



芽胞杆菌 BJ-6 的鉴定及对甜瓜细菌性果斑病的防治

贾慧慧¹, 谢心悦¹, 潘园园², 任争光¹, 刘钢^{2,3,4*}, 魏艳敏^{1*}

¹北京农学院农业应用新技术北京市重点实验室, 植物生产国家级实验教学示范中心, 北京 102206

²中国科学院微生物研究所真菌学国家重点实验室, 北京 100101

³中国科学院大学, 北京 100049

⁴中国科学院种子创新研究院, 北京 100864

摘要: 芽胞杆菌是目前植物病害生物防治研究最多的一类微生物, 其在自然界中分布广泛, 开发潜力大。

【目的】为了探究从杏树根际土壤分离的芽胞杆菌 BJ-6 的分类地位及其防病促生作用。【方法】本研究测定了芽胞杆菌 BJ-6 的形态和生理生化特征, 通过 PCR 扩增了该菌的 16S rRNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因并进行了序列测定, 通过多基因聚类分析确定其分类地位, 平板对峙法测定抗菌谱, 盆栽幼苗实验验证其对甜瓜细菌性果斑病的防治效果和对甜瓜的促生作用。【结果】结合形态特征、生理生化特性及多基因序列分析建立的系统进化树, 确定菌株 BJ-6 为解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*), 抑菌实验发现该菌株对 15 种植物病原菌均有不同程度的抑菌活性, 盆栽实验结果发现该菌株发酵液对甜瓜细菌性果斑病有很好的防治效果, 并对甜瓜苗有很好的促生作用。【结论】BJ-6 属于解淀粉芽胞杆菌, 抑菌谱广, 且具有防病促生作用, 具有进一步开发为生防制剂的前景。

关键词: 芽胞杆菌, 鉴定, 甜瓜细菌性果斑病, 生物防治, 促生

芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)是一类革兰氏阳性细菌, 广泛分布在江河、海水、土壤等自然环境中, 也可以作为内生菌生长于植物体内。芽胞杆菌在生长过程中能够产生大量的次级代谢产物, 这些物质能够有效抑制植物病原真菌或细菌的生长,

达到防病和促生的效果^[1-4]。此外, 多数芽胞杆菌具有对植物无致病性、对环境无污染、对人畜无害、自身抗逆性强、抑菌谱广等优点, 因而成为了植物病害生物防治的良好材料^[5-9]。甜瓜细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是由西瓜食酸菌

基金项目: 北京市教委(科技创新)服务能力建设-科研计划(KM201710020007)

*通信作者。魏艳敏, Tel/Fax: +86-10-80794280, E-mail: yanminwei@139.com; 刘钢, Tel/Fax: +86-10-64806017, E-mail: liug@im.ac.cn

收稿日期: 2019-09-03; 修回日期: 2019-11-17; 网络出版日期: 2019-11-25

(*Acidovorax citrulli*)引起的西瓜和甜瓜上的毁灭性病害,在我国各地瓜类产区均有不同程度的发生,造成了巨大经济损失^[10-12]。目前甜瓜细菌性果斑病防治主要以化学防治为主,但是长期大量使用化学农药已经带来一些负面影响,如农药在果蔬上的残留问题、农药对生态环境的污染问题以及病原菌的耐药性和病害的再次发生等问题^[13]。因此,开发和利用拮抗微生物防治甜瓜细菌性果斑病具有重要的意义。本文以北京市门头沟区杏树根际土壤分离到的一株芽胞杆菌 BJ-6 为对象,明确其分类地位、抑菌活性和防病促生效果。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试拮抗菌株:芽胞杆菌 BJ-6 分离自杏树根际土壤,北京农学院植物保护实验室保存。

供试植物病原菌:供试的 15 种常见植物病原菌由北京农学院植物病理实验室提供并保存。

供试甜瓜:“绿翠”薄皮甜瓜,由大绿种苗科技有限公司生产。

供试农药:72%农用硫酸链霉素可湿性粉剂,由华北制药股份有限公司生产。90%新植霉素可溶性粉剂,由石家庄三农化工有限公司生产。

1.2 供试培养基

PDA 培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L;用于植物病原真菌培养。

发酵培养基:麦芽糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L,麸皮 10 g/L, CaCO₃ 10 g/L, Na₂HPO₄ 2 g/L, KH₂PO₄ 1 g/L;用于拮抗菌 BJ-6 的发酵培养。

LB 培养基:酵母膏 5 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,氯化钠 5 g/L;用于植物病原细菌的培养。

1.3 细菌形态与生理生化特征鉴定

细菌形态观察和生理生化鉴定参考《常见细菌系统鉴定手册》^[14]进行。

1.4 16S rDNA、*gyrB* 和 *gyrA* 基因序列分析

菌株 BJ-6 的单个菌落在 LB 液体培养基中于 28 °C、180 r/min 培养 36 h,离心收集菌体,用细菌 DNA 提取试剂盒提取细菌 DNA。以提取的总 DNA 为模板,分别用细菌 16S rDNA 扩增通用引物 27F 和 1492R^[3,15]、*gyrB* 基因扩增引物 *gyrB*-up1f 和 *gyrB*-up2r^[16]、*gyrA* 基因扩增引物 *gyrA*-F 和 *gyrA*-R^[9]进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 25 μL: 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL,总 DNA 模板 1 μL,上下游引物各 1 μL, ddH₂O 补充到 25 μL。PCR 反应:95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min,共 34 个循环;72 °C 10 min 延伸。将扩增产物纯化后送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将测序结果提交到 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中,进行 BLAST 比对分析。从 NCBI 中下载其他芽胞杆菌的相关基因序列,利用 Clustal W 软件和 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。

1.5 菌株 BJ-6 的抑菌活性测定

采用平板对峙法^[15]测定拮抗菌株 BJ-6 对植物病原真菌的抑菌活性。采用抑菌圈法^[17]测定菌株 BJ-6 对植物病原细菌的抑菌活性。

1.6 芽胞杆菌 BJ-6 对甜瓜细菌性果斑病的防病效果

采用盆栽幼苗喷雾法实验^[16]测定菌株的防病效果。

拮抗菌发酵液的制备:将活化好的 BJ-6 菌液按照 1% 的接菌量加到装有 100 mL 的发酵培养基

中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d, 得到菌株 BJ-6 的发酵液, 菌液浓度约 7×10^9 CFU/mL。

待测植物病原菌液的制备: 将活化好的甜瓜细菌性果斑病菌 MH21 的菌液按照终浓度 1% 的接菌量加到含有 100 mL 的 LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d, 调整菌液浓度至 1×10^9 CFU/mL, 喷雾接种时加入 1% 的吐温 80。

甜瓜幼苗处理和接种: 首先, 采用喷雾法将清水、72% 农用链霉素可湿性粉剂 1000 倍液、90% 新植霉素可溶性粉剂 1000 倍液、稀释 5 倍的 BJ-6 带菌发酵液(菌液浓度 1.4×10^9 CFU/mL)、稀释 5 倍的 BJ-6 灭菌发酵液以及稀释 5 倍的培养基 6 个处理均匀喷洒在幼苗上, 每个处理重复 3 盆, 每盆 5 棵苗。然后, 用喷雾法接种甜瓜细菌性果斑病菌, 最后, 保湿光照培养。

检查结果: 分别在第 5 天和 7 天观察甜瓜幼苗的发病情况, 计算病叶率(公式 1)、病情指数(公式 2)和防治效果(公式 3)。细菌性果斑病分级标准见表 1。

$$\text{发病率(\%)} = \frac{\text{病叶数}}{\text{调查总叶数}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{代表数值})}{(\text{调查总叶数} \times \text{最高病级值})} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{防治效果(\%)} = \frac{(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数})}{\text{对照病情指数}} \times 100\% \quad (3)$$

表 1. 甜瓜细菌性果斑病分级标准

Table 1. The grading standard of bacterial fruit blotch of melon

Grade	The severity of symptom
0	No lesions on leaves
1	0–5% lesion area in total leaves
3	6%–10% lesion area in total leaves
5	11%–25% lesion area in total leaves
7	25%–50% lesion area in total leaves
9	More than 50% lesion area in total leaves

1.7 室内盆栽甜瓜促生作用测定

在装有灭菌土的花盆($\Phi=6$ cm)中分别灌入 1 mL、5 mL 菌株 BJ-6 发酵液和清水 3 个处理, 每处理 5 盆, 在处理的花盆中播种甜瓜, 20 d 后测定甜瓜株高、茎粗、鲜重、叶片个数。

2 结果和分析

2.1 芽胞杆菌 BJ-6 的形态特征观察结果

菌株 BJ-6 在 LB 培养基上生长 24–48 h 后, 菌落颜色呈浅黄色, 菌落边缘略显乳白色, 边缘不规则且不透明, 菌落表面不光滑, 有褶皱隆起(图 1-A)。单菌落中心也会有褶皱隆起, 革兰氏染色呈阳性。在扫描电镜下观察菌体成杆状, 芽孢表面不光滑, 侧面有脊状突起, 芽孢顶部有局部突起(图 1-B)。

2.2 芽胞杆菌 BJ-6 的生理生化特征

菌株 BJ-6 生理生化实验发现: 接触酶试验、硝酸盐试验、明胶液化试验、VP 试验均呈阳性; 硫化氢试验、亚硝酸盐还原试验、纤维素试验、甲基红试验均呈阴性。菌株 BJ-6 在以硝酸铵、氯化铵、硫酸铵、或硝酸钠为唯一氮源的培养基中均能生长。BJ-6 利用葡萄糖、肌醇、麦芽糖、蔗糖、乳糖、半乳糖和山梨醇的效果比木糖和甘露醇好。参考《常见细菌系统鉴定手册》, 菌株 BJ-6 与解淀粉芽胞杆菌的特征基本相似。

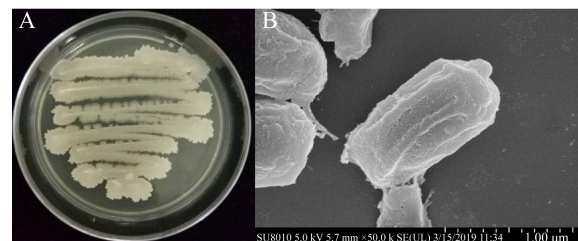


图 1. 菌株 BJ-6 的菌落(A)和芽孢(B)

Figure 1. The colony of stain BJ-6 (A) and its spore structure under scanning microscope (B).

2.3 基于 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 的序列分析结果

将 PCR 扩增菌株 BJ-6 的 16S rDNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因序列提交到 GenBank 中(16S rRNA 基因登录号 MN272328, *gyrA* 登录号 MN295596, *gyrB* 登录号 MN295597)。通过 BLAST 软件比对分析发现, 菌株 BJ-6 的 16S rRNA 基因扩增序列与 NCBI 中的芽胞杆菌属序列相似度最高, 菌株 BJ-6 与该属下的几个模式种的序列相似度均在 100%。*gyrB* 和 *gyrA* 基因序列的比对结果显示, BJ-6 菌株与解淀粉芽胞杆菌高度相似。通过串联 16S rRNA、*gyrB* 和 *gyrA* 基因序列, 利用 MEGA 5.0 邻接法构建系统进化发育树, 结果发现(图 2), 菌株 BJ-6 与解淀粉芽胞杆菌 DSM7(FN597644.1) 聚类在一支上。根据菌落形态特征及生理生化特征, 对照《常见细菌系统鉴定手册》, 并结合系

统发育分析, 初步确定菌株 BJ-6 为解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

2.4 芽胞杆菌 BJ-6 的抑菌活性测定

芽胞杆菌 BJ-6 对供试的 15 种植物病原菌的抑菌活性测定结果见图 3 和表 2。菌株 BJ-6 对 15 种植物病原菌均表现出不同程度的抑制活性, 其中对葡萄炭疽病菌、苹果树皮腐烂病菌、桃树细菌性穿孔病菌、葡萄白腐病菌、甜瓜细菌性果斑病菌抑菌活性最强, 抑菌带宽度分别达到 1.27、0.90、0.75、0.59、0.50 cm; 对葡萄溃疡病菌、草莓炭疽病菌、玉米大斑病菌、南瓜炭疽病菌、富克葡萄孢盘菌、辣椒疫病菌、果生炭疽病菌、黄瓜枯萎病菌抑菌活性稍差, 抑菌带宽度分别为 0.47、0.43、0.43、0.35、0.30、0.22、0.22、0.13 cm; 对草莓枯萎病菌、草莓立枯病菌仅有微弱的抑菌活性。

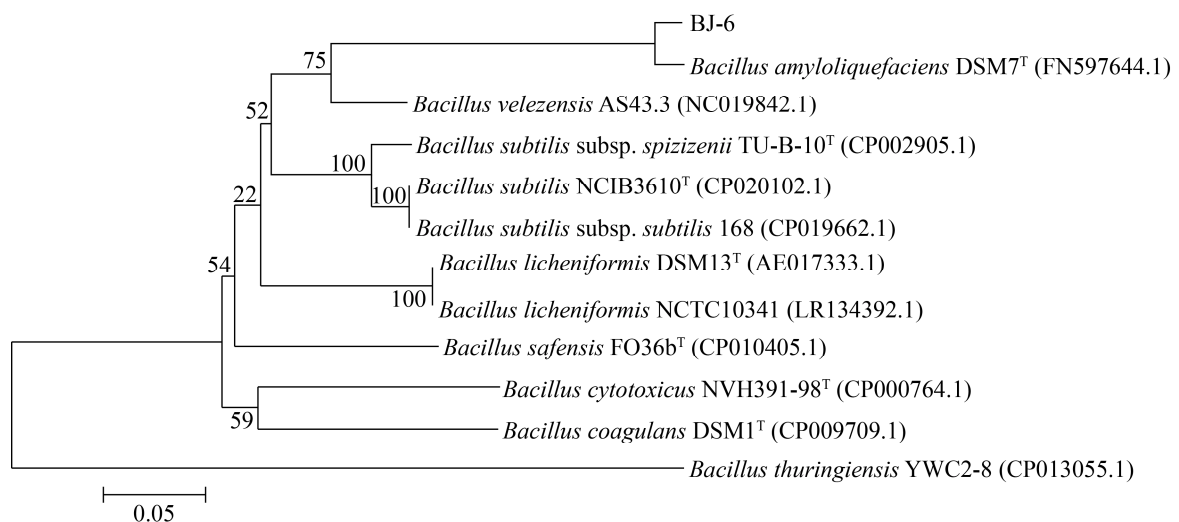


图 2. 基于 16S rRNA、*gyrA* 和 *gyrB* 多基因序列的聚类分析

Figure 2. Phylogenetic tree based on the sequences of 16S rRNA, *gyrA* and *gyrB*. GenBank accession numbers of the aligned sequences are shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 0.05 means the nucleotide substitution rate of 0.05. T represents the sequence from the type strain.

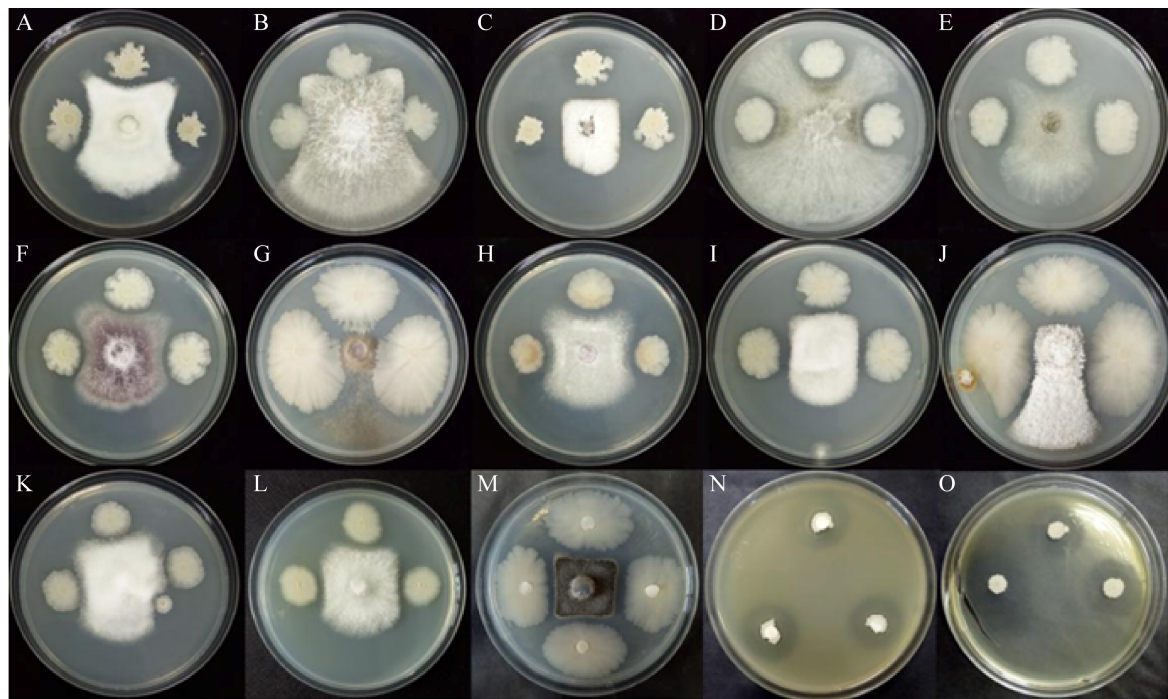


图 3. 菌株 BJ-6 的抗菌活性

Figure 3. Antimicrobial activity of BJ-6 strain. A: *Colletotrichum fragariae*; B: *Rhizoctonia solani*; C: *Colletotrichum fragariae*; D: *Botryosphaeria dothidea*; E: *Pilidiella diplodiella*; F: *Phytophthora capsici*; G: *Valsa mali*; H: *Fusarium oxysporum*; I: *Exserohilum turcicum*; J: *Botryotinia fuckelliana*; K: *Fusarium oxysporum*; L: *Colletotrichum fructicola*; M: *Colletotrichum orbiculare*; N: *Acidovorax citrull*; O: *Xanthomonas campestris*.

表 2. 菌株 BJ-6 对 15 种植物病原菌的抑制作用

Table 2. Inhibition activity of BJ-6 against 15 plant pathogens

Diseases	Pathogen	Inhibition belt/cm
Grape anthracnose	<i>Colletotrichum fragariae</i>	1.27±0.08
Apple canker	<i>Valsa mali</i>	0.90±0.25
Peach perforation	<i>Xanthomonas campestris</i>	0.75±0.05
Grape white rot	<i>Pilidiella diplodiella</i>	0.59±0.19
Bacterial fruit blotch of melon	<i>Acidovorax citrulli</i>	0.50±0.00
Grape canker	<i>Botryosphaeria dothidea</i>	0.47±0.06
Strawberry anthracnose	<i>Colletotrichum fragariae</i>	0.43±0.07
Northern leaf blight of corn	<i>Exserohilum turcicum</i>	0.43±0.07
Pumpkin anthracnose	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	0.35±0.05
Grape canker	<i>Botryotinia fuckelliana</i>	0.30±0.10
Phytophthora blight of pepper	<i>Phytophthora capsici</i>	0.22±0.03
Strawberry anthracnose	<i>Colletotrichum fructicola</i>	0.22±0.11
Cucumber fusarium wilt	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.13±0.03
Strawberry fusarium wilt	<i>Fusarium oxysporum</i>	0±0
Strawberry seedling disease	<i>Rhizoctonia solani</i>	0±0

2.5 芽胞杆菌 BJ-6 对甜瓜细菌性果斑病的防病效果

采用盆栽喷雾接种的方法测定了菌株 BJ-6 对甜瓜细菌性果斑病的防治效果(图 4 和表 3)。结果显示,甜瓜幼苗在接种病原细菌 5 d 后,处理组带菌发酵液、农用链霉素、新植霉素和灭菌发酵液的病叶率分别为 10%、10%、15.63%、43.33%,病情指数分别为 1.85、7.78、10.07、18.52,防治效果分别为 95.84%、82.49%、77.34%、58.33%、水和培养基的对照组处理发病较重,病叶率分别为 80%和 70%,病情指数分别为 44.44 和 47.04,由此可见 BJ-6 的带菌发酵液防效最好,达到了 95%以上,高于农用链霉素和新植霉素。接种甜瓜细菌性果斑病菌 7 d 后,处理组带菌发酵液、农用链霉素、新植霉素和灭菌发酵液病情指数分别为 9.62、7.78、24.55、26.30,防治效果分别为 79.55%、83.46%、47.81%、44.09%。

2.6 室内盆栽甜瓜促生作用测定结果

室内盆栽测定结果表明,用 BJ-6 菌株发酵液灌根处理甜瓜对甜瓜生长具有显著的促生作用(表 4)。用 1 mL 的 BJ-6 发酵液灌根处理后,甜瓜植株的株高、茎粗、鲜重、叶片个数分别为

20.64 cm、2.90 mm、1.73 g、4.80 个,比对照分别增加了 32.14%、7.41%、12.34%、14.29%。用 5 mL 的 BJ-6 发酵液灌根后,甜瓜植株的株高、茎粗、鲜重、叶片个数分别为 25.16 cm、2.80 mm、1.75 g、5.25 个,比对照分别增加 61.08%、3.70%、13.64%、25.00%。

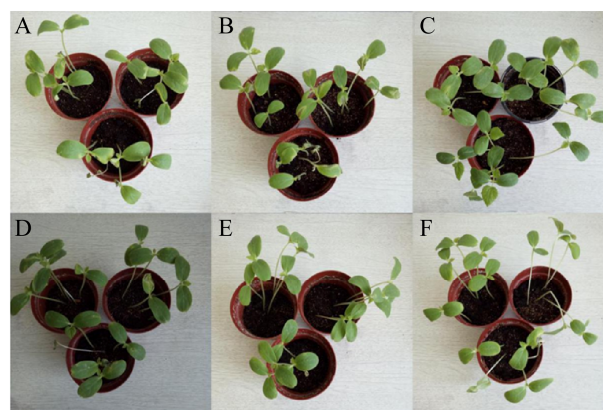


图 4. BJ-6 菌株发酵液对盆栽甜瓜细菌性果斑病的防治效果

Figure 4. The biocontrol effect of BJ-6 fermentation broth on bacterial fruit blotch of melon seedlings. A: water; B: culture medium; C: fermentation liquid with bacteria; D: sterile fermentation liquid; E: 72% agricultural streptomycin (72% streptomycin sulfate); F: 90% Xinzhimycin (35% streptomycin sulfate and 55% oxytetracycline hydrochloride).

表 3. 菌株 BJ-6 发酵液对盆栽甜瓜细菌性果斑病的防治效果

Table 3. The biocontrol effect of BJ-6 fermentation broth on bacterial fruit blotch of sweet melon

Treatments	5 d			7 d		
	Incidence of diseased leaves/%	Disease index	Control effect/%	Incidence of diseased leaves/%	Disease index	Control effect/%
Water	80.00	44.44	0.00	76.67	47.04	0.00
5 times dilution of culture medium	70.00	47.04	-5.85	80.00	55.56	-18.11
5 times dilution of fermentation broth with bacteria	10.00	1.85	95.84	23.33	9.62	79.55
5 times dilution of sterile fermentation broth	43.33	18.52	58.33	46.67	26.30	44.09
1000 times dilution of 90% Xinzhimycin	15.63	10.07	77.34	28.13	24.55	47.81
1000 times dilution of 72% agricultural streptomycin	10.00	7.78	82.49	10.00	7.78	83.46

表 4 菌株 BJ-6 发酵液对甜瓜苗生长的影响

Table 4. The effect of BJ-6 fermentation broth on the growth of melon seedlings

Treatment	Stem length/cm	Stem diameter/mm	Fresh weight/g	Number of leaves
Water	15.62	2.70	1.54	4.20
1 mL of fermentation broth with bacteria	20.64	2.90	1.73	4.80
5 mL of fermentation broth with bacteria	25.16	2.80	1.75	5.25

3 讨论

通过形态特征、生理生化指标以及基于 16S rRNA、*gyrA* 和 *gyrB* 序列的多基因聚类分析,初步将菌株 BJ-6 鉴定为解淀粉芽胞杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。16S rRNA 基因由于高度保守,因此仅能区别属水平上的细菌,无法区分亲缘关系较近的种间关系。*gyrA* 和 *gyrB* 基因存在于所有细菌中,是编码 DNA 促旋酶 A 和 B 亚单位蛋白的基因,分子进化率要比 16S rRNA 基因大很多,且芽胞杆菌属不同种的 *gyrA* 和 *gyrB* 基因存在很大差异。通过 *gyrA* 和 *gyrB* 基因构建系统发育树,从而判断不同种之间的亲缘关系,是芽胞杆菌(*Bacillus*)的常用分类鉴定方法^[18-19]。因此,本实验采用多基因聚类对 16S rRNA、*gyrA* 和 *gyrB* 三个基因进行了分析。抑菌活性测定发现,菌株 BJ-6 对供试的绝大部分植物病原菌都有不同程度的抑菌活性,其中对葡萄炭疽病菌、苹果树皮腐烂病菌、桃树细菌性穿孔病菌、葡萄白腐病菌、甜瓜细菌性果斑病菌抑菌活性最强。菌株 BJ-6 对甜瓜细菌性果斑病的盆栽防病效果发现, BJ-6 带菌发酵液防病效果较好,接种 5 d 后防病效果高于农用链霉素、新植霉素和灭菌发酵液。而灭菌发酵液对甜瓜细菌性果斑病仍有一定防病作用,推测 BJ-6 发酵液中有某些抗菌物质起到了抑制病原菌的作用。带菌发酵液防效优于灭菌发酵液,说明可能还有其他生防机理存在,比如生防菌占据

生态位点,与病原菌竞争营养和空间位点,使得病原菌不能侵染植物等;或者生防菌在植物表面存活并且产生次级代谢产物,破坏病原菌的细胞结构和改变生活环境,使得病原菌侵染效果下降;还有可能是生防菌诱导植物产生抗病性和激活植物防卫反应,从而抑制有害微生物的生长^[20-23]。无菌发酵液对甜瓜细菌性果斑病有很好的防治作用,证实了 BJ-6 能够产生一些抗菌物质,这些抗菌物质能够外泌到培养基中^[24],这类物质应该包括脂肽类物质^[25-26]、聚酮类物质、胞外酶等物质,为此下一步将研究 BJ-6 的最佳发酵条件,更好地利用 BJ-6 产生的次级代谢产物。总之,菌株 BJ-6 抑菌谱广,抑菌活性强,具有良好的防病促生效果,具有一定的开发利用潜能。

参考文献

- [1] Elshagabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: status, concerns, and future perspectives. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1490.
- [2] Chen ZY. Research and application of bio-fungicide with *Bacillus* spp.. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31(5): 723-732. (in Chinese)
陈志谊. 芽胞杆菌类生物杀菌剂的研发与应用. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 723-732.
- [3] Chen X, Tang TT, Sun X, Liu Q. Identification of marine bacillus isolate Y3F suppressing fusarium wilt of cucumber. *Microbiology China*, 2017, 44(10): 2370-2379. (in Chinese)
陈香, 唐彤彤, 孙星, 刘勤. 对黄瓜枯萎病具防效的海洋

- 源芽孢杆菌 Y3F 的鉴定. 微生物学通报, 2017, 44(10): 2370–2379.
- [4] Azaiez S, Ben Slimene I, Karkouch I, Essid R, Jallouli S, Djebali N, Elkahoui S, Limam F, Tabbene O. Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds. *Microbiological Research*, 2018, 217: 23–33.
- [5] Cheng XK, Ji XX, Ge YZ, Li JJ, Qi WZ, Qiao K. Characterization of antagonistic *Bacillus methylotrophicus* isolated from rhizosphere and its biocontrol effects on maize stalk rot. *Phytopathology*, 2019, 109(4): 571–581.
- [6] Masum MMI, Liu L, Yang M, Hossain MM, Siddiq MM, Supty ME, Ogunyemi SO, Hossain A, An Q, Li B. Halotolerant bacteria belonging to operational group *Bacillus amyloliquefaciens* in biocontrol of the rice brown stripe pathogen *Acidovorax oryzae*. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 125(6): 1852–1867.
- [7] Wang YJ, Gao Y, Chen XM, Liu ML, Zhang DD. Biocontrol ability of *Bacillus amyloliquefaciens* against gray mold on tomato fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(7): 1296–1304. (in Chinese)
王亚杰, 高宇, 陈晓萌, 刘梦灵, 张冬冬. 解淀粉芽孢杆菌防治番茄果实灰霉病及其抑菌物质分析. 园艺学报, 2018, 45(7): 1296–1304.
- [8] Zhang JX, Gu YB, Chi FM, Ji ZR, Wu JY, Dong QL, Zhou ZS. *Bacillus amyloliquefaciens* GB1 can effectively control apple valsa canker. *Biological Control*, 2015, 88: 1–7.
- [9] Yang DX, Lin QL, Lu NH, He H, Huang YY, Huang QZ, Cao YJ. Screening and identification of a marine bacterium strain SH-27 against *Phytophthora capsici* causing pepper phytophthora blight. *Microbiology China*, 2018, 45(1): 54–63. (in Chinese)
杨定祥, 林巧玲, 卢乃会, 何红, 黄银燕, 黄勤知, 曹永军. 拮抗辣椒疫霉菌海洋细菌菌株 SH-27 的筛选鉴定及其防病促生作用. 微生物学通报, 2018, 45(1): 54–63.
- [10] Ren ZG, Jiang WJ, Ni XY, Lin M, Zhang W, Tian GZ, Zhang LQ. Multiplication of *Acidovorax citrulli* in planta during infection of melon seedlings requires the ability to synthesize leucine. *Plant Pathology*, 2014, 63(4): 784–791.
- [11] Ren ZG, Hou L, Song ZG, Zhang LQ. Screening of the pathogenicity mutants of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and cloning of the *hrcR* gene. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2009, 39(5): 501–506. (in Chinese)
任争光, 侯磊, 宋治国, 张力群. 甜瓜细菌性果斑病菌致病性突变体筛选与 *hrcR* 基因的克隆. 植物病理学报, 2009, 39(5): 501–506.
- [12] Ren ZG, Lin M, Jiang WJ, Ni XY, Mei GY, Han SC, Zhang LQ. Influence of quorum-sensing system on the virulence of *Acidovorax citrulli* MH21 on melon seedlings. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2012, 42(6): 608–619. (in Chinese)
任争光, 林敏, 姜文君, 倪兴雅, 梅桂英, 韩升才, 张力群. 群体感应系统对甜瓜果斑病菌 MH21 致病力的影响. 植物病理学报, 2012, 42(6): 608–619.
- [13] Chen XD. Application of *Bacillus subtilis* in agriculture as biocontrol agent. *Microbiology China*, 2013, 40(7): 1323–1324. (in Chinese)
陈向东. 枯草芽孢杆菌作为生防制剂在农业上的应用. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1323–1324.
- [14] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [15] Dou YN, Niu SQ, Dou JT, Zhao D, Zheng DD, Zhou X, Wang Y, Zhu XT, Kong WB. Screening, identification and preliminary study on biocontrol effect of antagonistic *Bacillus* against the pathogen of *Valsa mali* for apple tree. *Microbiology China*, 2018, 45(12): 2684–2694. (in Chinese)
豆雅楠, 牛世全, 豆建涛, 赵丹, 郑豆豆, 周璇, 王彦, 朱学泰, 孔维宝. 芽孢杆菌拮抗苹果树腐烂病菌的筛选、鉴定及抑菌活性初探. 微生物学通报, 2018, 45(12): 2684–2694.
- [16] Wu LY, Liu BY, Wang YJ, Liu SP, Zhao TC, Hu J. Isolation and identification of bio-control bacterial strain BW-6 against bacterial fruit blotch of sweet melon. *Plant Protection*, 2014, 40(1): 43–47, 53. (in Chinese)
吴丽媛, 刘宝玉, 王钰杰, 刘双平, 赵廷昌, 胡俊. 甜瓜细菌性果斑病生防菌株 BW-6 的筛选和鉴定. 植物保护, 2014, 40(1): 43–47, 53.
- [17] Zhu BC, Gu L, Li Z, Wu HJ, Gu Q, Wu LM, Gao XW. Isolation and identification of the Antarctic soil *Bacillus* and its biocontrol effect against brown stalk rot on maize. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(4): 641–648. (in

- Chinese)
朱碧春, 顾丽, 李正, 伍辉军, 顾沁, 吴黎明, 高学文. 南极土壤芽孢杆菌的分离鉴定及其防治玉米细菌性褐腐病的研究. *南京农业大学学报*, 2017, 40(4): 641–648.
- [18] Yu GH, Niu CY, Chen YF, Chen YH, Yang ZH. Use of 16S rDNA, *gyrA* and *gyrB* gene sequence to identify a biocontrol *Bacillus* sp. strain R31. *Chinese Journal of Biological Control*, 2010, 26(2): 160–166. (in Chinese)
喻国辉, 牛春艳, 陈远凤, 陈燕红, 杨紫红. 利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定. *中国生物防治*, 2010, 26(2): 160–166.
- [19] Yu C, Jin J, Meng LQ, Xia HH, Yuan HF, Wang J, Yu DS, Zhao XY, Sha CQ. Sequence comparison of *phoR*, *gyrB*, *groEL*, and *cheA* genes as phylogenetic markers for distinguishing *Bacillus amyloliquefaciens* and *B. subtilis* and for identifying *Bacillus* strain B29. *Cellular and Molecular Biology*, 2017, 63(5): 19–24.
- [20] Chai QK, Zhang B, Chang RK, Liu HQ, Tian XW, Wang YH. Preliminary study on the effect of the induced resistance in cucumber with *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 against *Botrytis cinerea*. *Acta Phytopathologica Sinica*. (2019-12-24). <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000303>. (in Chinese)
柴庆凯, 张斌, 常若葵, 刘慧芹, 田小卫, 王远宏. 解淀粉芽孢杆菌 LJ02 对黄瓜抗灰霉病菌的生防效果及其诱导抗性机理的初步研究. *植物病理学报*. (2019-12-24). <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000303>.
- [21] Kakar KU, Nawaz Z, Cui Z, Almoneafy AA, Ullah R, Shu QY. Rhizosphere-associated *Alcaligenes* and *Bacillus* strains that induce resistance against blast and sheath blight diseases, enhance plant growth and improve mineral content in rice. *Journal of Applied Microbiology*, 2018, 124(3): 779–796.
- [22] Wang H, Han LZ. Identification of four plant growth-promoting rhizobacteria isolated from tea rhizosphere. *Microbiology China*, 2019, 46(3): 548–562. (in Chinese)
王欢, 韩丽珍. 4 株茶树根际促生菌菌株的鉴定及促生作用. *微生物学通报*, 2019, 46(3): 548–562.
- [23] Zhang MJ, Li JL, Shen AR, Tan SY, Yan Z, Yu YT, Xue ZD, Tan TM, Zeng LB. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* IBFCBF-1 with potential for biological control of phytophthora blight and growth promotion of pepper. *Journal of Phytopathology*, 2016, 164(11/12): 1012–1021.
- [24] Liu Z, Wang YT, Jia XQ, Lu WY. Isolation of secondary metabolites with antimicrobial activities from *Bacillus amyloliquefaciens* LWYZ003. *Transactions of Tianjin University*, 2019, 25(1): 38–44.
- [25] Chen MC, Wang JP, Zhu YJ, Liu B, Yang WJ, Ruan CQ. Antibacterial activity against *Ralstonia solanacearum* of the lipopeptides secreted from the *Bacillus amyloliquefaciens* strain FJAT-2349. *Journal of Applied Microbiology*, 2019, 126(5): 1519–1529.
- [26] Asari S, Ongena M, Debois D, de Pauw E, Chen KL, Bejai S, Meijer J. Insights into the molecular basis of biocontrol of *Brassica* pathogens by *Bacillus amyloliquefaciens* UCMB5113 lipopeptides. *Annals of Botany*, 2017, 120(4): 551–562.

Identification of *Bacillus* sp. BJ-6 for biocontrol of bacterial fruit blotch of melon

Huihui Jia¹, Xinyue Xie¹, Yuanyuan Pan², Zhengguang Ren¹, Gang Liu^{2,3,4*}, Yanmin Wei^{1*}

¹ Beijing Key Laboratory of New Technology in Agricultural Application, National Demonstration Center for Experimental Plant Production Education, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China

² State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

³ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

⁴ The Innovative Academy of Seed Design, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100864, China

Abstract: *Bacillus* sp. is one of the most studied microorganisms in biological control of plant diseases. It is widely distributed in nature and has great potential in agriculture. **[Objective]** To identify strain BJ-6 and explore its biological control function. **[Methods]** We identified the strain BJ-6 by morphological characteristics, physiological and biochemical tests and 16S rRNA, *gyrA* and *gyrB* gene sequence analysis. We measured the antimicrobial spectrum of BJ-6 by antagonistic experiment and studied the biocontrol effects and growth promotion on melon seedlings by pot experiment. **[Results]** We identified strain BJ-6 as *B. amyloliquefaciens* through the phylogenetic analysis of 16S rRNA, *gyrA* and *gyrB* sequences, and the characteristics of morphology, physiology and biochemistry. We found that BJ-6 strain had the bioactivity against 15 plant pathogens by the antagonistic experiment. The fermentation broth of BJ-6 had very good control efficiency to bacterial fruit blotch of melon seedlings in the pot experiment. Pot tests also showed that BJ-6 strain could promote the melon seedlings growth significantly. **[Conclusion]** We identified BJ-6 strain as *B. amyloliquefaciens*. Due to its broad spectrum of inhibiting plant pathogens and plant growth promoting ability, this stain had a good development value as biocontrol agents in plant protection.

Keywords: *Bacillus*, identification, bacterial fruit blotch, biocontrol, growth promotion

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Research Project of Beijing Municipal Education Commission (KM201710020007)

*Corresponding authors. Yanmin Wei, Tel/Fax: +86-10-80794280, E-mail: yanminwei@139.com; Gang Liu, Tel/Fax: +86-10-64806017, E-mail: liug@im.ac.cn

Received: 3 September 2019; Revised: 17 November 2019; Published online: 25 November 2019