

## 研究报告

# *Lysobacter antibioticus* 13-1 菌株抗菌物质鉴定及对水稻白叶枯病的防治效果

魏兰芳<sup>1</sup> 周丽洪<sup>2</sup> 姬广海<sup>2\*</sup> 王永吉<sup>2</sup> 汪绍雪<sup>2</sup>

(1. 云南农业大学 农科基础实验教学中心 云南 昆明 650201)

(2. 云南农业大学 植物保护学院 云南 昆明 650201)

**摘要:** 【目的】为了明确对水稻白叶枯病具有优质防效的生防细菌——抗生素溶杆菌 13-1 菌株抗菌物质及对白叶枯病的防治效果。【方法】研究采用高效液相色谱、质谱、<sup>13</sup>C 核磁共振谱、氢核磁共振谱、电喷雾质谱等分析方法。【结果】13-1 产生 4 种抑菌活性组分: 6-甲氧基-10-氧基-1-吩嗪醇、吩嗪、吩嗪-1-羧酸及 1-羟基-6-甲氧基吩嗪。4 种吩嗪类物质对水稻白叶枯病原细菌均具有抑菌活性。田间小区试验表明, 菌株 13-1 发酵液对水稻白叶枯病的防效在 60% 以上。【结论】研究明确了菌株 13-1 产生的抗菌物质为吩嗪类物质, 这是国内关于吩嗪类物质控制水稻白叶枯病的首次报道。

**关键词:** 根际细菌 13-1, 抗菌物质, 水稻白叶枯病, 生物防治

## Control of rice bacterial leaf blight by antibacterial substances from *Lysobacter antibioticus* strain 13-1

WEI Lan-Fang<sup>1</sup> ZHOU Li-Hong<sup>2</sup> JI Guang-Hai<sup>2\*</sup> WANG Yong-Ji<sup>2</sup> WANG Shao-Xue<sup>2</sup>

(1. Agricultural-based Experimental Center, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

(2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201, China)

**Abstract:** [Objective] To clarify the antibacterial activity of *Lysobacter antibioticus* strain 13-1 against rice bacterial blight. [Methods] Four antibiotic compounds were isolated from the fermentation extracts of the strain 13-1 by sephadex LH-20 column chromatography, reverse C-18 Silica gel and high performance liquid chromatography (HPLC). [Results] These purified compounds were identified as 6-Methoxy-1-phenazinol-10-oxide, Phenazine, 1-Phenazinecarboxylic acid and 1-Hydroxy-6-methoxyphenazine by nuclear magnetic resonance (NMR), ESI-Mass spectrum analysis. Four phenazine analogs strongly inhibited multiple Xoo strains growth. The protective efficacy of strain 13-1 was above 60% in field plot compared to controls. [Conclusion] The antimicrobial substances of strain 13-1 was phenazine substances that have the inhibition potential against rice bacterial blight.

**Keywords:** Rhizosphere strain 13-1, Antibacterial compounds, Rice bacterial blight, Biocontrol

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31360002); 农业部农业行业科研专项项目(No. 201003029, 201303015)

\*通讯作者: Tel: 86-871-65226116; ✉: jghai001@aliyun.com

收稿日期: 2013-03-15; 接受日期: 2013-04-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-11

水稻白叶枯病是世界水稻生产中最严重的水稻细菌病害,该病在水稻分蘖后期侵染水稻,造成 20%–40% 的产量损失。该病主要流行于我国东南沿海和长江流域地区,其中云南省水稻白叶枯病危害范围逐年增大,特别是近年来高原粳稻上危害更严重。目前,由于病原菌的抗药性的增长,化学防治白叶枯病的常用杀菌剂(叶枯唑、农用链霉素)防治效果逐年下降。

近年来,生物防治以其生态环境友好、成本低、无污染的特点成为植物病害防治的热门研究领域。其中溶杆菌是一类已研究报道的田间有效的生防因子,产酶溶杆菌 C3、3.1T8 及 SB-K88 等已经在黄瓜猝倒病、甜菜、菠菜猝倒病、羊茅草叶斑点、小麦赤霉病、牧草斑点病和蚕豆锈病等土传真菌病害的防治工作上取得较好的防效<sup>[1-6]</sup>。研究表明溶杆菌属菌株是一类较好的生防因子,可以控制植物土传病害,现国内外已报道生防细菌(枯草芽孢杆菌、假单胞杆菌等)用于水稻白叶枯病的防治。但在国内应用抗生素溶杆菌防治植物细菌性病害上的生防实例极少<sup>[7-8]</sup>。

本课题组从玉米、魔芋等作物根际土壤中分离到多株对水稻白叶枯病有拮抗作用的生防细菌,筛选出拮抗菌株抗生素溶杆菌 13-1。利用 16S rRNA 序列分析及 Biolog 生理生化对其进行鉴定。利用高效液相色谱、质谱、<sup>13</sup>C 核磁共振谱、氢核磁共振谱、电喷雾质谱等技术进行抗菌物质分离、纯化及化学结构分析,得到对水稻白叶枯病菌和条斑病菌均有良好抑菌活性的 4 种吩嗪类化合物<sup>[9]</sup>。课题组同时检测了各代谢组分对水稻白叶枯病菌的抑菌能力及其发酵液的田间防病作用。这是国内外对抗生素溶杆菌代谢成分的首次报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试病原细菌菌株:本实验室提供的稻白叶枯病菌的强毒性小种代表菌株[YN24 (9 号小种)、FUJ (8 号小种)、YN11 (7 号小种)],白叶枯病菌株 53

号,水稻条斑病菌强毒性代表菌株(Xoc16、3-9、Xoc5)。

供试生防菌株:从云南省曲靖市富源县魔芋根际土和玉米根际土中分离得到的生防细菌 13-1。生防菌株 13-1 在 NA 培养基上菌落呈圆形,产生黑褐色色素,培养初期为暗黄色,后期转为棕褐色菌落,菌体杆状、单生、无鞭毛、不形成荚膜和芽孢。大小为(0.6–0.9)  $\mu\text{m}$ ×(1.5–2.0)  $\mu\text{m}$ ,革兰氏染色反应呈阴性<sup>[10]</sup>。

### 1.2 平板抑菌试验

将 7 株水稻病原细菌制成  $3\times 10^8$  CFU/mL 菌悬液后加入 NA 培养基混合制备含菌平板,培养基中病原细菌终浓度为  $1\times 10^8$  CFU/mL。无菌操作台冷却晾干后,在培养基上放置 4 个牛津杯,在牛津杯中加入 50  $\mu\text{L}$  浓度为  $1\times 10^8$  CFU/mL 的生防细菌 13-1 或无菌水对照。每皿设置一个处理,3 个重复,28  $^{\circ}\text{C}$  培养 2–3 d,测量抑菌圈直径。

### 1.3 代谢产物粗提物的制备

取保存于–70  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中的 13-1 菌株悬浮液 50  $\mu\text{L}$ ,用划线法接种到 NA 培养基平板上,置生化培养箱中 25  $^{\circ}\text{C}$  培养直至长出单菌落。

在装 400 mL 已灭菌的 R<sub>2</sub>A 液体培养基的 800 mL 锥形瓶中接种菌株 13-1,在 25  $^{\circ}\text{C}$  条件下培养 7 d 终止发酵。将发酵液离心 20 min (12 000 r/min) 收集上清液,于上清液中加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次。有机溶媒层用 5% NaHCO<sub>3</sub> 和水洗,再用无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 脱水,减压浓缩,获得代谢产物粗提物。

### 1.4 代谢产物组分的分离

硅胶薄层色谱分离分析:取高效荧光硅胶薄层析板,将拮抗提取物点样于距底部边缘 0.8 cm 处,展开剂为乙酸乙酯:石油醚=1:1。待展开剂至距另一端为 0.8 cm 时,停止层析,取出层析板吹干。在紫外灯下观察样品的分离情况,并将其割下,用乙酸乙酯萃取,检测各带的拮抗活性,指示菌为白叶枯病菌菌株 53。

液相色谱分析条件:色谱柱,Diamonsil C<sub>18</sub> 柱

(4.6 mm×200 mm, 5  $\mu$ m); 流动相, CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (4:6) 检测波长 235 nm 柱温 40 °C 流速 1 mL/min, 进样量 20  $\mu$ L。

### 1.5 单一化合物的分离、纯化及结构测定

分离过程: 萃取物(0.6 g)经反相(C<sub>18</sub>)硅胶柱层析, 甲醇-水梯度洗脱。取 50% MeOH 洗脱部分, 经硅胶柱层析(Petrol-EtOAc, 5:1)得到组分 pjh1。取 40% MeOH 洗脱部分, 再经 LH-20 凝胶柱层析(MeOH), 最后经制备性薄层层析(Petrol-EtOAc, 3:1)得到组分 pjh2。取 30% MeOH 洗脱部分, 再经 LH-20 凝胶柱层析(MeOH)得到两部分, 第一部分经制备性薄层层析(CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 20:1)得到组分 pjh3, 第二部分经制备性薄层层析(Petrol-EtOAc, 1:3)得到组分 pjh4。

对制备得到的纯物质进行纯度分析, 采用 HPLC、UV、MS、NMR 等技术手段分析其结构。

### 1.6 化合物对病原细菌的抑制活性

对所鉴定化合物进行抑菌活性研究, 采用含菌平板法: 在无菌培养皿(9 cm)中加入 200  $\mu$ L 浓度为  $3\times 10^8$  CFU/mL 的病原菌悬液后, 再加入培养基, 混匀, 无菌条件下吹干待用。在每块平板上放置 2 个牛津杯( $\Phi=0.6$  cm、 $H=1.0$  cm), 分别向每个牛津杯内加入 100  $\mu$ L 一定浓度化合物溶液, 对照加 5% DMSO 溶液, 重复 3 次。然后将平板放置在 25 °C 生化培养箱中培养。2 d 后观察, 并测量抑菌圈的大小。

### 1.7 生防菌株 13-1 对水稻白叶枯病的防治效果测定

**1.7.1 水稻白叶枯病菌及生防菌悬液的制备:** 将活化好的水稻白叶枯病原菌菌株 FUJ 分别转接到 NA 平板上培养 36–48 h (28 °C), 将病原菌从固体培养基上用无菌水洗脱制成菌悬液, 菌悬液浓度相当于  $10^8$ – $10^9$  CFU/mL, 供接种用。

将活化好的生防菌株分别转接到 NA 平板上培养 36–48 h (28 °C), 将生防细菌从固体培养基上用无菌水洗下制成菌悬液, 菌悬液浓度相当于  $10^8$ – $10^9$  CFU/mL, 供接种用。

**1.7.2 田间试验:** 田间试验于 2009 年在云南省蒙自县郊的十里铺进行。试验田所种植的水稻品种为丰优香占。

试验一(保护作用): 先将制备好的生防菌悬液(浓度为  $3\times 10^8$  CFU/mL)和清水配好的农药 20% 力农叶枯唑(按使用倍数稀释)用喷雾接种到水稻叶片上(孕穗期), 24 h 后接种水稻白叶枯病菌(浓度为  $3\times 10^8$  CFU/mL)。试验设置 3 个处理: A. 生防菌 13-1, 浓度为  $3\times 10^8$  CFU/mL; B. 20% 力农叶枯唑 WP 600 倍液; C. 清水空白对照。每个处理 3 次重复, 每小区 20 m<sup>2</sup>, 随机区组排列, 小区间作小埂, 防止田水串灌, 影响药效。喷雾接种生防菌及农药采用 1.5 L 的喷壶均匀喷雾。

试验二(治疗作用): 先接种水稻白叶枯病菌(浓度为  $3\times 10^8$  CFU/mL), 24 h 后接种生防菌悬液(浓度为  $3\times 10^8$  CFU/mL)和清水配好的农药(按使用倍数稀释)用喷雾接种到水稻叶片上(孕穗期), 试验设置 3 个处理: A. 生防菌 13-1, 浓度为  $3\times 10^8$  CFU/mL; B. 20% 力农叶枯唑 WP 600 倍液; C. 清水空白对照。每个处理 3 次重复, 每小区 20 m<sup>2</sup>, 随机区组排列, 小区间作小埂, 防止田水串灌, 影响药效。喷雾接种生防菌及农药采用 1.5 L 的喷壶均匀喷雾。

每小区随机调查 5 点, 每点 20 片叶, 共计 100 片叶, 并于空白对照完全发病时调查, 测量病斑长度, 计算病叶率、病情指数及相对防效, 观察施药后水稻长势情况, 并在水稻收获期对各小区进行常规测产。

病情分级标准参照方中达的《植病研究方法》, 具体为<sup>[11]</sup>:

|     |                               |
|-----|-------------------------------|
| 0 级 | 无病                            |
| 1 级 | 只有 1–2 个短条斑, 病斑面积占叶面积的 1/5 以下 |
| 3 级 | 病斑面积占叶面的 1/4 左右               |
| 5 级 | 病斑面积占叶面的 1/2 左右               |
| 7 级 | 病斑面积占叶面的 3/4 左右               |
| 9 级 | 全叶发病                          |

病情指数=  $\frac{\sum[\text{各级病株(叶)数} \times \text{该病级值}]}{\text{调查总株叶数} \times \text{最高病级数值}} \times 100$

病叶率=  $\frac{\text{调查发病叶数}}{\text{调查的总叶数}} \times 100\%$

相对防效=  $\frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100$

2 结果与分析

2.1 菌株 13-1 对水稻病原细菌的平板抑菌试验

平板抑菌试验结果显示：抗生素溶杆菌 *L. antibioticus* 13-1 对水稻白叶枯病菌及条斑病菌各菌株均具有强烈拮抗作用生防菌株 ,抑菌圈直径达 3.05–3.82 cm。

2.2 生防细菌 13-1 活性组分的分离和活性检测

2.2.1 代谢产物各组分的硅胶薄层色谱分离和活性检测：将代谢产物粗提物用乙酸乙酯充分溶解后毛细管点样于高效荧光硅胶薄层层析板。用展开剂(乙酸乙酯:石油醚=1:1)展开后，紫外灯下观察发现共有 4 条带。将各样品带刮下并用甲醇萃取，检测各带萃取液的拮抗活性 ,结果发现这 4 条带都对白叶枯病菌菌株 53 具有抑菌活性，其中 B1 迁移率  $R_f$  为 0.842，颜色为黄绿色，对白叶枯病菌菌株 53 的抑菌圈直径为 8.8 cm；B2 迁移率  $R_f$  为 0.526，颜色为橙色，对菌株 53 的抑菌圈直径为 3.1 cm；B3 迁移率  $R_f$  为 0.407，颜色为棕色，对菌株 53 的抑菌圈直径为 3.0 cm；B4 迁移率  $R_f$  为 0.276，颜色为紫色(紫外照射)，对菌株 53 的抑菌圈直径为 2.6 cm (图 1、2)。将代谢产物粗提物通过高压液相色谱分析后显示 4 个峰。

2.2.2 生防菌 13-1 代谢产物活性组分分析与结构鉴定：薄层层析及高效液相色谱分析结果显示有 4 种抑菌活性组分，再采用  $^{13}\text{C}$  NMR、 $^1\text{H}$  NMR、ESI-MS 等分析 4 种组分的结构。pjh1 组分鉴定为 6-甲氧基-10-氧基-1 吩嗪醇，该化合物的 NMR 数据未见报道，通过 2D NMR 谱(HSQC，HMBC， $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY)对  $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 数据进行了归属。Pjh2 组分的 NMR 数据与文献[12]报道的一致，结构鉴定为吩嗪；pjh3 的  $^1\text{H}$  NMR 数据与文

献[13]报道的一致，结构鉴定为吩嗪-1-羧酸；pjh4  $^{13}\text{C}$  NMR， $^1\text{H}$  NMR 数据未见报道，参照化合物 6-甲氧基-10-氧基-1 吩嗪醇和 1,6-二甲氧基-吩嗪，将化合物鉴定为 1-羟基-6-甲氧基吩嗪(表 1)。

2.3 化合物对病原菌的抑制活性

菌株 13-1 的 4 种代谢组分对水稻白叶枯病菌强毒性小种代表菌株(YN24、FUJ、YN11)均有抑菌作用(表 2)，以化合物吩嗪(Pjh2)抑菌作用最强，化合物稀释 200 倍抑菌圈直径仍达 3.0 cm，以 1-羟基-6-甲氧基吩嗪(Pjh4)抑菌作用最弱，平均在 1.0 cm 左右 ;各组分对水稻条斑病菌 3 个毒性代表菌株均有不同程度的抑菌作用。

2.4 不同生防菌剂对水稻白叶枯病的田间防效

2009 年在蒙自县进行了田间小区试验，分预防和治理两组试验，对生防菌和农药的控病效果进行测定。田间试验结果显示，较对照而言各处理发病有所减轻(表 3)。用药处理前接种，抗生素溶杆菌 13-1 田间防效为 63.20%，叶枯唑的防效为 61.00%；用药处理后接种，抗生素溶杆菌 13-1 田间防效为 63.23%，叶枯唑的防效为 61.00%，说明抗生素溶杆菌防治效果在田间的防效与常用杀菌剂叶枯唑相当。

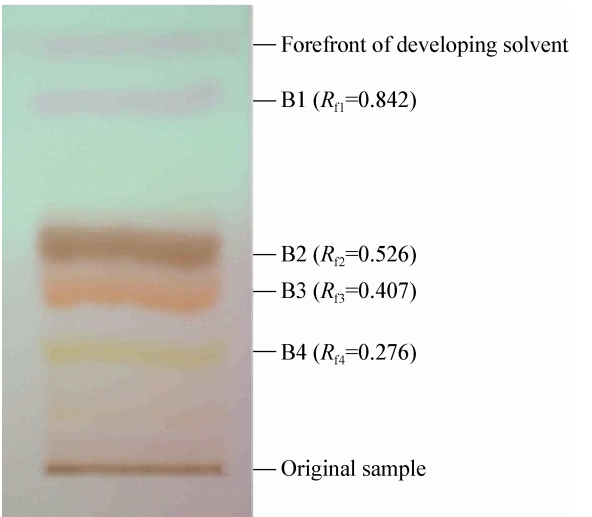


图 1 代谢产物粗提物的硅胶薄层色谱图  
Figure 1 The Chromatogram of crude antagonistic substance extracts on silica gel thin layer

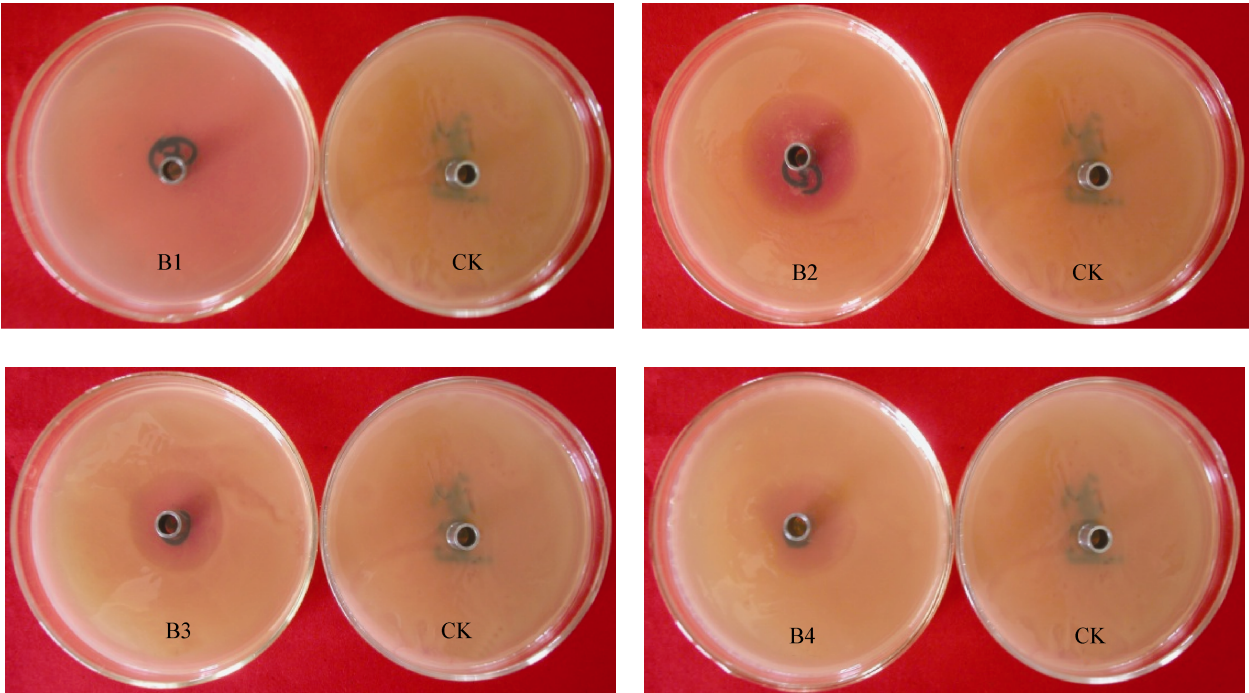


图 2 薄层层析制备的各组分对水稻白叶枯病菌菌株 53 的抑制效果  
Figure 2 The inhibition zone of the component prepared by TLC to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* strain 53

| 表 1 抗生素溶杆菌 13-113C 核磁共振谱、氢核磁共振谱及电喷雾质谱分析结果<br>Table 1 The results of <i>L. antibioticus</i> 13-1 detected by <sup>13</sup> C NMR , NMR , ESI-MS analysis |   |                                 |                    |
|---|---|---------------------------------|--------------------|
| Compound No.  | Compound  | Assignment                      | Chemical structure |
| Pjh1  | C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 6-Methoxy-1-phenazinol 10-oxide |                    |
| Pjh2  | C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub>                 | Phenazine                       |                    |
| Pjh3  | C <sub>13</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | 1-Phenazinecarboxylic acid      |                    |
| Pjh4  | C <sub>13</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 1-Hydroxy-6-methoxyphenazine    |                    |

| 表 2 不同代谢成分对不同病原细菌的抑菌圈直径  |          |      |      |     |       |     |      |
|--|----------|------|------|-----|-------|-----|------|
| Table 2 The average diameter of inhibition zone of different compounds to various pathogenic bacteria (cm) |          |      |      |     |       |     |      |
| Compound   | Dilution | YN24 | YN11 | FUJ | Xoc16 | 3-9 | Xoc5 |
| Pjh1   | 10       | 4.2  | 4.4  | 4.3 | 3.0   | 2.8 | 2.7  |
|  | 50       | 3.4  | 3.3  | 3.6 | 2.1   | 2.6 | 2.4  |
|  | 100      | 2.8  | 2.4  | 2.7 | 1.8   | 2.3 | 1.8  |
|  | 200      | 2.6  | 2.3  | 2.6 | 1.6   | 1.5 | 1.7  |
| Pjh2   | 10       | 5.2  | 5.4  | 5.1 | 2.8   | 3.0 | 2.8  |
|  | 50       | 4.2  | 4.1  | 4.0 | 2.4   | 2.5 | 2.3  |
|  | 100      | 3.6  | 3.8  | 3.1 | 2.3   | 2.2 | 2.2  |
|  | 200      | 3.1  | 3.2  | 3.0 | 1.8   | 2.0 | 1.9  |
| Pjh3   | 10       | 4.1  | 4.2  | 4.0 | 2.6   | 2.9 | 2.8  |
|  | 50       | 3.1  | 3.2  | 3.4 | 2.4   | 2.6 | 2.2  |
|  | 100      | 2.4  | 2.6  | 2.6 | 2.0   | 1.9 | 2.1  |
|  | 200      | 2.6  | 2.4  | 2.5 | 1.6   | 1.8 | 1.9  |
| Pjh4   | 10       | 2.7  | 2.6  | 2.5 | 1.3   | 1.4 | 1.3  |
|  | 50       | 2.3  | 2.3  | 2.2 | 1.1   | 1.2 | 1.0  |
|  | 100      | 1.8  | 1.7  | 1.3 | 0.9   | 0.8 | 0.8  |
|  | 200      | 1.2  | 1.1  | 1.2 | 0.8   | 0.7 | 0.6  |
| CK   |          | 0    | 0    | 0   | 0     | 0   | 0    |

| 表 3 生防菌株 13-1 对水稻白叶枯病的田间防效  |                               |                      |                               |                      |
|---|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|----------------------|
| Table 3 Control efficacy of strain 13-1 against rice bacterial blight in field plot |                               |                      |                               |                      |
| Treatment   | Inoculation before treatment* |                      | Inoculation after treatment** |                      |
|   | Disease index (%)             | Control efficacy (%) | Disease index (%)             | Control efficacy (%) |
| 13-1 strain broth   | 11.7b                         | 63.20                | 12.06b                        | 63.23                |
| 13-6 strain broth   | 13.3b                         | 57.86                | 13.42b                        | 59.08                |
| Bismertiazol  | 12.4b                         | 61.00                | 12.45b                        | 62.04                |
| Sterile distilled water   | 31.8a                         | —                    | 32.8a                         | —                    |

Note: \*: Rice leaves were inoculated with *Xoo* pathogen strain FUJ 1day before treated with 13-1 strain broth, bismertiazol (600 kg/L) or sterile distilled water; \*\*: Rice leaves were inoculated with *Xoo* pathogen strain FUJ 1 day after treatment with 13-1 strain broth, bismertiazol (600 kg/L) or sterile distilled water. Values are the means of three replicates. Means followed by different letters are significantly different ( $P=0.05$ ).

### 3 讨论

据目前报道许多溶杆菌属细菌能够产生抗生素,例如抗生素溶杆菌菌株产生 4-羟基苯乙酸,该化合物对辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)菌丝生长有破坏作用<sup>[14]</sup>。Russell 和 Furr 等研究表明化合物结构中含有苯环结构主要是破坏细胞膜,导致细胞内含物渗漏<sup>[15]</sup>。Li 等研究产酶溶杆菌 C3 时发现一种热稳定性的抗真菌物质(HSAF),一种

抗生素复合体主要有 Dihydromaltophilin 和结构类似于大型环状的内酰胺,抑制多种真菌或卵菌的孢子萌发和菌丝极性生长,在防治高羊毛草叶斑病和小麦赤霉病中起主要作用<sup>[16]</sup>,但上述研究主要针对植物真菌性病害,抗生素溶杆菌产生的抗生物物质对病原细菌有活性,目前仅见于本实验室的报道。

本研究中明确了抗生素溶杆菌 13-1 可产生 4 种吩嗪类化合物,通过结构鉴定,有 6-甲氧基-10-



氧基-1-吩嗪醇、吩嗪、吩嗪-1-羧酸、1-羟基-6-甲氧基吩嗪。已有研究表明吩嗪-1-羧酸(PCA)具有广谱抑菌作用,如可抑制小麦全蚀病、西瓜炭疽病和辣椒疫病等病菌。许多生防细菌菌株如致金色假单胞菌 30-84、铜绿假单胞菌、荧光假单胞菌 2-79、芽孢杆菌 B-6、假单胞菌 M18 菌株都能够分泌 PCA 其中对假单胞菌 M18 菌株合成 PCA 的机理、发酵条件的优化及调控方式研究更深入,PCA 等吩嗪类物质在细胞内可作为电子载体,传递电子到目标细胞,从而增加细胞内的超氧化物自由基,使目标细胞中毒死亡<sup>[17-20]</sup>。在国内仅有利用荧光假单胞菌株 M18 产生的吩嗪-1-羧酸研制的具有广谱、高效、安全且能有效防治瓜果蔬菜真菌性根腐和茎腐等病害的生物农药,定名为“申嗪霉素”<sup>[21]</sup>。

本实验室在后续研究中以大豆粉、蛋白胨等低成本发酵培养基对抗生素溶杆菌 13-1 进行发酵,证实发酵液中含有较高抑菌活性的吩嗪类物质,这为今后对菌株 13-1 开发和应用推广提供理论依据并奠定了坚实的基础。

## 参 考 文 献

- [1] Folman LB, De Klein MJEM, Postma J, et al. Characterization of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook, 1978) strain 3.1T8, a powerful antagonist of fungal disease of cucumber[J]. Microbiology Research, 2003, 158(2): 107-115.
- [2] Folman LB, De Klein MJEM, Postma J, et al. Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3.1 T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatem* in cucumber[J]. Biological Control, 2004, 31(2): 145-154.
- [3] Jochum CC, Osborne LE, Yuen GY. *Fusarium* head blight biological control with *Lysobacter enzymogenes* C3[J]. Biological Control, 2006, 39(3): 336-344.
- [4] Giesler LJ, Yuen FY. Evaluation of *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 for biocontrol of brown patch disease[J]. Crop Protection, 1998, 17(6): 509-513.
- [5] Yuen GY, Steadman JR, Lindgren DT, et al. Bean rust biological control using bacterial agents[J]. Crop Protection, 2001, 20(5): 395-402.
- [6] Islam MT, Hashidoko Y, Deora A, et al. Suppression of damping-off disease in host plants by rhizoplane bacterium *Lysobacter* sp. strain SB-K88 is linked to plant colonization and antibiosis against soilborne peronosporomycetes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 3786-3796.
- [7] Hayward AC, Fegan N, Fegan M, et al. *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 756-770.
- [8] Qian GL, Hu BS, Jiang YH, et al. Identification and characterization of *Lysobacter enzymogenes* as a biological control agent against some fungal pathogens[J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(1): 68-75.
- [9] Breitmaier E, Hollstein U. C-13 Nuclear magnetic-resonance chemical-shifts of substituted phenazines[J]. Organic Chemistry, 1976, 41(12): 2104-2108.
- [10] 姬广海, 魏兰芳, 吴亚鹏. 一种新型生防细菌菌株 13-1 鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 974-980.
- [11] Jayatilake GS, Thornton MP, Leonard AC, et al. Metabolites from an Antarctic sponge-associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Natural Products, 1996, 59(3): 293-296.
- [12] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual[M]. 2nd Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [13] Fang ZD. Methods in Plant Pathology[M]. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese), 1998.
- [14] Ko HS, Jin RD, Krishnan HB, et al. Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against phytophthora blight is mediated by the production of 4-Hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes[J]. Current Microbiology, 2009, 59(6): 608-615.
- [15] Russel AD, Furr JR. Biocides, mechanisms of antifungal action and fungal resistance[J]. Science Progress, 1996, 79(1): 27-48.
- [16] Li S, Jochum CC, Yu F, et al. An antibiotic complex from *Lysobacter enzymogenes* strain C3: antimicrobial activity and role in plant disease control[J]. Phytopathology, 2008, 98(6): 695-701.
- [17] Pierson LS, Pierson EA. Phenazine antibiotic production in *Pseudomonas aureofaciens*: role in rhizosphere ecology and pathogen suppression[J]. FEMS Microbiological Letters, 1996, 136(2): 101-108.
- [18] Thomashow LS, Weller DM. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* val. *tritici*[J]. Bacteriology, 1988, 170(8): 3499-3508.
- [19] Kim KI, Kim IS. Phenazine 1-carboxylic acid resistance in phenazine 1-carboxylic acid producing *Bacillus* sp.[J]. Biochemistry and Molecular Biology, 2000, 33: 332-336.
- [20] Kim KI. Regulation of 3-Deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase of *Bacillus*. B-6 Producing Phenazine-1-carboxylic acid[J]. Biochemistry and Molecular Biology, 2001, 34(4): 299-304.
- [21] Wang XX, Lin XW. High produce technology or reaching in phenazine-1-carboxylic acid[J]. Pesticide Science and Administration, 2007, 28(4): 37-40.