



研究报告

杜仲黑斑病菌(*Pestalotiopsis trachicarpicola*)拮抗细菌的分离和鉴定

李书颖 朱天辉*

四川农业大学林学院 四川 成都 611130

摘要:【背景】杜仲黑斑病菌(*Pestalotiopsis trachicarpicola*)是引起杜仲黑斑病的新病原,当前尚未见生防菌对其产生拮抗作用的报道。【目的】从杜仲健康叶片上分离筛选出对 *P. trachicarpicola* DZHBB-1 拮抗效果最好的生防芽孢杆菌(*Bacillus* sp.), 利用 16S rRNA 基因结合蛋白质编码基因, 实现对该菌株的快速准确鉴定。【方法】采用稀释分离法从健康杜仲叶片上分离菌株, 通过平板对峙实验和生长速率法进行筛选, 联合 16S rRNA、*gyrA*、*gyrB* 基因序列构建系统发育树分析, 结合形态学特征及生理生化特性鉴定目标菌株, 盆栽试验验证其对杜仲黑斑病的防治效果。【结果】总共分离得到 62 株芽孢杆菌, 初筛出 14 株对病原菌有较好生防效果的菌株, 复筛结果证明菌株 J1 拮抗效果最好且稳定, 抑制率达到 66.67%, 16S rRNA、*gyrA*、*gyrB* 基因序列系统发育树分析结果综合显示, 菌株 J1 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。盆栽试验结果显示, 该菌能有效防治杜仲黑斑病的发生, 防治效果均超过 57%。【结论】该菌株具有防治 *P. trachicarpicola* 引起相关植物病害的生防潜力, 16S rRNA、*gyrA*、*gyrB* 基因联合鉴定芽孢杆菌, 可为快速准确地鉴定芽孢杆菌及其近缘种提供借鉴方法。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌, 杜仲黑斑病菌, 16S rRNA, *gyrA*, *gyrB*, 鉴定

Isolation and identification of antagonistic bacterial strain against *Pestalotiopsis trachicarpicola*

LI Shu-Ying ZHU Tian-Hui*

College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China

Abstract: [Background] *Pestalotiopsis trachicarpicola* is a new pathogen causing black spot disease of *Eucommia ulmoides*. There is no report that biocontrol bacteria had antagonistic activity on it. [Objective] The best *Bacillus* sp. antagonistic activity against *P. trachicarpicola* DZHBB-1 was isolated and selected from healthy leaves of *E. ulmoides*, the rapid and accurate identification of this strain was achieved by using the 16S rRNA gene binding protein-encoding gene. [Methods] The strains were isolated from healthy *E. ulmoides* leaves by dilution separation method, screened by sputum experiments and growth rate methods, combined with 16S rRNA, *gyrA* and *gyrB* gene sequences to construct

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31700568)

*Corresponding author: Tel: 86-28-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

Received: 19-04-2019; Accepted: 13-08-2019; Published online: 16-09-2019

基金项目: 国家自然科学基金(31700568)

*通信作者: Tel: 028-86291456; E-mail: zhuth1227@126.com

收稿日期: 2019-04-19; 接受日期: 2019-08-13; 网络首发日期: 2019-09-16

phylogenetic tree analysis. The target strains were identified by its morphological characteristics, physiological and biochemical properties. The pot experiment was carried out to verify its control effect on black spot of *E. ulmoides*. **[Results]** A total of 62 strains of *Bacillus* were isolated and 14 strains with good biocontrol effect on pathogens were screened out. The results of rescreening showed that the strain J1 had the best antagonistic activity and was stable, the inhibition rate reached 66.67%. Phylogenetic tree analysis of 16S rRNA, *gyrA* and *gyrB* gene sequences showed that strain J1 was *B. amyloliquefaciens*. In the pot experiment, the strain could effectively prevent the occurrence of black spot disease of *E. ulmoides* and the control effect exceeded 57%. **[Conclusion]** This strain has the potential to prevent and cure the related plant diseases caused by *P. trachicarpicola*. 16S rRNA, *gyrA* and *gyrB* genes are combined to identify *Bacillus* sp., which can provide a reference method for the rapid and accurate identification of *Bacillus* sp. and its related species.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, *Pestalotiopsis trachicarpicola*, 16S rRNA, *gyrA*, *gyrB*, Identification

拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis*)是常见的植物病原菌,可引起多种病害,如溃疡病、枯梢病、叶斑病、针枯病、顶枯病、灰枯病、黄萎病、果实腐烂等^[1-7]。研究表明,*P. trachicarpicola*可引起棕榈叶斑病^[1]、杜仲黑斑病^[8]、蓝莓叶斑病^[9]、葡萄枝干病害和果实软腐病^[10]。生物防治利用其独特的优势,使有关植物病害生防细菌资源的研究和应用成为植物病害生物防治领域的热点^[11]。已报道的生防菌种类繁多,其中芽孢杆菌由于具有广谱抗菌活性和极强的抗逆能力,并且能够有效抑制病原菌生长的优点,日益成为生防菌的优势菌源^[12-13]。目前,解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)已广泛应用于植物病害生物防治,如冯中红等^[14]通过试验表明该菌株对番茄细菌性叶斑病具有防效作用,并证明其对8种病原真菌均具有抑菌能力;范晓静等^[15]从银杏内生细菌分离得到解淀粉芽孢杆菌W5,实验证明该菌株对辣椒采后果疫病及其他病原真菌的防治具有潜在应用价值。然而迄今为止还未见对*P. trachicarpicola*产生拮抗作用生防菌的报道。

系统发育学是一门通过比较DNA或蛋白质序列来估计某一个类群进化关系的科学^[16]。根据形态学和生理生化特征来鉴定菌落是最简单也最早鉴定微生物种群的方法,与传统检测方法相比,现代生物学技术的应用可以大大提高检测的准确性和灵敏度。16S rRNA基因测序通常用作检测复杂微生物群落的特定种群,但不能区分亲缘关系较近的菌株^[17-18],并且生理生化鉴定的结果会因测定

菌株的不同而与模式菌株的结果存在差异^[19]。研究证明,蛋白质编码基因表现出更高的遗传变异,可用于密切相关种群的分类和鉴定^[20-22],如卢佳琦等^[23]采用16S rRNA基因与*gyrB*基因即促旋酶(*gyrase*)的B亚单位基因序列联合法精确鉴定菌株YSSNJ-005是蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*);喻国辉等^[19]利用16S rRNA基因结合编码DNA促旋酶A蛋白的基因*gyrA*和*gyrB*将分离自石斛兰(*Dendrobium* sp.)叶片的生防芽孢杆菌R31快速鉴定为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。因此,将16S rRNA基因与蛋白质编码基因结合起来进行测序能够更加快速、准确地鉴定细菌的种类,明确其分类地位。

本研究从健康杜仲叶片上分离出对*P. trachicarpicola*拮抗作用最好的芽孢杆菌J1,根据其菌落形态特征及生理生化特性初步判定,并将16S rRNA、*gyrA*和*gyrB*基因结合起来进行序列比对,构建系统发育树,确定该菌株的种类,以期丰富*P. trachicarpicola*的生防菌种类,并为进一步开发研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

植物样品:杜仲(*Eucommia ulmoides* Oliver)样本采集于四川省成都市大邑县杜仲黑斑病发病地区。

供试菌株:杜仲黑斑病病原菌*Pestalotiopsis trachicarpicola* DZHBB-1,由四川农业大学森林保

护林木病理实验室分离鉴定保存。

供试培养基:生防细菌的分离培养采用牛肉膏蛋白胨(NA)固体培养基(g/L):牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, 琼脂 20.0, pH 自然; NA 液体培养基(g/L):牛肉膏 3.0, 蛋白胨 10.0, NaCl 5.0, pH 自然; 病原菌的培养及平板对峙实验均采用马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基(g/L):马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0, pH 自然。培养基配方均参照文献[24]并做适当改良。

主要试剂和仪器:细菌基因组 DNA 试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; PCR 扩增引物、2×TSINGKE Master Mix, 成都擎科梓熙生物技术有限公司。智能人工气候箱, 韶关市广智科技设备有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司。

1.2 生防菌的分离和纯化

采用稀释分离法从健康杜仲叶片上分离菌株。取健康杜仲叶片, 放入灭菌研钵中研碎, 加入适量无菌水充分研磨均匀。将研磨液用移液枪转入灭菌离心管中, 12 000 r/min 离心 2 min。取 1 mL 上清液 85 °C 恒温水浴 15 min 后, 加入盛有 9 mL 无菌水的试管中振荡混匀, 制成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 稀释液。然后吸取 100 μ L 菌液, 均匀涂布于 NA 固体培养基, 每处理 3 次重复, 倒置于 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h, 挑取菌落形态差异明显的单菌落纯化保存。

1.3 *Pestalotiopsis trachicarpicola* 生防菌的筛选

初筛采用 PDA 平板对峙生长法。用直径 5 mm 的灭菌打孔器打取已经培养 5 d 的病原菌 DZHBB-1 放置在 PDA 平板一侧, 在距离病原菌 3 cm 处的另一侧用灭菌接种环挑取生防菌划线, 每处理 3 次重复; 另以不接种生防菌而只接种病原菌为空白对照, 置于 25 °C 恒温培养箱中培养 7 d, 观测记录有无抑菌带产生, 并测定抑菌带(细菌菌落中心至病原菌菌丝边缘)宽度, 选出抑菌效果最明显的菌株进行纯化后准备进行复筛。

复筛采用生长速率法。取一环初筛出来的生防菌株接种于 100 mL NA 液体培养基, 放置在

30 °C、170 r/min 摇床中恒温培养 12 h 制备成种子液。再将种子液以 2% 的量接种新的 100 mL NA 液体培养基中, 30 °C、170 r/min 摇床恒温培养 24 h 后取出, 8 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤制成无菌发酵滤液, 取 10 mL 加入 90 mL PDA 培养基混匀后倒入培养皿中, 以加无菌水为空白对照, 每处理 3 次重复。待培养基冷却凝固后, 用直径 5 mm 的灭菌打孔器打取培养 5 d 的病原菌 DZHBB-1 菌饼, 接种在平板中央, 25 °C 恒温培养 7 d 后, 用十字交叉法测量菌落直径, 计算抑制率: 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 \times 100, 其中菌落直径(mm)为相垂直的两直径平均值。

1.4 生防菌菌株的鉴定

1.4.1 菌株形态观察及生理生化特性测定

将复筛获得的生防效果最好的菌株接种在 NA 固体培养基上, 置于 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h, 观察菌落的形态特征, 包括色泽、平滑或有褶皱、致密或疏松、质地、边缘沟纹等形态。生理生化特性测定参照《常见细菌系统鉴定手册》^[25]进行, 包括革兰氏染色、芽孢染色、接触酶反应、乙酰甲基甲醇试验、明胶液化实验、硝酸盐还原反应、硫化氢(H₂S)试验、柠檬酸盐试验、淀粉水解试验、糖氧化发酵测定等。

1.4.2 菌株分子生物学鉴定

依照细菌基因组 DNA 试剂盒提取生防菌 DNA。采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGAT CCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTT ACGACTT-3')扩增 16S rRNA 基因序列^[26], PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 34 个循环; 72 °C 10 min。采用特异性引物 *gyrA*-F (5'-CAGTCAGGAAATGCGTACG TCCTT-3')和 *gyrA*-R (5'-CAAGGTAATGCTCCAG GCATTGCT-3')扩增 *gyrA* 基因序列^[27], PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 40 s, 50 °C 40 s, 68 °C 1 min, 共 30 个循环; 68 °C 10 min。*gyrB* 基因扩增引物为 UP1f (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCT

GCAYGCNNGGNGNAARTTYGA-3')和 UP2r (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTCN GCRTCNGTCAT-3')^[28], PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 98 °C 10 s, 62 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 8 min。以上 PCR 反应体系(50 μ L)均为: 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μ L, 引物(10 μ mol/L)各 2 μ L, DNA 模板(100 mg/L) 1 μ L, ddH₂O 20 μ L。

待 PCR 反应结束后, 取 6 μ L 反应产物, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果, 并将 PCR 产物送样测序。将所得的各个基因序列测序结果在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库中进行 BLAST 比对分析后, 提交到 GenBank。下载相关基因相似性高的菌株序列, 用 MEGA 6.0 软件采用邻接(neighbour-joining)法分别构建 16S rRNA、*gyrA*、*gyrB* 基因序列的系统发育树, 其中 Bootstrap 检验的重复次数设置为 1 000 次, 确定该生防菌株的系统发育学地位。

1.5 盆栽试验

盆栽试验在四川农业大学成都校区第五教学楼大棚内进行。将解淀粉芽孢杆菌 J1 接种于 NA 液体培养基, 置于 30 °C 摇床中 180 r/min 振荡培养 48 h, 制成菌悬液备用; 用无菌水冲洗 PDA 平板中培养 15 d 的杜仲黑斑病病原菌 *P. trachicarpicola* DZHBB-1, 稀释配制成 1×10^6 CFU/mL 的分生孢子悬浮液。选取株高 60–70 cm 左右健康的杜仲一年生幼苗, 做如下处理: 在杜仲叶片上用针刺造成伤口后均匀喷施 *P. trachicarpicola* 分生孢子悬浮液, 每株 5 mL, 7 d 后在原处喷施解淀粉芽孢杆菌 J1 菌悬液, 设原液、50 倍液、100 倍液、200 倍液、500 倍液、1 000 倍液 6 个处理, 每株 5 mL, 以无菌水作为空白对照, 每处理 10 株, 3 个重复。15 d 后观察发病情况, 计算发病率、病情指数及生防菌对杜仲黑斑病相对防治效果。参照朱天辉^[29]方法分级, 病害分级标准为: I 级, 代表数值 0, 无病或者几乎没有病; II 级, 代表数值 1, 25%以下的叶片感病; III 级, 代表数值 2, 25%–50%的叶片感病; IV 级, 代表数值 3, 51%–75%的叶片感病; V

级, 代表数值 4, 76%的叶片感病。

发病率(%)=(发病株数/总接种株数) \times 100;

病情指数=[\sum (病级株数 \times 代表数值)/(总株数 \times 发病最重级的代表数值)] \times 100;

防治效果(%)=[(对照病情指数–处理病情指数)/对照病情指数] \times 100。

2 结果与分析

2.1 生防菌株的分离

从健康的杜仲叶片组织中总共得到 62 株芽孢杆菌分离物, 编号 J1–J62。用灭菌接种环挑取单菌落在 NA 固体培养基上划线培养, 纯化后转接在 NA 固体斜面培养基中, 30 °C 培养 48 h 得到纯化菌株, 于 4 °C 冰箱保存。

2.2 对 *Pestalotiopsis trachicarpicola* 产生拮抗作用的生防菌株筛选

2.2.1 初筛

将分离得到的 62 株芽孢杆菌分别与病原菌 *P. trachicarpicola* DZHBB-1 进行平板对峙实验, 筛选出 14 株对病原菌有一定拮抗作用的芽孢杆菌, 抑菌带宽度介于 0.93–1.28 cm (表 1)。与对照相比, 病原菌菌丝生长受到明显抑制, 靠近芽孢杆菌的一侧菌丝生长稀疏, 出现明显的抑菌带, 菌丝由白色变为黄色, 表现为不生长, 其中菌株 J1、J13、J14、J33、J39、J41、J62 对病原菌具有强拮抗效果, 菌株 J1 抑菌带最宽达 1.28 cm (图 1)。

2.2.2 复筛

使用无菌发酵液对初筛获得的 14 株芽孢杆菌进行复筛, 结果表明, 菌株 J1 抑菌效果最好, 病原菌 *P. trachicarpicola* DZHBB-1 菌落直径最小, 为 2.37 cm, 抑制率最高, 达到 66.67% (表 2)。与对照相比, 病原菌菌落边缘菌丝不发达, 少且稀疏, 菌丝生长出现倒退, 受到抑制作用明显(图 2)。结合初筛实验结果, 菌株 J1 对病原菌产生了强拮抗效果, 表现稳定, 且明显高于其他 13 个菌株, 因此, 菌株 J1 将被选作目标芽孢杆菌进行后续实验。

表 1 初筛菌株对 *P. trachicarpicola* DZHBB-1 的拮抗作用

Table 1 Antagonistic effect of primary screening strains on *P. trachicarpicola* DZHBB-1

菌株编号	抑菌带宽
Strains No.	Inhibition zone (cm)
J1	1.28±0.11a
J3	1.06±0.08ab
J5	1.04±0.08ab
J13	1.24±0.06a
J14	1.23±0.32a
J25	1.11±0.01ab
J29	1.11±0.01ab
J30	0.93±0.04b
J33	1.23±0.04a
J39	1.25±0.08a
J41	1.26±0.21a
J42	1.19±0.01ab
J43	1.12±0.04ab
J62	1.27±0.16a

注: 各数据均为 3 次重复的“平均值±标准差”。同列数据后不同小字母表示经最小显著差异法 LSD (L)检验, 在 $P<0.05$ 水平差异显著。下同。

Note: Data are “mean±SD” of three replication. Different lowercase letters in the same column show the significantly different at $P<0.05$ level by LSD (L) test, respectively. The same below.

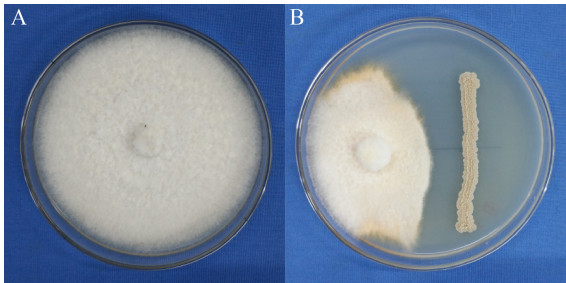


图 1 平板对峙生长实验结果

Figure 1 Plate confrontation growth test results

注: A: 空白对照; B: 菌株 J1 对 *P. trachicarpicola* 的拮抗作用。
Note: A: Control check; B: Strain J1 had antagonistic activity against *P. trachicarpicola*.

2.3 生防菌株的鉴定

2.3.1 形态特征

菌株 J1 划线接种在 NA 固体培养基上, 于 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h, 菌落近圆形, 呈乳白色, 有粘性, 质软, 不透明, 表面有褶皱, 凸起, 边缘不规则(图 3), 液体静置培养有乳白色菌膜产生, 革

兰氏阳性菌(G^+), 菌体杆状, 直或略弯, $(0.3-0.7)\times(1.6-3.5)\mu\text{m}$, 芽孢中生, 呈卵圆形(图 4)。

2.3.2 生理生化特性

菌株 J1 生理生化特性测试结果表明: 该菌株为好氧性芽孢杆菌, 能够水解淀粉和明胶, 接触酶反应与硝酸盐还原反应均为阳性, 能够利用柠檬酸盐和多种糖原, 乙酰甲基甲醇试验与硫化氢(H_2S)试验均为阴性(表 3)。

表 2 复筛菌株对 *P. trachicarpicola* DZHBB-1 的拮抗作用

Table 2 Antagonistic effect of rescreening strains on *P. trachicarpicola* DZHBB-1

菌株编号	菌落直径	抑制率
Strains No.	Diameter of colony (cm)	Inhibition rate (%)
J1	2.37±1.34f	66.67a
J3	4.68±0.87bc	34.18cde
J5	5.41±1.27b	23.91e
J13	3.25±0.73def	54.29ab
J14	3.46±0.27de	51.34abc
J25	4.67±1.05bc	34.32cde
J29	4.82±1.25bc	32.21de
J30	5.74±0.60b	19.27e
J33	3.49±1.09de	50.91abc
J39	3.25±0.83def	54.29ab
J41	2.53±0.54ef	64.42a
J42	3.58±0.41d	49.65abcd
J43	3.98±0.79cd	44.02bcd
J62	3.03±0.92def	57.38ab
CK	7.11±0.20a	—

Note: —: No data.

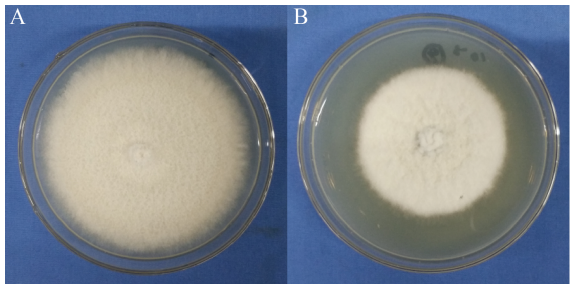


图 2 复筛实验结果

Figure 2 Rescreening experiment results

注: A: 空白对照; B: 菌株 J1 对 *P. trachicarpicola* 的拮抗作用。
Note: A: Control check; B: Strain J1 had antagonistic activity against *P. trachicarpicola*.



图3 菌株 J1 在 NA 培养基上的形态
Figure 3 Morphology of strain J1 on NA culture medium

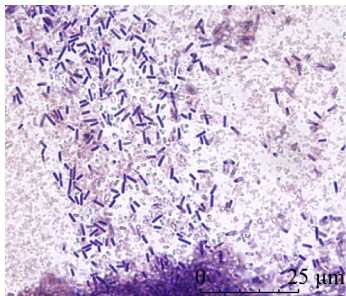


图4 菌株 J1 的显微形态(菌体和芽孢)
Figure 4 Micromorphology of strain J1 (mycelium and spores)

表3 菌株 J1 的生理生化特性
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain J1

特性 Characteristics	结果 Results
革兰氏染色 Gram staining	G ⁺
厌氧生长 Anaerobic growth	—
淀粉水解 Starch hydrolysis	+
明胶水解 Gelatin hydrolysis	+
接触酶 Catalase	+
硝酸盐还原亚硝酸盐 Nitrate reduced to nitrite	+
利用柠檬酸盐 Utilization of citrate	+
乙酰甲基甲醇试验 Voges-Proskauer	—
产生硫化氢(H ₂ S) Production of hydrogen sulfide	—
产酸 Acid production from	
葡萄糖 Glucose	+
木糖 Xylose	+
蔗糖 Sucrose	+
果糖 Fructose	+
甘露醇 Mannito	+

注：+：阳性反应；—：阴性反应。
Note: +: Positive reaction; —: Negative reaction.

2.3.3 16S rRNA 基因序列分析与系统发育树的构建

从菌株 J1 的基因组 DNA 中扩增 16S rRNA 基因序列，得到一个 1 401 bp 的 PCR 产物 (GenBank 登录号 MK737747)，测序后在 NCBI 数据库中进行相似性比对，序列相似性研究表明，该菌株显示出与解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、暹罗芽孢杆菌 (*B. siamensis*)、贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*)、死亡谷芽孢杆菌 (*B. vallismortis*)、莫海威芽孢杆菌 (*B. mojavensis*)、萎缩芽孢杆菌 (*B. atrophaeus*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*) 的高度相似性 (100%) (表 4)。系统发育树构建结果 (图 5) 表明，菌株 J1 与解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)、贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) 聚在一起，但还不能完全区分，初步将菌株 J1 归为芽孢杆菌属。

2.3.4 *gyrA* 基因序列分析与系统发育树的构建

根据测序结果，扩增的 *gyrA* 基因序列全长 966 bp，在 NCBI 数据库中进行相似性比对，序列相似性研究表明，菌株 J1 (登录号 MK789290) 与解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) (登录号 KF601552.1)、贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) (登录号 CP029473.2)、甲基营养型芽孢杆菌 (*B. methylotrophicus*) (登录号 LN999829.1)、枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) (登录号 CP009684.1) 的相似度均达到 99% 以上。将菌株 J1 与来自 GenBank 的 8 株芽孢杆菌一起构建基于 *gyrA* 基因序列的系统发育树 (图 6)，结果显示，菌株 J1 与解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 遗传距离更近，初步鉴定菌株 J1 为解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。

2.3.5 *gyrB* 基因序列分析与系统发育树的构建

菌株 J1 *gyrB* 基因测序后长度为 1 152 bp，在 NCBI 数据库中进行相似性比对，序列相似性研究表明，菌株 J1 扩增的 *gyrB* 基因 (登录号 MK789291) 与解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) (登录号

表 4 菌株 J1 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中部分细菌菌株相似性比较
Table 4 Identity comparisons of 16S rRNA gene sequence between strain J1 and some bacteria in GenBank

菌种 Species	菌株 Strains	登录号 Accession No.	总分 Total score	相似性 Identities (%)
解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	YC16	MK713569.1	2 588	100
枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	RQ6	MK696398.1	2 588	100
暹罗芽孢杆菌 <i>B. siamensis</i>	K14	MK696264.1	2 588	100
贝莱斯芽孢杆菌 <i>B. velezensis</i>	M-r12	MK660024.1	2 588	100
死谷芽孢杆菌 <i>B. vallismortis</i>	BV23	MG793227.1	2 588	100
莫海威芽孢杆菌 <i>B. mojavensis</i>	RHPR20	MH211387.1	2 588	100
萎缩芽孢杆菌 <i>B. atrophaeus</i>	WYZ	MG584985.1	2 588	100
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus warneri</i>	HBUM06952	MF662224.1	2 588	100

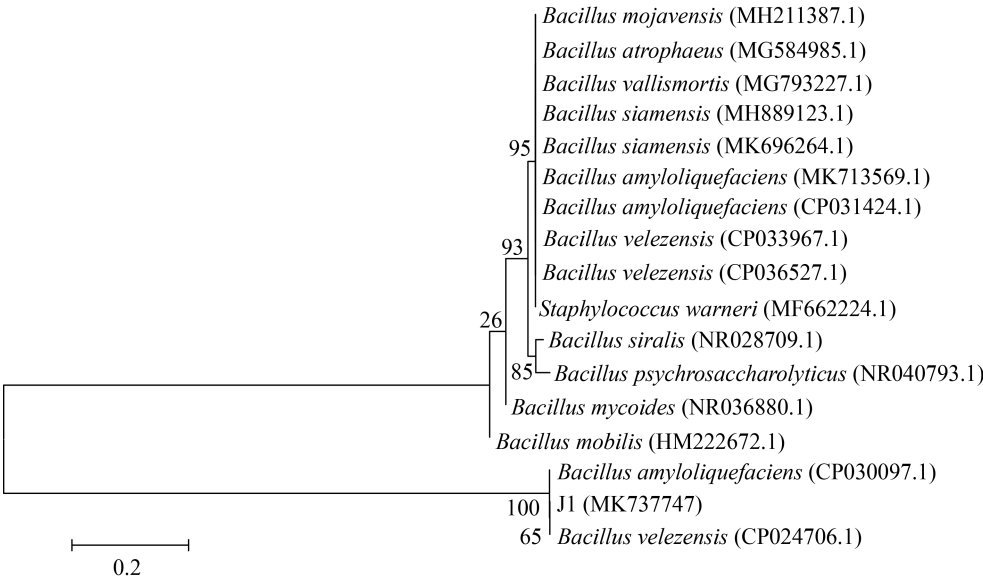


图 5 菌株 J1 基于 16S rRNA 基因序列建立的系统发育树

Figure 5 Phylogenetic tree of strain J1 based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号内数值为菌株在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字表示自展支持值; 标尺表示每个核苷酸位点上的替换值。下同。
Note: Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Values above the branches are parsimony bootstrap; The value on the scale represents each nucleotide sites replacement value. The same below.

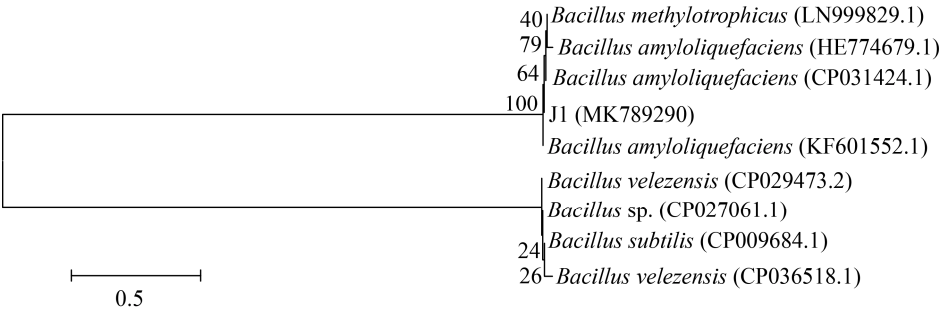


图 6 菌株 J1 基于 gyrA 基因序列建立的系统发育树

Figure 6 Phylogenetic tree of strain J1 based on gyrA gene sequence

CP013727.1)、贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) (登录号 CP037417.1)、甲基营养型芽孢杆菌 (*B. methylotrophicus*) (登录号 LN999829.1)、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) (登录号 CP009684.1)中的 *gyrB* 基因序列相似性为 99%以上。系统发育树(图 7)显示,菌株 J1 与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)亲缘关系最近。结合 16S rRNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因序列分析,发现菌株 J1 均与解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)相应基因的序列相似性达到 99%以上,且系统发育树均属于同一分支。因此,综合形态特征、生理生化特性及 16S rRNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因序列比对结果,最终将菌株 J1 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

2.4 盆栽试验结果

盆栽试验结果如表 5、图 8 所示。未使用任何解淀粉芽孢杆菌 J1 菌悬液处理的杜仲几乎全有黑斑病发生,发病率高达 96.67%,而经 J1 菌悬液处理后的杜仲发病情况得到有效控制,原液处理后的杜仲使发病率明显降低,与对照相比,减少了 80% 的病害发生,病情指数下降 74.17,防治效果达到最好,为 83.78%。稀释后的 J1 菌悬液也可降低杜仲黑斑病的发生,但随着稀释倍数的增加,发病率和病情指数逐渐升高,而防治效果随之降低,其中 50–500 倍液的防治效果较好,均达到 67%以上。综合考虑经济及防治效果等因素,选用 200–500 倍液用于防治杜仲黑斑病较为适宜。

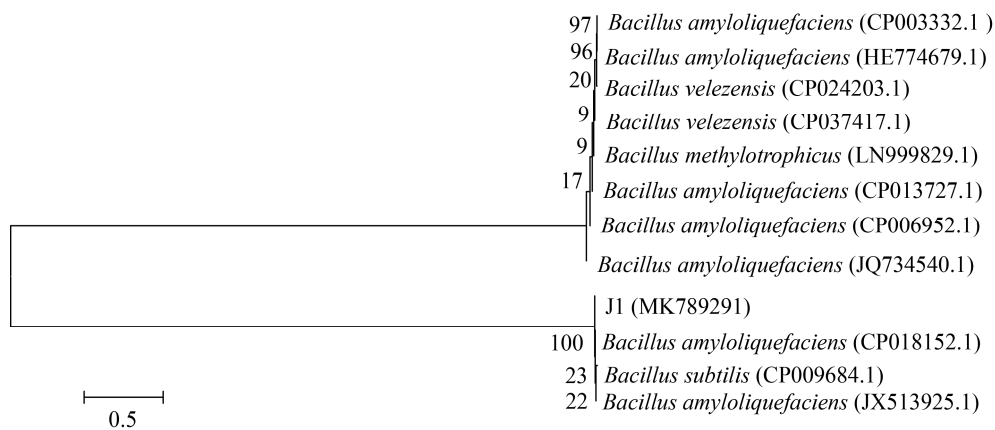


图 7 菌株 J1 基于 *gyrB* 基因序列建立的系统发育树
Figure 7 Phylogenetic tree of strain J1 based on *gyrB* gene sequence

表 5 解淀粉芽孢杆菌 J1 对杜仲黑斑病的盆栽防效
Table 5 Control efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* J1 against black spot of *Eucommia ulmoides* in pot

处理	发病率	病情指数	防治效果
Treatment	Incidence (%)	Disease index	Control effect (%)
Stock solution	16.67±15.28d	15.00±13.23c	83.78±14.30a
50-fold dilution	23.33±11.55cd	20.00±10.00c	77.94±10.16a
100-fold dilution	26.67±5.77cd	20.00±0.00c	77.51±1.51a
200-fold dilution	30.00±10.00cd	23.33±5.77bc	73.90±5.64ab
500-fold dilution	46.67±20.82bc	28.89±10.18bc	67.02±13.90ab
1 000-fold dilution	60.00±17.32b	38.33±8.78b	57.25±7.74b
CK	96.67±5.77a	89.17±5.77a	—

Note: —: No data.

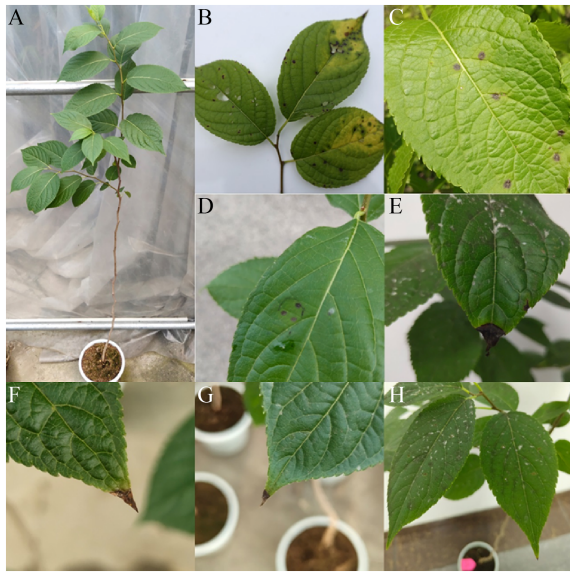


图8 解淀粉芽孢杆菌 J1 对杜仲黑斑病的盆栽防效
Figure 8 Control efficiency of *Bacillus amyloliquefaciens* J1 against black spot of *Eucommia ulmoides* in pot

注: A: 未喷施病原菌; B: CK; C: 1 000 倍液; D: 500 倍液; E: 200 倍液; F: 100 倍液; G: 50 倍液; H: 原液。

Note: A: No spraying of pathogens; B: CK; C: 1 000-fold dilution; D: 500-fold dilution; E: 200-fold dilution; F: 100-fold dilution; G: 50-fold dilution; H: Stock solution.

3 讨论与结论

目前,芽孢杆菌生物制剂拥有广阔的开发前景,在农业、林业、畜牧业、渔业等多个领域都有涉及^[30-33]。据报道,用于防治植物病害的芽孢杆菌种类繁多,但还未见芽孢杆菌用于生物防治 *P. trachicarpicola* 引起植物病害的研究^[1,8,10,34]。关于解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)生防机制的研究发现,其可以分泌多种抑菌物质,通常报道的生物控制相关化合物是肽衍类抑菌物质,由非核糖体合成酶合成,包括伊枯草菌素(iturin)和泛草素(fengycin),可直接抑制多种植物病原体的生长及孢子萌发,表面活性素(surfactin)可刺激植物生长,增加该生物防治剂对植物表面的粘附,抑制病原微生物的生物膜形成,以及激活多种植物的系统抗性^[35-36]。此外,解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)被认为是非致病性细菌物种^[36],其中菌株 FZB42

及 SQR9 得到了广泛研究。研究发现,植物根际定殖的解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) FZB42 能产生多种不同次级代谢物,在抑制植物病原菌生长的同时,具有刺激植物生长的显著能力,其作为生物肥料和生物防治剂在农业上应用广泛,表现出对铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)有很高的抑制作用,可抑制有害藻类物种的生长,以及对黄单胞菌属(*Xanthomona* spp.)的生物控制活性,验证了作为水稻细菌性病害的生物防治剂的潜力;除此之外,该菌还对番茄、黄瓜、棉花、烟草和莴苣的植物生长和病害防治具有有益效果^[37-39]。解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) SQR9 也是一种促进植物生长的根际细菌,具有突出的抗菌活性,其拮抗作用同样归因于具有抗微生物活性的次级代谢产物的产生,可抑制根际土壤中尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的生长,通过有效的根部定殖保护宿主免受病原体入侵,有效防治黄瓜枯萎病,并对土壤镰刀菌枯萎病具有生物防治活性,现已被用作抑制土壤植物病原生物的生物防治剂^[40-43]。但以上两种生防芽孢杆菌均分离自根际土壤,且主要抑制根际病原微生物。在本研究中,我们首次从杜仲叶片分离出解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) J1,实验发现其对 *P. trachicarpicola* DZHBB-1 具有良好的拮抗作用,盆栽试验证明该菌可有效降低杜仲黑斑病的发生,表现出对杜仲黑斑病的生防潜力。本文是解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)对 *P. trachicarpicola* 具有拮抗作用的首次报道,可为进一步研发防治杜仲黑斑病的生物制剂提供理论依据,为新型生物农药的研制提供菌源。

在现代细菌分类中,16S rRNA 基因序列分析通常是研究细菌系统发育关系的标准方法,它所包含的高度保守区域可以用于决定亲缘关系较远种群和区分属种之间可变区域的关系^[17]。但是,16S rRNA 基因序列在近缘物种中的变异有限,对于枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)及其相关分类群很难

区分到种,如解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)与枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)就具有很高的亲缘性,相比之下,一些具有更高突变率的蛋白质编码基因,如 *rpoB*、*rpoD*、*gyrA*、*gyrB* 等已成功用于区分单独使用 16S rRNA 基因序列无法鉴定的分类群^[44-46]。本研究通过 16S rRNA 基因序列分析发现,单纯依靠 16S rRNA 基因序列并不能有效区分出目标菌株,NCBI 相似性比对发现共有 8 种芽孢杆菌与目标菌株的相似性均达到 100%,系统发育树构建显示出目标菌株所在分支的最小自展值达到 65,还不能做到准确区分,只能暂时将目标菌株鉴定到芽孢杆菌属。在此基础上,利用 *gyrA* 基因序列分析可初步鉴定出芽孢杆菌 J1 为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),虽然仍有 4 种芽孢杆菌表现出与目标菌株较高的相似性,但系统发育树构建显示目标菌株与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)的亲缘关系更近,*gyrB* 基因序列分析也进一步证实了解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)是与芽孢杆菌 J1 亲缘关系最近的菌种,结合形态特征及部分生理生化特性,可实现对芽孢杆菌 J1 进行快速准确鉴定。

综上所述,本研究首次从健康杜仲叶片中分离得到对杜仲黑斑病病原菌(*P. trachicarpicola*) DZHBB-1 有较好抑制作用的生防菌解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) J1,并同时利用 16S rRNA、*gyrA* 和 *gyrB* 基因进行分子鉴定,结合形态特征及生理生化特性,快速准确地鉴定出菌株 J1 为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),可为生物防治杜仲黑斑病提供可能的生防菌种,并为快速准确地分类鉴定芽孢杆菌相关近缘种提供借鉴。在后期实验中,将进一步对该菌进行发酵条件的优化,提高其拮抗作用,选择合适的剂型做成生物制剂进行田间试验,充分用来防治杜仲黑斑病及相关的其他植物病害;同时找到该菌在杜仲上的定殖规律,及其相关抗菌物质和抑制规律,以期丰富该菌的抑菌机制。

REFERENCES

- [1] Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Cai L, et al. A multi-locus backbone tree for *Pestalotiopsis*, with a polyphasic characterization of 14 new species[J]. Fungal Diversity, 2012, 56(1): 95-129
- [2] Maharachchikumbura SSN, Hyde KD, Groenewald JZ, et al. *Pestalotiopsis* revisited[J]. Studies in Mycology, 2014, 79: 121-186
- [3] Crous PW, Summerell BA, Swart L, et al. Fungal pathogens of *Proteaceae*[J]. Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi, 2011, 27: 20-45
- [4] Maharachchikumbura SSN, Chukeniroti E, Guo LD, et al. *Pestalotiopsis* species associated with *Camellia sinensis* (tea)[J]. Mycotaxon, 2013, 123: 47-61
- [5] Maharachchikumbura SSN, Guo LD, Chukeniroti E, et al. A destructive new disease of *Syzygium samarangense* in Thailand caused by the new species *Pestalotiopsis samarangensis*[J]. Tropical Plant Pathology, 2013, 38(3): 227-235
- [6] Zhang YM, Maharachchikumbura SSN, McKenzie EHC, et al. A novel species of *Pestalotiopsis* causing leaf spots of *Trachycarpus fortunei*[J]. Cryptogamie, Mycologie, 2012, 33(3): 311-318
- [7] Zhang YM, Maharachchikumbura SSN, Tian Q, et al. *Pestalotiopsis* species on ornamental plants in Yunnan province, China[J]. Sydowia, 2013, 65(1): 113-128
- [8] Li SJ, Li SY, Zhang ZY, et al. First report of *Pestalotiopsis trachicarpicola*, a causal agent of leaf spot of *Eucommia ulmoides* in southwest China[J]. Plant Disease, 2018, 102(12): 2656
- [9] Shi LB, Li Y, Fei NY, et al. Identification of the *Pestalotiopsis* pathogen of blueberry leaf spot[J]. South China Fruits, 2017, 46(1): 24-28 (in Chinese)
石凌波, 李媛, 费诺亚, 等. 蓝莓拟盘多毛孢叶斑病原菌鉴定[J]. 中国南方果树, 2017, 46(1): 24-28
- [10] Jayawardena RS, Zhang W, Liu M, et al. Identification and characterization of *Pestalotiopsis*-like fungi related to grapevine diseases in China[J]. Fungal Biology, 2015, 119(5): 348-361
- [11] Li JZ, Wen CY. Research progress on bacteria for biological control of plant disease[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2015, 44(10): 1-7 (in Chinese)
李俊州, 文才艺. 植物病害生防细菌研究进展[J]. 河南农业科学, 2015, 44(10): 1-7
- [12] Tan YH, Yu B, Li ZY, et al. Isolation and identification of an antagonistic bacterial strain YM-8 against *Fusarium proliferatum*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2015, 30(S1): 287-291 (in Chinese)
檀迎会, 于波, 李志勇, 等. 一株层出镰刀菌拮抗细菌 YM-8 的筛选与鉴定[J]. 华北农学报, 2015, 30(S1): 287-291
- [13] Yang ZZ. Application of *Bacillus subtilis* in biological control

- of plant diseases[J]. Journal of Sichuan Forestry Science and Technology, 2001, 22(3): 41-44 (in Chinese)
- 杨佐忠. 枯草杆菌拮抗剂在植物病害生物防治中的应用[J]. 四川林业科技, 2001, 22(3): 41-44
- [14] Feng ZH, Wang YQ, Yang CD, et al. Screening, identification and assessment of endophytic bacteria antagonistic totomato bacterial spot[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(8): 166-173 (in Chinese)
- 冯中红, 王玉琴, 杨成德, 等. 番茄细菌性叶斑病菌的拮抗菌筛选、鉴定及其拮抗性能评价[J]. 草业学报, 2015, 24(8): 166-173
- [15] Fan XJ, Huang W, Qiu SX, et al. Isolation and identification of endophytic bacterial strains from *Ginkgo biloba* and their antimicrobial activities[J]. Microbiology China, 2013, 40(9): 1638-1648 (in Chinese)
- 范晓静, 黄未, 邱思鑫, 等. 银杏内生细菌的分离鉴定及抑菌活性初探[J]. 微生物学通报, 2013, 40(9): 1638-1648
- [16] Baldauf SL. Phylogeny for the faint of heart: a tutorial[J]. Trends in Genetics, 2003, 19(6): 345-351
- [17] 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104-1109
- [18] Fox GE, Wisotzkey JD, Jurtshuk Jr P. How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42(1): 166-170
- [19] Yu GH, Niu CY, Chen YF, et al. Use of 16S rDNA, *gyrA* and *gyrB* gene sequence to identify a biocontrol *Bacillus* sp. strain R31[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(2): 160-166 (in Chinese)
- 喻国辉, 牛春艳, 陈远凤, 等. 利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定[J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 160-166
- [20] Mollet C, Drancourt M, Raoult D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification[J]. Molecular Microbiology, 1997, 26(5): 1005-1011
- [21] Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, et al. Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*)[J]. Journal of Clinical Microbiology, 1999, 37(6): 1714-1720
- [22] Yamamoto S, Bouvet PJM, Harayama S. Phylogenetic structures of the genus *Acinetobacter* based on *gyrB* sequences: comparison with the grouping by DNA-DNA hybridization[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(1): 87-95
- [23] Lu JQ, Li SC, Wang DH, et al. Combined 16S rDNA and *gyrB* gene sequence to identify a strain of *Bacillus cereus*[J]. Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science), 2018, 39(1): 73-77,83 (in Chinese)
- 卢佳琦, 李市场, 王大红, 等. 16S rDNA 与 *gyrB* 序列联合法鉴定一株蜡样芽孢杆菌[J]. 河南科技大学学报: 自然科学版, 2018, 39(1): 73-77,83
- [24] Fang ZD. Plant Pathology Research Methods[M]. 3rd ed. Beijing: China Agricultural Press, 1998 (in Chinese)
- 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [25] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [26] Brosius J, Palmer ML, Kennedy PJ, et al. Complete nucleotide sequence of a 16S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*[J]. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1978, 75(10): 4801-4805
- [27] Li HX. The inhibition mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens*[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Normal University, 2016 (in Chinese)
- 李红晓. 解淀粉芽孢杆菌抑菌作用机理的探究[D]. 沈阳: 沈阳师范大学硕士学位论文, 2016
- [28] Zhu BC, Gu L, Li Z, et al. Isolation and identification of the Antarctic soil *Bacillus* and its biocontrol effect against brown stalk rot on maize[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2017, 40(4): 641-648 (in Chinese)
- 朱碧春, 顾丽, 李正, 等. 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[J]. 南京农业大学学报, 2017, 40(4): 641-648
- [29] Zhu TH. Garden Plant Pathology[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2003: 330-331 (in Chinese)
- 朱天辉. 园林植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 330-331
- [30] Chen XD. Application of *Bacillus subtilis* in agriculture as biocontrol agent[J]. 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[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1323-1324
- [31] Chang CG, Zhang L. Application test of *Bacillus* in Japanese shrimp breeding[J]. Shandong Fisheries, 2010, 27(9): 16-17 (in Chinese)
- 常传刚, 张磊. 芽孢杆菌在日本对虾育苗中的应用试验[J]. 齐鲁渔业, 2010, 27(9): 16-17
- [32] Su J, Fang H, Zhao MJ, et al. Prevention test of different biological agents on olive leaf disease[J]. Journal of Gansu Forestry Science and Technology, 2014, 39(3): 50-53 (in Chinese)
- 苏瑾, 方浩, 赵梦炯, 等. 不同生物制剂对油橄榄叶部病害防治试验[J]. 甘肃林业科技, 2014, 39(3): 50-53

- [33] Diao QY. Probiotics: application in nutrition and feed of young ruminants[J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2014, 26(10): 3159-3167 (in Chinese)
刁其玉. 微生物制剂在幼龄反刍动物营养与饲料中的应用[J]. 动物营养学报, 2014, 26(10): 3159-3167
- [34] Shi LB. Identification and biological characteristics of *Pestalotiopsis*-like fungi on blueberry[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2017 (in Chinese)
石凌波. 蓝莓类拟盘多毛孢病菌鉴定及生物学特性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2017
- [35] Chen Z, Huang J, Zhao J, et al. Research advances on antibacterial mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(6): 37-41 (in Chinese)
陈哲, 黄静, 赵佳, 等. 解淀粉芽孢杆菌抑菌机制的研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(6): 37-41
- [36] Li SB, Fang M, Zhou RC, et al. Characterization and evaluation of the endophyte *Bacillus* B014 as a potential biocontrol agent for the control of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* – induced blight of *Anthurium*[J]. Biological Control, 2012, 63(1): 9-16
- [37] Wu LM, Wu HJ, Chen LN, et al. Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7512-7520
- [38] Wu LM, Wu HJ, Chen LN, et al. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12975
- [39] Chowdhury SP, Hartmann A, Gao XW, et al. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 – a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 780
- [40] Cao Y, Zhang ZH, Ling N, et al. *Bacillus subtilis* SQR9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots[J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(5): 495-506
- [41] Xu ZH, Shao JH, Li B, et al. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(3): 808-815
- [42] Xu ZH, Zhang RF, Wang DD, et al. Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(9): 2941-2950
- [43] Li B, Li Q, Xu ZH, et al. Responses of beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to different soilborne fungal pathogens through the alteration of antifungal compounds production[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5: 636
- [44] Singh S, Moholkar VS, Goyal A. Isolation, identification, and characterization of a cellulolytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain SS35 from rhinoceros dung[J]. ISRN Microbiology, 2013, 2013: 728134
- [45] Hutsebaut D, Vandroemme J, Heyrman J, et al. Raman microspectroscopy as an identification tool within the phylogenetically homogeneous '*Bacillus subtilis*'-group[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2006, 29(8): 650-660
- [46] Shen YD, Liu RB, Chen YH, et al. Identification of an antifungal *Bacillus* strain and studies on its antifungal active ingredients[A]//Proceedings of the 2012 International Conference on Applied Biotechnology[C]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014, 251: 1637-1644