

王皓楠,靳鹏飞,康 迅,等. 解淀粉芽孢杆菌 HAB-6 抑菌物质及其相关基因的分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(4):79-83.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.04.019

解淀粉芽孢杆菌 HAB-6 抑菌物质及其相关基因的分析

王皓楠,靳鹏飞,康 迅,谢清标,刘文波,郑服丛,缪卫国

(海南大学环境与植物保护学院,海南海口 570228)

摘要:芽孢杆菌是重要的生防菌株,分析了解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) HAB-6 菌株的抑菌物质及其抑菌活性。采用特异性 PCR 和液质联用(LC-MS)等方法对 HAB-6 菌株的抑菌物质进行初步研究。通过对编码合成脂肽类抗生素的 10 个基因进行 PCR 扩增,分别得到与 *yndj*、*srfAB*、*ituD*、*fenD*、*ituC* 同源的基因 5 个;扩增编码合成脂肽类物质关键合成酶基因,得到与 *fenB*、*lpa-14*、*sfp*、*mycB*、*ituA* 同源的基因 5 个;LC-MS 结果显示,HAB-6 菌株能产生 C₁₄Iturin A、C₁₇Iturin A、C₁₃Surfactin A、C₁₅Surfactin C 等脂肽类化合物,但通过与病原真菌对峙抑菌活性检测,脂肽类物质没有抑制真菌活性。结果表明,HAB-6 菌株具有脂肽类物质的合成基因和相关调控基因,代谢产生伊枯草菌素(iturin)、表面活性素(surfactin),但是酸沉淀提取得到的脂肽类物质不是 HAB-6 菌株抑制真菌的主要物质,其抑菌成分种类和代谢脂肽类物质的途径可能与已知的途径有所不同,有待进一步研究。

关键词:解淀粉芽孢杆菌 HAB-6 菌株;抑菌活性;脂肽类物质;伊枯草菌素;表面活性素

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)04-0079-05

芽孢杆菌在生长过程中能够产生不同的抑菌物质,已报道的脂肽类物质是芽孢杆菌作为生防菌产生的最主要的抑菌物质,尤其是其可以产生具有极高生物工程利用价值的脂肽类和肽类抗生素^[1-2],如非核糖体途径合成的脂肽类抗生素表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素(iturin)和丰源素(fengycin);核糖体途径合成的肽类抗生素枯草菌素(subtilin)和类羊毛硫抗生素(lantibiotic-like peptides)^[3-4]等。脂肽类物质在植物病害生物防治过程中发挥着重要的作用^[5-12],其结构一般是由 1 个 β -羟基脂肪酸与 7~10 个氨基酸以酰胺键形式连接的环肽^[13]。Iturin 家族的脂肽类化合物由七肽与 14~17 个碳原子的 β -氨基脂肪酸链相连而成,包括 7 个异构体 iturin A、iturin C、杆菌抗霉素(bacillomycin) D、bacillomycin F、bacillomycin L、bacillomycin LC 和抗霉枯草菌素(mycosubtilin)。在体外检测中,iturin 表现出广谱的抗菌活性和微弱的抑细菌活性,主要抑制真菌生长^[14-18]。Surfactin 家族脂肽类化合物是七肽与 β -羟基脂肪酸交联形成的内酯环状结构,细分为 surfactin A、surfactin B、surfactin C1、surfactin C2 等,主要抑制细菌、病毒、支原体生长^[18-19]。Fengycin 是由十肽与 β -氨基脂肪酸链(C₁₄~C₁₈)形成的内酯环,包括 fengycinA 和 fengycinB 这 2 类——对丝状真菌有

强烈的抑制作用。另有研究表明,surfactin 与 iturin、surfactin 与 fengycin、iturin 与 fengycin 两两之间存在协同效应,能够有效地增强后者的抑菌活性^[18,20-21]。

芽孢杆菌脂肽类抗生素合成基因的特点是抗生素合成受一个大的基因簇控制,基因簇由合成基因、调控基因共同组成^[22]。脂肽类抗生素是通过非核糖体途径合成的,其合成酶须要翻译后经修饰才有活性,该过程由共价调节酶磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(phosphopantetheinyl transferase, PPTases)催化^[23]。Surfactin 由 surfactin 合成酶,即非核糖体多肽合成酶(nonribosomalpeptide synthetases, NRPS)催化得到,在 *sfp* 基因缺失的情况下将不能产生 surfactin,将外源基因整合入枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 168 菌株中,使其产 surfactin^[24]。在枯草芽孢杆菌 168 中由于没有编码 PPTases 的基因,尽管其含有 surfactin 和 fengycin 等 2 种脂肽类抗生素合成酶基因,却不产生任何脂肽类抗生素^[23]。芽孢杆菌脂肽的快速检测一般采用分析化学的方法,如高效液相质谱、核磁共振等方法。目前,用分子生物学来检测芽孢杆菌脂肽类物质越来越普遍,根据芽孢杆菌脂肽的生物合成相关基因(*sfp*、*srf*、*fenD*、*ituC*、*bmyB* 等)设计引物,从而快速检测抗菌脂肽。

前期研究发现,笔者所在实验室获得的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) HAB-6 菌株具有广谱抑菌活性,本研究对 HAB-6 菌株产脂肽类物质的机制进行初步探究,表明其基因组中含有脂肽类物质的合成基因和调控基因,可以为今后研究 HAB-6 菌株中脂肽类物质的功能提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

解淀粉芽孢杆菌 HAB-6 菌株由笔者所在实验室从豇豆

收稿日期:2016-09-02

基金项目:国家农业产业技术体系建设(编号:CARS-034-GW8);

国家自然科学基金(编号:31160359);国家“973”计划(编号:2011CB111612);海南大学社会服务专项基金(编号:HDSF201305)。

作者简介:王皓楠(1990—),女,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事生物防治预测化学农药研究。E-mail:568494776@qq.com。

通信作者:缪卫国,博士,教授,主要从事植物病理研究。Tel:(0898) 66270229;E-mail:miao@hainu.edu.cn。

中分离得到;芒果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Penz)为笔者所在实验室保存,作为 HAB-6 菌株抑菌活性测定的主要靶标菌;感受态细胞为笔者所在实验室保存的大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 。

1.2 培养基

LB 液体培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g、5 mol/L NaOH 调节 pH 值至 7,用去离子水定容至 1 L;马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA):马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、去离子水定容至 1 L。

表 1 HAB-6 菌株扩增基因及引物序列

序号	基因名称	引物名	序列(5'→3')	片段大小 (bp)
1	<i>ituC</i>	<i>ITUCF1</i>	TTCACTTTTGATCTGCGCAT	575
		<i>ITUCR3</i>	CGTCCGGTACATTTTCAC	
2	<i>srfAB</i>	110F	GTTCTCGCAGTCCAGCAGAAG	308
		110R	GCCGAGCGTATCCGTACCGAG	
3	<i>sboA</i>	<i>Sbo1F</i>	TCCGTTTGTAAACTTCAACTGC	334
		<i>Sbo1R</i>	GTCCACTAGACAAGCGGCTCATTGT	
4	<i>ituD</i>	<i>ituD2F</i>	GATCGGATCTCCTTGGATGT	647
		<i>ituD2R</i>	ATCGTCATGTGCTGCTTGAG	
5	<i>qk</i>	<i>Qk1F</i>	CTTAAACGTCAGAGCGGAG	704
		<i>Qk1R</i>	GCAGCTGCTTGTACC	
6	<i>fenD</i>	<i>FNDF1</i>	CCTGCAGAAGGAGAAGTGAAG	293
		<i>FNDR1</i>	TGCTCATCGTCTTCCGTTTC	
7	<i>bamC</i>	<i>bamC2F</i>	CTGGAAGAGATGCCGCTTAC	850
		<i>bamC2R</i>	AAGAGTGCCTTTTCTTCGGA	
8	<i>yndj</i>	147F	CAGAGCGACAGCAATCACAT	212
		147R	TGAATTTTCGCTCCGCTTATC	
9	<i>ituB</i>	bamB1F	AAGAAGCGCTTTTTC AAGCA	508
		bamB1R	CGACATACAGTTCTCCCGGT-	
10	<i>fenB</i>	<i>FenB1F</i>	TACCTATCGCAATGTCGTGT	767
		<i>FenB1R</i>	CTTCGATTTCTAACAGCCGC	

1.4 脂肽类关键合成酶基因 PCR 扩增

以 HAB-6 菌株总 DNA 为模板,分别用 6 对脂肽类关键合成酶基因 *ituA*、*ituD*、*lpa-14*、*sfp*、*mycB*、*fenB* 的引物进行靶

1.3 HAB-6 菌株脂肽类合成基因 PCR 检测

HAB-6 菌株接种于 LB 培养基中,在 28 ℃、180 r/min 条件下培养 48 h。提取 HAB-6 菌株总 DNA,以总 DNA 为模板,分别用 10 对 *ituC*、*srfAB*、*sboA*、*ituD*、*qk*、*fenD*、*bamC*、*yndj*、*ituB*、*fenB* 脂肽类抗生素合成相关基因引物^[25](表 1),进行靶标基因的 PCR 扩增。PCR 反应条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 60 s、52 ℃ 30 s、72 ℃ 60 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物经电泳胶回收后进行 TA 克隆,转化后送华大基因公司测序,测序结果经 Blast 比对分析。

标基因的 PCR 扩增。PCR 扩增产物经电泳胶回收后进行 TA 克隆、转化后送华大基因测序,结果经 NCBI 数据库 Blast 比对分析。

表 2 扩增基因及引物序列

序号	基因名称	引物名	序列(5'→3')	片段大小 (bp)	PCR 程序
1	<i>ituA</i>	<i>ituAF</i>	ATGTATACCAGTCAATTCC	1 100	94 ℃ 3 min;94 ℃ 1 min,43 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min,30 循环;72 ℃ 10 min
		<i>ituAR</i>	GATCCGAAGCTGACAATAG		
2	<i>ituD</i>	<i>ituDF</i>	ATGAACAATCTTGCCTTTT	1 203	94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,58 ℃ 0.5 min、72 ℃ 1.5 min,30 循环;72 ℃ 10 min
		<i>ituDR</i>	TTATTTTAAATCCGCAATT		
3	<i>lpa-14</i>	<i>lpa-14F</i>	GAAAATTTACGGAGTATATATGGACCGC	675	94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,58 ℃ 0.5 min、72 ℃ 1.5 min,30 循环;72 ℃ 10 min
		<i>lpa-14R</i>	TTATAACAGCTCTTCATACGTTTTCATCTCATTGT		
4	<i>sfp</i>	<i>sfpF</i>	ATGAAGATTACGGAATTTA	675	94 ℃ 3 min;94 ℃ 1 min,43 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min,30 循环;72 ℃ 10 min
		<i>sfpR</i>	TTATAAAAGCTCTTCGTACG		
5	<i>mycB</i>	<i>mycBF</i>	ATGTCGGTGTTTAAAAATCAAGTAACG	2 024	94 ℃ 4 min;94 ℃ 1 min,53 ℃ 1.5 min、72 ℃ 1 min,30 循环;72 ℃ 10 min
		<i>mycBR</i>	TTAGCACGCCAGCAGTTCTTCTATTGA		
6	<i>fenB</i>	<i>fenBF</i>	CTATAGTTTGTTGACGGCTC	1 400	94 ℃ 3 min;94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min、72 ℃ 1 min,30 循环;72 ℃ 10 min
		<i>fenBR</i>	CAGCACTGTTCTTTGTGCGCA		

1.5 酸沉淀法提取脂肽类物质

HAB-6 菌株发酵液于 10 000 r/min 离心 10 min,去除菌体得离心上清液,6 mol/L 的 HCl 溶液调 pH 值至 2.0,4 ℃ 静置过夜,离心收集沉淀,用甲醇溶液溶解沉淀,为脂肽类物质

粗提物^[9]。用滤纸片法检测脂肽类物质的抑菌活性。

1.6 LC-MS 色谱条件

色谱柱 SMB200-12C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm,12);流动相为 0.05% 甲酸水溶液(A):乙腈(B),梯度洗脱(表 1);流

速为 1 mL/min; 柱温 30 ℃; 检测波长 235 nm; 进样量 20 mL^[22]。

表 3 分析色谱梯度洗脱程序

时间 (min)	A : B
0→20	60 : 40→30 : 70
20→25	30 : 70→0 : 100
25→26	0 : 100→60 : 40
26→36	60 : 40

1.7 脂肽类物质粗提物抑菌活性检测

将芒果炭疽病菌接种于 9.0 cm PDA 培养平板中央,在距离中央 2.5 cm 的位置等距离接种 HAB-6 菌体和滤纸片,每片滤纸片上加 15 μL HAB-6 菌株发酵上清液和脂肽类粗提物,将培养皿倒置于 28 ℃培养箱中培养 5 d,观察。

2 结果与分析

2.1 脂肽类基因序列检测

用 10 对引物扩增,HAB-6 菌株中分 5 个基因片段 *ituC*、*srfAB*、*ituD*、*fenD*、*yndj* 与目标片段长度一致(图 1)。对扩增得到的 5 个基因片段进行测序,经 NCBI 的 Blast 比对分析,分别为 *ituC*、*srfAB*、*ituD*、*fenD*、*yndj*,条带大小与目标条带大小一致。其中 HAB-6 菌株中的 *ituC* 基因序列与 *B. subtilis* B010 菌株的 *ituC* 基因(GU062715.1)同源性达到 97%,HAB-6 菌株中的 *srfAB* 基因序列与 *B. amyloliquefaciens* 菌株的 *srfAB* 基因(AJ575642.1)同源性达到 96%,HAB-6 菌株中的 *ituD* 基因序列与 *B. amyloliquefaciens* Q-426 菌株的 *ituD* 基因(JQ271536.1)同源性达到 98%,HAB-6 菌株中的 *fenD* 基因序列与 *B. amyloliquefaciens* SQR9 菌株的 *fenD* 基因(CP006890.1)同源性达到 98%,HAB-6 菌株中的 *yndj* 基因序列与 *B. amyloliquefaciens* SQR9 菌株的 *yndj* 基因(JN093032.1)同源性达到 97%。

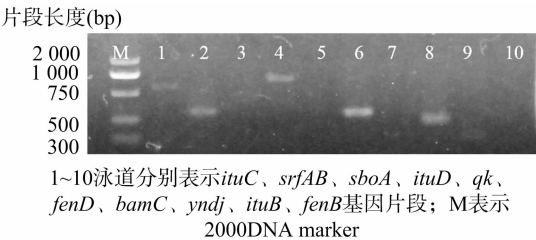


图 1 HAB-6 菌株脂肽类物质合成相关基因 PCR 扩增

2.2 脂肽类合成酶基因序列检测

用 10 对引物扩增,HAB-6 菌株中得到 5 个基因片段 *ituA*、*lpa-14*、*sfp*、*mycB*、*fenB* 与目标片段长度一致(图 2)。对扩增得到的 5 个基因片段进行测序,经 NCBI 的 Blast 比对分析,HAB-6 菌株中的 *ituA* 基因序列与 *B. amyloliquefaciens* 菌株的 *ituA* 基因(KF765804.1)同源性达到 98%;HAB-6 菌株中的 *lpa-14* 基因序列与 *B. subtilis* RP24 菌株的 *lpa-14* 基因(EU797520.1)同源性达到 98%;HAB-6 菌株中的 *sfp* 基因序列与 *B. amyloliquefaciens* S20 菌株 *sfp* 基因(JX414225.1)同源性达到 99%;HAB-6 菌株中的 *mycB* 基因序列与 *B. amyloliquefaciens* Q-426 菌株的 *mycB* 基因(JQ271536.1)同

源性达到 96%;HAB-6 菌株中的 *fenB* 基因序列与 *B. amyloliquefaciens* S20 菌株的 *fenB* 基因(JX414225.1)同源性达到 96%。

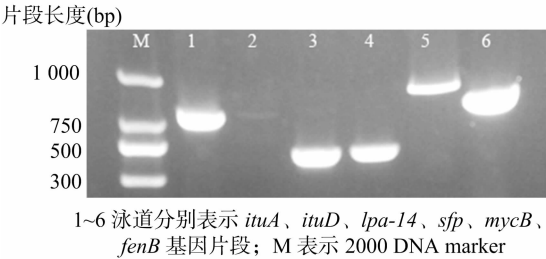


图 2 HAB-6 菌株脂肽类物质合成酶相关基因 PCR 扩增

2.3 HAB-6 菌株脂肽类抗生素组成

通过 HAB-6 菌株脂肽类物质粗提物的液质联用可以发现,保留时间在 3.31、7.70、24.67、25.35 min 对应的相对分子质量分别为 1 041.5、1 083.6、1 006.6、1 034.7(图 3),与脂肽类物质相对分子质量吻合(表 4)。质荷比(*m/z*) 1 042.5、1 084.6、1 007.6、1 035.7 所对应的脂肽类抗生素为 C₁₄Iturin A、C₁₇Iturin A、C₁₃Surfactin A、C₁₅Surfactin C^[26]。

2.4 脂肽类物质活性检测

通过对峙培养,显示 HAB-6 菌株及其发酵上清液均对芒果炭疽病菌有明显的抑制作用,产生明显的抑菌带,但将 HAB-6 菌株发酵离心上清液通过酸沉淀法提取的脂肽类物质对芒果炭疽病菌没有抑菌活性,说明脂肽类物质不是 HAB-6 菌株的抑菌活性物质(图 4)。

3 结论与讨论

芽孢杆菌在自然生长和发酵培养后期产生的脂肽类物质是其最重要的抗菌物质^[26]。Iturin 只限于枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌中产生,抑制植物病原菌。Iturin 家族通过与细胞膜相互作用引起孔隙形成,普遍对多种真菌有较强的抗真菌活性^[27]。于是根据已知脂肽类物质的基因序列设计引物进行 PCR,与已知基因经 Blast 比对,显示 HAB-6 菌株有合成脂肽类物质的 5 条基因。进一步设计引物对合成脂肽类物质关键酶基因进行扩增,HAB-6 菌株含有编码关键酶的 5 条基因。*Sfp* 基因编码的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺腺苷酰转移酶是芽孢杆菌非核糖体途径脂肽类物质合成的关键基因。*SrfAB* 编码 surfactin 合成酶,surfactin 合成酶通过磷酸泛酰巯基转移酶将 4'-磷酸泛酰巯基乙胺腺苷酰转移酶以硫酯键连接到 PCP 结构域上^[26-30],活化后启动 surfactin 的合成^[23]。在 *B. subtilis*168 中由于没有编码 PPTases 的基因,即 *sfp*,尽管其含有 surfactin 和 fengycin 这 2 种脂肽类抗生素合成酶基因,却不产生任何脂肽类抗生素^[26,31]。笔者所在实验室另一株解淀粉芽孢杆菌 HAB-2 菌株缺失 *sfp* 基因,但有 *lpa-14* 基因,同样能产生有抑菌活性的脂肽类物质。HAB-6 菌株含有编码 4'-磷酸泛酰巯基乙胺腺苷酰转移酶的 *sfp* 基因、*lpa-14* 基因以及编码 surfactin 合成酶的 *srfAB* 基因,从基因的角度初步推测 HAB-6 菌株产生的脂肽类物质应具有抑菌活性。

通过 LC-MS 可以看出,HAB-6 菌株代谢产生了 C₁₄Iturin A、C₁₇Iturin A、C₁₃Surfactin A、C₁₅Surfactin C 等脂肽

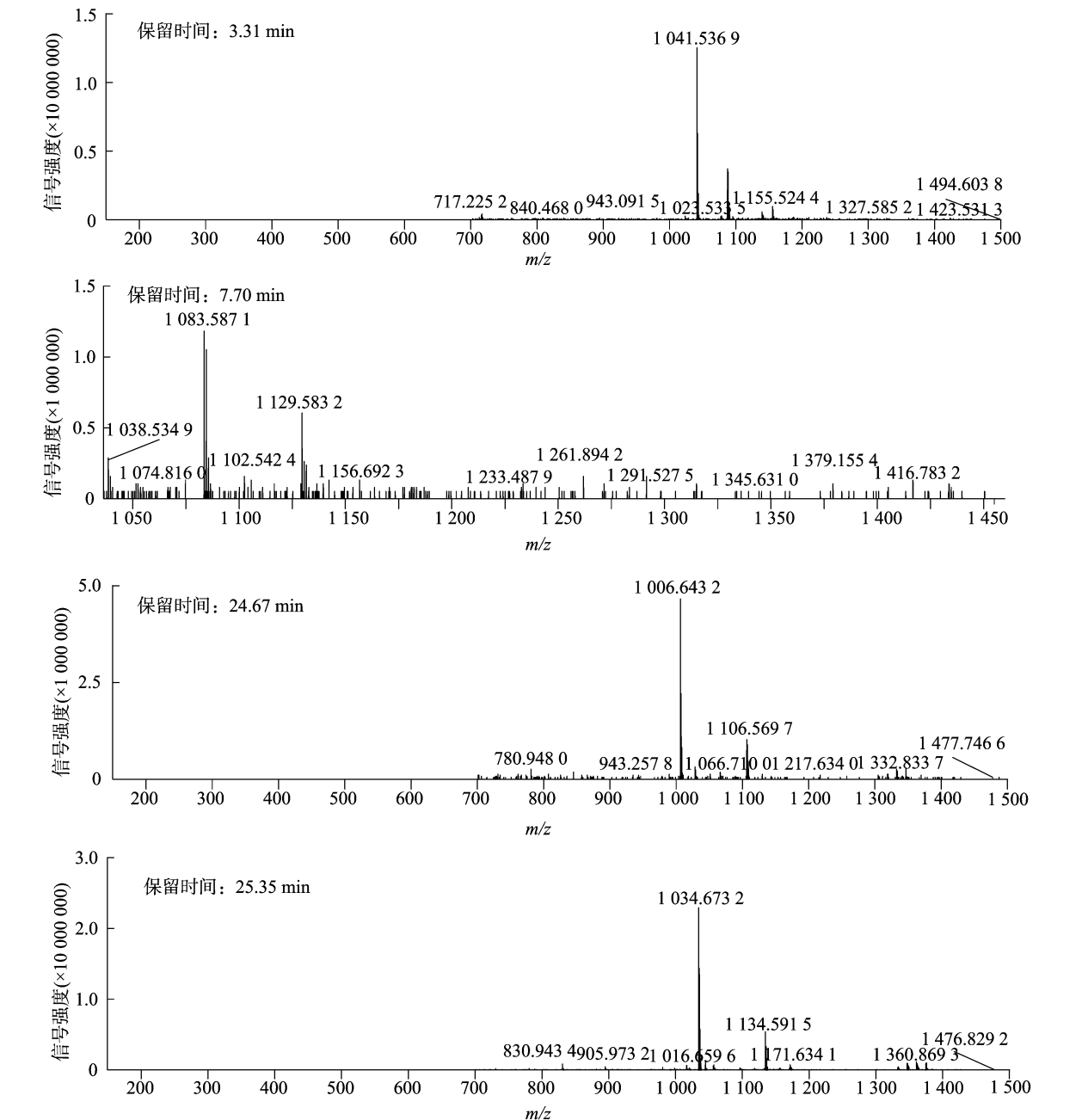


图3 HAB-6 菌株脂肽类物质粗提物 LC-MS 质谱图

表 4 HPLC - ESI - MS 脂肽类物质活性检测分析			
保留时间 (min)	质量测定值	离子结合形式	推测分子量
3.31	1 041.5	[M - H] ⁻	1 042.5
7.70	1 083.6	[M - H] ⁻	1 084.6
24.67	1 006.6	[M - H] ⁻	1 007.6
25.35	1 034.7	[M - H] ⁻	1 035.7

类物质。Iturin 类家族的脂肽类化合物在抑制真菌病害中起着重要作用^[9-10]。最近,Tanaka 等研究表明,Iturin 类化合物抗真菌活性随侧链长度增加; $C_{17} > C_{16} > C_{15}$ ^[28]。很多研究显示脂肽类物质具有相互协同作用^[29]。对峙培养结果显示,HAB-6 菌株以及其发酵液有抑制芒果炭疽病菌的活性,但是从 HAB-6 菌株发酵液中提取的脂肽类化合物没有抑制真

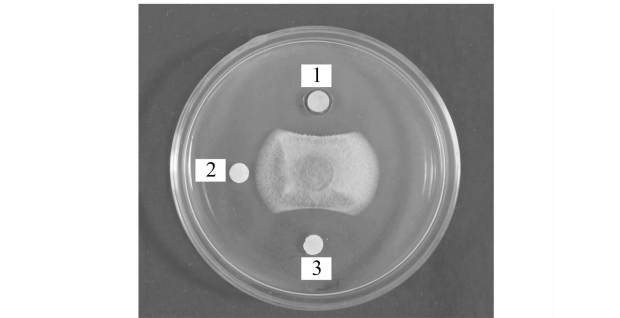


图4 HAB-6 菌株脂肽类物质抑菌活性检测

菌的活性。说明提取的脂肽类物质不是 HAB-6 菌株抑制真菌的主要物质。Surfactin 家族主要抑制细菌、病毒,对真菌没

有明显的抑制作用,可能 HAB-6 菌株代谢产生的脂肽类物质中以 surfactin 为主。因此,HAB-6 菌株脂肽类物质代谢途径以及抑菌活性物质的分离纯化还有待进一步研究。

解淀粉芽孢杆菌 HAB-6 具有脂肽类物质的合成基因 *yndJ*、*srfAB*、*ituD*、*fenD*、*ituC* 和调控基因 *fenB*、*lpa-14*、*sfp*、*mycB*、*ituA*,代谢产生 C₁₄ Iturin A、C₁₇ Iturin A、C₁₃ Surfactin A、C₁₅ Surfactin C,但是酸沉淀提取得到的脂肽类物质不是 HAB-6 菌株抑制真菌的主要物质。

参考文献:

- [1] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly R H, et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca* [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2007, 20(4): 430–440.
- [2] 高学文, 姚仕义, 王金生. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的抑菌活性物质分析[J]. 中国生物防治学报, 2003, 19(4): 175–179.
- [3] 李宝庆, 鹿秀云, 郭庆港, 等. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 脂肽类化合物的分离及稳定性分析[J]. 中国农业科学, 2009, 41(2): 196–202.
- [4] Stein T, Borchert S, Conrad B, et al. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* AI/3[J]. Journal of Bacteriology, 2002, 184(6): 1703–1711.
- [5] 谢永利, 马莉贞, 徐志伟, 等. 青海柴达木极干旱沙地分离芽孢杆菌的分子鉴定及拮抗活性分析[J]. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1079–1086.
- [6] Stein T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions[J]. Molecular Microbiology, 2005, 56(4): 845–857.
- [7] 曹小红, 廖振宇, 王春玲, 等. *Bacillus natto* TK-1 产脂肽的纯化、抑菌活性及其表面活性剂特性[J]. 中国生物工程杂志, 2008, 28(1): 44–48.
- [8] 别小妹, 陆兆新, 吕凤霞, 等. *Bacillus subtilis* fmbR 抗菌物质的分离和鉴定[J]. 中国农业科学, 2006, 39(11): 2327–2334.
- [9] 高学文, 姚仕义, 王金生. 基因工程菌枯草芽孢杆菌 GEB3 产生的脂肽类抗生素及其生物活性研究[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1496–1501.
- [10] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes [J]. Biophysical Journal, 2008, 94(7): 2667–2679.
- [11] Thimon L, Peypoux F, Wallach J, et al. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 128(2): 101–106.
- [12] 别小妹, 吕凤霞, 陆兆新, 等. *Bacillus subtilis* fmbJ 脂肽类抗菌物质的分离和鉴定[J]. 生物工程学报, 2006, 22(4): 644–649.
- [13] Yu G Y, Sinclair J B, Hartman G L, et al. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani* [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2002, 34(7): 955–963.
- [14] Hiradate S, Yoshida S, Sugie H, et al. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 [J]. Phytochemistry, 2002, 61(6): 693–698.
- [15] Moyne A L, Shelby R, Cleveland T E, et al. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(4): 622–629.
- [16] Kracht M, Rokos H, ÖZEL M, et al. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives [J]. The Journal of Antibiotics, 1999, 52(7): 613–619.
- [17] Zerrouh H, Romero D, García-Gutiérrez L, et al. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2011, 24(12): 1540–1552.
- [18] 刘俊. 解淀粉芽孢杆菌 C06 防治桃褐腐病菌的机制及其产生的 γ -多聚谷氨酸在定殖中的作用 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- [19] Peypoux F, Bonmatin J M, Wallach J. Recent trends in the biochemistry of surfactin [J]. Applied Microbiol and Biotechnol, 1999, 51: 553–563.
- [20] Cazorla F M, Romero D, Pérez-García A, et al. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity [J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(5): 1950–1959.
- [21] Ongena M, Jacques P, Touré Y, et al. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2005, 69(1): 29–38.
- [22] 邓建良. 解淀粉芽孢杆菌 YN-1 抑制植物病原真菌活性物质研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [23] 刘丽霞. Surfactin 合成酶相关基因研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [24] 曹云. SQR9 微生物有机肥防治黄瓜土传枯萎病的效应与机制研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
- [25] 鲁小城. 一株枯草芽孢杆菌抗植物病原真菌活性物质的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [26] Lambalot R H, Gehring A M, Flugel R S, et al. A new enzyme superfamily—the phosphopantetheinyl transferases [J]. Chemistry & Biology, 1996, 3(11): 923–936.
- [27] Tabbene O, Kalai L, Ben S I, et al. Anti-*Candida* effect of bacillomycin D-like lipopeptides from *Bacillus subtilis* B38 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2011, 316(2): 108–114.
- [28] Tanaka K, Ishihara A, Nakajima H. Isolation of anteiso-C₁₇, iso-C₁₇, iso-C₁₆, and iso-C₁₅ bacillomycin D from *Bacillus amyloliquefaciens* SD-32 and their antifungal activities against plant pathogens [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(7): 1469–1476.
- [29] Ongena M, Jacques P. *Bacillus lipopeptides*: versatile weapons for plant disease biocontrol [J]. Trends in Microbiology, 2008, 16(3): 115–125.
- [30] Reuter K, Mofid M R, Marahiel M A, et al. Crystal structure of the surfactin synthetase-activating enzyme Sfp: a prototype of the 4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily [J]. The EMBO Journal, 1999, 18(23): 6823–6831.
- [31] Tsuge K, Ano T, Shoda M. Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8 [J]. Archives of Microbiology, 1996, 165(4): 243–251.