

# 棉花黄萎病生防菌脂肽类抑菌物质分离和鉴定\*

罗佳<sup>1,2</sup> 陈立华<sup>1</sup> 赵爽<sup>1</sup> 杨兴明<sup>1</sup> 冉炜<sup>1</sup> 沈其荣<sup>1</sup> 胡江<sup>1†</sup>

(1 南京农业大学,江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室,南京 210095)

(2 江苏省农业科学院农业资源与环境研究所,南京 210014)

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIAL LIPOPEPTIDE, AN ANTAGONISTIC SUBSTANCE, FROM *BACILLUS SUBTILIS* FOR BIOCONTROL OF COTTON VERTICILLIUM WILT

Luo Jia<sup>1,2</sup> Chen Lihua<sup>1</sup> Zhao Shuang<sup>1</sup> Yang Xingming<sup>1</sup> Ran Wei<sup>1</sup> Shen Qirong<sup>1</sup> Hu Jiang<sup>1†</sup>

(1 Jiangsu Key Lab for Solid Organic Waste Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

(2 Institute of Agricultural Resource and Environmental Sciences, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**关键词** 棉花黄萎病;微生物有机肥;枯草芽孢杆菌;脂肽类抑菌物质;丰原素

**中图分类号** S144.1 **文献标识码** A

棉花黄萎病(Cotton Verticillium Wilt)是一种由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb)引起的严重危害棉花生产的土传维管束病害<sup>[1]</sup>。因大丽轮枝菌菌丝体产生的大量微菌核在土壤中存活时间长以及病原菌变异快等特点,造成培育抗病品种、使用化学药剂和利用新的栽培技术等方法防病效果均不理想。近年来,以生物防治为主的综合防治措施日益受到人们重视,并取得了一定效果<sup>[2-4]</sup>;该措施具有环境友好、不易产生抗性等优势,在棉花土传黄萎病的防治中具有非常重要意义。目前利用生物方法防治棉花土传黄萎病主要集中在以下两个方面:一是利用拮抗微生物防治;二是利用无毒菌系或用弱毒株系和促生菌诱导棉花产生抗病性来防治;前一种方法应用更为广泛,国内外研究均较多,已经分离到了一系列生防菌。Luo等<sup>[5]</sup>分离获得枯草芽孢杆菌DF14,连续3季盆栽实验结果表明对棉花黄萎病防治率达到80%以上,土壤中真菌种群和数量明显减少。Ioanna等<sup>[6]</sup>分离得到多株可以拮抗棉花土传黄萎病病原菌的*Pseudomonas fluores-*

*cens*,并取得了良好的应用效果。当前,对生防菌防治棉花土传黄萎病的生防机制研究相对较少,本研究从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)所产生的非核糖体合成的脂肽类抑菌物质入手,脂肽类抑菌物质抑菌作用的原理是影响细胞膜的结构,通过改变细胞膜通透性抑制病原菌的生长<sup>[7]</sup>。而枯草芽孢杆菌合成的主要抑菌物质,根据其结构上的差异主要有伊枯草菌素(Iturin)家族、表面活性素(Surfactin)家族和丰原素(Fengycin)家族三大类。本文通过研究菌株HJ5对病原菌拮抗效果及制备成微生物有机肥的田间试验防治效果并对其产生的抑菌物质进行提取和鉴定,为进一步明确枯草芽孢杆菌HJ5的生防机制提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

拮抗菌为本实验室筛选的1株枯草芽孢杆菌HJ5<sup>[4]</sup>(CGMCC No. 3301),目前已经保藏在中国普

\* 江苏省科技支撑项目(BE2009347)和江苏省重大科技成果转化项目(BA2008027)联合资助

† 通讯作者:胡江,副教授,主要从事微生物有机肥料研究。E-mail:hujiang@njau.edu.cn

作者简介:罗佳,男,江苏滨海人,博士,主要从事微生物有机肥料研究。E-mail:luo\_jia\_428@163.com

收稿日期:2011-04-26;收到修改稿日期:2011-07-24

通微生物菌种保藏中心(CGMCC)。棉花土传黄萎病病原菌大丽轮枝菌(*V. dahliae*)菌株 A 由新疆石河子大学提供。

## 1.2 拮抗菌及其发酵液对病原菌平板拮抗实验

采用平板对峙法评估拮抗菌对棉花土传黄萎病病原菌的拮抗效果。将病原菌保藏种进行活化,用打孔器(直径 5 mm)在菌落边缘区域打孔制成菌片,转接至马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)平板中央,28℃培养 3 d,将拮抗菌菌株 HJ5 点接在距病原菌菌片 20 mm 处,每皿接种 4 个样品,同时设只接病原菌的空白对照。28℃培养 10 d,测量病原菌的菌落直径,并按照下列公式计算抑菌率。

将拮抗菌 HJ5 接种至牛肉膏蛋白胨液体培养基,37℃、170 r min<sup>-1</sup>条件下振荡培养 48 h,10 000 r min<sup>-1</sup>离心 10 min 去除菌体,获得拮抗菌的发酵液。将发酵液经过旋转蒸发仪分别浓缩至 10 倍、50 倍和 100 倍,然后将发酵液经 0.22 μm 细菌过滤器过滤灭菌获得无菌的发酵液,4℃保存待用。按体积比 1:10 与冷却至 40~50℃ 的 PDA 培养基均匀混合,凝固后在平板中央接种病原菌菌块(直径 5 mm),同时用无菌水设对照,每处理重复 3 次,28℃培养 10 d,测量病原菌菌落直径,并计算抑菌率。

抑菌率(%) = (对照病原菌菌落直径 - 处理病原菌菌落直径) / 对照病原菌菌落直径 × 100%

## 1.3 拮抗菌对棉花黄萎病防治效果的田间试验

田间试验在江苏省宜兴工程中心试验田中进行,土壤基本性状为:有机质 15.36 g kg<sup>-1</sup>,全氮 1.87 g kg<sup>-1</sup>,有效磷 87.25 mg kg<sup>-1</sup>,速效钾 78.92 mg kg<sup>-1</sup>,因该田未种植过棉花,向试验小区接种病原菌,添加量 1 × 10<sup>3</sup> 个 g<sup>-1</sup>[8]。将试验田分 4 块,每块分隔成 3 个小区,每个小区面积 5 m × 2.5 m,棉花行距 0.8 m,株距 0.8 m,每个小区种植 18 株。拮抗菌与有机肥结合经过二次发酵后形成微生物有机肥,应用于本田间试验,微生物有机肥中菌株 HJ5 的含量在 1 × 10<sup>9</sup> 个 g<sup>-1</sup> 以上,脂肽类抑菌物质含量为 0.46 g kg<sup>-1</sup>,其中有机质为 37.3%,N、P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 和 K<sub>2</sub>O 分别为 3.2%、3.6% 和 0.89%。

棉花经过营养钵育苗,生长两周后移栽至田间。在营养钵中施肥量为 1% (300 g 土壤);田间肥料为穴施,施用量为每穴 50 g。田间试验设置 4 个处理:1) 对照(CK + CK); 2) 田间对照(HJ5 + CK),即仅在营养钵育苗时施用微生物有机肥;3) 营养钵对照(CK + HJ5),即仅在田间施用微生物有机肥;4) 微生物有机肥(HJ5 + HJ5),即在营养钵育苗和田

间均施用微生物有机肥。各处理等氮磷钾施入,不足以化肥尿素、过磷酸钙和氯化钾补足。

在棉花黄萎病爆发后,即棉花生长 100 d,处于花铃期时计算防治率(防治率 = (对照的发病率 - 样品的发病率) / 对照的发病率 × 100%)。

## 1.4 脂肽类物质的提取及高效液相色谱(HPLC)分析

菌株的培养:BPY 种子培养基(g L<sup>-1</sup>):牛肉膏 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,酵母膏 5.0 g,葡萄糖 10.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水 1 L。脂肽类抑菌物质富集培养基 Landy 培养基(g L<sup>-1</sup>):葡萄糖 20.0 g,L-谷氨酸 5.0 g,MgSO<sub>4</sub> 0.5 g,KCl 0.5 g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g,FeSO<sub>4</sub> 0.15 mg,MnSO<sub>4</sub> 5.0 mg,CuSO<sub>4</sub> 0.16 mg,蒸馏水 1 L。BPY 种子培养基按照 5% 的比例接入 Landy 培养基中,在 30℃ 摇床中培养 24 h<sup>[8]</sup>。

脂肽类物质的提取:将发酵液 10 000 r min<sup>-1</sup>离心 20 min 除去菌体,上清液用浓 HCl 调至 pH 2.0,放置于 4℃ 冰箱中过夜。然后 10 000 r min<sup>-1</sup>离心 20 min 收集沉淀,用 NaOH 溶液调至 pH 7.0 后,进行冷冻干燥,用甲醇浸提干燥物,4℃ 冰箱中静置 4 h 后 10 000 r min<sup>-1</sup>离心 20 min 获得上清液,经过 22 μm 的有机滤膜过滤后,获得脂肽粗提物。

HPLC 分析条件:柱型,Zorbax Eclipse XDB-C18(Analytical 4.6 mm × 15 cm, 5-Micron);流速,1 ml min<sup>-1</sup>;柱温,30℃;检测波长,254 nm;流动相 A,水(含 0.05% 甲酸,V/V);流动相 B,乙腈。洗脱程序:0 min,100% 流动相 A,0% 流动相 B;3 min,100% 流动相 A,0% 流动相 B;60 min,0% 流动相 A,100% 流动相 B;62 min,100% 流动相 A,0% 流动相 B;70 min,0% 流动相 A,100% 流动相 B。

馏分收集条件:柱型,Zorbax SB-C18(Semi-preparative 9.4 mm × 15 cm, 5-Micron);流速,1 ml min<sup>-1</sup>;柱温,30℃;检测波长,254 nm;流动相 A,水(含 0.05% 甲酸,V/V);流动相 B,乙腈。洗脱程序:0 min,100% 流动相 A,0% 流动相 B;3 min,100% 流动相 A,0% 流动相 B;60 min,0% 流动相 A,100% 流动相 B;62 min,100% 流动相 A,0% 流动相 B;70 min,0% 流动相 A,100% 流动相 B。分峰采用馏分收集器收集相应峰的洗脱液。

采用平板对峙法检测不同峰收集来的纯化物对棉花黄萎菌的抑菌活性。将棉花黄萎病病原菌保藏种进行活化,用打孔器(直径 5 mm)在菌落边缘区域打孔制成菌片,转接在 PDA 培养基平板中央,28℃培养 3 d,将纯化物溶于甲醇中,采用细菌过滤器过滤灭

菌,然后吸取 20  $\mu\text{l}$  滤液点接在已经生长病原菌的平板菌片四周 20 mm 处,3 个重复,甲醇为对照。28 $^{\circ}\text{C}$  培养 10 d,观察各个纯化物对病原菌的抑制作用。

### 1.5 纯化物的电喷雾质谱分析

实验所用的电喷雾质谱仪是 Agilent 公司的液质联用仪。将 HPLC 收集的纯化物通过注射器直接进样。利用电喷雾质谱技术(ESI/MS)测定纯化物的相对分子量,电喷雾条件为:毛细管电压 32 V、喷雾电压 5 000 V、毛细管温度 320 $^{\circ}\text{C}$ ,检测方式:阳离子。利用碰撞诱导解离技术(CID)对一级质谱主要离子峰进行串联质谱(MS/MS)分析获得化合物的典型碎片离子,碰撞池中碰撞气体为氦气,碰撞能量根据实验需要进行设定。

### 1.6 数据分析与统计

试验数据处理使用 Excel 2003 程序和 SPSS 13.0 统计分析软件。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌 HJ5 及其发酵液对病原菌的抑制作用

菌株 HJ5 能够有效抑制 *V. dahliae* 的生长,通

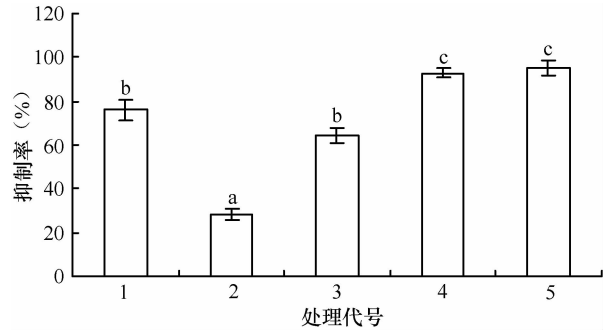
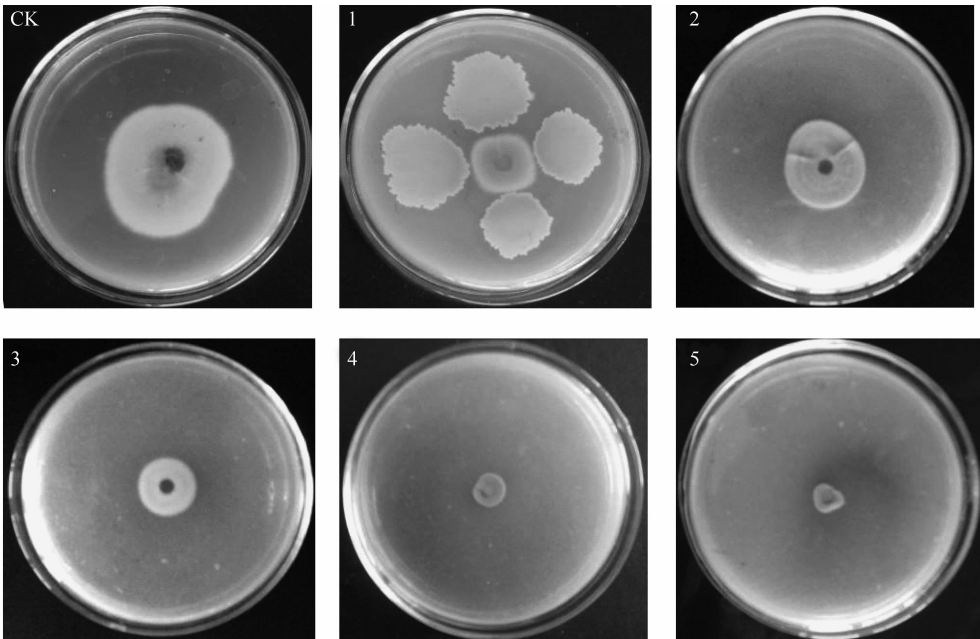


图 1 菌株 HJ5 不同浓度发酵液对病原菌的抑制作用  
注:abc 表示邓肯检验 5% 显著水平;误差线表示  $\pm$  SE;1 表示菌株,2 表示 1/10 浓度发酵液,3 表示 1 倍浓度发酵液,4 表示 5 浓度发酵液,5 表示 10 倍浓度发酵液

过平板对峙实验检测出菌株 HJ5 对病原菌菌落生长的抑制率为 76.2%。将拮抗菌发酵液离心除去菌体浓缩后,研究了不同浓度发酵液对病原菌的影响(图 1,图 2)。在原始发酵液浓度(1 倍)下,菌株 HJ5 的发酵液对病原菌抑制率为 64.3%;将发酵液稀释 10 倍后,对病原菌仍然有 28.6% 的抑制率;抑制率随着发酵液浓度的增加而增加,浓缩 5 倍以上发酵液对病原菌的抑制率达到了 90% 以上。



CK 表示对照,1 表示菌株,2 表示 1/10 浓度发酵液,3 表示 1 倍浓度发酵液,4 表示 5 倍浓度发酵液,5 表示 10 倍浓度发酵液

图 2 菌株 HJ5 发酵液不同处理对病原菌生长的影响效果

### 2.2 菌株 HJ5 田间防治试验

田间试验结果表明,CK + CK 处理棉花黄萎病的发病率为 20.83%,HJ5 + HJ5 的发病率仅为 4.17%;而仅在营养钵育苗施用微生物有机肥(HJ5 + CK)的

发病率为 12.76%,仅在大田施用微生物有机肥(CK + HJ5)发病率为 10.42%。施用微生物有机肥显著降低了棉花黄萎病的发病率,营养钵育苗和移栽大田两次施用微生物有机肥的生物防治率达到 79.98%,

而单次施用微生物有机肥的(HJ5 + CK)和(CK + HJ5)防治率也分别达到 38.74% 和 49.98% (表 1)。

表 1 不同处理对田间棉花防治率的影响

处理	发病率(%)	防治率(%)
CK + CK	20.83 ± 3.85a	—
HJ5 + CK	12.76 ± 2.68b	38.74
CK + HJ5	10.42 ± 2.65b	49.98
HJ5 + HJ5	4.17 ± 1.17c	79.98

注:平均值 ± 标准误。abc 表示邓肯检验 5% 显著水平

## 2.3 脂肽的富集制备与抑菌活性检测

拮抗菌 HJ5 的发酵液 1 000 ml 经离心除菌、

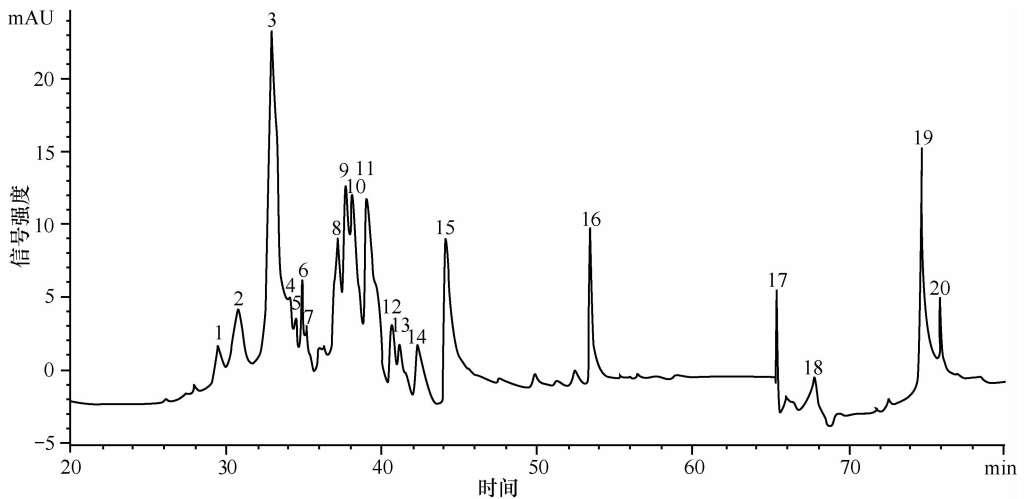


图 3 脂肽类物质粗提液的 HPLC 图谱

表 2 菌株 HJ5 发酵液脂肽类物质对病原菌拮抗效果

编号	保留时间(min)	拮抗效果	编号	保留时间(min)	拮抗效果
1	29.49	-	11	39.01	+
2	30.91	-	12	40.60	-
3	32.91	+	13	41.11	-
4	33.99	-	14	42.26	-
5	34.43	-	15	44.10	+
6	34.88	+	16	53.35	+
7	35.11	-	17	65.34	+
8	37.15	-	18	67.75	-
9	37.67	+	19	74.67	-
10	38.09	-	20	75.79	-

注: +, 表示生长受抑制; -, 表示正常生长

## 2.4 脂肽类抑菌物质的分子量及结构的分析

将 HPLC 洗脱出的具有抗菌活性物质 3、6、9、11、15、16、17 这 7 种物质进行 ESI-MS 分析,在纯化物 3 中含有分子量为 1 463 的化合物(图 4

酸沉、干燥和有机溶剂浸提等步骤获得脂肽的粗品 12.45 g,提取率为 12.45 g L<sup>-1</sup>;然后用高效液相色谱对粗提液进行初步检测(图 3),在 20 min 至 80 min 共出现了 28 个峰,说明该粗提取液中含有多种不同类型的物质。通过馏分收集器收集到了图 3 中所标的 20 个峰的脂肽类物质,进行下一步实验。

通过平板对峙法对这 20 种物质抗菌活性进行检测,结果如表 2 所示,物质 3、6、9、11、15、16、17 这 7 种物质对病原菌具有拮抗效果,说明拮抗菌 HJ5 可能产生多种对病原菌具有抑制作用的脂肽类物质。

(A)),在纯化物 6 中含有分子量为 1 477 的化合物(图 4(B)),在纯化物 9 中含有分子量为 1 491 的化合物(图 4(C)),纯化物 11、15、16 和 17 中未能够发现有益化合物。以上 3 种分子量的物质均

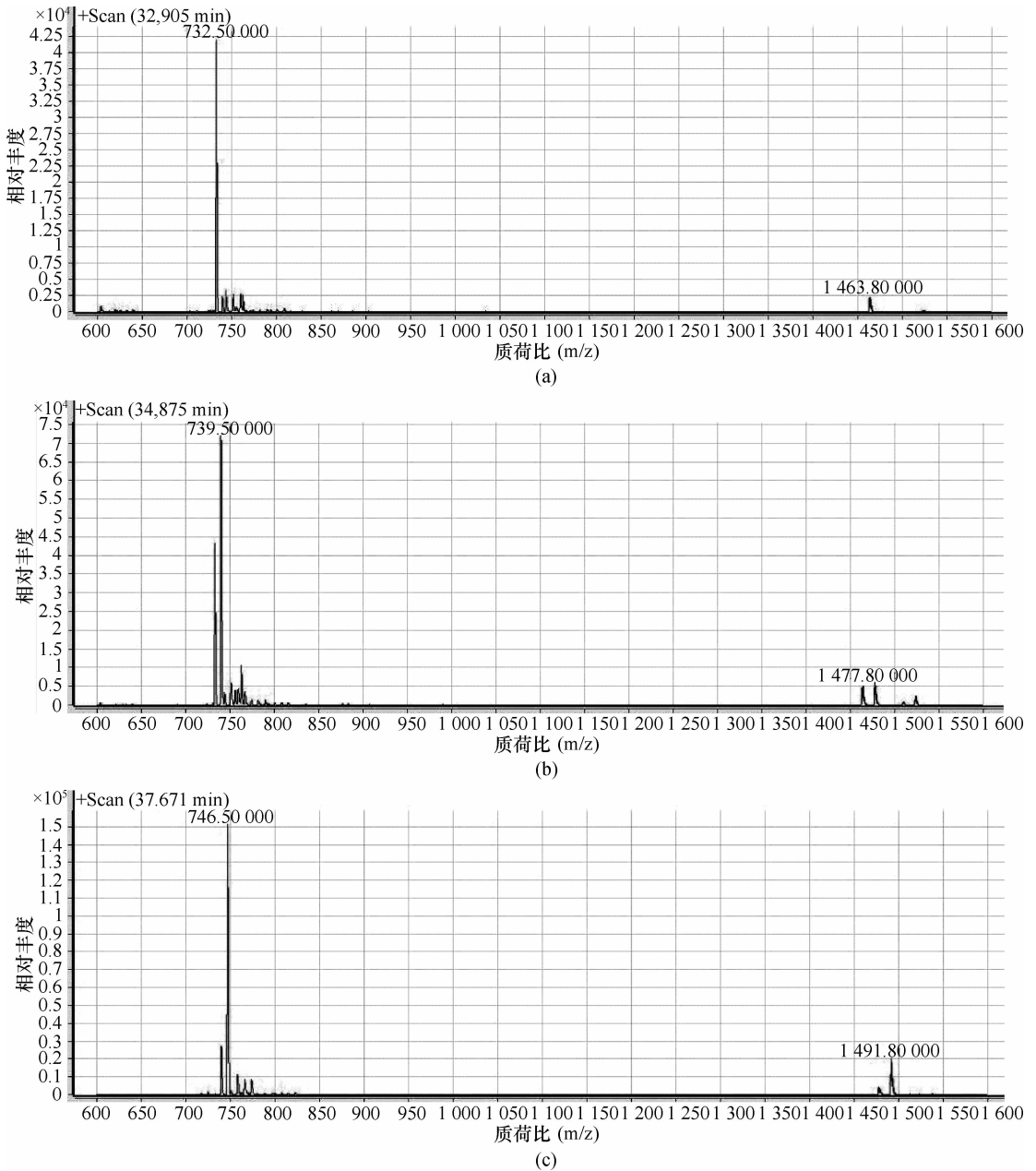


图4 脂肽类化合物的 ESI-MS 质谱图(a,b 和 c 分别表示图 3 所标出的 3,6 和 9 三个峰)

为  $[M + H]^+$  形态,除去 H 离子后分子量分别为 1463 Da、1477 Da 和 1491 Da,与相关报道的 Fengycin 家族中物质的相对分子量是一致的, Fengycin 家族中主要含有分子量分别为 1435 Da、1449 Da、1463 Da、1477 Da、1491 Da 和 1505 Da 的 6 种同系物或者同分异构体<sup>[9]</sup>,这些化合物具有相似的氨基酸序列,其在第六位氨基酸残基存在差异, Fengycin A 的第六位残基为 Ala(结构见图 5), Fengycin B 的第六位残基为 Val(结构见图 6)。因此推测菌株 HJ5 抗菌物质中含有 Fengycin 家族中 3 种分子量分别为 1463 Da、1477 Da

和 1491 Da 脂肽类物质。

## 2.5 主要化合物的分子结构

对一级质谱中的主要离子峰进行 MS/MS 分析,根据 MS/MS 中的碎片离子推测主成分的结构。本实验主要运用 MS/MS 技术分析了  $m/z$  1463、 $m/z$  1477 和  $m/z$  1491 这 3 种化合物的离子碎片,推测其结构。图 7 显示  $m/z$  1463 的化合物经过 MS/MS 分解为  $m/z$  1392、1080、966.4、620.1、436、388.9、226、168.9、114.9,九种离子碎片;图 8 显示  $m/z$  1477 的化合物经过 MS/MS 分解为  $m/z$  1392、1080、966.1、865.3、620.3、389.1、226、169、

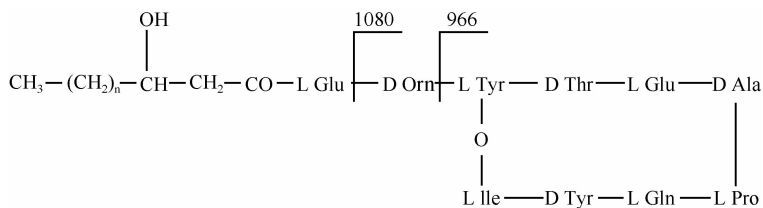


图 5 化合物 Fengycin A 的结构

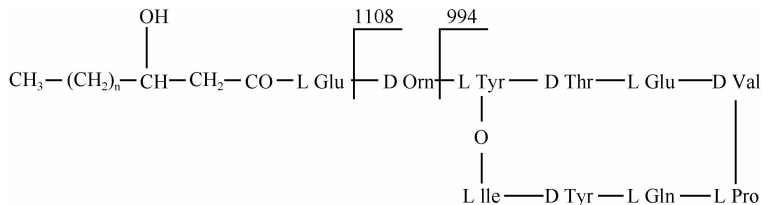


图 6 化合物 Fengycin B 的结构

115, 九种离子碎片;图 9 显示  $m/z$  1 491 的化合物经过 MS/MS 分解为  $m/z$  1 473、1 108、994.2、744.2、620.3、523.1、389.1、226.1、169、115, 十种离子碎片。

Fengycin 家族是一类环肽抗生素,由 10 个氨基酸和一个  $\beta$ -羟基脂肪酸组成,其中 3-Tyr 和 10-Ile 通过内酯键形成环状结构(见图 5,图 6),根据其在第六位上的氨基酸的不同分为 Fengycin A 和 Fengycin B 两大类。Fengycin A 的第六位残基为 Ala,环肽链 8 个氨基酸分子量为 966 Da;Fengycin B 的第六位残基为 Val,环肽链 8 个氨基酸分子量为 994 Da。根据典型性碎片的不同可以推测  $m/z$  1 463 和  $m/z$  1 477 可能为 Fengycin A,  $m/z$  1 491 可能为 Fengycin B。

### 3 讨 论

枯草芽孢杆菌具有抑制土传病害和植物病害的能力,又是自然界中广泛存在的非致病细菌,因而备受科研人员的青睐,被广泛应用于植物根部、枝干、叶、花部以及果蔬病害防治上<sup>[10-11]</sup>。张成省<sup>[12]</sup>等报道枯草芽孢杆菌 Tpb55 菌株对烟草赤星病菌菌丝生长、孢子产生具有抑制作用,并延缓黑色素的产生,Tpb55 菌株对烟草赤星病的防治效果达 100%。Zhang 等<sup>[13]</sup>研究表明枯草芽孢杆菌 N11 能大量定殖于香蕉根际,有效防治香蕉枯萎病,防治率达到 80% 以上。本实验室从棉花地里筛选出一株能够高效拮抗棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌的菌株,经过鉴定确定该菌为枯草芽孢杆菌。在 PDA 培养基平板上,菌株 HJ5 对病原菌抑制率为

76.2%,其发酵液也能有效抑制病原菌的生长,田间试验防治率最高达到 80%,说明其产生某些物质能够抑制病原菌生长。

目前,对于枯草芽孢杆菌产脂肽类抗生素报道很多,根据其结构上的差异主要分为伊枯草菌素(Iturin)家族、表面活性素(Surfactin)家族和丰原素(Fengycin)家族等几大类。Fengycin 是由 10 个氨基酸和一个  $\beta$ -羟基脂肪酸组成,其中 3-Tyr 和 10-Ile 通过内酯键形成环状结构。研究表明,Fengycins 对丝状真菌有明显的抑菌效果,其抑制机制主要有两种<sup>[7]</sup>:低浓度时,Fengycins 插入生物膜中形成孔道,导致膜的通透性改变;高浓度时,Fengycins 以去污剂的方式作用于生物膜,破坏膜的结构。另有研究表明,Fengycins 能诱导植物产生诱导性系统抗性<sup>[14]</sup>。Sun 等<sup>[15]</sup>从黄芩中分离获得一株 *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 能产生 Fengycin 和 Surfactin,能抑制食品腐败菌和病原真菌的生长。李宝庆<sup>[16]</sup>等发现枯草芽孢杆菌 BAB-1 能够产生 Fengycin 等多种脂肽类物质,对番茄灰霉菌有抑制作用,能够防治番茄灰霉病。本研究用 HPLC 从菌株 HJ5 发酵液中分离出 20 种脂肽类物质,检测出 7 种物质对棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌有拮抗作用,说明菌株 HJ5 能够产生多种抗真菌物质,对病原菌有拮抗作用;利用液质联用仪推测菌株 HJ5 可能含有 Fengycin 家族中 3 种分子量分别为 1 463 Da、1 477 Da 和 1 491 Da 脂肽类物质,经过 MS/MS 分析推测分子量为 1 463 Da 和 1 477 Da 可能为 Fengycin A 的两种同系物,分子量为 1 491 Da 可能为 Fengycin B。通过液质联用仪检测出了枯草芽孢杆菌 HJ5 中含有 3

种脂肽类抗菌物质, 这为今后进一步研究枯草芽孢杆菌 HJ5 在根表定植和作用机理提供了很好的基

础, 也为枯草芽孢杆菌 HJ5 液体、固体发酵并提高抗生素产量等应用研究提供了技术途径。

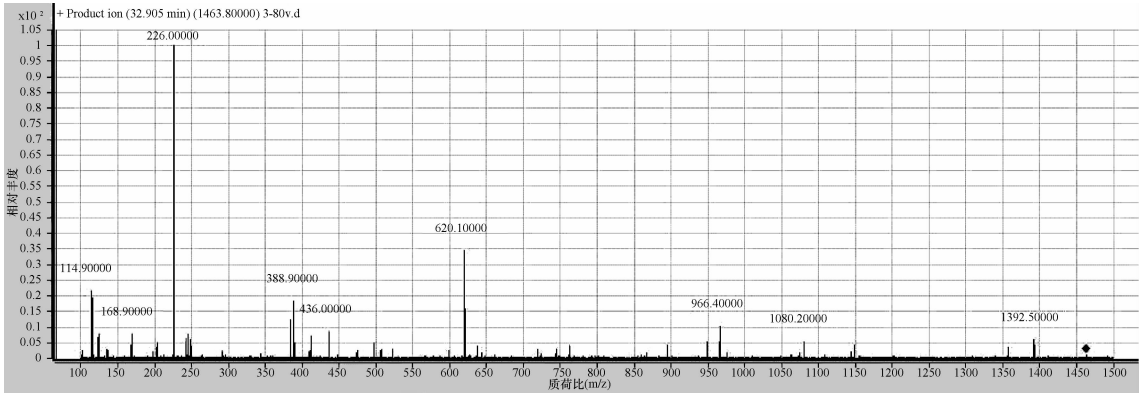


图7 m/z 1463 离子峰的 MS/MS 图谱

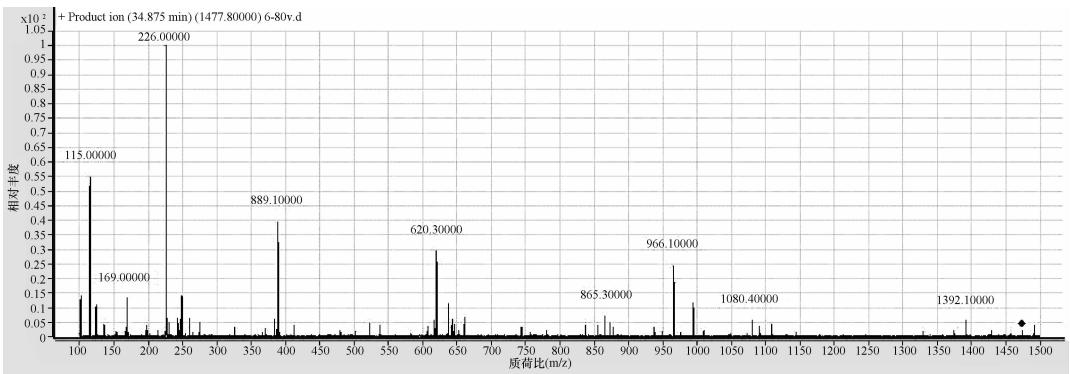


图8 m/z 1477 离子峰的 MS/MS 图谱

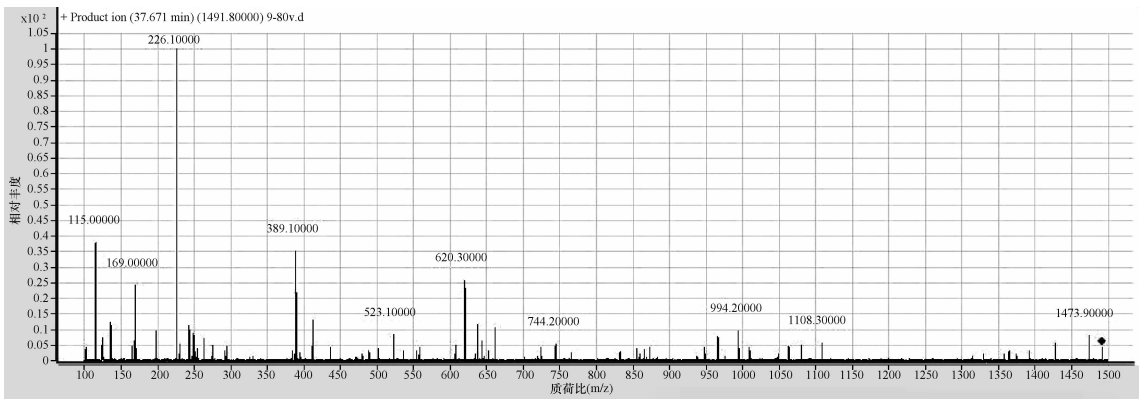


图9 m/z 1491 离子峰的 MS/MS 图谱

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Huang J L, Li H L, Yuan H X. Effect of organic amendments on verticillium wilt of cotton. *Crop Protection*, 2006, 25 ( 11 ): 1 167—1 173
- [ 2 ] Zhang S S, Raza W, Yang X M, et al. Control of fusarium wilt disease of cucumber plants with the application of a bio-organic fertilizer. *Biol Fert Soils*, 2008, 44: 1 073—1 080
- [ 3 ] Wu H S, Yang X M, Fan J Q, et al. Suppression of fusarium wilt of watermelon by a bio-organic fertilizer. *Biological Control*, 2009, 54(2): 287—300
- [ 4 ] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 等. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应. *土壤学报*, 2008, 45(6): 1 095—1 101
- [ 5 ] Luo J, Ran W, Hu J, et al. Application of bio-organic fertilizer significantly affected fungal diversity of soils. *Soil Science Society of American Journal*, 2010, 74(6): 2 039—2 048
- [ 6 ] Ioanna M, Sotirios E T, Iakovos S P, et al. Thermal inactivation of compost suppressiveness implicates possible biological factors in disease management. *Biological Control*, 2008, 44: 180—187
- [ 7 ] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2005, 283(2): 358—365
- [ 8 ] 孙力军, 陆兆新, 别小妹, 等. 培养基对解淀粉芽孢杆菌 ES-2 菌株产抗菌脂肽的影响. *中国农业科学*, 2008, 41(10): 3 389—3 398
- [ 9 ] Wang J, Liu J, Wang X, et al. Application of electrospray ionization mass spectrometry in rapid typing of fengycin homologues produced by *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39: 98—102
- [ 10 ] Cao Y, Ling N, Yang X M, et al. Biological control of Fusarium wilt of cucumber by application of a bio-organic fertilizer with *Bacillus subtilis* and *Trichoderma antagonists*. *Biol Fert Soils*, 2011, on line, DOI 10.1007/s00374-011-0556-2
- [ 11 ] Vespermann A, Kai M, Piechulla B. Rhizobacterial volatiles affect the growth of fungi and *Arabidopsis thaliana*. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(17): 5 639—5 641
- [ 12 ] 张成省, 孔凡玉, 刘朝科, 等. 枯草芽孢杆菌 Tpb55 挥发物对烟草的防病促生效应. *中国生物防治*, 2009, 25(3): 245—249
- [ 13 ] Zhang N, Wu K, He X, et al. A new bioorganic fertilizer can effectively control banana wilt by strong colonization of *Bacillus subtilis* N11. *Plant Soil*, 2011, 344: 87—97
- [ 14 ] Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 2007, 9: 1 084—1 090
- [ 15 ] Sun L J, Lu Z X, Bie X M, et al. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi. *World J Microbiol Biotechnol*, 2006, 22: 1 259—1 266
- [ 16 ] 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. *中国农业科学*, 2010, 43(17): 3 547—3 554