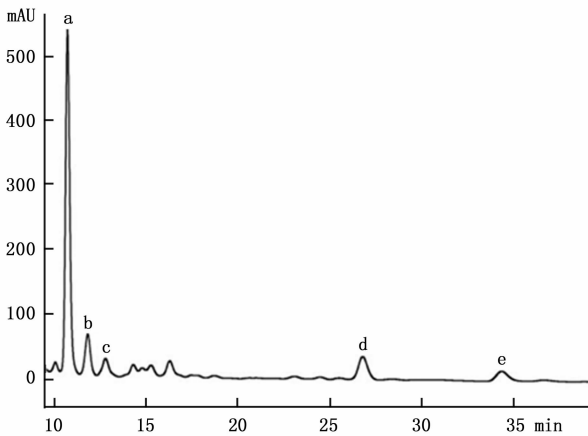
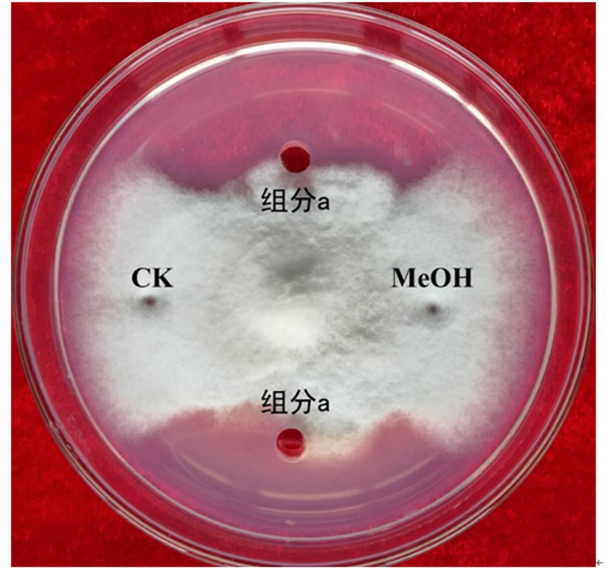


图 1 菌株 P-14 脂肽类抗菌物质的 HPLC 分析图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of the lipopeptide antibiotics produced by strain P-14.



CK: 对照组为水, MeOH: 甲醇

图 2 a 号峰抗菌活性测定

Fig. 2 Anti-fungi active determination of component (a)

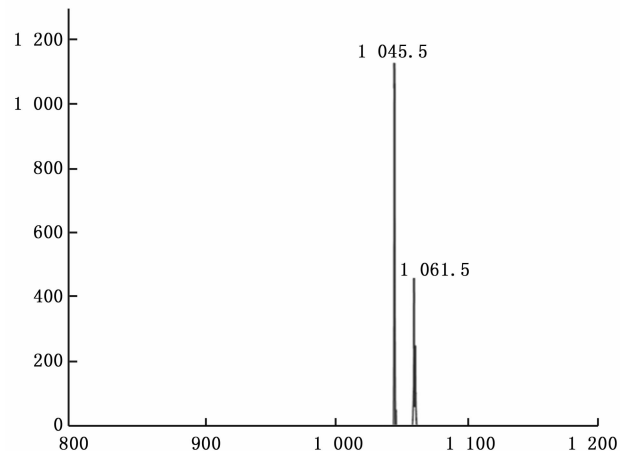
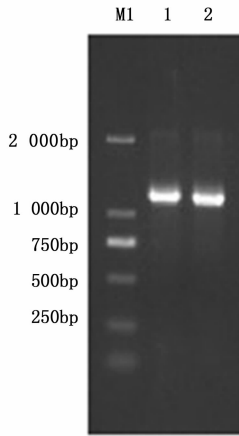


图 3 a 号峰各组分的质谱图

Fig. 3 Mass spectrum of component (a) from HPLC

2.2 拮抗菌 P-14 与脂肽类拮抗物质合成相关基因的检测

为进一步确定拮抗菌 P-14 产生的脂肽类拮抗物质,以菌株 P-14 的基因组 DNA 为模板扩增 bacillomycin D 合成的相关基因,其 PCR 产物的大小和理论值吻合,结果如图 4。将扩增得到的序列上传至 NCBI 进行同源性分析,比对结果表明菌株 P-14 中 bamD 基因片段与 *B. amyloliquefaciens* FZB42 bacillomycin D 基因同源性达 99%。



M1:DL2000 DNA marker;1 和 2:bamD

图 4 菌株 P-14 抗菌物质合成相关基因 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis for the PCR results of anti-fungi active related genes in Strain P-14

2.3 解淀粉芽孢杆菌挥发性抑菌物质的鉴定

挥发性物质抑菌试验结果如图 5 所示,接种 3 d 后,解淀粉芽孢杆菌处理中病原菌的菌落直径显著低于对照组,相对抑菌率为 $(26.19 \pm 3.82)\%$;此外,经过 3 次重复试验,在油茶健康叶片发病实验中,二分皿另一侧未接种 P-14 菌株时,油茶叶片发病严重,而接种 P-14 菌株的油茶叶片未发病(图 6),表明解淀粉芽孢杆菌的挥发性物质具有显著的抑菌活性。运用顶空固相微萃取法收集 P-14 菌株产生的挥发性气体进行 GC-MS 分析,可分离得到 35 种化合物,包含苯类物质(benzenes)10 种、烷基类物质

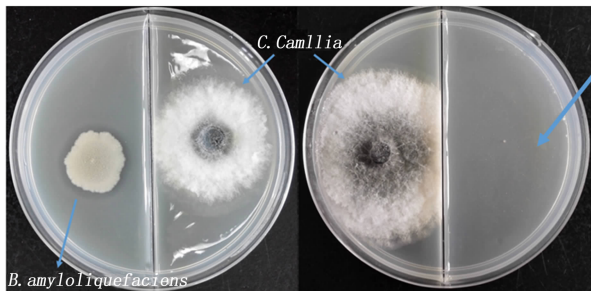


图 5 解淀粉芽孢杆菌的挥发性有机物质抑制病原菌生长(左边为处理,右边为对照)

Fig. 5 *B. amyloliquefaciens* anti-fungal volatile activity on divided plates. Mycelial plug growth was inhibited in the presence of the bacteria streaked in the different compartments (right), compared to the control (left)

(alkyls) 8 种、醇类物质(alcohols) 2 种、酮类物质(ketones)11 种、醛类物质(aldehydes)3 种和 1 种酯类物质(esters),如表 1 所示。

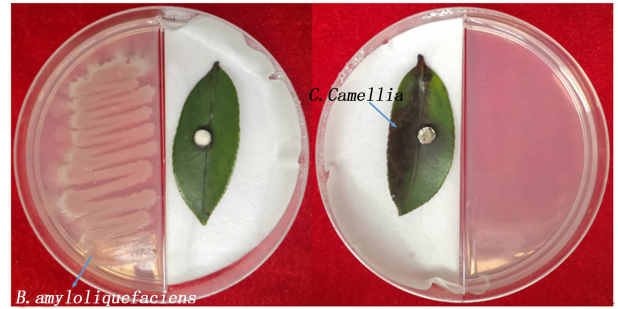


图 6 解淀粉芽孢杆菌的挥发性有机物质抑制叶片发病(左边为处理,右边为对照)

Fig. 6 Volatile organic compounds of *B. amyloliquefaciens* reduce symptoms of *Camellia oleifera* leaf. Mycelial plug growth was inhibited in the presence of the bacteria streaked in the different compartments (right), compared to the control (left)

3 讨论

解淀粉芽孢杆菌在促进植物生长、增强植物抗病性方面具有一定作用,并作为拮抗菌在棉花、番茄、黄瓜等的病虫害防治中得到广泛应用^[17-19]。解淀粉芽孢杆菌能产生多种具有拮抗作用的次生代谢产物,主要可分为两大类:通过核糖体途径合成的抗菌物质,如细菌素^[20-21]及杆菌溶素^[22]等;通过非核糖体途径也能合成两种重要抗菌物质,如脂肽类抗生素^[23]、聚酮化合物^[24]和挥发性抗菌物质^[16]。本研究对解淀粉芽孢杆菌菌株 P-14 主要抗菌活性物质——脂肽类抗生素和挥发性物质进行了分离纯化,并进行鉴定,以期阐明该菌株的生防机制。

研究表明,解淀粉芽孢杆菌可以产生至少一种具有拮抗作用的脂肽类抗生素,其中两个主要类群——伊枯草杆菌素 Iturins 和丰原素 Fengycins 具有很强的抗真菌活性^[25-27]。本研究利用酸沉淀法和 HPLC 法分离鉴定解淀粉芽孢杆菌 P-14 发酵液中的脂肽类物质,结果表明分离后的组分 a 对油茶炭疽病的病原菌具有良好的抑制作用,组分 a 中主要成分为分子量 1 045.5 和 1 067.5 的 C15 bacillo-mycin D,该组分属于伊枯草杆菌素家族 Iturin,是一种在抑制真菌生长方面起主要作用的胞外物质^[28]。研究表明,bacillomycin D 是抑制黄曲霉(*Aspergillus*

表1 解淀粉芽孢杆菌 P-14 挥发性物质鉴定

Table.1 Volatile organic compounds produced by *B. amyloliquefaciens* P-14

苯类物质 Benzenes		烷基类物质 Alkyls		醇类物质 Alcohols		酮类物质 Ketones		醛类物质 Aldehydes		酯类物质 Esters	
保留时间 Retention time	化合物 Compounds	保留时间 Retention time	化合物 Compounds	保留时间 Retention time	化合物 Compounds	保留时间 Retention time	化合物 Compounds	保留时间 Retention time	化合物 Compounds	保留时间 Retention time	化合物 Compounds
1.25	1,4-Pentadiene	12.64	Cyclooctane, methyl-	10.48	Benzyl Alcohol	7.68	2-Heptanone	9.16	Benzaldehyde	14.51	n-pentadecyl ester
9.54	Phenol	13.05	Dodecane	10.35	1-Hexanol, 2-ethyl-	8.96	2-Heptanone, 6-methyl-	10.64	Benzaldehyde, 2-hydroxy-		
10.09	Benzene, 1, 2-dichloro-	15.48	Cyclodecane			10.79	2-Nonanone	15.97	Dodecanal		
11.21	Pyrazine, 2-ethyl-3, 5-dimethyl-	15.83	Tetradecane			11.04	Acetophenone				
13.57	Benzothiazole	16.68	2-Methyl-1-dodecene			11.39	2-Nonanone				
14.75	Pyrazine, 2, 5-dimethyl-3-(3-methylbutyl)-	16.79	Cyclododecane			12.40	Cycloheptatrien-1-one				
15.24	Quinazoline, 4-methyl-	19.52	Eicosane			13.47	Benzofuran, 2-ethenyl-				
16.25	Naphthalene, 2,6-dimethyl-	20.06	Nonadecane			13.90	2-Undecanone				
17.00	9-Octadecene, (E)-					15.3	4-Dodecanone				
17.35	Butylated Hydroxytoluene					16.60	2-Tridecanone				
						17.84	2-Hexadecanone				

flavus) 效果最佳的抗生素之一^[29], 对白粉病病原菌 (*Podosphaera fusca*) 也具有很强的抑制作用^[30]; 与其它脂肽类抗生素无交叉耐药性、毒性小、抗菌谱广、显著增强其他脂肽类抗生素的抑菌活性^[31]。信珊珊等^[32-33]研究表明, 运用解淀粉芽孢杆菌 WH1 中的脂肽类物质作为防治油茶炭疽病的生物农药是可行的, 但未对其主要有效成分进行分离鉴定; 孟庆敏等^[34]通过乙醇沉淀、固相萃取、HPLC 及 LC-MS 对枯草芽孢杆菌 Y13 中的抑菌物质进行分离鉴定, 结果表明其主要脂肽类抑菌物质分别为 Iturin 和 Fengycin 的同系物。本研究首次从油茶分离并鉴定解淀粉芽孢杆菌中脂肽类抑菌物质 bacillomycin D, 并验证了其对油茶炭疽病的抑制效果。

芽孢杆菌所合成的挥发性物质的抑菌作用明显, 代谢产生的挥发性物质能够抑制多种植物病原真菌的生长, 其中包括酸、酮、酯和醇等有机物, 不同的挥发性物质抑制真菌的效果也不同^[35-37]。本研究中通过顶空固相微萃取法收集, 能够直接收集挥

发性物质, 无需采用有机溶剂萃取, 既增加了收集的挥发性物质种类, 同时也减少了操作步骤, 提高了收集效率^[27]。此外, 本研究通过 GC-MS 对解淀粉芽孢杆菌 P-14 的挥发性物质进行了鉴定, 共分离得到 35 种化合物, 包含苯类物质 (benzenes) 10 种、烷基类物质 (alkyls) 8 种、醇类物质 (alcohols) 2 种、酮类物质 (ketones) 11 种、醛类物质 (aldehydes) 3 种和 1 种酯类物质 (esters), 其种类与前人研究基本一致。本研究分离的 35 种化合物中, 至少有 13 种在其他芽孢杆菌的挥发物中能够分离得到, 其中苯并噻唑 (Benzothiazole)、2-乙基己醇 (1-Hexanol, 2-ethyl-)、2-壬酮 (2-Nonanone)、苯酚 (Phenol)、2-十一酮 (2-Undecanone) 已被证实具有植物生长的功能, 并能诱导植物产生抗病作用^[16, 38-39]。其它挥发性化合物是否具有抑菌作用, 还需进一步的证实。

4 结论

本研究通过对解淀粉芽孢杆菌菌株 P-14 产生

的脂肽类抗生素的分离与鉴定,获得了油茶炭疽病病原菌具有拮抗作用的组分 a,其主要成分为 C15 bacillomycin D;同时对 P-14 产生的挥发性物质进行分离验证,结果表明 P-14 产生的挥发性物质对油茶炭疽病病原菌具有拮抗作用,并分离得到了 35 种挥发性物质。本研究确定了解淀粉芽孢杆菌 P-14 的拮抗物质种类,为油茶炭疽病的生物农药开发提供了可靠的研究内容。

参考文献:

- [1] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 北京,中国林业出版社,2012.
- [2] 周建宏. 油茶主要病害的植物源药剂研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2011.
- [3] 喻锦秀,聂延安,周刚,等. 湖南省油茶主要病害发生规律研究[J]. 湖南林业科技,2014,41(1):94-97.
- [4] 黄新华. 百菌清等3种药剂防治油茶炭疽病药效试验[J]. 江西林业科技,2000(2):18-19.
- [5] 邓鑫州,黄连桂,邓荫伟. 5种药剂对油茶炭疽病的防治效果研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(16):9653-9654.
- [6] 刘军根,吴军平,陈刚,等. 生物制剂果力士防治油茶炭疽病药效试验[J]. 林业实用技术,2011(6):46-47.
- [7] 罗洪,梁勇,肖琴琳,等. 果力士防治油茶嫁接苗炭疽病试验[J]. 中国森林病虫,2011,30(3):46.
- [8] Damalas C A. Understanding benefits and risks of pesticide use[J]. Scientific Research & Essays, 2009, 4(10):945-949.
- [9] Hvistendahl M. In rural asia, locking up poisons - prevent suicides [J]. Science, 2013, 341(6147):738.
- [10] Borriss R. Use of plant-associated bacillus strains as biofertilizers and biocontrol agents in agriculture[M]//Mahshwari. Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses. Springer, 2011:41-76.
- [11] Erlacher A, Cardinale M, Grosch R, et al. The impact of the pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus amyloliquefaciens* on the indigenous lettuce microbiome[J]. Front Microbiol, 2014, 5(175):175.
- [12] Chen X H, Koumoutsis A, Scholz R, et al. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(1):27-37.
- [13] Chowdhury S P, Hartmann A, Gao X W, et al. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-a review [J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6(780):780.
- [14] 高学文,姚仕义, Huang, 等. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的表面活性素变异体的纯化和鉴定[J]. 微生物学报, 2003, 43(5):647-652.
- [15] Chen X H, Koumoutsis A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(9):1007-1014.
- [16] Yuan J, Raza W, Shen Q, et al. Antifungal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 volatile compounds against *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2012, 78(16):5942-5944.
- [17] Grosch R, Junge H, Krebs B, et al. Use of *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent. III. Influence of *Bacillus subtilis* on fungal root diseases and on yield in soilless culture[J]. Journal of Plant Diseases & Protection, 1999, 106(6):568-580.
- [18] Yao A V, Bochow Dr H, Karimov S, et al. Effect of FZB 24[®] *Bacillus subtilis* as a biofertilizer on cotton yields in field tests[J]. Archives of Phytopathology & Plant Protection, 2006, 39(4):323-328.
- [19] Gül A, Kidoglu F, Tüzel Y, et al. Effects of nutrition and *Bacillus amyloliquefaciens* on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) growing in perlite[J]. 2008, 6(3):422-429.
- [20] Scholz R, Molohon K J, Nachtigall J, et al. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(1):215-224.
- [21] Scholz R, Vater J, Budiharjo A, et al. Amylocyclicin, a novel circular bacteriocin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Journal of Bacteriology, 2014, 196(10):1842-1852.
- [22] Chen X H, Scholz R, Borriss M, et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens*, are efficient in controlling fire blight disease[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(1-2):38-44.
- [23] Koumoutsis A, Chen X H, Henne A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4):1084.
- [24] Chen X H, Vater J, Piel J, et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(11):4024.
- [25] Földes T, Bánhegyi I, Herpai Z, et al. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and in vitro screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage microorganisms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(5):840-846.
- [26] Romero D, De V A, Olmos J L, et al. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis*, on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(4):969-976.
- [27] 李宝庆,鹿秀云,郭庆港,等. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 产脂肽类及挥发性物质的分离和鉴定[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17):3547-3554.
- [28] Ongena M, Jacques P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol [J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3):115-125.
- [29] Xu Z, Shao J, Li B, et al. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation[J]. Applied & Environmental Microbiology, 2013, 79(3):808-815.
- [30] Romero D, De V A, Rakotoaly R H, et al. The iturin and fengycin

families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*[J]. Molecular Plant-microbe Interactions: MPMI, 2007, 20(4):430.

- [31] Moyné A L, Shelby R, Cleveland T E, *et al.* Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(4):622.
- [32] 信珊珊. 解淀粉芽孢杆菌 WH1 的发酵优化及其产物对油茶炭疽病和肿瘤的抑制作用研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2011.
- [33] 信珊珊, 祁高富, 朱发银, 等. 1 株解淀粉芽孢杆菌发酵条件的优化及其对油茶炭疽病的防效[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(4): 411–415.
- [34] 孟庆敏, 周国英, 刘君昂, 等. 油茶炭疽病拮抗细菌 Y13 主要抑菌物质分离纯化及作用方式[J]. 植物保护, 2014, 40(2): 36–42
- [35] 龚庆伟. 芽孢杆菌抗菌脂肽分离纯化及 Bacillomycin D 抑制黄曲霉作用的研究[D]. 南京:南京农业大学, 2012.

- [36] W G Dilantha F, Ramarathnam R, Krishnamoorthy A S, *et al.* Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol[J]. Soil Biology & Biochemistry, 2005, 37(5): 955–964.
- [37] Kai M, Effmert U, Berg G, *et al.* Volatiles of bacterial antagonists inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. Archives of Microbiology, 2007, 187(5):351–360.
- [38] Almenar E, Del V V, Catala R, *et al.* Active package for wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.)[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2007, 55(6):2240–2245.
- [39] Raza W, Wang J, Wu Y, *et al.* Effects of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens*, on the growth and virulence traits of tomato bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2016, 100(17):1–12.

Analysis of Metabolic Antagonists Against *Colletotrichum camellia* by Antagonistic Bacteria P-14

YU Jin-xiu^{1,2}, HE Zhen², LI Mi², WU Ying³, PENG Shao-feng^{2,4}, ZHONG Jie¹, GAO Bi-da¹

(1. Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China; 2. Hunan Academy of Forestry, Changsha 410004, Hunan, China; 3. Hunan Linkeda Agriculture and Forestry Technology Service Co., Ltd, Changsha 410004, Hunan, China; 4. National Oil-tea Camellia Engineering & Technology Research Center, Changsha 410004, Hunan, China)

Abstract: [Objective] The purpose of this study is to explore the metabolic antagonists against *Colletotrichum camellia* produced by antagonistic bacteria P-14, in order to provide a theoretical basis for the development and utilization of biopesticides of *Camellia oleifera*. [Method] The acid precipitation and high-performance liquid chromatography was used to identify the lipopeptide antibiotics produced by strain P-14, and the volatile compounds were analyzed by gas chromatography-mass spectrometry. [Result] The component a containing C15 bacillomycin D showed the strongest inhibitory effect against *Colletotrichum camellia*. In addition, a total of 35 volatile compounds were separated, the relative bacteriostatic rate was $(26.19 \pm 3.82)\%$, including 10 benzenes, 8 alkyls, 2 alcohols, 11 ketones, 3 aldehydes, and 1 esters. [Conclusion] *Bacillus amyloliquefaciens* P-14 could produce metabolic antagonists against *Colletotrichum camellia*, and the metabolic antagonists has been identified, which can provide with reliable research data for the development of biopesticides against *C. oleifera*.

Keywords: *Colletotrichum camellia*; *Bacillus amyloliquefaciens*; metabolic antagonists; lipopeptide; volatile organic compounds

(责任编辑:崔 贝)