

研究报告

一株西瓜枯萎病生防菌 *Bacillus methylotrophicus* 的筛选、鉴定及抑菌物质分析余红凤^{1,2,3}, 张琳^{1,2,3}, 毕钰^{1,2,3}, 王志刚^{1,2,3}, 徐伟慧^{*1,2,3}, 黄欣冉^{1,2,3}, 郭嘉仪^{1,2,3}

1 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

2 黑龙江省农业微生物制剂产业化技术创新中心, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

3 黑龙江省农用生物制剂产业化协同创新中心, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

余红凤, 张琳, 毕钰, 王志刚, 徐伟慧, 黄欣冉, 郭嘉仪. 一株西瓜枯萎病生防菌 *Bacillus methylotrophicus* 的筛选、鉴定及抑菌物质分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 534-553.

YU Hongfeng, ZHANG Lin, BI Yu, WANG Zhigang, XU Weihui, HUANG Xinran, GUO Jiayi. Screening, identification, and antifungal substances of an antagonistic strain *Bacillus methylotrophicus* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 534-553.

摘要: 【背景】西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, Fon)是西瓜枯萎病的致病菌, 严重威胁连作西瓜的生产。【目的】筛选拮抗西瓜枯萎病菌的菌株并推测其无菌上清液(cell-free supernatant, CFS)的抑菌成分, 为其在农业生产中的应用提供理论依据。【方法】利用平板对峙法筛选拮抗 Fon 的菌株, 通过盆栽试验验证其抑制西瓜枯萎病的能力, 并通过扫描电镜、共聚焦显微镜观察和抗氧化酶活性测定等方法研究 Fon 暴露在拮抗菌株次级代谢物下孢子形态的变化、膜的完整性和造成的氧化损伤, 通过二代 Illumina HiSeq 联合三代 PacBio Sequel 测序平台进行全基因组测序、LC-MS 非靶代谢组学、超高压液相色谱系统和高分辨率质谱(UHPLC-ESI-MS/MS), 明确拮抗菌株次级代谢物中的抑菌功能物质。【结果】从健康西瓜根际土筛选到拮抗 Fon 的一株优良菌株 J4, 盆栽试验表明其对西瓜枯萎病的防治效果为 72.6%。经全基因组学鉴定为 *Bacillus methylotrophicus* J4, 该菌株可产蛋白酶、淀粉酶、葡聚糖酶和纤维素酶并有分泌铁载体的能力, 其衰亡期无菌上清液对 Fon 菌丝生长抑制率为 71.87%, 菌株 J4 的 CFS 使 Fon 孢子表面凹陷, 破坏其细胞膜的完整性, 造成细胞死亡。菌株 J4 诱导 Fon 菌丝体活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累; 菌株 J4 的 CFS 引起 Fon 菌丝超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)活性, 以及可溶性蛋白和丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的显著升高。该菌株基因组中含有 13 个抑菌

资助项目: 齐齐哈尔市食品产业研究院项目(SXSP-2021004); 黑龙江省高校基本科研业务费项目(145209808); 齐齐哈尔大学研究生创新项目(YJSCX2022020)

This work was supported by the Qiqihar Food Industry Research Institute Project (SXSP-2021004), the Basic Research Fees of Universities in Heilongjiang Province (145209808), and the Graduate Innovation Project of Qiqihar University (YJSCX2022020).

*Corresponding author. E-mail: xwh800206@163.com

Received: 2023-08-01; Accepted: 2023-08-23; Published online: 2023-10-17

功能的次级代谢产物合成基因簇, 菌株 J4 的 CFS 中含有 3 种多肽化合物, 并且这 3 种脂肽具有抑制 Fon 菌丝生长的能力, 推测菌株 J4 上清液中的抑菌功能物质是伊枯草菌素 A (iturin A)、丰原素 (fengycin) 和表面活性素 (surfactin)。【结论】菌株 J4 对西瓜枯萎病有较强的防效, 在西瓜枯萎病生物防治中具有广泛的应用前景。

关键词: 拮抗菌株; 西瓜专化型尖孢镰刀菌; 甲基营养型芽胞杆菌

Screening, identification, and antifungal substances of an antagonistic strain *Bacillus methylotrophicus* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*

YU Hongfeng^{1,2,3}, ZHANG Lin^{1,2,3}, BI Yu^{1,2,3}, WANG Zhigang^{1,2,3}, XU Weihui^{*1,2,3}, HUANG Xinran^{1,2,3}, GUO Jiayi^{1,2,3}

1 College of Life Science and Agroforestry, Qiqihar University, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China

2 Heilongjiang Provincial Technology Innovation Center of Agromicrobial Preparation Industrialization, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China

3 Heilongjiang Provincial Collaborative Innovation Center of Agrobiological Preparation Industrialization, Qiqihar 161006, Heilongjiang, China

Abstract: [Background] *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (Fon) is the causal agent of watermelon wilt, seriously threatening the production of watermelon in continuous cropping. [Objective] To screen out the antagonistic strain against Fon and identify the antifungal components in the cell-free supernatant (CFS), providing a theoretical basis for application of the strain in agricultural production. [Methods] Plate confrontation was employed to screen the antagonistic strain against Fon. Pot experiments were conducted to verify the control effect of the antagonistic strain on watermelon wilt. Scanning electron microscopy and confocal microscopy were employed to observe the conidial morphology and membrane integrity of Fon. The activities of antioxidant enzymes were determined to evaluate the oxidative damage. Whole genome sequencing through second-generation Illumina HiSeq combined with third-generation PacBio Sequel sequencing platform, LC-MS-based non-target metabolomics, and ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS) were employed to identify the antifungal substances in the secondary metabolites of the strain. [Results] An antagonistic strain J4 was screened out from the rhizosphere soil of healthy watermelon. The pot experiments showed that its control effect against watermelon wilt was 72.6%. The strain was identified as *Bacillus methylotrophicus* J4 by whole genome sequencing, and it could produce protease, amylase, glucanase, cellulose, and siderophores. The CFS of J4 in the decline stage presented the inhibition rate of 71.87% on the growth of Fon. Moreover, it led to the collapsing of Fon spore surface, destroyed the integrity of the cell membrane, and caused cell death. Strain J4 induced the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the mycelia of Fon. The CFS of strain J4 significantly increased the activities

of superoxide dismutase, catalase, peroxidase, and glutathione reductase and the content of soluble protein and malondialdehyde in the mycelia of Fon. The genome of strain J4 carried 13 gene clusters for the synthesis of secondary metabolites with antimicrobial functions. The CFS of strain J4 contained three peptides, which were proved to inhibit the growth of Fon. It was hypothesized that the antifungal functional substances in the CFS of strain J4 were iturin A, fengycin, and surfactin. **[Conclusion]** Strain J4 had a strong control effect on watermelon wilt and could be used to control watermelon wilt in the future.

Keywords: antagonistic strain; *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; *Bacillus methylotrophicus*

西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, Fon)是西瓜枯萎病的致病菌, 严重威胁连作西瓜的生产。在食品和环境安全日益受到关注的背景下, 使用生防菌剂来减少农业生产中农用化学品的投入, 是一种可持续的控制植物疾病的有效手段^[1-4]。例如, 生防菌(*Bacillus velezensis*) HY19 可以降低温室番茄灰霉病的发病率^[5], Radhakrishnan 等研究发现甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*) KE2 可作为芝麻炭腐病的生物防治剂^[6]。

许多芽孢杆菌具有很强的抗菌活性, 它们通过竞争生态位和营养, 或产生次级代谢产物及诱导系统抗性, 直接或间接地对抗真菌病原体^[1,3,7]。例如, 蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*) MH778713 生产的十三烷和 2,4-二叔丁基苯酚能促进番茄幼苗的生长并对尖孢镰刀菌显示抗真菌活性^[8]。氧化胁迫是描述细胞内发生的各种有害过程的表达, 这些过程由活性氧(reactive oxygen species, ROS)的过量形成和有限的抗氧化剂防御之间的不平衡引起^[9], 诸如单态氧($1O_2$)、超氧化物(O_2^-)、过氧化氢(H_2O_2)和羟基自由基(OH^\cdot)等 ROS 在高浓度下由于氧化胁迫而诱导细胞死亡^[10]。为减轻 ROS 的有害影响, 细胞会进化出复杂的反应和保护机制。例如, 提高超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶等抗氧化酶的活性^[10]。此外, 丙二醛是公认的氧化损伤的生物标志物, 其含量标志着细胞氧化损伤的程度^[11]。一些生

防菌通过分泌抗菌次级代谢产物诱导病原菌氧化胁迫。例如, bacillomycin D 在禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)中诱导 ROS 积累并导致细胞死亡^[12]。

芽孢杆菌是广谱抗生素的生产者, 包括非核糖体合成的产物脂肽、核糖体合成肽、铁载体杆菌肌动蛋白和聚酮类化合物, 对不同的腐生和病原微生物具有抑制活性^[13-14]。例如, 从保加利亚的天然温泉中分离出的 *B. methylotrophicus* BM47, 其合成的脂肽产物细菌素可以抑制串珠镰孢菌(*Fusarium moniliforme*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、青霉菌(*Penicillium* sp.)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)和铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的生长^[15]; 从秦岭原始森林土壤中分离到一株具有生防潜力的 *B. methylotrophicus* BC79, 经薄层色谱法和高效液相色谱法提取的发酵液中活性物质苯氨甲基乙酸, 被认为是该菌株中的最强抑制物质^[16]。利用基因组学和代谢组学测序, 预测微生物代谢产物的种类^[17-18], 有助于对具有多种次级代谢物生产潜能的芽孢杆菌进行更深层次的研究, 以促进其在农业和工业上的应用^[19]。

本研究以齐齐哈尔市园艺所棚室基地西瓜根际土和西瓜枯萎病致病菌(Fon)为材料筛选拮抗 Fon 的菌株, 通过盆栽试验验证其抑制西瓜枯萎病能力, 并研究 Fon 暴露在拮抗菌株次级代谢物下孢子形态的变化、膜的完整性及造

成的氧化损伤, 以确定拮抗菌株次级代谢物中的抑菌功能物质, 为其在农业生产中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

供试土壤: 齐齐哈尔市园艺所棚室基地健康西瓜与患西瓜枯萎病西瓜的根际土。

病原真菌: 西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, Fon)分离于患西瓜枯萎病的植株, 由齐齐哈尔大学微生物生态实验室提供, 属于生理小种 2 号。

1.1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA); 营养琼脂培养基(nutrient agar, NA); 营养培养基(nutrition medium, NB)。以上培养基或培养液均参照徐伟慧等^[20]的方法配制, 使用时定容至 1 000 mL, 于 121 °C 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

荧光探针 2',7'-二氯荧光素-二乙酸(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA), 默克有限公司; 菌丝超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和可溶性蛋白测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所; AO/PI 双染试剂盒, 上海沪震实业有限公司; Wizard[®] 基因组 DNA 纯化试剂盒, 上海普洛麦格公司。激光共聚焦扫描显微镜, 恩斯特·徕茨公司; 超高液相色谱系统和高分辨率质谱(UHPLC-ESI-MS/MS), 赛默飞世尔科技公司; TBS-380 荧光仪, Turner Biosystems 公司; 电热恒温水浴锅, 天津市泰斯特仪器有限公司; 台式高速离

心机, 湖南可成仪器设备有限公司; -40 °C 冰箱, 青岛海尔特种电器有限公司; 电子天平, 上海良平仪器仪表有限公司; 冷冻离心机和扫描电子显微镜, 日立(中国)有限公司; Illumina HiSeq 和 PacBio RS II 单分子实时平台(SMRT)测序, 美吉生物制药科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌株的筛选

将 10 g 根际土置于含有玻璃珠和 90 mL 水的锥形瓶中, 充分振荡 20 min, 取 1 mL 土壤悬浮液加入盛有 9 mL 无菌水的试管中, 混合均匀得到 10^{-1} 稀释液, 通过梯度稀释法依次得到 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} 的土壤悬浮液; 从 10^{-7} 、 10^{-8} 和 10^{-9} 的试管中分别取 0.1 mL 置于 NA 中进行稀释涂布, 最后将平板倒置于 30 °C 恒温培养箱培养 3 d, 每个稀释度重复 3 次。将筛选出的菌株通过平板划线法接种到 NA 培养基, 置于 30 °C 恒温箱培养 3 d, 利用平板对峙法筛选 Fon 的拮抗菌株。将筛选出的拮抗菌株采用平板划线法在 NA 培养基上进行纯化, 观察其菌落形态; 用革兰氏染色法对菌体染色并用光学显微镜观察其形态。

1.2.2 拮抗菌株的无菌上清液(cell-free supernatant, CFS)对 Fon 的抑制效果

将菌株 J4 接种在 LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 72 h, 并将培养 72 h 的菌液于 4 °C、10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 用 0.22 μ m 滤膜过滤, 得到 CFS。将其与未凝固的 PDA 培养基以 1:1 比例混合摇匀, 用等量的无菌 LB 培养液和未凝固的 PDA 培养基混合作对照; 混合液倒入平板(直径 90 mm), 待培养基凝固后在平板中央接入 Fon 菌饼(直径 8 mm), 28 °C 培养 5 d; 用十字交叉法测量 Fon 菌落直径, 根据公式(1)计算拮抗菌株的无菌上清液的抑菌率。

抑菌率(%)=(对照 Fon 菌落直径-处理 Fon 菌落直径)/对照菌落直径×100 (1)

1.2.3 拮抗菌株生理生化特性的测定

拮抗菌株分泌蛋白酶(protease)、淀粉酶(α-amylase)、葡聚糖酶(glucanase)和纤维素酶(cellulase)的测定参考刘海洋等^[21]的方法;铁载体(siderophores)活性的测定参考荣良燕等^[22]的方法。

1.2.4 拮抗菌株的生防试验

试验设置 2 个处理,分别为 J4 (生防菌 J4+Fon)和 CK (NB+Fon)。西瓜植株生长于 10 cm×10 cm 的营养钵中,每钵一株幼苗,每个处理 3 次重复,每个重复 10 株苗。幼苗长至两叶一心时,J4 处理每株苗均浇灌 30 mL 菌悬液(1×10^6 CFU/mL),培养 3 d 后再接入 Fon 孢子悬液 20 mL (2×10^6 CFU/mL),每间隔 7 d 浇灌一次 J4 菌悬液;CK 处理每株苗均浇灌等量的无菌 NB 培养基,3 d 后再接入相同量的 Fon 孢子悬液^[23],每间隔 7 d 浇灌一次无菌 NB 培养基。将西瓜幼苗置于日光温室中培养[白天(30 ± 2) °C/夜晚(20 ± 2) °C,相对湿度 60%],试验期间正常管理,待植株发生西瓜枯萎病时,记录并计算其发病率[公式(2)]和防治效果[公式(3)]。

发病率(%)=发病植株数/总植株数×100 (2)

防治效果(%)=(对照组发病率-处理组发病率)/对照组发病率×100 (3)

1.2.5 基因组测序、分类及次级代谢产物基因簇的预测

使用 Wizard[®]基因组 DNA 纯化试剂盒提取菌株 J4 的基因组 DNA。纯化的基因组 DNA 使用荧光计进行定量。提取的 DNA 在 Illumina HiSeq 和 PacBio RS II 单分子实时平台(SMRT)上测序。原始读数通过 Fastp v0.23.0 (<https://github.com/OpenGene/fastp>)进行质量过滤,剔除低质量数据以获得干净的数据。过滤后的数据由

Unicycler v0.4.8 (<https://github.com/rrwick/Unicycler>)组装,用 Pilon v1.22 软件进行短序列比对和碱基质量校正。根据 Wang 等^[24]的方法,利用菌株基因组服务器(<https://tygs.dsmz.de/>)构建菌株 J4 系统发育树。采用 antiSMASH 6.6.0rc1 (<https://dl.secondarymetabolites.org/releases/6.0.0/>)软件和 BLAST 预测菌株的次级代谢产物基因簇及数量。

1.2.6 Fon 菌丝 ROS 荧光观察

将 Fon 在 PDA 培养基上 30 °C 培养 5–7 d,待菌丝布满整个培养基,在菌落边缘扣取菌饼($\phi=8$ mm)接种在 PDA 培养基的一侧,同时将菌株 J4 接种在 NB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 培养 12 h,8 000 r/min 离心 10 min,将细菌沉淀物(30 μ L)接种在 PDA 培养基平板另一侧,在 28 °C 继续培养 3 d。用细胞刮刀收集抑菌区(U 区)的菌丝,重悬于 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)中,将收集到的 U 区菌丝与 10 μ mol/L DCFH-DA 混合置于 25 °C 下避光孵育 30 min,然后用激光共聚焦显微镜在激发波长 488 nm 和发射波长 535 nm 下观察^[12],对照组为正常生长的菌丝。

1.2.7 Fon 菌丝抗氧化酶活性检测

取菌株 J4 衰亡期 72 h 的 CFS 与 PDB 培养基按照一定比例混合,CFS 与培养基的体积比分别为 0.5:1、1:1、2:1 和 3:1。相同比例的 LB 培养基和 PDB 混合作为对照。在 40 mL 混合培养基中加入 4 个 Fon 菌饼,28 °C、180 r/min 培养 72 h,经无菌滤纸过滤后获得菌丝,按照 SOD、CAT、GR、POD、MDA 和可溶性蛋白试剂盒的说明,并结合 Wang 等^[25]的方法计算菌丝中 SOD、CAT、GR 和 POD 的活性及可溶性蛋白和 MDA 的含量。

1.2.8 拮抗菌株 J4 的 CFS 对 Fon 孢子微观形态的影响

挑取 PDA 平板上培养 5 d 的 Fon 置于无菌

水中,经6层纱布过滤后于4℃、10 000 r/min 离心5 min,弃去上清液,保留沉淀,加入适量无菌水制成孢子悬浮液,调节浓度至 1×10^6 CFU/mL。将菌株J4衰亡期72 h的CFS与Fon孢子悬液等体积混合,放入无菌离心管,于28℃培养12 h;以无菌LB培养液与Fon孢子悬液等体积混合作为阴性对照;以1.25 μg/mL两性霉素B与Fon孢子悬液等体积混合作为阳性对照。分别吸取混合液滴在锡箔纸上风干,在4℃冰箱中用2.5%戊二醛溶液固定并保存4 h以上;再用pH 7.2的磷酸缓冲液将其固定并冲洗2次,依次将样品置于浓度为50%、70%、80%、90%和100%乙醇中脱水置换,每级脱水时间为10–15 min;最后用100%乙醇和无水硫酸铜等体积混合溶液脱水10–15 min,置于冷冻室固化过夜。每组设置3个重复。用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)观察并分析其形态变化^[26]。

1.2.9 拮抗菌株J4的CFS对Fon膜完整性的影响

按上述1.2.8制备样品,按照AO/PI双染试剂盒的说明进行染色,在4℃、10 000 r/min 离心2 min,弃去上清液;加1 mL无菌水重复洗涤3次。再加1 mL无菌PBS缓冲溶液于离心管中,摇匀后取适量溶液于载玻片上制片,激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察并分析其颜色变化。荧光指示剂AO使所有细胞染色,碘化丙啶(propidium iodide, PI)仅使细胞膜受损的细胞染色,两种荧光指示剂同时进入细胞时,PI渗入量越大则AO染色效果越差^[27]。因此,具有完整细胞膜的Fon孢子被AO染色而发出绿色荧光,细胞膜受损的Fon孢子被PI染色并根据其受损程度发出黄色或红色荧光。

1.2.10 LC-MS 非靶代谢组学及差异代谢物分析

将菌株J4接种到LB培养基中28℃、180 r/min 发酵培养72 h,将发酵液4℃、8 000 r/min 离心10 min取上清,使用0.22 μm的滤膜过滤去除残留菌株,以无菌LB培养基为对照。冷冻干燥上述样品,干燥完成后送至上海美吉生物医药科技有限公司进行LC-MS非靶代谢组学分析。此外,进行student's *t* 检验和差异倍数分析,差异代谢物的选择基于偏最小二乘判别法分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA)模型得到的变量权重值(variable information processing, VIP)和student's *t* 检验 *P* 值来确定, VIP>1 且 *P*<0.05 的代谢物为差异代谢物。

1.2.11 菌株J4的CFS中抑菌功能物质的检测

为评价不同代谢产物对Fon菌丝生长的影响,将标准品(浓度分别为0.1、0.2和1.0 mg/mL)溶于甲醇取0.2 mL涂布于PDA平板,涂布等量的无菌水为CK1,涂布等量的甲醇为CK2,在中央接入Fon菌饼(直径8 mm),28℃培养5 d;用十字交叉法测量Fon的菌落直径,根据公式(1)计算不同代谢产物的抑菌率,同时确定具有抑制Fon作用的物质。

菌株J4按照1.2.10描述培养72 h后获得CFS,并检测分析其次级代谢产物,以相同方式培养72 h的LB培养基上清液为对照。参考Wang等^[25]的方法使用超高液相色谱系统和高分辨率质谱(UHPLC-ESI-MS/MS)对抑菌化合物进行鉴定。

1.3 数据分析

利用Microsoft Excel 2021对试验数据进行整理;利用SPSS 26软件的Duncan法在*P*<0.05水平上进行差异显著性分析,利用GraphPad Prism 8.0.2软件作图。

2 结果与分析

2.1 11 株拮抗菌的 CFS 对 *Fon* 的影响

利用稀释涂布法从西瓜根际筛选出 53 株菌, 采用平板对峙法研究菌株对 *Fon* 的拮抗功能, 发现有 11 株菌对 *Fon* 有良好的拮抗作用。

11 株拮抗菌的 CFS 对 *Fon* 的抑制效果如图 1A 所示, 这 11 株菌的 CFS 对 *Fon* 均有抑制效果, 其 *Fon* 的菌丝直径均显著小于对照(CK)的菌丝直径($P<0.05$), 其中菌株 J4 的 CFS 对 *Fon* 的抑菌率最高, 达到 71.87% (图 1B), 其次是 J48

的 CFS 抑菌率为 71.35%, 菌株 J37a 的 CFS 抑菌率最低为 4.08%。

2.2 11 株拮抗菌的生理生化特性

由表 1 可以看出, 菌株 J52 不具有分泌铁载体的能力, 菌株 Y1-1 不产葡聚糖酶, 菌株 J37a 不产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和葡聚糖酶; 菌株 J4、J46、G1-2b、J7、G1-1、J48、J9a 和 Y1-2a 具有良好的产淀粉酶、纤维素酶、葡聚糖酶、蛋白酶和铁载体的能力(表 1)。

综上所述, 菌株 J4 具有产水解酶和分泌铁载体的能力, 且其无菌上清液对 *Fon* 的抑菌率

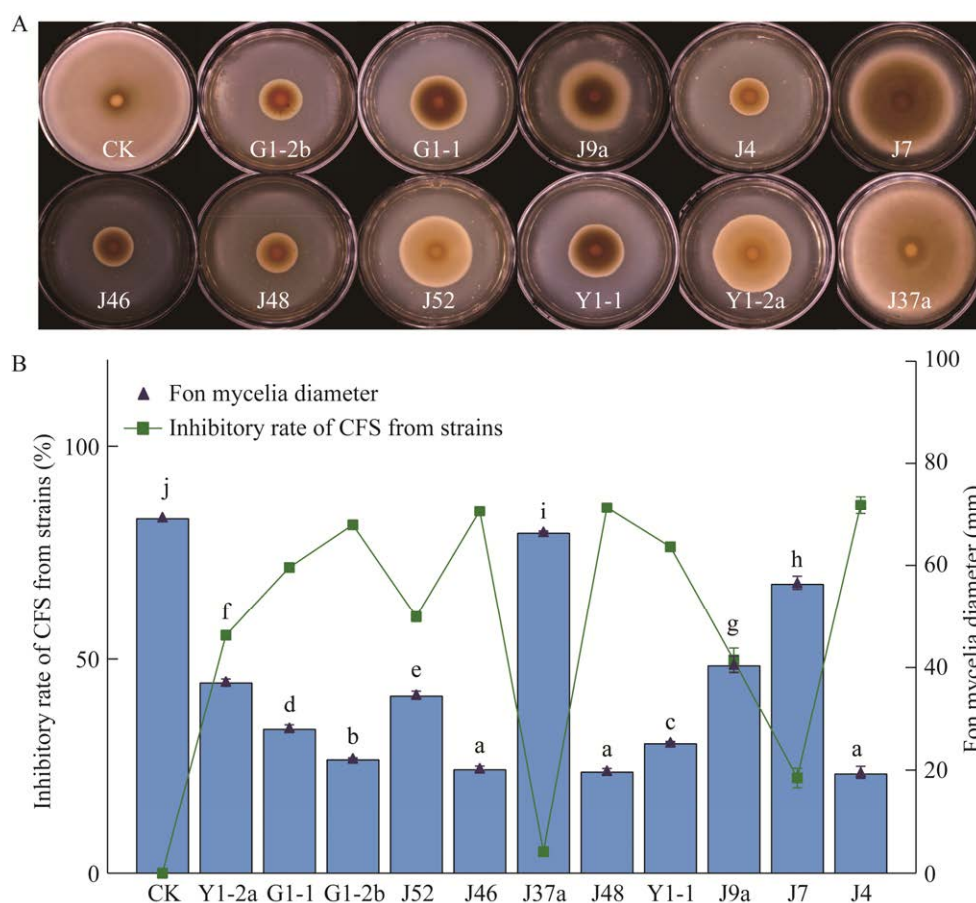


图 1 11 株拮抗菌的 CFS 对 *Fon* 生长的影响 A: 11 株拮抗菌的无菌上清液对 *Fon* 抑制的形态图. B: 11 株拮抗菌的上清液抑菌率以及 *Fon* 菌丝直径. 图中不同小写字母表示在 0.05 水平下差异显著, 下同

Figure 1 Effects of cell free supernatant from the 11 strains on growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (*Fon*). A: Morphological diagram of inhibited *Fon* by cell-free supernatants from 11 strains. B: The inhibition rate of cell-free supernatants from 11 antagonistic strains and the diameter of *Fon* mycelia. Different lowercase letters indicate a significant difference at the level of 0.05. The same below.

表 1 11 株拮抗菌的生理生化特性

Table 1 Determination of physiological and biochemical characteristics of the 11 strains

Strain No.	Protease	Amylase	Glucanase	Cellulase	Siderophore
J4	+	+	+	+	+
J46	+	+	+	+	+
G1-2b	+	+	+	+	+
J7	+	+	+	+	+
G1-1	+	+	+	+	+
J52	+	+	+	+	-
J48	+	+	+	+	+
J9a	+	+	+	+	+
Y1-1	+	+	-	+	+
J37a	-	-	-	-	+
Y1-2a	+	+	+	+	+

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

在筛选的菌株中表现最佳,因此选择菌株 J4 用于后续研究。

2.3 菌株 J4 对西瓜枯萎病发病率的影响

幼苗培养 45 d 后, J4、CK 处理组植株发病率分别为 17.6%、64.3%, J4 处理组西瓜枯萎病发病率明显低于 CK 组, 菌株 J4 对西瓜枯萎病的盆栽防效为 72.6%, 说明菌株 J4 能有效抑制西瓜枯萎病的发生。

2.4 菌株 J4 的系统发育分析和基因组特征

在生防特性研究的基础上, 进一步对其基因组进行了测序分析, 以探究菌株 J4 的生防潜能。对样品测序结果进行组装和注释, 得到 J4 的全基因组图谱(图 2A)。该菌株的全基因组由一条 3 929 790 bp 的环状染色体组成, G+C 含量为 46.5%。据预测, 该基因组包含 3 749 个编码 DNA 序列(coding DNA sequences, CDSs)、27 个 rRNA 基因、86 个 tRNA 基因。根据 COG、GO 和 KEGG 功能注释, 鉴定的基因分别为 3 011、2 850 和 2 231 个。在基因组中鉴定出 9 个已知的基因簇分别为丰原素(fengycin)、表面活性素

(surfactin)、多肽类杆菌素(bacillibactin)、大环内酰亚胺(macrolactin) H、杆菌烯(bacillaene)、丁酰苷菌素(butirosin) A、地非西丁(difficidin)、溶杆菌素(bacilysin)和 4 个未知基因簇(图 2A)。经系统发育分析表明(图 2B), 菌株 J4 与 *B. methylotrophicus* KACC 13105 的亲缘关系最密切。因此, 菌株 J4 最终被鉴定为 *Bacillus methylotrophicus* J4 (全基因组序列已经上传到 NCBI, 登录号为 CP119299)。

2.5 菌株 J4 对 Fon 菌丝细胞内 ROS 的影响

荧光探针 DCFH-DA 可以检测细胞内 ROS 的水平, 在活性氧的存在下 DCFH 被氧化生成 2',7'-二氯荧光素(2',7'-dichlorofluorescein, DCF), 从而发出绿色荧光, 荧光越强代表积累的 ROS 越多。如图 3 所示, U 区 Fon 菌丝的绿色荧光强于对照, 这表明菌株 J4 的次级代谢产物可以诱导 Fon 菌丝细胞中 ROS 的积累, 扰乱细胞氧化还原稳态, 造成氧化胁迫, 从而抑制 Fon 的生长。

2.6 CFS 对 Fon 菌丝抗氧化酶活性的影响

如图 4A-4D 所示, 经 CFS 处理后 Fon 的细胞 SOD、POD、CAT、GR 酶活性, 以及可溶性蛋白和 MDA 含量显著高于对照组, 当暴露于不同浓度(CFS 与 PDB 培养基的体积比分别为 0.5:1、1:1、2:1 和 3:1) CFS 时, SOD 酶活性分别升高 2.36、1.74、2.95 和 1.6 倍; GR 酶活性分别升高 2.66、3.84、1.67 和 1.56 倍; POD 含量分别升高 1.37、1.38、1.65 和 1.30 倍; CAT 含量分别升高 1.72、6.74、2.55 和 1.83 倍; 可溶性蛋白、MDA 在体积比为 0.5:1 的处理组与对照相比无显著差异, 在其他处理组(1:1、2:1 和 3:1)中, 可溶性蛋白含量分别升高 4.96、3.94 和 2.57 倍; MDA 含量分别升高 2.37、3.20 和 4.10 倍(图 4E、4F)。

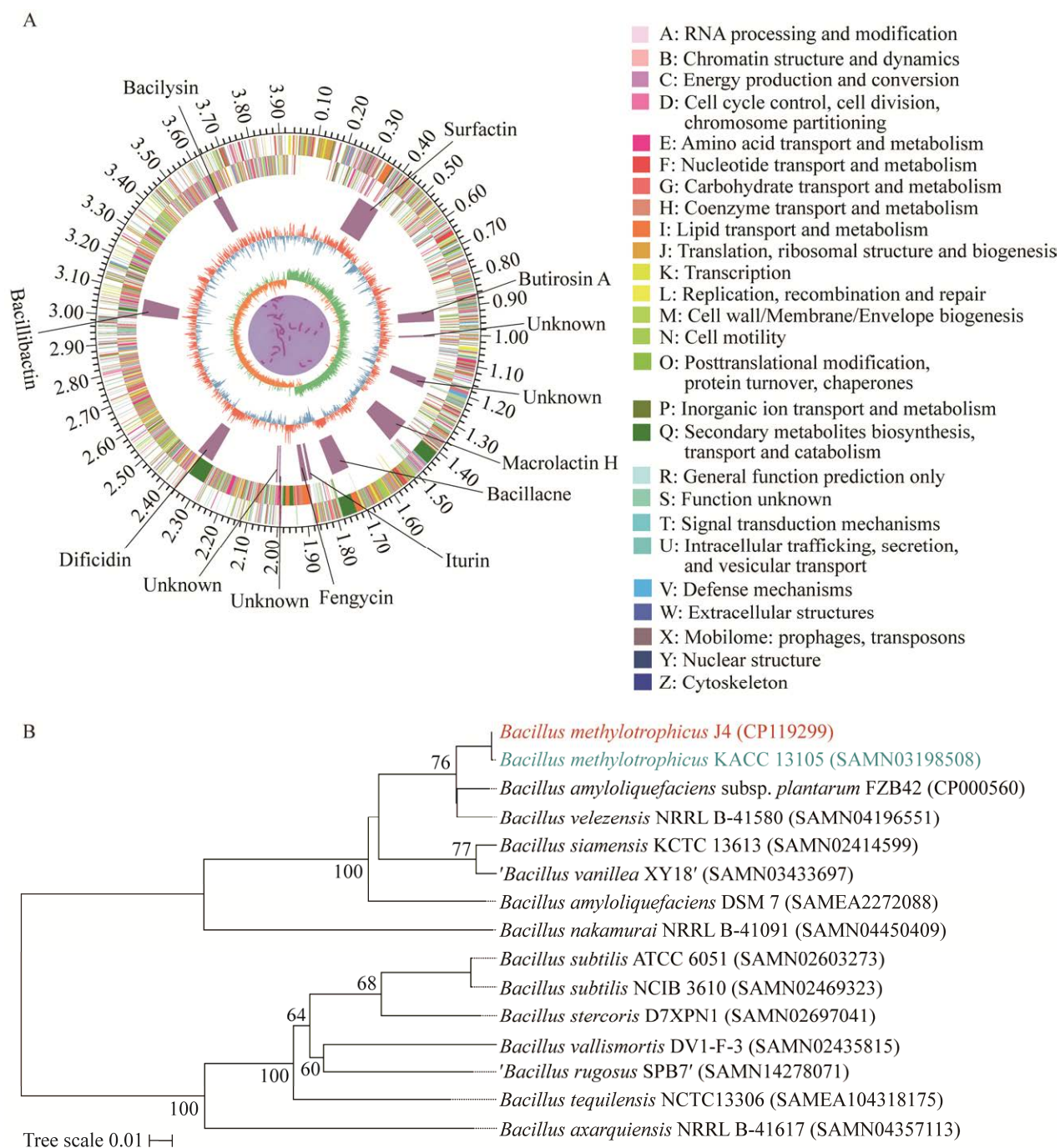


图2 菌株J4的基因组图谱及系统发育树分析 A: 菌株J4的基因组图谱, 由外到内的圈为: 基因组的大小、正向链基因、负向链基因、预测到的次级代谢产物基因簇位置和命名、G+C含量、G+C-skew值和菌株J4番红染色的形态图. B: 基于全基因组测序菌株J4的系统发育树

Figure 2 Genomic map of strain J4 and phylogenetic tree analysis. A: Genome map of strain J4, circles from outer to inner: genome size, forward-strand genes, reverse-strand genes, nomenclature and position of predicted secondary metabolite gene clusters, G+C content, G+C-skew value and morphological diagram of strain J4 stained with saffranine. B: Phylogenetic tree of strain J4 based on complete genome alignments.

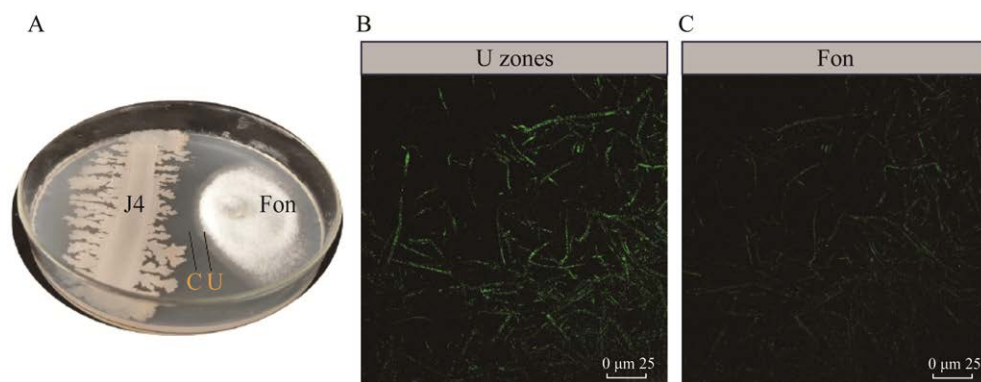
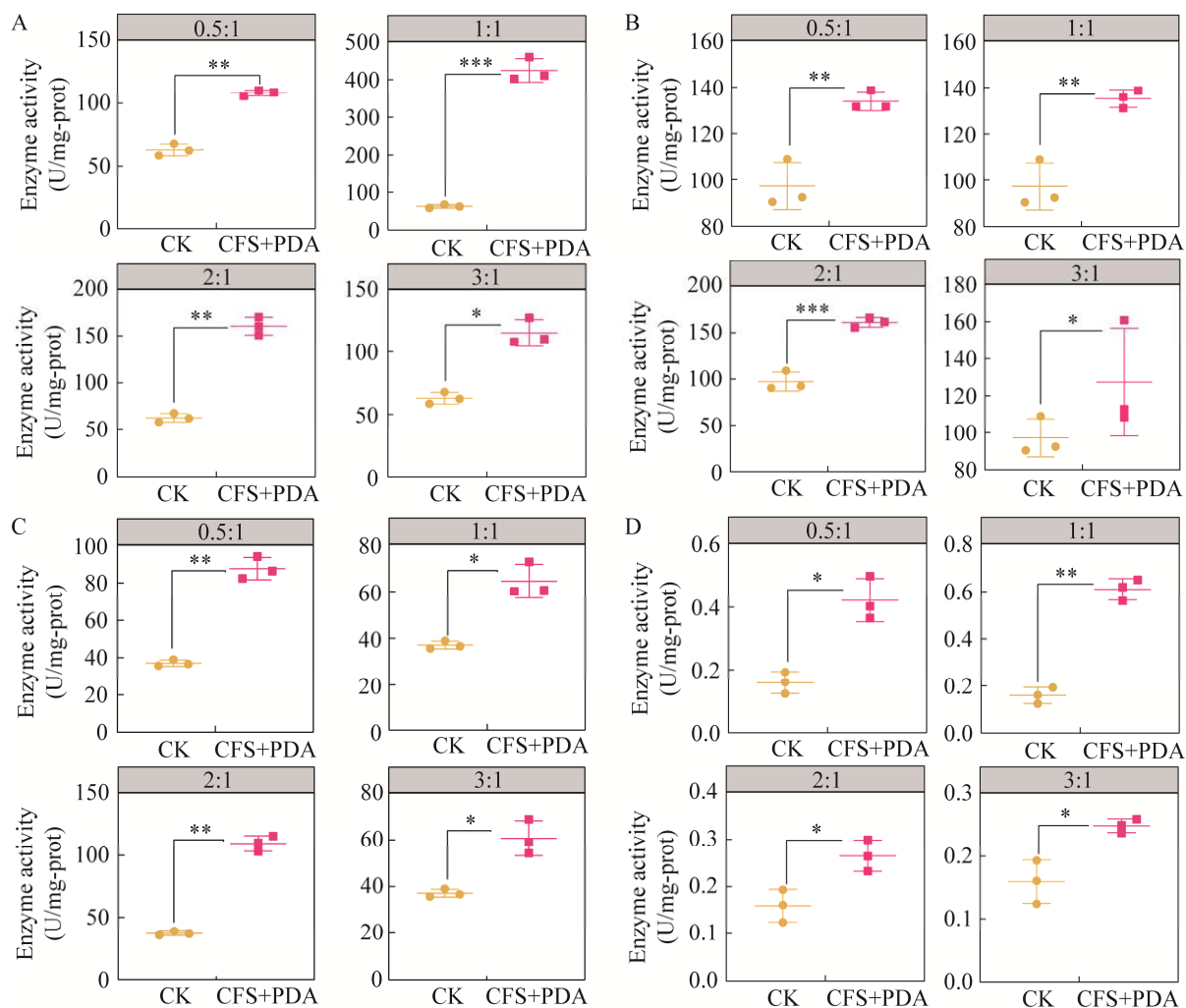


图3 菌株 J4 诱导 Fon 菌丝活性氧积累 A: 共培养平板(C: Fon 被完全抑制的无菌区; U: 抑菌区). B: 共聚焦显微镜下观察 U 区的 Fon 菌丝的 ROS 积累. C: 共聚焦显微镜下观察对照区的 Fon 菌丝的 ROS 积累

Figure 3 The J4 strain induces the accumulation of reactive oxygen species in Fon mycelia. A: Co-cultured plates of strain J4 and Fon (C: Fon is completely inhibited sterile area; U: Sterilization area). B: ROS production of Fon mycelia in the U region is observed under confocal microscopy. C: ROS production of Fon mycelia in the control is observed under confocal microscopy.



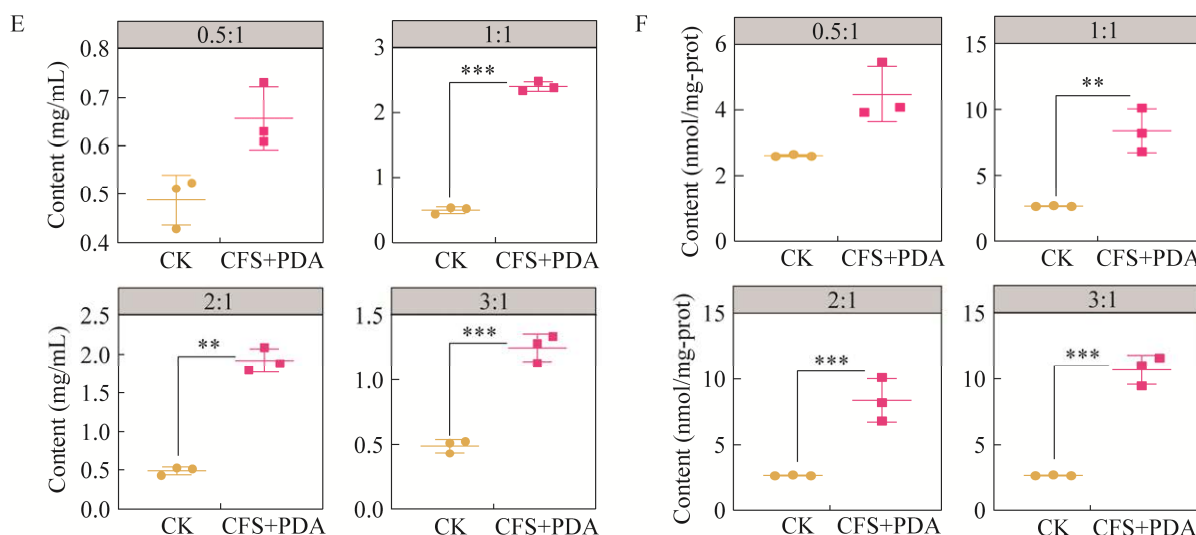


图4 菌株J4不同浓度的CFS对Fon菌丝抗氧化酶活性、可溶性蛋白和丙二醛含量的影响 A-D: 抗氧化酶活性(分别为CAT、POD、SOD和GR). E: 可溶性蛋白含量. F: 丙二醛含量. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$

Figure 4 Effects of different concentrations CFS from strain J4 on antioxidant enzyme activities, content of soluble protein and MDA in Fon mycelia. A-D: Antioxidant enzyme activities (CAT, POD, SOD and GR, respectively). E: Content of soluble protein. F: MDA content. *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$.

2.7 Fon孢子形态和膜完整性对拮抗菌株J4的CFS的响应

如图5A-5C所示, SEM观察发现, 阴性对照中Fon孢子表面光滑无凹陷(图5B), 阳性对照和J4 CFS处理的Fon孢子表面皱缩凹陷、畸形扭曲, 经J4的CFS处理后的Fon孢子表面凹陷程度要大于两性霉素B处理后的Fon孢子(图5A、5C)。说明菌株J4的CFS对Fon孢子形态的破坏性更大。CLSM观察结果如图5D、5E所示, 经J4的CFS处理后, 部分孢子显示黄色荧光, 部分孢子显示红色荧光, 说明部分孢子的膜结构受到损伤, 部分孢子的膜结构被严重破坏且引起孢子死亡(图5D), 表明菌株J4的CFS对Fon孢子膜完整性造成不同程度的损伤; 阴性对照中的Fon孢子显示绿色荧光, 说明Fon孢子膜结构完整(图5E); 经两性霉素B处理后的部分孢子显示黄色荧光, 部分显示绿色荧光, 无孢子呈现红色荧光(图5F), 说明经两性霉素B

处理后部分孢子的膜结构受到损伤。

2.8 菌株J4上清液抑菌活性成分分析

通过LC-MS在菌株发酵上清液中鉴定出丙二酸(malonic acid)、咪唑啉(imidaprilat)、钙三酸(calcitric acid)、埃博霉素(epothilone) A、恶唑并[5,4-B]吡啶(oxazolo[5,4-B]pyridine)、N-乙酰氨基甲酸酯(N-acetylmuramate)、表面活性素(surfactin) A和9-羟基癸酰肉碱(9-hydroxydecanoylcarnitine)等与抗菌有关的物质, 以上活性物质在CK组(不含菌株J4的LB培养基)中均不存在, 并且菌株J4上清液代谢物峰面积显著高于基础培养基LB发酵上清液(图6A)。通过LC-MS在菌株J4发酵上清液和培养基中均鉴定到7-O-琥珀酰大内酰胺(7-O-succinyl macrolactin) A、毛里塔尼亚(mauritine) A、芬吉松(fungizone)、多粘菌素(polymyxin)、林可霉素(lincomycin)、富米特霉素(fumitremorgin) B、硫酸西索霉素(sisomicin sulfate)、去甲基亚硝胺(desmethylenylnocardamine)、庆大

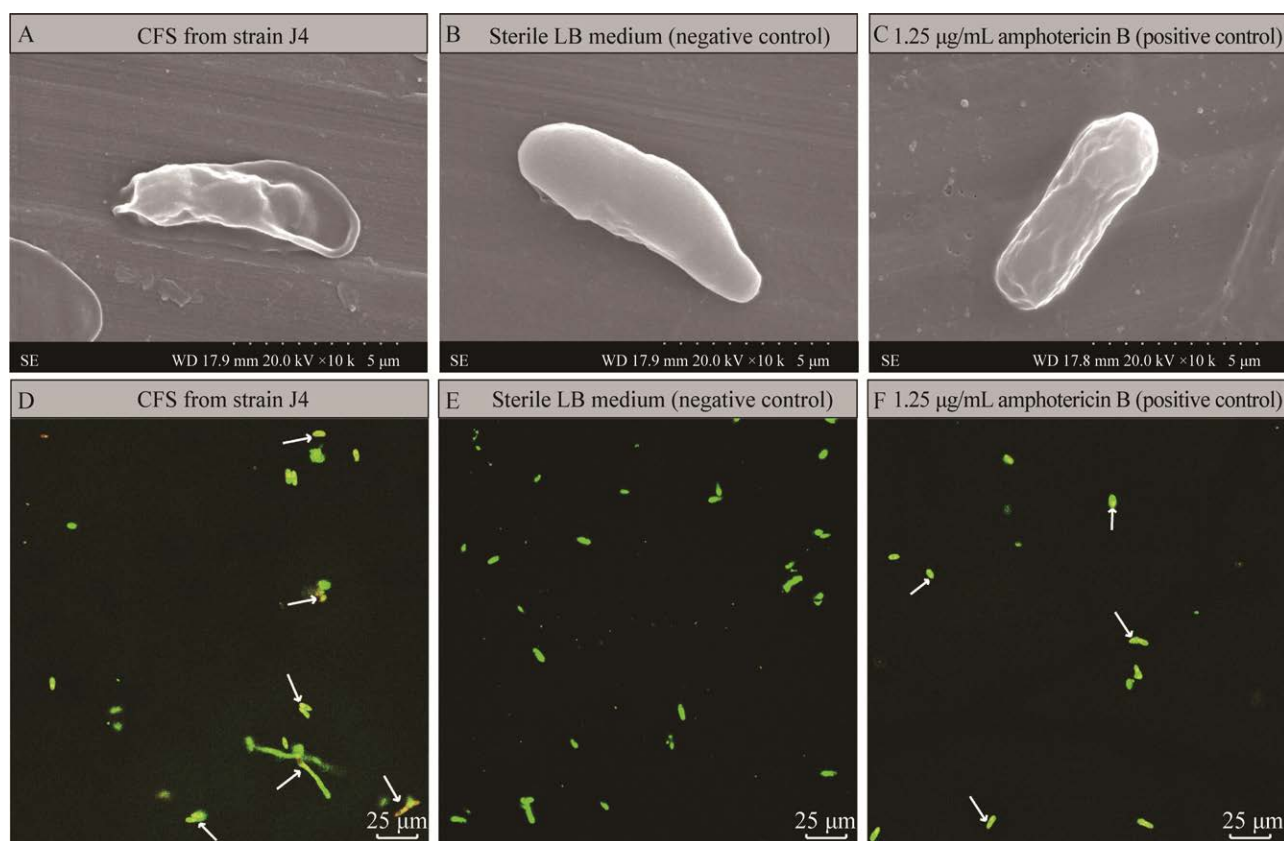


图 5 Fon 孢子形态和膜完整性对菌株 J4 的 CFS 的响应 A–C: 暴露于菌株 J4 CFS (A)、无菌 LB 培养液(B)和两性霉素 B (C)下 Fon 孢子微观形态的扫描电镜观察. D–F: 菌株 J4 的 CFS (D)、无菌 LB 培养液(E)和两性霉素 B (F)对 Fon 膜完整性的影响

Figure 5 Response of morphology and membrane integrity of Fon conidia to CFS from strain J4. A–C: Scanning electron microscopy (SEM) images of Fon conidia exposed to CFS from strain J4 (A), sterile LB medium (B) and amphotericin B (C). D–F: Effects of CFS from strain J4 (D), sterile LB medium (E) and amphotericin B (F) on the integrity of Fon membrane.

霉素(gentamicin) C、甜菊糖苷(stevioside)和环己酰亚胺(cycloheximide)等与抗菌有关的活性物质, 推测 LB 培养基原料在制作前可能被其他的细菌污染过(图 6B), 然而在菌株 J4 发酵后这些产物增加, 说明菌株 J4 能分泌上述这些物质。

2.9 抑制 Fon 物质的确定

结合全基因组学与代谢组学数据分析购买 6 种标准品, 结果表明, 放线菌酮(cycloheximide)浓度为 1.0 mg/mL 时对 Fon 的菌丝生长有明显的抑制作用(图 7A), 0.1、0.2 和 1.0 mg/mL 丰

原素(fengycin)、伊枯草菌素(iturin) A 和表面活性素(surfactin)均对 Fon 菌丝生长抑制作用, 但当其浓度为 1.0 mg/mL 时对 Fon 菌丝生长抑制作用最显著, 抑菌率分别为 60.96%、44.20%和 65.09% (图 7B–7D), 而丙二酸(malonic acid)和 N-乙酰氨基甲酸酯(N-acetylmuramate)不能抑制 Fon 的菌丝生长(图 7E、7F)。

2.10 菌株 J4 分泌抗真菌化合物的鉴定

通过对基因组数据挖掘, 在 J4 基因组中共发现 13 个代谢产物基因簇, 为进一步鉴定菌株 J4 的抗真菌化合物, 通过 UHPLC-ESI-MS/MS

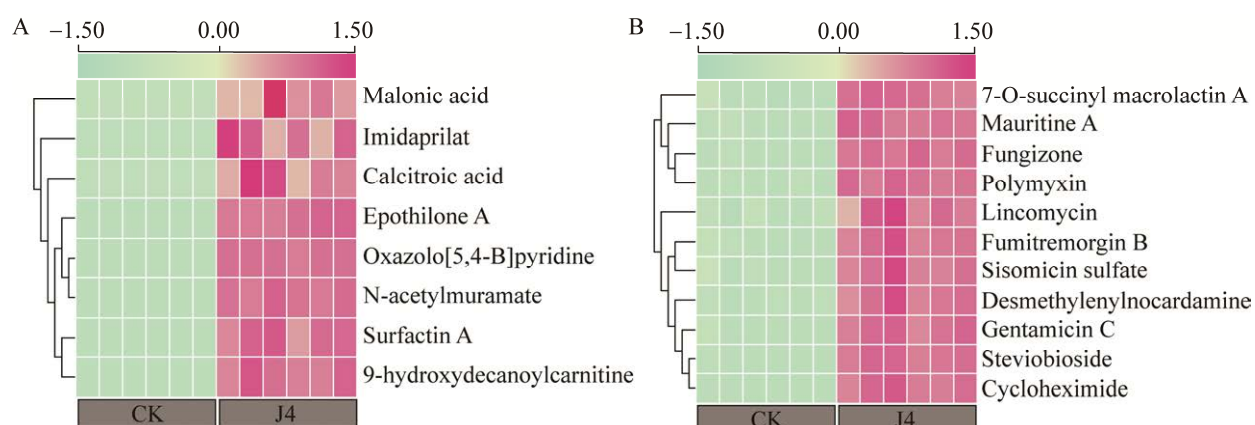


图 6 菌株 J4 分泌的抑菌物质 A: 抑菌物质仅存在于菌株 J4 的上清液中. B: 抑菌物质存在于 LB 培养基和菌株 J4 的上清液中

Figure 6 Antimicrobial substances secreted by strain J4. A: The antimicrobial substances existed only in the strain J4 CFS. B: The antimicrobial substances existed in the LB medium and strain J4 CFS.

检测菌株 J4 的 CFS。在菌株 J4 CFS 中检测到 m/z 值分别为 1 043.547 6、1 463.800 2 和 1 036.688 2 的离子, 分别属于伊枯草菌素(iturin) A、丰原素(fengycin)和表面活性素(surfactin); 未检测到 m/z 值为 282.168 7 的放线菌酮(cycloheximide) (图 8A、8B)。

3 讨论

芽孢杆菌是农业上很有潜力的生物防治剂, 不仅能促进植物的生长, 还能增强植物的抗病力, 在可持续的农业生产中具有良好的应用前景^[28]。暹罗芽孢杆菌产生的 macrolactin R 抑制草莓病原菌(葡萄孢杆菌)的生长, 可作为草莓病原菌(葡萄孢杆菌)的生防制剂^[29]。贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) N46 对苦瓜白粉病的防治效果达到 59%; 莫哈韦芽孢杆菌(*B. mojavensis*) 对梨树腐烂病的生物防治效果为 44.6%^[30-31]。本研究盆栽试验发现, 甲基营养性芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*) J4 对西瓜枯萎病菌有较强的抑制作用, 能显著降低西瓜枯萎病的发病率, 防治效果为 72.6%, 这一结果为其生产和后续

研究提供了依据。

据报道, 过量的 ROS 会对丝状真菌造成损伤, 通过细胞内蛋白质失活和脂质过氧化导致线粒体老化和细胞程序性死亡^[32], 在菌株 J4 与 *Fon* 共培养平板中, 可见明显的无菌区(C 区)和抑菌区(U 区), 并且菌株 J4 刺激了 U 区 *Fon* 菌丝细胞的 ROS 积累, 这可能导致氧化胁迫^[10,33]。有研究表明, 脂肽类化合物如 iturin、fengycin 和 bacillomycin D 通过诱导 ROS 积累导致真菌细胞死亡^[12,34]。结合共聚焦显微镜观察结果, 说明氧化胁迫可能是造成共培养时 *Fon* 菌丝生长受到抑制的原因之一(图 3B、3C)。ROS 扰乱细胞氧化还原稳态并产生氧化胁迫, 引起生物损伤, 真菌可以通过多种机制来抵抗 ROS 的毒性, 分泌抗氧化酶是一种重要的细胞内防御机制^[35]。CAT、POD、SOD 和 GR 是广泛存在于微生物中的防御酶, 在氧化应激过程中对清除活性氧起着关键作用^[36]。本研究结果表明, 暴露于菌株 J4 的 CFS 下 *Fon* 菌丝体中的 SOD、CAT、GR 和 POD 酶活性水平显著增加(图 4A-4D), 这种增加被认为是对 ROS 积累的一种适应性反

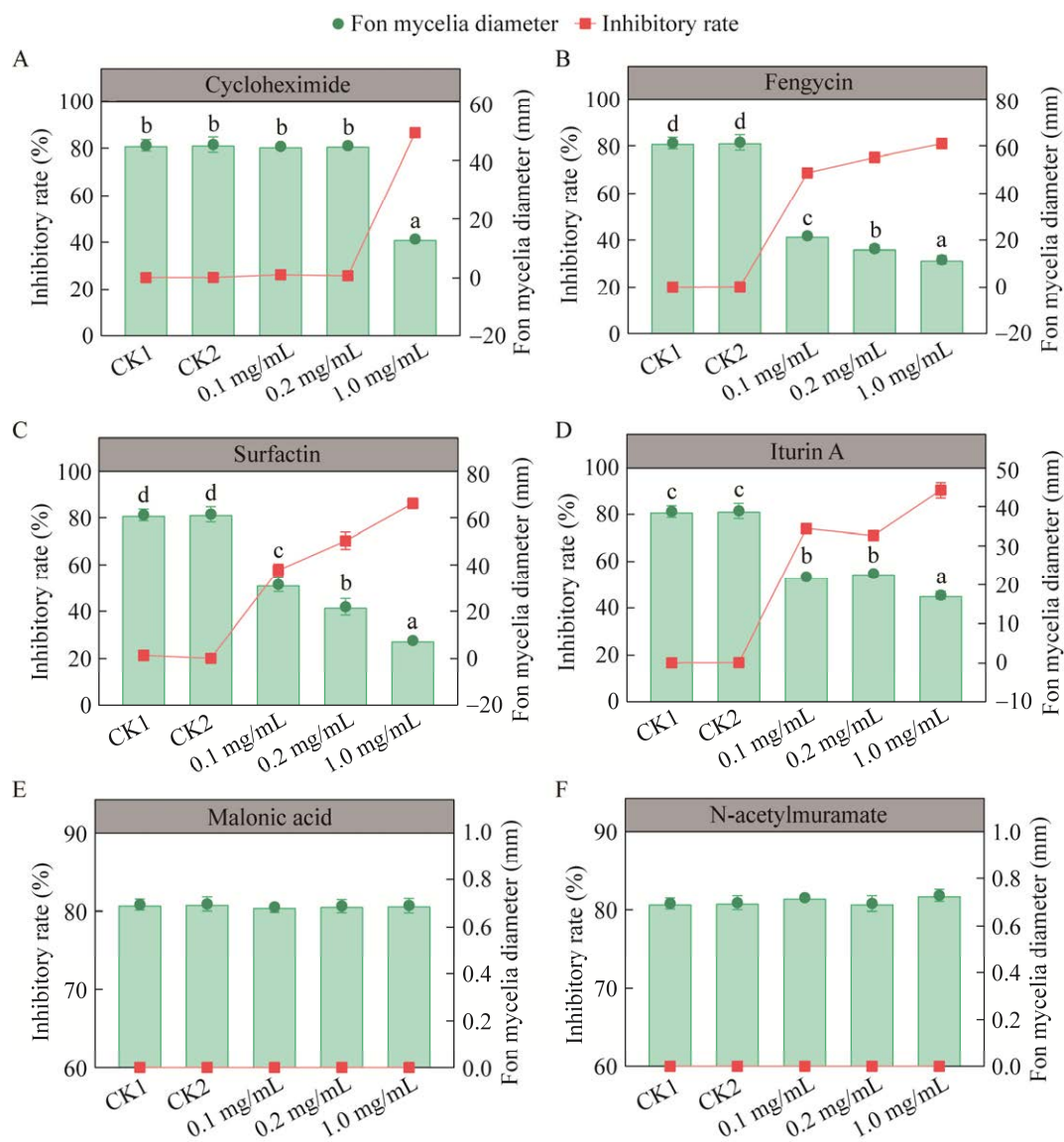
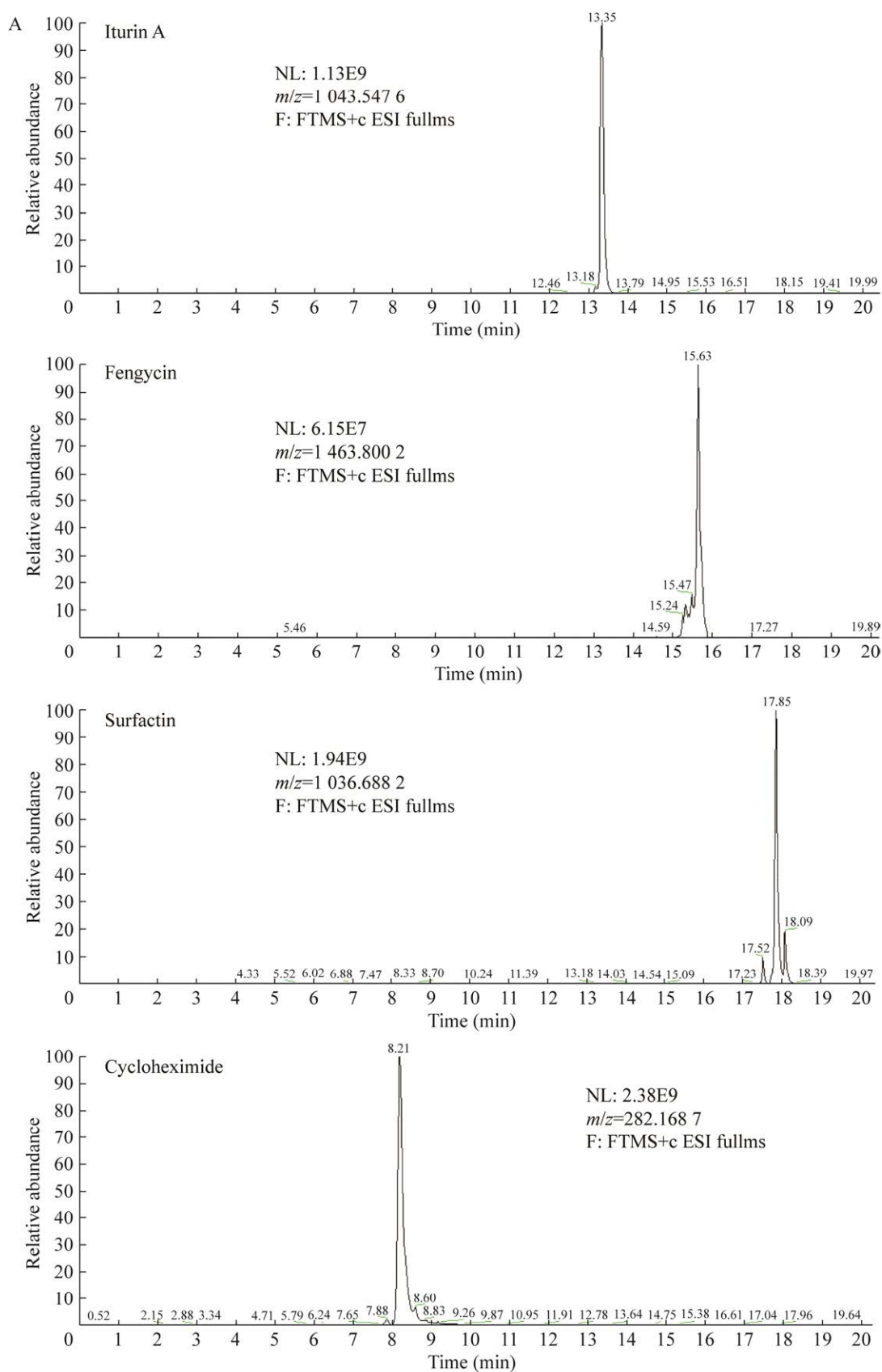


图7 六种标准品对 *Fon* 菌丝生长的影响 A-F 分别为放线菌酮(cycloheximide)、丰原素(fengycin)、表面活性素(surfactin)、伊枯草菌素 A (iturin A)、丙二酸(malonic acid)和 N-乙酰氨基甲酸酯(N-acetylmuramate)对 *Fon* 菌丝生长的影响($P < 0.05$)

Figure 7 Effects of six standard products on growth of *Fon* mycelia. A-F represents the effects of cycloheximide, fengycin, surfactin, iturin A, malonic acid, and N-acetylmuramate on growth of *Fon* mycelia, respectively ($P < 0.05$).

应^[37]。如图 4E 所示,可溶性蛋白含量的升高说明 *Fon* 菌丝通过增加细胞中可溶性蛋白含量,提高细胞的渗透压,进而提高细胞对 CFS 胁迫的抗性。此结果与 Yin 等^[37]和 Halifu 等^[38]报道

的真菌在胁迫下的反应相似;过多的 ROS 会攻击生物膜中的不饱和脂肪酸,造成脂质过氧化,形成脂质过氧化物 MDA,从而使 MDA 的含量升高^[11]。研究发现 MDA 的含量明显增加(图 4F),



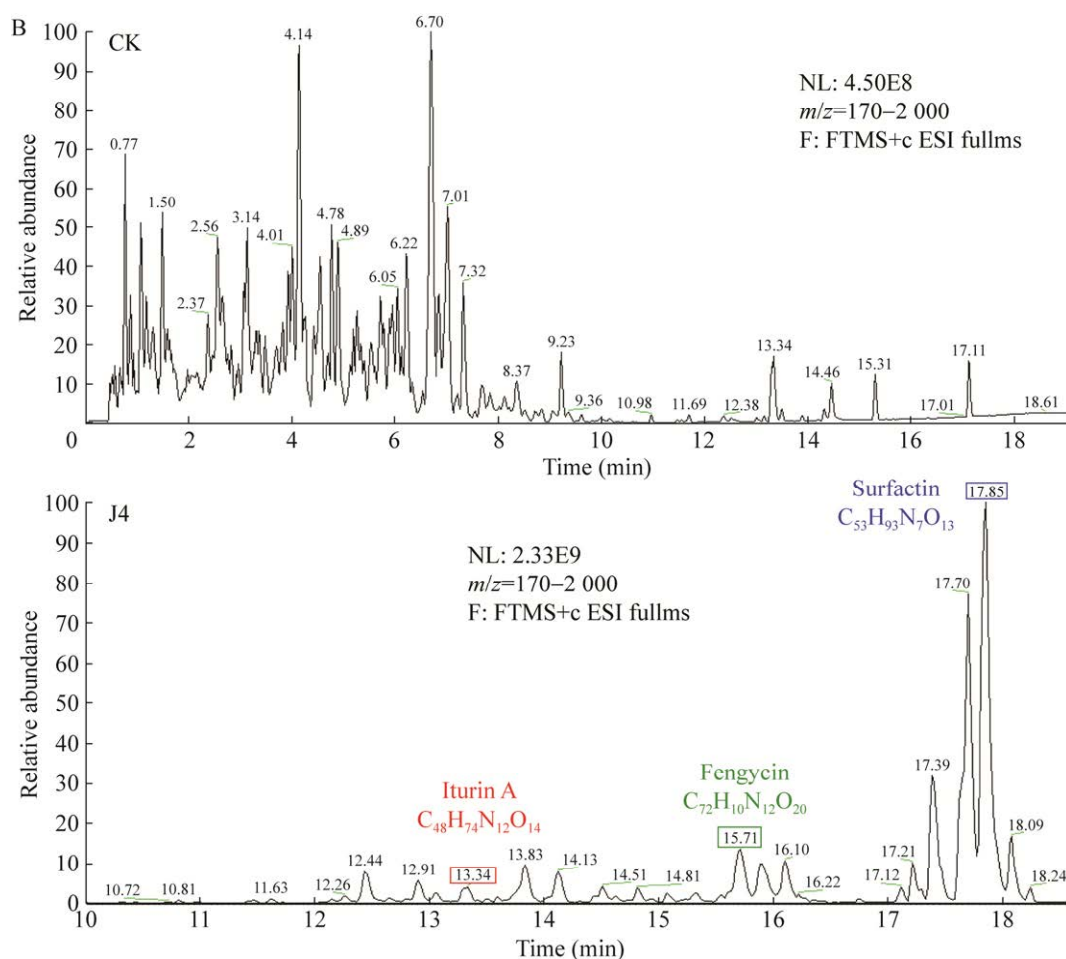


图 8 四种代谢产物在菌株 J4 CFS 中的 UPLC-MS 分析 A: 4 种标准品. B: 菌株 J4 CFS 的液质分析
Figure 8 UPLC-MS analysis of four metabolites from strain J4 CFS. A: Four standard substances. B: UPLC-MS analysis of CFS from strain J4.

表明 Fon 暴露于菌株 J4 的 CFS 下,菌丝体发生了脂质氧化的现象;同时,利用 J4 的 CFS 对西瓜枯萎病菌的抑制率($P<0.05$)进行评估(图 1),结果显示 J4 的 CFS 对 Fon 具有较强的抑制作用,其抑菌率可以达到 71.87%,表明 J4 的 CFS 中含有抑制 Fon 生长的功能物质,这些功能物质可能导致 Fon 细胞 ROS 累积,造成氧化损伤,从而抑制 Fon 的生长。

J4 中的 CFS 可使 Fon 孢子表面凹陷,破坏细胞膜的完整性,造成细胞死亡(图 5)。据报道,多数抗菌物质的靶标是病原菌细胞膜,溶解细

胞膜导致病原菌死亡^[39], Li 等^[40]发现抗菌物质直接与病原菌细胞膜作用,增强膜的渗透性引起细胞死亡,芽孢杆菌分泌的脂肽类对植物病原真菌具有抑菌活性^[41-42],通常将其分为 surfactin、iturin 和 fengycin 这三大类,并以各种各样异构体的形式出现^[43]; surfactin 是一种强力的生物表面活性剂,具有抗病毒和抑菌活性,Shan 等^[44]研究发现 surfactin 通过破坏细胞壁和细胞膜有效地抑制了痤疮杆菌(*Propionibacterium acnes*)的生长; fengycin 对丝状真菌有较强的抑制活性, *B. velezensis* FZB42 产生的 fengycin 具有抑

制镰刀菌的生物防治潜力,并且可以抑制该真菌产生的毒素,降低致病力^[45];从枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) WL-2 中提取的 iturin A 可以通过诱导细胞氧化应激、损伤线粒体并破坏其细胞结构抑制马铃薯晚疫病的发生^[46]。本研究发现, surfactin、iturin A 和 fengycin 对 Fon 菌丝存在抑制作用,且通过 UHPLC-ESI-MS/MS 在菌株 J4 次级代谢产物中检测到 iturin A、fengycin 和 surfactin 这 3 种次级代谢产物(图 7 和图 8),此结果与 Wang 等^[25]报道的 *B. velezensis* WB 的次生代谢产物通过触发氧化应激而对 Fon 显示出抗真菌作用的结果相似。fengycin、iturin A 和 surfactin 在 J4 CFS 中的含量以及菌株 J4 抑制西瓜枯萎病机制还需要进一步研究。

4 结论

本研究从健康西瓜根际中分离到一株优良的拮抗 Fon 的菌株 J4,该菌株可产生蛋白酶、淀粉酶、葡聚糖酶和纤维素酶并有分泌铁载体的能力,其衰亡期的 CFS 对 Fon 菌落生长抑制率为 71.87%,其对西瓜枯萎病的防治效果为 72.6%,经全基因组学鉴定为 *Bacillus methylotrophicus*。菌株 J4 的 CFS 可使 Fon 孢子表面凹陷,破坏细胞膜的完整性,造成细胞死亡,还能诱导 Fon 菌丝体 ROS 的积累,引发氧化应激反应,使 SOD、CAT、POD、GR 活性及 MDA、可溶性蛋白含量升高。经 LC-MS 非靶代谢组学、超高液相色谱系统和高分辨率质谱(UHPLC-ESI-MS/MS)分析及抑菌功能验证,明确了丰原素(fengycin)、伊枯草菌素 A (iturin A)和表面活性素(surfactin)在 J4 菌株抑制 Fon 生长中起着很重要的作用。

REFERENCES

- [1] HERMAN MA, NAULT BA, SMART CD. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York[J]. Crop Protection, 2008, 27(6): 996-1002.
- [2] SAIRANEN I, NOVÁK O, PĚNČÍK A, IKEDA Y, JONES B, SANDBERG G, LJUNG K. Soluble carbohydrates regulate auxin biosynthesis via PIF proteins in *Arabidopsis*[J]. The Plant Cell, 2012, 24(12): 4907-4916.
- [3] NAUTIYAL CS, SRIVASTAVA S, CHAUHAN PS, SEEM K, MISHRA A, SOPORY SK. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress[J]. Plant Physiology and Biochemistry: PPB, 2013, 66: 1-9.
- [4] CHOWDHURY SP, HARTMANN A, GAO XW, BORRIS R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 780.
- [5] LI SP, XIAO QL, YANG HJ, HUANG JG, LI Y. Characterization of a new *Bacillus velezensis* as a powerful biocontrol agent against tomato gray mold[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2022, 187: 105199.
- [6] RADHAKRISHNAN R, SATHASIVAM R, RENGARAJAN R, HASHEM A, ALLAH EFA. Isolation and identification of charcoal rot disease causing agent in sesame (*Sesamum indicum* L.) and their growth inhibition by *Bacillus methylotrophicus* KE2[J]. Pakistan Journal of Botany, 2017, 49(6): 2495-2497.
- [7] CARVALHAIS LC, DENNIS PG, FAN B, FEDOSEYENKO D, KIERUL K, BECKER A, von WIREN N, BORRIS R. Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions[J]. PLoS One, 2013, 8(7): e68555.
- [8] RAMÍREZ V, MARTÍNEZ J, BUSTILLOS-CRISTALES MDR, CATAÑEDA-ANTONIO D, MUNIVE JA, BAEZ A. *Bacillus cereus* MH778713 elicits tomato plant protection against *Fusarium oxysporum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(1): 470-482.
- [9] LI Q, HARVEY LM, MCNEIL B. Oxidative stress in industrial fungi[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2009, 29(3): 199-213.
- [10] MASSAWE VC, HANIF A, FARZAND A, MBURU DK, OCHOLA SO, WU LM, TAHIR HAS, GU Q, WU

- HJ, GAO XW. Volatile compounds of endophytic *Bacillus* spp. have biocontrol activity against *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Phytopathology*, 2018, 108(12): 1373-1385.
- [11] TSIKAS D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: analytical and biological challenges[J]. *Analytical Biochemistry*, 2017, 524: 13-30.
- [12] GU Q, YANG Y, YUAN QM, SHI GM, WU LM, LOU ZY, HUO R, WU HJ, BORRIS R, GAO XW. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant-pathogenic fungus *Fusarium graminearum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(19): e01075-e01017.
- [13] RABBE MF, ALI MS, CHOI J, HWANG BS, JEONG SC, BAEK KH. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes[J]. *Molecules* (Basel, Switzerland), 2019, 24(6): 1046.
- [14] BELBAHRI L, CHENARI BOUKET A, REKIK I, ALENEZI FN, VALLAT A, LUPTAKOVA L, PETROVOVA E, OSZAKO T, CHERRAD S, VACHER S, RATEB ME. Comparative genomics of *Bacillus amyloliquefaciens* strains reveals a core genome with traits for habitat adaptation and a secondary metabolites rich accessory genome[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1438.
- [15] TUMBARSKI Y, DESEVA I, MIHAYLOVA D, STOYANOVA M, KRASTEV L, NIKOLOVA R, YANAKIEVA V, IVANOV I. Isolation, characterization and amino acid composition of a bacteriocin produced by *Bacillus methylotrophicus* strain BM47[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2018, 56(4): 546-552.
- [16] SHAN HY, ZHAO MM, CHEN DX, CHENG JL, LI J, FENG ZZ, MA ZY, AN DR. Biocontrol of rice blast by the phenaminomethylacetic acid producer of *Bacillus methylotrophicus* strain BC79[J]. *Crop Protection*, 2013, 44: 29-37.
- [17] 杨杰. 枯草杆菌 fmb60 的 NRPS 和 I 型 PKS 基因簇代谢产物发掘及其生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2017.
- YANG J. Genomics-driven discovery of NRPS and Type I PKS metabolites from *Bacillus subtilis* fmb60 and their bioactivity[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [18] 赵燕妮, 余瑞, 刘欢, 王永波. 功能代谢组学技术在微生物研究中的应用[J]. *微生物学报*, 2023, 63(8): 3009-3025.
- ZHAO YN, YU R, LIU H, WANG YB. Application of functional metabolomics in microbiological studies[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(8): 3009-3025 (in Chinese).
- [19] 李苏冉, 李雪, 冯佳霖, 赵江琦, 黄磊. 生防菌解淀粉芽孢杆菌 SQ-2 全基因组测序及生物信息学分析[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(3): 1073-1097.
- LI SR, LI X, FENG JL, ZHAO JQ, HUANG L. Whole genome sequencing and genomics analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* SQ-2 with biocontrol activity[J]. *Microbiology China*, 2023, 50(3): 1073-1097 (in Chinese).
- [20] 徐伟慧, 王恒煦, 赵井明, 王志刚, 王可昕. 西瓜枯萎病拮抗菌筛选及其拮抗性研究[J]. *农业生物技术学报*, 2019, 27(12): 2238-2247.
- XU WH, WANG HX, ZHAO JM, WANG ZG, WANG KX. Antagonistic properties screening of antagonistic bacteria against *Fusarium wilt* of watermelon (*Citrullus lanatus*) and its antagonistic properties[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2019, 27(12): 2238-2247 (in Chinese).
- [21] 刘海洋, 王琦, 王伟, 张仁福, 韩万里, 姚举. 拮抗菌 AL7 的鉴定及其生防特性的初步研究[J]. *植物保护*, 2018, 44(2): 53-60.
- LIU HY, WANG Q, WANG W, ZHANG RF, HAN WL, YAO J. Species identification and biocontrol characteristics of antagonistic bacterium AL7[J]. *Plant Protection*, 2018, 44(2): 53-60 (in Chinese).
- [22] 荣良燕, 姚拓, 赵桂琴, 柴强, 席琳乔, 王小利. 产铁载体 PGPR 菌筛选及其对病原菌的拮抗作用[J]. *植物保护*, 2011, 37(1): 59-64.
- RONG LY, YAO T, ZHAO GQ, CHAI Q, XI LQ, WANG XL. Screening of siderophore-producing PGPR bacteria and their antagonism against the pathogens[J]. *Plant Protection*, 2011, 37(1): 59-64 (in Chinese).
- [23] 徐伟慧, 吴凤芝, 王志刚, 孙国雁, 徐红红. 连作西瓜光合特性及抗病性对小麦伴生的响应[J]. *中国生态农业学报*, 2014, 22(6): 655-660.
- XU WH, WU FZ, WANG ZG, SUN GY, XU HH. Response of photosynthetic characteristics and disease resistance of watermelon to companion with wheat[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2014, 22(6): 655-660 (in Chinese).
- [24] WANG KX, XU WH, CHEN ZN, HU JL, LUO SQ

- AND WANG ZG. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* WB, an isolate from the watermelon rhizosphere: genomic insights into its antifungal effects[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2022, 30: 442-444.
- [25] WANG KX, WANG ZG, XU WH. Induced oxidative equilibrium damage and reduced toxin synthesis in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* by secondary metabolites from *Bacillus velezensis* WB[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2022, 98(8): fiac080.
- [26] WANG HX, WANG ZG, XU WH, WANG KX. Comprehensive transcriptomic and proteomic analyses identify intracellular targets for myriocin to induce *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* cell death[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 1-15.
- [27] BENITEZ LB, VELHO RV, LISBOA MP, da COSTA MEDINA LF, BRANDELLI A. Isolation and characterization of antifungal peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* LBM5006[J]. The Journal of Microbiology, 2010, 48(6): 791-797.
- [28] SUN M, MENG XG, PENG TL, HU XH. Effect of *Bacillus methylotrophicus* on tomato plug seedling[J]. Horticulturae, 2022, 8(10): 947.
- [29] NI J, YU L, LI F, LI YL, ZHANG MF, DENG YP, LIU XL. Macrolactin R from *Bacillus siamensis* and its antifungal activity against *Botrytis cinerea*[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2023, 39(5): 117.
- [30] 项佳胤, 商桑, 田丽波. 贝莱斯芽孢杆菌 N46 对苦瓜白粉病的防治机理研究[J]. 热带作物学报, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1019.S.20230629.1530.002.html>.
- XIANG JY, SHANG S, TIAN LB. Study on the control mechanism of *Bacillus velezensis* N4 against powdery mildew of bitter melon[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2023. <https://kns.cnki.net/kcms2/detail/46.1019.S.20230629.1530.002.html> (in Chinese).
- [31] 刘龙, 荣华, 郑童童, 马俊杰, 郭庆元. 莫海威芽孢杆菌对梨腐烂病的抑菌防病效果[J]. 中国农学通报, 2022, 38(18): 140-146.
- LIU L, RONG H, ZHENG TT, MA JJ, GUO QY. Antifungal and control effect of *Bacillus mojavensis* on pear *Valsa* canker[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2022, 38(18): 140-146 (in Chinese).
- [32] VENICE F, PINTO MC, NOVERO M, GHIGNONE S, SALVIOLI A, BONFANTE P. *Gigaspora margarita* with and without its endobacterium shows adaptive responses to oxidative stress[J]. Mycorrhiza, 2017, 27(8): 747-759.
- [33] KAZEK M, KACZMAREK A, WRÓŃSKA AK, BOGUŚ MI. *Conidiobolus coronatus* induces oxidative stress and autophagy response in *Galleria mellonella* larvae[J]. PLoS One, 2020, 15(2): e0228407.
- [34] FARZAND A, MOOSA A, ZUBAIR M, KHAN AR, MASSAWE VC, TAHIR HAS, SHEIKH TMM, AYAZ M, GAO XW. Suppression of *Sclerotinia sclerotiorum* by the induction of systemic resistance and regulation of antioxidant pathways in tomato using fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 613.
- [35] 燕霞飞, 郑长英, 李凯月, 万方浩, 王俊平. 球孢白僵菌在重金属 Cd(II)作用下抗氧化酶系变化[J]. 环境昆虫学报, 2017, 39(5): 992-999.
- YAN XF, ZHENG CY, LI KY, WAN FH, WANG JP. The effect of Cd(II) on antioxidant enzymes activity of *Beauveria bassiana*[J]. Journal of Environmental Entomology, 2017, 39(5): 992-999 (in Chinese).
- [36] SATO I, SHIMATANI K, FUJITA K, ABE T, SHIMIZU M, FUJII T, HOSHINO T, TAKAYA N. Glutathione reductase/glutathione is responsible for cytotoxic elemental sulfur tolerance via polysulfide shuttle in fungi[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(23): 20283-20291.
- [37] YIN DC, QI JY. The physiological response of Ectomycorrhizal fungus *Lepista sordida* to Cd and Cu stress[J]. PeerJ, 2021, 9: e11115.
- [38] HALIFU S, DENG X, SONG XS, SONG RQ, LIANG X. Inhibitory mechanism of *Trichoderma virens* ZT05 on *Rhizoctonia solani*[J]. Plants (Basel, Switzerland), 2020, 9(7): 912.
- [39] LI L, SHI YH, CHENG XR, XIA SF, CHESEREK MJ, LE GW. A cell-penetrating peptide analogue, P7, exerts antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC25922 via penetrating cell membrane and targeting intracellular DNA[J]. Food Chemistry, 2015, 166: 231-239.
- [40] LI Y, XIANG Q, ZHANG QH, HUANG YD, SU ZJ. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application[J]. Peptides, 2012, 37(2): 207-215.
- [41] CHEN L, HENG JY, QIN SY, BIAN K. A comprehensive understanding of the biocontrol

- potential of *Bacillus velezensis* LM2303 against *Fusarium* head blight[J]. PLoS One, 2018, 13(6): e0198560.
- [42] KIM YS, LEE Y, CHEON W, PARK J, KWON HT, BALARAJU K, KIM J, YOON YJ, JEON Y. Characterization of *Bacillus velezensis* AK-0 as a biocontrol agent against apple bitter rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Scientific Reports, 2021, 11: 626.
- [43] ZERIOUH H, ROMERO D, GARCÍA-GUTIÉRREZ L, CAZORLA FM, de VICENTE A, PÉREZ-GARCÍA A. 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.
- [44] SHAN MY, MENG FQ, ZHOU LB, LU FX, BIE XM, ZHAO HZ, LU ZX. Surfactin inhibits the growth of *Propionibacterium acnes* by destroying the cell wall and membrane[J]. Letters in Applied Microbiology, 2021, 73(6): 684-693.
- [45] HANIF A, ZHANG F, LI PP, LI CC, XU YJ, ZUBAIR M, ZHANG MX, JIA DD, ZHAO XZ, LIANG JG, MAJID T, YAN J, FARZAND A, WU HJ, GU Q, GAO XW. Fengycin produced by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 inhibits *Fusarium graminearum* growth and mycotoxins biosynthesis[J]. Toxins, 2019, 11(5): 295.
- [46] WANG YY, ZHANG CY, LIANG J, WU LF, GAO WB, JIANG JZ. Iturin A extracted from *Bacillus subtilis* WL-2 affects *Phytophthora infestans* via cell structure disruption, oxidative stress, and energy supply dysfunction[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 536083.