



桑树内生拮抗菌的分离鉴定及其对桑断枝烂叶病的生防初探

王若琳^{1,2}, 徐伟芳^{1,2}, 王飞^{1,2}, 周小磊^{1,2}, 郑月^{1,2}, 江鸿森^{1,2}, 谢洁^{1,2*}

¹西南大学生物技术学院, 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400715

²西南大学生物技术学院, 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715

摘要:【目的】本研究从健康桑树茎中分离筛选对桑断枝烂叶病菌具显著拮抗作用的内生细菌, 为该病生物防治奠定研究基础。【方法】采用组织培养法分离桑树内生菌, 抑菌圈法和平板对峙法筛选抑菌活性稳定的内生拮抗菌; 根据形态学、生理生化特征检测和基于 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因的系统发育分析对拮抗菌进行菌种鉴定; 利用抑菌圈法测定拮抗菌株活性发酵液热稳定性, 菌丝生长速率法检测活性发酵液抑菌谱; 并通过观察拮抗菌对桑断枝烂叶病菌 *Boeremia exigua* GXH1 菌株生长及菌丝形态的影响, 扩增抑菌活性物质合成关键基因, 以及采用酸沉淀法提取拮抗菌株脂肽类化合物并进行高效液相色谱串联质谱分析(LC-MS), 初步探究可能的抑菌机制。【结果】从健康桑树茎中共分离获得 17 株桑树内生细菌, 并从中筛选获得一株对桑断枝烂叶病菌 *B. exigua* GXH1 有稳定拮抗作用的桑树内生细菌 NPJ13 菌株。该菌株形态学、生理生化特征与芽孢杆菌属一致, 基于 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因序列的系统发育分析结果显示该菌株与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)的亲缘关系最近, 且处于系统发育树的最小分枝, 故将 NPJ13 菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌, 命名为 *B. velezensis* NPJ13。NPJ13 菌株对灰霉病菌 SWU5、核地杖菌 SXSG-5、核盘菌 PZ-2 及烟草疫霉 SWU20 等 12 种病原真菌具有不同程度的拮抗作用, 其活性发酵液具有较好的热稳定性。NPJ13 菌株会导致桑断枝烂叶病菌 GXH1 菌丝发生扭曲、膨大、透明度增加、断裂等畸变现象; 基因检测结果显示 NPJ13 菌株基因组中具有 *PKSI*、*NRPS*、*Sfp*、*ItuD*、*Srfc* 等 5 种抑菌活性物质合成关键基因, LC-MS 检测结果表明菌株 NPJ13 脂肽类粗提物中含有表面活性素和伊枯草菌素。【结论】本研究分离筛选获得一株对桑断枝烂叶病菌具有显著拮抗作用的桑树内生细菌 *B. velezensis* NPJ13 菌株, 为桑断枝烂叶病的生物防治提供了候选菌株。

关键词: 桑树内生菌, 拮抗, 桑断枝烂叶病, 抑菌机理

基金项目: 国家自然科学基金(31601678, 31870518)

*通信作者。Tel: +86-23-68251701; Fax: +86-23-68250191; E-mail: healthjie@163.com

收稿日期: 2018-11-28; 修回日期: 2019-04-19; 网络出版日期: 2019-07-11

桑树作为传统经济林木,在我国种植历史悠久。桑叶可养蚕、入药,并兼具观赏及生态保护价值^[1]。然而,桑树常遭受到多种病原微生物侵染,导致桑叶产量降低、桑树发育不良等现象。我国的桑树病害约有 200 种,包括真菌病、细菌病及病毒病等,其中真菌病害所占比例最大,高达 80% 左右^[2]。2011 年在广西西部蚕区的桑园较大范围流行桑断枝烂叶病,该病主要危害桑树嫩枝和叶片,染病的桑树新枝出现灰褐色病斑、且易折断,桑叶也因出现灰褐斑而穿孔破烂。该病流行广,危害严重,部分植株发病率高达 90%,枝发病率也达 50%,导致桑叶严重减产,给桑农造成了较大经济损失^[3]。桑断枝烂叶病的病原菌为 *Boeremia exigua*,属于真菌中的子囊菌门、盘菌亚门、座囊菌纲、格孢菌亚纲、格孢菌腔目、*Didymellaceae*、*Boeremia*,菌丝为无色或褐色,有隔,合轴分枝,多为锐角二叉分枝,老龄菌丝呈褐色,藕节状膨大,载孢体为分生孢子器,单腔室,分生孢子无色,单孢,椭圆形、梨形,内常含油球^[3]。现有防治桑断枝烂叶病的方法主要是物理防治和化学防治。物理防治主要包括及时修剪病、弱、枯枝和桑叶,清除田间杂草,雨季及时疏水,改善桑园通风透光性,降低田间湿度等。化学防治包括施加化肥,使桑枝条健壮,增强抗病性;喷洒化学农药,杀灭病原菌等。物理防治人工投入大、成本高,且防效有限;化学防治其农药降解周期长,严重污染环境,并且会给养蚕业带来不良影响,因此寻找绿色、环保的桑断枝烂叶病防治方法已经刻不容缓。生物防治是利用有益生物或其代谢产物控制有害生物种群的侵染、繁殖,以防止或减轻病害发生^[4],具有环保、持久等优点。有关植物病害生物防治的相关研究结果表明,利用植物内生菌及其代谢产物防治宿主感染病原微生物,

是近年来备受青睐的生防新策略^[5-7]。

植物内生菌(Endophyte)指其生活史的一定阶段或全部阶段定殖于植物器官、组织内部以及细胞间隙,但不引起宿主植物出现明显病症的微生物^[8]。内生菌作为植物微生态系统的重要组成部分,几乎可定殖于所有植物的不同组织部位,它们之间存在共生、竞争、对抗等各种关系^[9]。健康桑树中存在大量内生菌,其构筑了桑树的健康屏障^[10]。本课题组前期研究结果表明,内生成团泛菌 SWg2 菌株能稳定存在于桑树体内,且能提升桑树对桑疫病的抵抗能力^[11];内生芽孢杆菌 7PJ-16 菌株能够定殖于桑树体内,提高桑树对桑椹菌核病的抵抗力,并可促进桑苗生长^[12]。山东农业大学牟志美、路国兵等人从桑树根、茎、叶以及花蕾中分离获得多株对植物病原菌具有拮抗作用的内生细菌,其中洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*) LU10-1 能长期定殖于桑树体内,且定殖过程中拮抗性能未发生改变^[13]。然而,有关利用桑树内生菌防治桑断枝烂叶病的相关研究还未见报道。

生防菌防治植物病害的主要机制包括竞争、拮抗作用和诱导植株产生抗性等,其中,拮抗作用是内生菌的重要生防机制。生防芽孢杆菌产生的主要拮抗物质包括脂肽类化合物和聚酮类化合物。前者主要通过非核糖体多肽合成途径(nonribosomal peptide synthetases, NRPSs)合成,后者则主要依赖于聚酮合酶途径(polyketide synthases, PKS)合成^[14]。其中脂肽类物质报道最多的是伊枯草菌素(iturin)、丰原素(fengycin)和表面活性素(surfactin) 3 种抑菌活性物质^[15-17]。伊枯草菌素、丰原素均有抗真菌活性,而表面活性素兼具抗细菌和真菌活性。Iturin 家族成员,以 iturin A、C, bacillomycin D、F、L、LC 和 mycosubtilin 为代

表, 因其对多种植物病原真菌具有较强的拮抗活性而被广泛研究^[18]。Zhao 等的研究表明 *B. subtilis* SG6 产生的丰原素和表面活性素对禾谷镰刀菌的生长具有抑制作用^[19]。Vitulo 等发现分离菌株 *B. amyloliquefaciens* BO7 产生的表面活性素对尖孢镰刀菌具有较强的抑菌活性^[20]。

本研究拟以桑断枝烂叶病病原菌 *Boeremia exigua* GXH1 为靶标菌, 从农桑 8 号的健康桑树中分离、筛选拮抗细菌, 测试拮抗菌的抑菌范围与其活性发酵滤液的热稳定性, 并通过扩增拮抗菌株抑菌活性物质合成相关基因以及检测菌株代谢产物中可能的脂肽化合物种类, 初步探究抑菌机理, 为利用桑树内生菌防治桑断枝烂叶病奠定坚实的前期研究基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料与培养基

供试桑树材料: 健康桑树农桑 8 号(桑树品种) 采自云南省红河自治州蒙自草坝镇(N 23°23'14", E 103°23'51")。

供试病原菌: *Boeremia exigua* GXH1、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*) PZ-2、桑椹核地杖菌(*Scleromitrua shiraiana*) SXSG-5 为本实验室分离保存。灰霉菌(*Botrytis cinerea*) SWU5、大丽花轮枝孢(*Verticillium dahlia*) SWU6、榆梢枯长喙霉(*Ceratocystis ulmi*) SWU10、木霉属菌(*Trichoderma viridae*) SWU11、烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*) SWU20、大丽轮枝菌(*Verticillium dahlia*) SWU23、链格孢(*Alternaria* sp.) SWU26、白僵菌(*Beauveria bassiana*) SWU40、绿僵菌(*Metarhizium anisopliae*) SWU42 为实验室收集保存菌株。

培养基: PDA 培养基(g/L): 土豆 200.0, 葡萄

糖 20.0, 琼脂 15–20; WA 培养基(g/L): 琼脂 15–20; 高氏一号培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, KNO₃ 1.0, K₂HPO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, NaCl 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.1, 琼脂 15–20; PDB 培养基(g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0; LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15–20; 发酵培养基(g/L): 土豆 200.0, 麦芽糖 20.0, 蛋白胨 10.0, Na₂HPO₄ 1.5, (NH₄)₂SO₄ 5.0; Landy 培养基参考文献[21]配制; 以上培养基均在 121 °C 灭菌 20 min 备用。

1.2 桑树内生菌的分离纯化

利用组织培养法^[10]进行桑树内生菌的分离。具体方法为: 取长约 3–5 cm 的桑枝茎段, 浸没于 75% 的酒精, 取出后于酒精灯上燃尽酒精, 将该茎段在 PDA 培养基滚一圈后进行培养, 以培养基上未生长微生物判定表面消毒彻底。将消毒后的茎段置于无菌培养皿中, 用无菌刀片将样品分层剖开, 切成小块置于 PDA 培养基、WA 培养基和高氏培养基, 于 25 °C 培养, 逐日观察, 待其长出细菌时, 及时挑取, 采用平板划线法进行纯化。

1.3 桑树内生细菌的保种与发酵

用接种环挑取单菌落于 PDB 培养基中, 28 °C 摇床 180 r/min 振荡培养 24 h, 取 500 μL 培养液加入装有 500 μL 60% 甘油的冻存管中, 置于 –80 °C 冰箱中保存; 同时, 用接种环挑取单菌落于 PDB 培养基中, 28 °C 摇床 180 r/min 振荡培养 4 d, 随后在 12000 r/min 条件下离心 30 min, 取上清备用。

1.4 内生拮抗菌的筛选

1.4.1 初筛: 以桑断枝烂叶病病原菌 *B. exigua* GXH1 为供试靶标菌, 采用抑菌圈法^[22]筛选对桑断枝烂叶病病原菌具拮抗作用的内生细菌。具体

方法为: 将 *B. exigua* GXH1 菌饼接种在新鲜 PDA 平板中央, 并用 8 mm 直径的打孔器在距离菌饼中心 30 mm 处打孔, 孔内加入 200 μ L 内生细菌发酵上清液, 25 $^{\circ}$ C 培养 7 d, 测量抑菌圈直径, 以此判断内生菌发酵液的抑菌活性。

1.4.2 复筛: 采用平板对峙法^[23]对初筛有拮抗效果的菌株进行复筛。具体方法为: 在直径为 90 mm 的 PDA 平板中心接种直径为 5 mm 的病原菌饼, 同时在距中央 25 mm 的对称处划线接种拮抗细菌, 以不接种拮抗细菌的平板为对照, 各设 3 个重复, 22 $^{\circ}$ C 培养 7 d 后测量病原菌的菌落直径, 计算抑菌率。复筛确定抑菌效果显著且稳定的菌株进行后续研究。

抑菌率(%) =

$$\frac{\text{对照组菌落直径(cm)} - \text{测试组菌落直径(cm)}}{\text{对照组菌落直径(cm)}} \times 100\%$$

1.5 拮抗菌的菌种鉴定

1.5.1 菌体培养特征、形态观察及生理生化反应特征测定: 在 LB 培养基上 28 $^{\circ}$ C 培养目的菌株 24 h 观察菌落形态特征, 28 $^{\circ}$ C 培养 24 h 进行革兰氏染色, 培养 48 h 进行芽孢染色, 均参照文献[23–25]的方法进行。参照文献[24–26]的方法测定拮抗菌株的淀粉水解、明胶液化、氧化酶、硝酸盐还原等生理生化特征。

1.5.2 基于 16S rDNA、DNA 促旋酶 A 亚基编码基因(*gyrA*)和 B 亚基编码基因(*gyrB*)序列的系统发育分析: 参照文献[27]提取目的菌株基因组, 以其为模板, 分别扩增 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因序列。利用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCC TGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTA CGACTT-3')扩增拮抗细菌 16S rDNA 序列。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 70 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。参照文献[28]

用引物 42F 和 1066R 扩增 *gyrA* 基因, 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 51 $^{\circ}$ C 45 s, 68 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 68 $^{\circ}$ C 10 min。参照文献[29]用引物 UP-1S 和 UP-2Sr 扩增 *gyrB* 基因, 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 34 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 1.0% 的琼脂糖核酸凝胶电泳检测扩增产物。将 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将获得的基因序列拼接后在 NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行同源性比较分析, 下载同源性较高的序列, 利用 MEGA 4.0 软件, 使用软件邻接法(Neighbor-joining method)进行 1000 次步长计算, 构建系统发育树^[27]。以上测序结果均提交至 GenBank 数据库, 获得序列登录号。

1.6 拮抗菌株发酵滤液热稳定性检测

将拮抗菌株 NPJ13 接种于 PDB 培养基, 参照方法 1.3 制备拮抗菌株无菌发酵上清液, 取等量无菌发酵上清液分别在 40、60、80 和 100 $^{\circ}$ C 处理 30 min, 冷却至室温后, 参照方法 1.4 用抑菌圈法检测其对病原真菌 *B. exigua* GXH1 菌株的抑菌活性。具体方法为: 在新鲜 PDA 平板中央接种 *B. exigua* GXH1 菌饼, 并在距离菌饼中心 20 mm 处用 8 mm 直径的打孔器打孔, 将 100 μ L 经不同温度处理后的拮抗菌发酵上清液注入孔中, 阳性对照为注入未经热处理的拮抗菌发酵上清液平板, 阴性对照为未加发酵滤液的 PDA 空白平板, 每组设置 3 个重复, 置于 25 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 5 d 后, 用十字交叉法测量病原菌菌落直径, 根据方法 1.4.2 中的公式计算抑菌率(其中对照组直径为阴性对照组直径)。

1.7 拮抗菌株抑菌谱检测

将具显著而稳定拮抗作用的分离株接种于发

酵培养基, 参照 1.3 方法进行发酵培养, 收集发酵液, 10000 r/min 离心 30 min, 将上清液过滤膜 ($D=0.22 \mu\text{m}$) 制备无菌发酵滤液, 采用菌丝生长速率法^[30]检测拮抗菌株无菌发酵滤液的抑菌谱。具体方法为: 将 PDA 培养基高压灭菌后冷却至 50 °C 左右, 拮抗菌无菌发酵上清液按 5% 的比例混入制备检测平板, 以未加发酵滤液的 PDA 平板作为空白对照, 接入直径 5 mm 的核盘菌 PZ-2、桑椹核地杖菌 SXSG-5 等 12 种病原菌菌饼, 每个处理 3 个重复, 于 25 °C 恒温培养, 逐日观察, 参照 1.4.2 中公式计算抑菌率。根据病原菌生长速度, 核盘菌 PZ-2、灰霉菌 SWU5、大丽花轮枝孢 SWU6、榆梢枯长喙霉 SWU10、木霉属菌 SWU11、烟草疫霉 SWU20、大丽轮枝菌 SWU23、链格孢菌 SWU26、桑椹核地杖菌 SXSG-5 在培养 5 d 时测算抑菌率, 桑断枝烂叶病原菌 GXH1、白僵菌 SWU40、绿僵菌 SWU42 在培养 7 d 时测算抑菌率。

1.8 拮抗菌株抑菌机理的初探

1.8.1 拮抗菌株对桑断枝烂叶病菌 GXH1 菌丝形态的影响: 将复筛中对照组平板和拮抗菌株处理组平板用于菌丝形态观察。用灭菌牙签挑取培养 7 d 对照组病原菌正常生长菌丝, 以及测试组处于抑菌带边缘的病原菌菌丝制片, 在光学显微镜下观察拮抗菌株对桑断枝烂叶病菌 GXH1 菌丝形态的影响。

1.8.2 抑菌活性物质合成关键基因的检测: 以 NPJ13 菌株基因组为模板, 参考文献[31–33], 扩增抑菌物质合成关键基因, 包括 2 种次级代谢产物合成关键酶基因 I 型聚酮合酶基因(*PKSI*)、非核糖体多肽合成酶基因(*NRPS*), 以及 4 种非核糖体途径合成的脂肽抗生素: 表面活性素(*Sfp*、*Srfc*)、伊枯草菌素 A (*ItuD*), 以及丰原素(*FenB*)等 6 种活

性次级代谢产物合成关键编码基因的保守区域, 引物序列详见表 1。

PKSI 扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。*NRPS* 扩增程序: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 35 个循环; 72 °C 10 min。*Sfp*、*ItuD*、*Srfc* 扩增程序: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 10 min。*FenB* 扩增程序: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 65 °C 40 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。

1.8.3 抑菌活性物质的初步分离与检测: 将新鲜的拮抗菌接种至 Landy 培养基, 置于恒温摇床 25 °C、200 r/min 培养 3 d 获得拮抗菌株活性发酵液。采用酸沉淀法^[34]提取活性发酵液中脂肽类化合物。具体方法为: 新鲜的拮抗菌株发酵液于 4 °C、8000 r/min 离心 20 min, 用浓 HCl 将上清液 pH 调至 2.0, 4 °C 静置沉淀 12 h, 4 °C、8000 r/min 离心 20 min 后, 加适量甲醇充分溶解沉淀, 静置 3 h 后于 4 °C、8000 r/min 离心 10 min, 用直径为

表 1. 扩增抑菌物质合成关键基因的引物序列

Table 1. The primers of key genes related to antibiotic synthesis

Antibiotic	Target gene	Primers	Primer sequences (5'→3')
PKS I	<i>PKSI</i>	KSF	GCGATGGATCCNCAGCAGCG
		KSR	GTGCCGGTNCCGTGNGYYTC
NRPS	<i>NRPS</i>	NRPSF	GCNGGYGGYG CNTAYGTNCC
		NRPSR	CCNCGDATYTTNACYTG
Surfactin	<i>Sfp</i>	SfpF	ATGAAGATTTACGGAATTTA
		SfpR	TTATAAAAGCTCTTCGTACG
Iturin A	<i>ItuD</i>	ItuD1F	GATGCGATCTCCTTGGATGT
		ItuD1R	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG
Surfactin	<i>Srfc</i>	Sur3F	ACAGTATGGAGGCATGGTC
		Sur3R	TTCCGCCACTTTTTTCAGTTT
Fengycin	<i>FenB</i>	FenBF1	CCTGGAGAAAGAATATACC GTACCY
		FenBR1	GCTGGTTCAGTTKGATCACAT

0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 取滤液于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中使甲醇充分挥发, 再进行样品冻干处理, 得到活性发酵液脂肽类化合物的粗提物, 最后进行高效液相色谱串联质谱仪(LC-MS)分析。LC-MS 分析使用 Agilent 1290 Infinity Ultra Performance Liquid Chromatography 与 Agilent 6545 UHD and Accurate-Mass Q-TOF 质谱联用仪, 其中色谱柱型号为 Waters XSelect[®] HSS T3 (2.5 μm , 100 mm \times 2.1 mm)。流动相为 A-水溶液(含 0.1%甲酸)和 B-乙腈(含 0.1%甲酸); 柱温设为 25 $^{\circ}\text{C}$, 进样量为 4 μL , 流速设为 0.35 mL/min。优化的色谱梯度: 0–2 min, 5% B; 2–10 min, 5%–95% B; 10–15 min, 95% B; 15–18 min, 5% B。质谱使用正离子模式结合负离子模式; 干燥气体流量: 10 L/min; 干燥气体温度: 325 $^{\circ}\text{C}$; 雾化器压力: 20 psig; 碰撞电压: 120 V; skimmer voltage, 45 V。质谱的采集范围 50–1500 m/z , 在质谱采集中打入参比离子监测质量轴的准确性。进一步鉴别拮抗菌株代谢物采用 MS/MS, collision energy 使用 10、20、40 V 三个能量。数据系统分析运用 Agilent Masshunter Qualitative Analysis B.07.00 software。

2 结果和分析

2.1 桑树内生菌的分离与拮抗菌的筛选

从健康农桑 8 号的茎中共分离获得内生细

菌 17 株, 初筛结果表明 6 株对桑断枝烂叶病菌 *B. exigua* GXH1 具有拮抗效果。复筛结果显示其中 5 株仍对 *B. exigua* GXH1 具有稳定的抑菌活性, 尤以 NPJ13 菌株的抑菌活性最为显著, 22 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后抑菌率可达 94.29% (表 2), 故选择 NPJ13 菌株开展后续研究。

2.2 拮抗菌株的菌种鉴定

2.2.1 形态特征及生理生化特征: NPJ13 菌株在 LB 培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h, 菌落呈乳白色, 表面稍有褶皱, 边缘不整齐, 有黏性, 不透明(图 1-A); 染色结果显示 NPJ13 菌株为革兰氏阳性、杆状细菌, 能形成芽孢(图 1-B, C)。NPJ13 可以水解葡萄糖、淀粉、明胶、蔗糖和甘露醇, 能够还原硝酸盐(表 3)。

表 2. 桑断枝烂叶病菌拮抗菌株的筛选结果

Table 2. Screening results of antagonistic strains of *B. exigua* GXH1

Strain No.	Inhibition rate/% ($\bar{x} \pm s, n=3$)
NPJ13	94.29 \pm 1.86
NPJ1-1	45.33 \pm 2.06
NPJ12	27.34 \pm 1.76
NWJ1	25.31 \pm 2.53
NWJ2-2	15.67 \pm 0.78

Inhibition rates were calculated as a percentage of growth inhibition as compared to control test organism at 7 days after inoculation. Tests were conducted in triplicate and results varied as indicated by standard deviation.

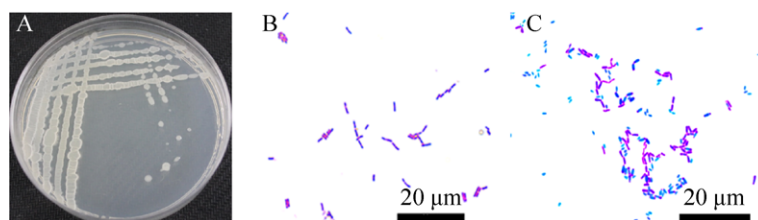


图 1. NPJ13 菌株的形态学特征

Figure 1. The morphological features of strain NPJ13. A: the colony characteristic of strain NPJ13 on the LB after 24 h; B: gram staining result; C: spores staining result.

表 3. NPJ13 菌株生理生化鉴定结果

Table 3. Physiological and biochemical characteristics of strain NPJ13

Test items	Results	Test items	Results
Mannose	+	Gelatine liquefaction test	+
Simon's phosphate	-	Arabinose	-
Semi-solid agar	-	Xylose	-
Gas of glucose	-	Gelation	+
Lactose	-	Sucrose	+
Nitrate reduction	+	Glycerinum	-
Starch hydrolysis	+	Sorbitol	+
Maltose	-	Sulfuretted hydrogen	-

+: positive (growth or reaction); -: negative (no growth or no reaction).

2.2.2 NPJ13 菌株 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因

序列测定及系统发育分析: 以 NPJ13 菌株基因组为模板, 扩增获得 NPJ13 菌株的 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 序列分别长度为 1399 bp、1127 bp 和 1363 bp, GenBank 登录号分别为 MH884062、MK564524、MK564525。基于 16S rDNA 的系统发育分析结果表明, NPJ13 菌株与多株 *Bacillus velezensis* 的相似性达到 99%, 并与登录号为 AY603658、KY694464 的 *Bacillus velezensis* 处于系统发育树的同一最小分枝(图 2-A)。基于 *gyrA* 基因序列的系统发育分析结果表明, NPJ13 菌株与登录号为 EU138622 的 *Bacillus velezensis* 处于系统发育树的同一最小分枝(图 2-B); 基于 *gyrB* 基因序列的系统发育分析结果表明, NPJ13 菌株与登录号为 DQ903176 的 *Bacillus velezensis* 处于系统发育树的同一最小分枝(图 2-C)。结合其形态学、生理生化特征及基于 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因序列的系统发育分析结果, 将 NPJ13 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*), 命名为 *B. velezensis* NPJ13。

2.3 NPJ13 菌株发酵滤液热稳定性检测

热稳定性检测结果显示 NPJ13 菌株发酵液具有较强的热稳定性, 未经热处理的活性发酵液抑

菌率为 51.85%, 80 °C 热处理 30 min 后抑菌率仍保持有 44.44%, 100 °C 热处理 30 min 后抑菌率仅降至 33.33% (表 4)。良好的热稳定性, 将有利于后续研究制定活性物质的分离纯化方案, 更有利于 *B. velezensis* NPJ13 菌株用于田间防治桑断枝烂叶病。

2.4 拮抗菌株 NPJ13 抑菌谱检测

抑菌谱测试结果表明 NPJ13 菌株的无菌发酵滤液对 12 种病原真菌有不同程度的抑制作用, 其中对桑断枝烂叶病菌 GXH1 和灰霉菌 SWU5 的抑制率最高, 分别可达 92.12%、91.55% (表 5, 图 3); 对核盘菌 PZ-2、核地杖菌 SXSG-5 的抑菌率超过 70%; 而对榆梢枯长喙霉 SWU10、白僵菌 SWU40 和绿僵菌 SWU42 的抑菌率亦超过 50% (表 5)。较广的抑菌谱, 使得 NPJ13 菌株亦可作为其他病害生物防治的候选菌株。

2.5 NPJ13 菌株对桑断枝烂叶病菌 GXH1 菌丝的影响

拮抗菌对 *B. exigua* GXH1 菌体生长影响的镜检结果表明, NPJ13 菌株对病菌菌丝的生长有明显的破坏作用。对照组菌丝体生长繁茂、平滑修长, 光滑匀整, 颜色为褐色(图 4-A); 而受拮抗菌 NPJ13 影响的 *B. exigua* GXH1 菌丝体大部分发生畸变, 菌丝缠绕、扭曲, 部分菌丝膨大、透明度增加甚至断裂, 局部现串珠状细胞, 内含物多数溢出(图 4-B)。

2.6 拮抗菌株抗菌次级代谢产物合成相关基因的检测

抗菌次级代谢产物合成相关基因扩增结果显示, NPJ13 菌株的基因组中能检测到 *PKSI*、*NRPS*、*Sfp*、*ItuD*、*Srfc* 这 5 种与抑菌活性物质合成相关的基因(表 6)。由此初步推测拮抗菌株 NPJ13 可通过产生表面活性素、伊枯草菌素 A、聚酮类化合物等抗菌次级代谢产物抑制 *B. exigua* GXH1 生长。

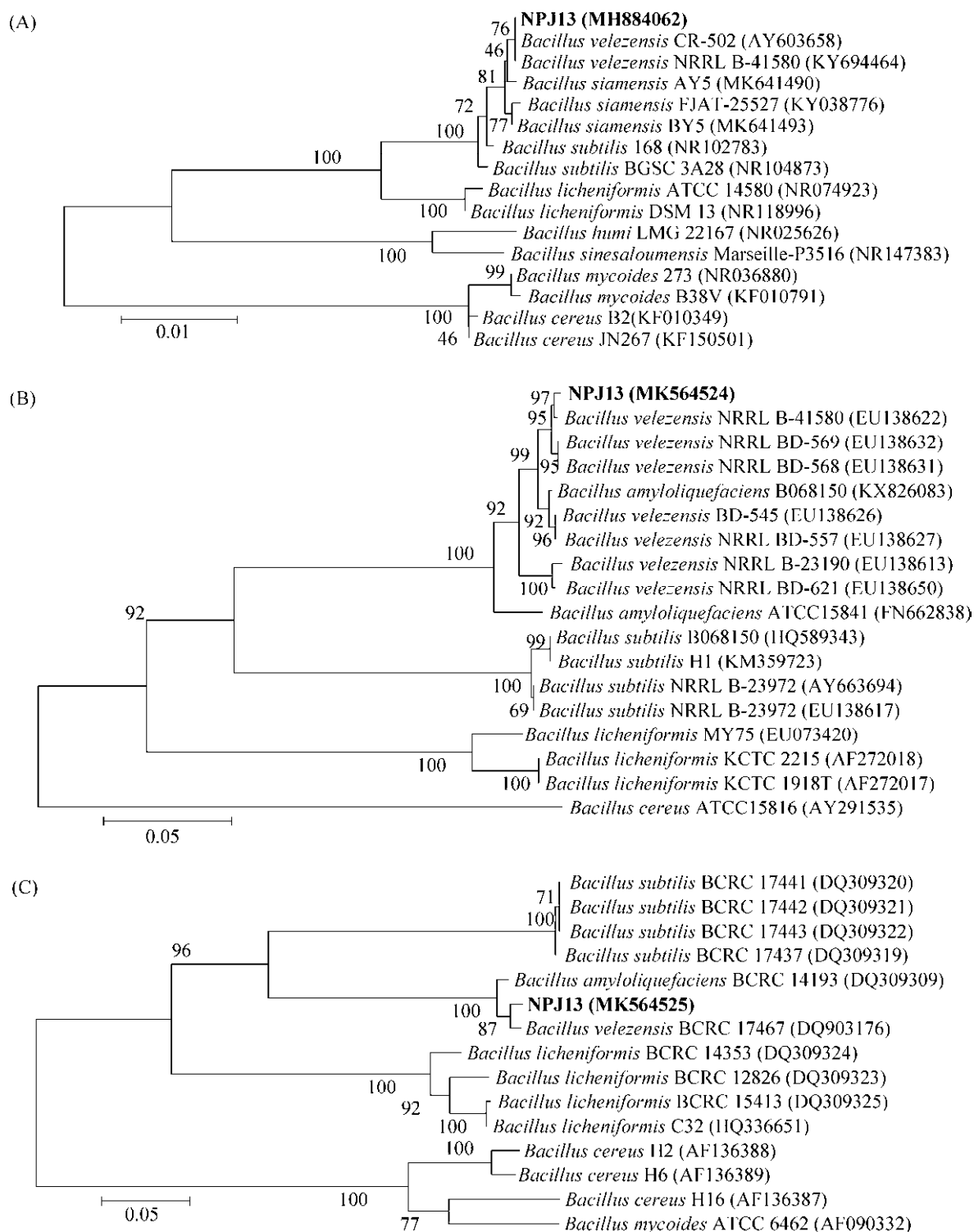


图 2. NPJ13 菌株基于 16S rDNA(A)、*gyrA*(B)、*gyrB*(C)基因的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic trees of NPJ13 strain based on 16S rDNA(A), *gyrA*(B) and *gyrB*(C) genes sequences. Numbers at the nodes represent the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 resampled datasets. The scale bar indicates 0.5% sequence divergence. Target strain was labeled in bold.

表 4. NPJ13 菌株发酵滤液热稳定性检测结果

Table 4. The thermal stability assay results of strain NPJ13 cell-free fermentation supernatant

<i>T</i> /°C	Inhibition rate/% ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Positive control	51.85±0.97
40	48.15±1.31
60	46.38±0.87
80	44.44±2.42
100	33.33±0.87

The strain NPJ13 cell-free fermentation supernatant treated at 40, 60, 80 and 100 °C for 30 min respectively. Observed the results at the fifth day after *B. exigua* GXH1 inoculation.

2.7 抑菌活性物质的初步分析

LC-MS 分析结果显示 NPJ13 菌株脂肽粗提物在 *m/z* 值为 1008.65、1022.67 和 1036.68 处有离子峰(簇)出现, 这 3 个离子峰的分子量依次相差 14

表 5. NPJ13 菌株发酵上清液的抑菌谱检测结果

Table 5. The antimicrobial spectrum analysis results of strain NPJ13 cell-free fermentation supernatant

Pathogen	Inhibition rate/% ($\bar{x} \pm s, n=3$)
<i>Botrytis cinerea</i> SWU5	91.55±0.64
<i>Verticillium dahlia</i> SWU6	40.23±0.69
<i>Ceratocystis ulmi</i> SWU10	67.99±6.91
<i>Trichoderma viridae</i> SWU11	39.46±22.63
<i>Phytophthora nicotianae</i> SWU20	35.95±0.64
<i>Verticillium dahlia</i> SWU23	25.47±8.80
<i>Alternaria alternata</i> SWU26	19.54±0.21
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> PZ-2	79.41±4.97
<i>Sclerotium shiraiana</i> SXSG-5	80.79±4.05
<i>Boeremia exigua</i> GXH1*	92.12±1.39
<i>Beauveria bassiana</i> SWU40*	64.00±7.37
<i>Metarhizium anisopliae</i> SWU42*	59.00±5.07

Inhibition rates were calculated as a percentage of growth inhibition as compared to control test organism at 5 days after inoculation for most organisms (*: 7-day). Tests were conducted in triplicate and results varied as indicated by standard deviation.

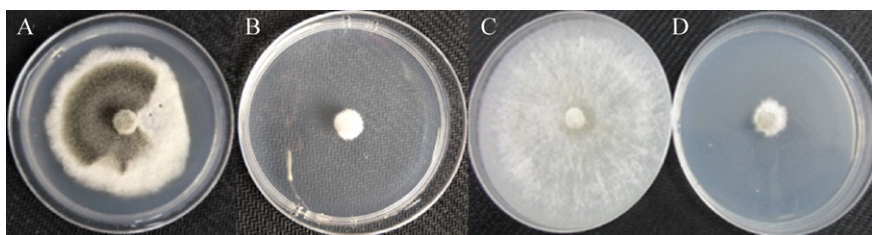


图 3. NPJ13 菌株发酵上清液对桑断枝烂叶病菌 GXH1 和灰霉菌 SWU5 的抑菌效果

Figure 3. The antagonistic activity of cell-free fermentation supernatant of strain NPJ13 against *B. exigua* GXH1 and *Botrytis cinerea* SWU5. A: *B. exigua* GXH1 was cultured on the PDA plate for 7 days; B: *B. exigua* GXH1 was cultured for 7 days on the PDA plate containing cell-free fermentation supernatant of strain NPJ13; C: *B. cinerea* SWU5 was cultured on PDA plate for 5 days; D: *B. cinerea* SWU5 was cultured for 5 days on the PDA plate containing cell-free fermentation supernatant of strain NPJ13.

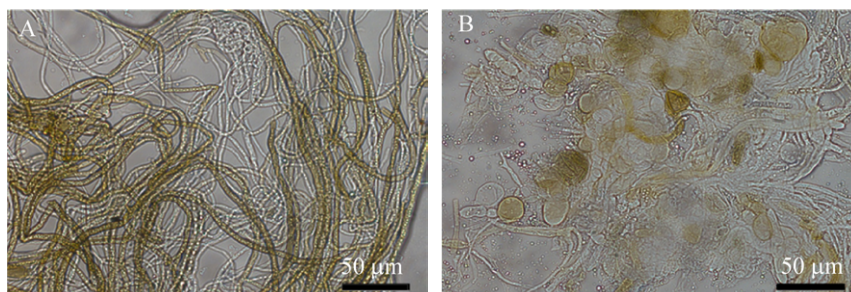


图 4. NPJ13 菌株对桑断枝烂叶病菌 GXH1 菌株菌丝的影响

Figure 4. Effect of strain NPJ13 on mycelium of *B. exigua* GXH1. A: The mycelial morphology of control group observed with optical microscope after cultured for 7 days; B: The mycelial morphology of treatment group observed with optical microscope after cultured for 7 days.

表 6. NPJ13 菌株抑菌活性物质合成关键基因的检测
Table 6. The PCR amplification results of key genes involved in strain NPJ13 antimicrobial metabolite synthesis

Material	Gene	NPJ13
PKS I	<i>PKSI</i>	+
NRPS	<i>NRPS</i>	+
Surfactin	<i>Sfp</i>	+
Iturin A	<i>ItuD</i>	+
Surfactin	<i>Srfc</i>	+
Fengycin	<i>FenB</i>	-

+: positive; -: negative.

(脂肪酸链结构“-CH₂-”), 分别对应于 C13–C15 的表面活性素正离子峰(图 5-A); 在 m/z 值为 1064.68、1070.63 和 1076.59 处有离子峰(簇)出现, 这 3 个离子峰均对应于 1031–1082 范围内的伊枯草菌素类脂肽化合物(图 5-B)。通过 LC-MS 质谱图分析

表明, 菌株 NPJ13 发酵液中含有脂肽类化合物表面活性素和伊枯草菌素。

3 小结和讨论

本研究从桑树品种农桑 8 号健康茎中分离得到 17 株内生细菌, 并从中筛选获得一株对桑断枝烂叶病菌抑菌作用稳定且显著的内生细菌 NPJ13, 鉴定其为贝莱斯芽孢杆菌, 命名为 *B. velezensis* NPJ13。抑菌谱检测结果表明 *B. velezensis* NPJ13 菌株活性发酵滤液对灰霉病菌 SWU5、核地杖菌 SXSG-5、核盘菌 PZ-2 及烟草疫霉 SWU20 等 12 种常见病原真菌具有不同程度的抑制作用, 且其抑菌活性发酵液具有较好的热稳定性, 经 80 °C 处理 30 min 后, 抑菌活性仍较为显著, 且 NPJ13 菌株

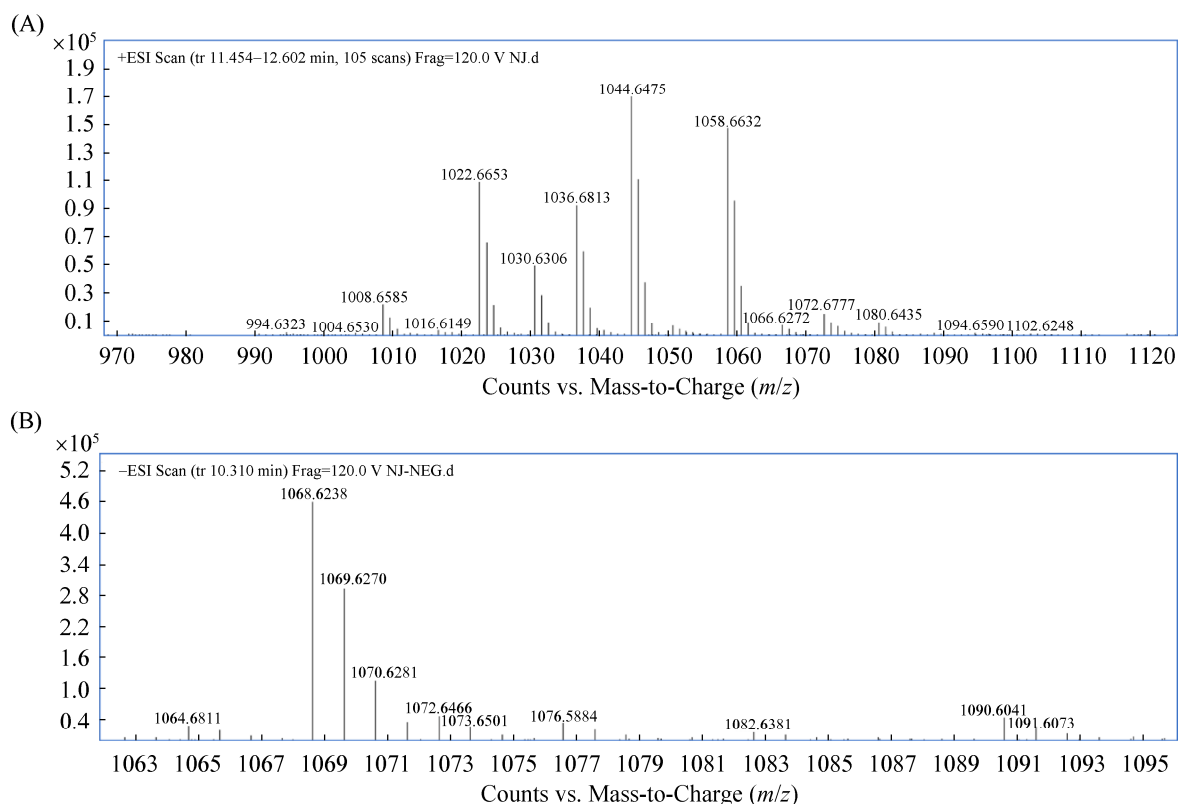


图 5. 菌株 NPJ13 脂肽类物质的 LC-MS 分析

Figure 5. LC-MS analysis of lipopeptide compounds by strain NPJ13. A: surfactin; B: iturin.

可能通过合成表面活性素、伊枯草菌素 A、聚酮类化合物等次级代谢产物，抑制病原菌生长。

芽孢杆菌是一类广泛分布于土壤、水体等多种自然环境，亦作为植物内生菌存在于多种植物体内^[35]。芽孢杆菌可以产生多种抗菌化合物，包括表面活性素、丰原素和伊枯草菌素等脂肽类抗生素^[15]。Arima 等报道了枯草芽孢杆菌能分泌抗菌物质脂肽类抗生素表面活性素^[36]。Cao 等在枯草芽孢杆菌 SQR9 中鉴定出 *BmyA*、*ppsE*、*ituD*、*fenD*、*bamD*、*alba*、*srfAB*、*qk* 和 *yndJ* 等 9 个脂肽合成相关基因^[37]。Surendra 等从玉米内生拮抗菌芽孢杆菌中检测到伊枯草菌素 A 和丰原素等抑菌活性物质合成相关基因^[30]。桑建伟等从健康香蕉植株根部中分离得到一株内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17，能有效拮抗香蕉枯萎病菌，并从其代谢产物中分离到表面活性素、丰原素和伊枯草菌素三类脂肽类化合物以及 Bacillibactin、Difficidin 和 Bacillaene 三类聚酮类化合物^[38]。贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) 作为芽孢杆菌属的一个重要成员，对植物生长、抗病虫和诱导系统抗病性等方面起着重要作用^[39]。宗英等从感染赤霉病的麦穗上筛选到 1 株可高效抑制小麦赤霉病菌禾谷镰刀菌的 *B. velezensis* JS25R，在温室条件下该菌能有效降低小麦赤霉病的发病率、发病程度和病情指数^[40]。KIM 等对 *B. velezensis* CAUB946 菌株的抗性相关次级代谢产物分析发现其可通过产生脂肽、PKS 和溶杆菌素来防治烟草黑胫病、水稻纹枯病和棉花枯萎病^[41]。后续研究将在本文研究基础上，评估 *B. velezensis* NPJ13 菌株对桑树的安全性，检测其田间防病效果，并分离纯化获得 NPJ13 菌株发酵液的主要抑菌活性成分，深入探究该菌株对桑断枝烂叶病的抑制相关机理，为在生产中

利用该菌株进行桑断枝烂叶病的生物防治奠定坚实的研究基础。

参 考 文 献

- [1] Dai YW, Zhu H, Du HZ, Zhang JB, Wen BY. Economic value and ecological function of mulberry (*Morus alba* L.). *Protection Forest Science and Technology*, 2009, (1): 78–80. (in Chinese)
戴玉伟, 朱弘, 杜宏志, 张剑斌, 温宝阳. 论桑树资源经济价值和生态功能. *防护林科技*, 2009, (1): 78–80.
- [2] Pu GQ, Huang YJ, Mao JP, Zhang YJ. List of Chinese mulberry diseases (I). *China Sericulture*, 2012, 33(2): 21–24. (in Chinese)
浦冠勤, 黄艳君, 毛建萍, 张月季. 中国桑树病害名录(I). *中国蚕业*, 2012, 33(2): 21–24.
- [3] Wei HL. Identification of pathogen of mulberry snags rotten leaves disease. Master Dissertation of Guangxi University, 2015. (in Chinese)
韦海玲. 桑断枝烂叶病的病原菌种类鉴定. 广西大学硕士学位论文, 2015.
- [4] Xiao YF, Mao RQ, Wan FH. New concept of biological control: bio-control plants used for management of arthropod pests. *Chinese Journal of Biological Control*, 2013, 29(1): 1–10. (in Chinese)
肖英方, 毛润乾, 万方浩. 害虫生物防治新概念——生物防治植物及创新研究. *中国生物防治学报*, 2013, 29(1): 1–10.
- [5] Gao XN, Chen JY, Huang LL, Qiao HP, Han QM, Kang ZS. Screening of antagonistic endophytic bacteria and their roles in control of *Sclerotinia sclerotiorum* in canola. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2010, 12(2): 161–167. (in Chinese)
高小宁, 陈金艳, 黄丽丽, 乔宏萍, 韩青梅, 康振生. 油菜菌核病内生拮抗细菌的筛选及防病作用研究. *农药学报*, 2010, 12(2): 161–167.
- [6] Dou GM, Liu XY, Zhang YD, Ma YC. Screening and identification of antagonistic endophytes against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2013, (7): 78–82. (in Chinese)
窦桂铭, 刘晓瑜, 张银东, 马玉超. 大豆菌核病拮抗内生细菌的筛选与鉴定. *广东农业科学*, 2013, (7): 78–82.
- [7] Kumar S, Kaushik N. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56202.

- [8] Fang ZJ, Zhang XX, Ma LA. Advances in plant endophytes. *Journal of Yangtze University (Natural Science Edition)*, 2018, 15(10): 41–45. (in Chinese)
方珍娟, 张晓霞, 马立安. 植物内生菌研究进展. 长江大学学报(自然科学版), 2018, 15(10): 41–45.
- [9] Porras-Alfaro A, Bayman P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 2012, 49: 291–315.
- [10] Ren HS, Xu WF, Wang AY, Zuo WD, Xie J. Research on biodiversity of endophytic bacteria and the antagonistic endophytes in mulberry. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2017, 39(1): 36–45. (in Chinese)
任慧爽, 徐伟芳, 王爱印, 左伟东, 谢洁. 桑树内生细菌多样性及内生拮抗活性菌群的研究. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(1): 36–45.
- [11] Xie J, Shu P, Strobel G, Chen J, Wei JH, Xiang ZH, Zhou ZY. *Pantoea agglomerans* SWg2 colonizes mulberry tissues, promotes disease protection and seedling growth. *Biological Control*, 2017, 113: 9–17.
- [12] Xu WF, Ren HS, Ou T, Lei T, Wei JH, Huang CS, Li T, Strobel G, Zhou ZY, Xie J. Genomic and functional characterization of the endophytic *Bacillus subtilis* 7PJ-16 strain, a potential biocontrol agent of mulberry fruit sclerotinose. *Microbial Ecology*, 2019, 77(3): 651–663.
- [13] Mu ZM, Lu GB, Ji XL, Gai YP, Wang YW, Gao HJ, Zha CY. Identification and colonization of an antagonistic endophytic *Burkholderia cepacia* Lu10-1 isolated from mulberry. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(5): 623–630. (in Chinese)
牟志美, 路国兵, 冀宪领, 盖英萍, 王彦文, 高绘菊, 查传勇. 桑树内生拮抗细菌 *Burkholderia cepacia* Lu10-1 的分离鉴定及其内生定殖. 微生物学报, 2008, 48(5): 623–630.
- [14] Gong AD. Isolation and antagonistic mechanism analyses of biocontrol agents against *Fusarium* and *Aspergillus* species. Doctor Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2015. (in Chinese)
宫安东. 镰刀菌和黄曲霉菌生防菌的分离及拮抗机理研究. 华中农业大学博士学位论文, 2015.
- [15] Gao XW, Yao SY, Pham H, Vater J, Wang JS. Inhibitive substance produced by *Bacillus subtilis* B2 strain. *Chinese Journal of Biological Control*, 2003, 19(4): 175–179. (in Chinese)
高学文, 姚仕义, Pham H, Vater J, 王金生. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的抑菌活性物质分析. 中国生物防治, 2003, 19(4): 175–179.
- [16] Qian CD, Li BQ, Zhao T, Guo QG, Lu XY, Li SZ, Ma P. Isolation and stability analysis of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* strain BAB-1. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2009, 11(6): 69–74. (in Chinese)
钱常娣, 李宝庆, 赵添, 郭庆港, 鹿秀云, 李社增, 马平. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 脂肽类化合物的分离及稳定性分析. 中国农业科技导报, 2009, 11(6): 69–74.
- [17] Xie YL, Ma LZ, Xu ZW, Du Z, Gao XW. Molecular identification of *Bacillus* strains isolated from extreme dry-sand environment in Qinghai Chaidamu region and its lipopeptide compound analysis. *Microbiology China*, 2012, 39(8): 1079–1086. (in Chinese)
谢永丽, 马莉贞, 徐志伟, 杜卓, 高学文. 青海柴达木极端干旱沙地分离芽孢杆菌的分子鉴定及拮抗活性分析. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1079–1086.
- [18] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 2005, 56(4): 845–857.
- [19] Zhao PC, Quan CS, Wang YG, Wang JH, Fan SD. *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 as a potential biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *spinaciae*. *Journal of Basic Microbiology*, 2014, 54(5): 448–456.
- [20] Vitullo D, Di Pietro A, Romano A, Lanzotti V, Lima G. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 2012, 61(4): 689–699.
- [21] Wei YH, Chu IM. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 22(8): 724–728.
- [22] Xie J, Xia T, Lin LP, Zuo WD, Zhou ZY. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacterial strain from mulberry. *Science of Sericulture*, 2009, 35(1): 121–125. (in Chinese)
谢洁, 夏天, 林立鹏, 左伟东, 周泽扬. 一株桑树内生拮抗菌的分离鉴定. 蚕业科学, 2009, 35(1): 121–125.
- [23] Zhang YP, Ling LJ, Zhao Y, Hou YQ. Study on antagonistic activity on *P. infestans* exhibited from *Pseudomonas* sp. HC5. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2018, (1): 33–36. (in Chinese)
张艳萍, 令利军, 赵瑛, 厚毅清. 假单胞菌 HC5 对马铃薯晚疫病病菌的抑制作用研究. 甘肃农业科技, 2018, (1): 33–36.
- [24] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组, 译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [25] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版

- 社, 2001.
- [26] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [27] Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697–703.
- [28] Chun J, Bae KS. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2000, 78(2):123–127.
- [29] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 1104–1109.
- [30] 方中达. 植病研究方法. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [31] Wang YT, Zhang CB, Qi L, Jia XQ, Lu WY. Diversity and antimicrobial activities of cultivable bacteria isolated from Jiaozhou Bay. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(12): 1892–1900. (in Chinese)
王怡婷, 张传波, 齐麟, 贾晓强, 卢文玉. 胶州湾沉积物可培养细菌的多样性及其抑菌活性. *微生物学报*, 2016, 56(12): 1892–1900.
- [32] Chung S, Kong H, Buyer JS, Lakshman DK, Lydon J, Kim SD, Roberts DP. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80(1): 115–123.
- [33] Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White Jr JF. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research*, 2015, 172: 79–87.
- [34] Luo CP, Liu XH, Zhou HF, Wang XY, Chen ZY. Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 422–431.
- [35] Fang X, Xu WF, Niu N, Ou T, Wang F, Zuo WD, Xie J. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(12): 2147–2160. (in Chinese)
方翔, 徐伟芳, 牛娜, 欧婷, 王飞, 左伟东, 谢洁. 一株桑树内生拮抗菌的分离、鉴定及发酵条件优化. *微生物学报*, 2018, 58(12): 2147–2160.
- [36] Arima K, Kakinuma A, Tamura G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1968, 31(3): 488–494.
- [37] Cao Y, Xu ZH, Ling N, Yuan YJ, Yang XM, Chen LH, Shen B, Shen QR. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia Horticulturae*, 2012, 135: 32–39.
- [38] Sang JW, Yang Y, Chen YP, Cai JM, Lu CM, Huang GX. Antibacterial activity analysis of lipopeptide and polyketide compounds produced by endophytic bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* BEB17. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2018, 48(3): 402–412. (in Chinese)
桑建伟, 杨扬, 陈奕鹏, 蔡吉苗, 陆翠梅, 黄贵修. 内生解淀粉芽孢杆菌 BEB17 脂肽类和聚酮类化合物的抑菌活性分析. *植物病理学报*, 2018, 48(3): 402–412.
- [39] Cai GL, Zhang F, Ouyang YX, Zhao CS, Peng XH, Jiang AM. Research progress on *Bacillus velezensis*. *Northern Horticulture*, 2018, (12): 162–167. (in Chinese)
蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 赵昌松, 彭宣和, 江爱明. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展. *北方园艺*, 2018, (12): 162–167.
- [40] Zong Y, Zhao YJ, Liu Y, Yang QL. Study on the inhibitory effect of *Bacillus velezensis* on *Fusarium graminearum*. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2018, 32(2): 310–317. (in Chinese)
宗英, 赵月菊, 刘阳, 杨庆利. 一株贝莱斯芽孢杆菌抑制禾谷镰刀菌的研究. *核农学报*, 2018, 32(2): 310–317.
- [41] Kim SY, Lee SY, Weon HY, Sang MK, Song J. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* M75, a biocontrol agent against fungal plant pathogens, isolated from cotton waste. *Journal of Biotechnology*, 2017, 241: 112–115.

Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry for biocontrol against *Boeremia exigua*

Ruolin Wang^{1,2}, Weifang Xu^{1,2}, Fei Wang^{1,2}, Xiaolei Zhou^{1,2}, Yue Zheng^{1,2}, Hongsen Jiang^{1,2}, Jie Xie^{1,2*}

¹ State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

² Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, College of Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] Antagonistic endophytic bacteria were isolated and screened from the healthy stems of mulberry using *Boeremia exigua* (the pathogen of mulberry snags rotten leaves disease) as target, for the biological control of mulberry snags rotten leaves disease. [Methods] Endophytic bacteria were isolated from mulberry by tissue isolation method, and the antagonistic bacteria with stable antifungal activity were screened out by the combination of inhibition zone method and confrontation culture method. The antagonistic bacterium was identified through morphological features, cultural, physiological and biochemical characteristics and phylogenetic analysis based on 16S rDNA, *gyrA* and *gyrB* sequence. The thermal stability and antimicrobial spectrum of cell-free fermentation supernatant were assayed by inhibition zone method and mycelial growth rate method, respectively. Finally, the antimicrobial mechanism was explored through observation the affection of the antagonistic bacteria on *B. exigua* GXH1, amplification the key genes that were involved in the biosynthesis of antimicrobial active substances, and the lipopeptide compounds produced by antagonistic bacteria were extracted by acid precipitation and analyzed by LC-MS. [Results] In total 17 endophytic bacteria were isolated from healthy mulberry. Among them, strain NPJ13 exhibited strong and stable antagonistic activity against *B. exigua* GXH1. Morphological features, cultural, physiological and biochemical characteristics analysis results indicated that NPJ13 belongs to genus of *Bacillus*. Phylogenetic analysis results based on 16S rDNA, *gyrA* and *gyrB* genes revealed that NPJ13 strain and several strains of *Bacillus velezensis* were in the same minimal clade. Therefore, strain NPJ13 was identified as *Bacillus velezensis* and named *B. velezensis* NPJ13. The results of thermal stability test showed that strain NPJ13 had superior heat stability. Antimicrobial spectrum showed that strain NPJ13 had different degrees of antagonism against 12 kinds of pathogenic fungi, such as *Botrytis cinerea* SWU5, *Scleromitrella shiraiana* SXSG-5, *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2, *Phytophthora nicotianae* SWU20 and so on. The hyphae of *B. exigua* GXH1 treated by *B. velezensis* NPJ13 would become distorted, intumescent, broken and more transparent. The results of functional genes detection showed that the genome of *B. velezensis* NPJ13 contains 5 antimicrobial metabolite synthesis related genes, which are *PKSI*, *NRPS*, *Sfp*, *ItuD*, *Srfc*. Surfactins and iturins were detected from the lipopeptide compounds of strain NPJ13 by LC-MS. [Conclusion] The above results indicated that mulberry endophytic bacterium *B. velezensis* NPJ13 has strong antagonistic activity on *B. exigua* GXH1, being a candidate strain for developing the biological control agent against mulberry snags rotten leaves disease.

Keywords: mulberry endophytic bacterium, antagonism, mulberry snags rotten leaves disease, antagonistic mechanism

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31601678, 31870518)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68251701; Fax: +86-23-68250191; E-mail: healthjie@163.com

Received: 28 November 2018; Revised: 19 April 2019; Published online: 11 July 2019