



桑树内生枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其对桑椹菌核病的生防机理

李燕^{1,2}, 欧婷^{1,2}, 焦文莲^{1,2}, 张克瑶^{1,2}, 刘晓姣^{1,2}, 谢洁^{1,2*}

1 西南大学 蚕桑纺织与生物质科学学院, 资源昆虫高效养殖与利用全国重点实验室, 重庆 400715

2 西南大学 蚕桑纺织与生物质科学学院, 农业农村部蚕桑生物学与遗传育种重点实验室, 重庆 400715

李燕, 欧婷, 焦文莲, 张克瑶, 刘晓姣, 谢洁. 桑树内生枯草芽孢杆菌的分离鉴定及其对桑椹菌核病的生防机理[J]. 微生物学报, 2024, 64(9): 3253-3268.

LI Yan, OU Ting, JIAO Wenlian, ZHANG Keyao, LIU Xiaojiao, XIE Jie. Isolation and identification of an endophytic *Bacillus subtilis* from mulberry and preliminary exploration of its biocontrol mechanisms against mulberry fruit sclerotinirose[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(9): 3253-3268.

摘要: 【目的】从菌核病抗性桑树品种中筛选具有生防潜力的内生拮抗菌, 为绿色防控桑椹菌核病提供优质菌种及有效策略。【方法】通过植物组织培养法及平板对峙培养法分离、筛选桑椹菌核病拮抗菌, 根据形态学特征、生理生化特征和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析对其进行菌种鉴定; 分析拮抗菌抑菌谱及离体防效, 评估其应用潜力; 通过观察拮抗菌发酵上清液对病原菌菌丝生长的影响, 检测拮抗菌作用后病原菌糖原和活性氧积累量变化, 并测定病原菌基因表达变化, 初步探究拮抗菌的抑菌机理。【结果】从健康桑枝中分离筛选出一株对桑椹菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) PZ-2 抑制作用强且稳定的内生细菌 C1R32, 其形态学和生理生化特征与芽孢杆菌一致, 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析显示该菌株与枯草芽孢杆菌聚在同一最小分支, 将其鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。 *B. subtilis* C1R32 对核盘菌在内的多种植物病原菌具有抑制作用; 桑椹菌核病离体防效实验结果表明, *B. subtilis* C1R32 菌悬液和发酵上清液处理组的防效分别为 52.94% 和 46.43%; 抑菌机理初探结果显示, *B. subtilis* C1R32 发酵上清液能使 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝膨大畸变, 细胞壁破裂, 胞质流出; 该菌可通过减少 *S. sclerotiorum* PZ-2 糖原积累、促进活性氧迸发, 影响其抗氧化相关基因的表达抑制病原菌。【结论】本研究从桑椹

资助项目: 国家自然科学基金(32371713); 西南大学大学生创新创业训练计划(X202310635221); 重庆市自然科学基金(CSTB2022NSCQ-MSX0536)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32371713), the Southwest University College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (X202310635221), and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTB2022NSCQ-MSX0536).

*Corresponding author. Tel: +86-23-68251701, E-mail: healthjie@163.com

Received: 2024-02-08; Accepted: 2024-06-12; Published online: 2024-06-14

菌核病抗性品种中分离获得一株内生枯草芽孢杆菌，并初步探究其拮抗机理，为桑椹菌核病生物防治提供了潜在菌种资源。

关键词：桑树；内生枯草芽孢杆菌；桑椹菌核病；鉴定；生防机理

Isolation and identification of an endophytic *Bacillus subtilis* from mulberry and preliminary exploration of its biocontrol mechanisms against mulberry fruit sclerotinose

LI Yan^{1,2}, OU Ting^{1,2}, JIAO Wenlian^{1,2}, ZHANG Keyao^{1,2}, LIU Xiaojiao^{1,2}, XIE Jie^{1,2*}

1 State Key Laboratory of Resource Insects, College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Key Laboratory of Sericultural Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Sericulture, Textile and Biomass Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: [Objective] To provide candidate strains and effective strategies for the control of mulberry fruit sclerotinose, we screened out the endophytic bacteria with biocontrol potential for mulberry fruit sclerotinose from a resistant mulberry cultivar. [Methods] The endophytic bacteria antagonistic to mulberry fruit sclerotinose were isolated from mulberry plants by the tissue culture and confrontation culture methods. The antagonistic strain was identified based on morphological features, physiological and biochemical characteristics, and the phylogenetic relationship based on 16S rRNA gene sequences. The antimicrobial spectrum and control efficiency to detached mulberry fruits were determined to evaluate the application potential of the antagonistic strain. Furthermore, we observed the inhibitory effect of the fermentation supernatant of the strain on the mycelial growth of the pathogen, measured the variations in glycogen and reactive oxygen species accumulation of the pathogen treated with the antagonistic strain, and determined the expression of pathogen-related genes after treatment with the antagonistic strain to decipher the antagonistic mechanism of this strain. [Results] An endophytic bacterial strain C1R32 with strong and stable antagonistic activity on *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2 (the pathogen of mulberry fruit sclerotinose) was isolated from a healthy mulberry branch. C1R32 showed similar morphological features and physiological and biochemical characteristics with *Bacillus*. The phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences revealed that C1R32 was located in the same clade with *B. subtilis*. Therefore, strain C1R32 was identified as *B. subtilis*. *B. subtilis* C1R32 had antagonistic activities against a variety of phytopathogens including *S. sclerotiorum*. The suspension and fermentation supernatant of *B. subtilis* C1R32 showed the control effects of 52.94% and 46.43%, respectively, on sclerotinose of detached mulberry fruits. The cell-free fermentation supernatant of *B. subtilis* C1R32 caused the hypha swelling and distorting, cell wall breaking, and cytoplasm leakage of *S. sclerotiorum* PZ-2. Moreover, *B. subtilis* C1R32 inhibited *S. sclerotiorum* PZ-2 by reducing glycogen accumulation, promoting reactive oxygen species

burst, and influencing the expression of genes associated with antioxidant activity. **[Conclusion]** We isolated an endophytic *B. subtilis* strain capable of controlling mulberry fruit sclerotinose from a resistant mulberry cultivar and preliminarily explored its antagonistic mechanism, providing potential strain resources for the biocontrol of mulberry fruit sclerotinose.

Keywords: mulberry; endophytic *Bacillus subtilis*; mulberry fruit sclerotinose; identification; biocontrol mechanism

桑树(*Morus L.*)是桑科桑属植物, 其果实桑椹为聚花果, 极具药用和经济价值。桑椹中的活性化合物具有抗氧化、清除自由基、降糖降脂降血压、调节肠道微生物群、防治肿瘤等功效^[1-4]。以桑椹为主的鲜果销售和系列加工产品为各地桑农带来可观的经济收益, 据统计, 重庆市 2015 年果桑项目产值 1 500 万元以上, 河南省 2019 年桑椹产值 3 亿元, 四川省攀枝花市截至 2021 年底桑果累计收入 1.71 亿元, 新疆维吾尔自治区阿克苏地区每年可实现桑椹收入 2.5 亿元^[5-8]。

桑椹菌核病是一种由桑实杯盘菌(*Ciboria shiraiana*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、桑椹核地杖菌(*Scleromitula shiraiana*)、肉阜状杯盘菌(*Ciboria carunculoides*)等病原真菌引起的桑椹病害, 根据病原菌与病症的不同, 可将桑椹菌核病分为肥大性菌核病、缩小性菌核病及小粒性菌核病^[9-13]。桑椹菌核病病原菌易于传播, 若不妥善处理土壤中的病果及菌核, 病原菌会逐年积累, 给桑椹菌核病防治带来巨大困难^[14]。桑椹菌核病的防治措施有化学防治、农业防治、物理预防和生物防治。化学防治效果好, 但存在农药残留、抗药性等问题; 农业防治和物理预防绿色环保, 但无法彻底清除病原菌, 而且防治效果有限^[15-17]。近年来, 生物防治因其绿色安全、高效持久等优点在桑椹菌核病防治方面备受关注。张健等^[18]的研究结果表明, 田间喷洒哈茨木霉发酵液对桑椹菌核病的防治效果可达 90%以上; Sultana 等^[19]报道一株苏云金芽孢杆菌(*B.*

thuringiensis) C25 在田间条件下可减轻由 *C. shiraiana* 引起的桑椹菌核病; 朱志贤等^[20]从桑椹中分离出一株贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) Wh-1, 其对 *S. shiraiana*、*C. carunculoides* 和 *C. shiraiana* 的抑菌率分别高达 100.00%、100.00% 和 63.15%。

枯草芽孢杆菌作为芽孢杆菌属的典型代表, 广泛分布于土壤、根际环境及植物各组织。近年来, 因其对菌核病具有良好的生防潜力而受到广泛关注。朱孔艳等^[21]分离鉴定到一株向日葵菌核病生防内生菌 *B. subtilis* Y116, 该菌株在盆栽试验中可抑制向日葵发病。Monteiro 等^[22]报道了一株对生菜菌核病有防治效果的 *B. subtilis*, 该菌株代谢物对 *S. sclerotiorum* 菌丝的生长有显著抑制作用。Cao 等^[23]分离鉴定到一株 *B. subtilis* RSS-1, 其 10^8 CFU/mL 悬浮液对油菜菌核病病原菌 *S. sclerotiorum* 的生物防治效果达到 89.6%。本课题组前期从健康桑树中分离获得对 *S. shiraiana* 具有生防潜力的内生枯草芽孢杆菌, 其展示了内生菌防治桑椹菌核病的巨大潜能^[12]。为获得对桑椹菌核病具有生防作用的优良菌株, 丰富菌剂开发的菌种资源, 本研究从桑树抗病品种‘川桑 7637’中分离鉴定对核盘菌具有良好拮抗效果的内生菌 *B. subtilis* C1R32, 通过测定其抑菌谱及离体防效, 并初步探究其抑菌机理, 综合评估 *B. subtilis* C1R32 防治桑椹菌核病的潜力, 为田间防治桑椹菌核病和开发生防制剂提供重要的菌种资源及研究基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物和病原菌

桑枝: 2022 年秋采自重庆市蚕业科学技术研究院(29°48'58"N, 106°24'51"E), 桑树品种为抗性品种‘川桑 7637’。

病原菌: *S. sclerotiorum* PZ-2 为本实验室分离保存, *Botryotinia fuckeliana*、*Colletotrichum gloeosporioides*、*Colletotrichum lagenarium*、灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、旋孢腔菌(*Cochiobolus sativus*)、*Thanatephorus cucumeri*、大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等为实验室收集保存菌株。

1.1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母粉 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 15.0–20.0。

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 15.0–20.0。

PDB 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0。

胰酪大豆胨琼脂(tryptone soya agar, TSA)培养基(g/L): 胰蛋白胨 15.0, 大豆胨 5.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0–20.0。

营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, NaCl 5.0, 琼脂 15.0–20.0。

R2A 琼脂培养基(g/L): 细菌蛋白胨 0.5, 可溶性淀粉 0.5, 酵母粉 0.5, 葡萄糖 0.5, 酸水解酪蛋白 0.5, KH₂PO₄ 0.3, 丙酮酸钠 0.3, MgSO₄ 0.024, 琼脂 15.0–20.0。

以上培养基均采用 121 °C 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂

KI-I₂ 染液: 60 mg/mL KI 溶液与 10 mg/mL I₂ 溶液以体积比 1:1 混合。

200 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸

(4-hydroxyethyl piperazine ethane sulfonic acid, HEPES)的配制: 用 1 mol/L NaOH 溶液将 1 mol/L HEPES 溶液 pH 调至 6.8–8.2, 向 20 mL 1 mol/L HEPES 中加入 80 mL 水, 得到 200 mmol/L HEPES。

1.2 桑树内生拮抗菌的分离及筛选

1.2.1 内生菌分离纯化

利用植物组织培养法^[12]分离内生菌, 具体方法: 取健康的‘川桑 7637’枝条, 剪至 5–6 cm 长, 置于 75%乙醇中浸泡 1–2 min, 取出后于酒精灯火焰上燃尽表面乙醇, 置于 PDA 培养基表面滚动数圈后 28 °C 条件下培养, 以验证表面灭菌是否彻底。随后用无菌刀片将其分三层, 分别置于 LB、TSA、NA、R2A 培养基上 28 °C 条件下培养, 待植物组织周围长出菌落后, 通过平板划线法分离纯化内生细菌。

1.2.2 桑椹菌核病拮抗菌初筛

利用平板对峙法^[24]筛选对 *S. sclerotiorum* PZ-2 有拮抗效果的内生菌。用打孔器取直径 8 mm 的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌饼, 接种于培养基中央, 在距中央 2.5 cm 处的 4 个方向分别划线接种不同内生菌, 28 °C 培养, 观察病原菌生长情况, 筛选对 *S. sclerotiorum* PZ-2 具有拮抗效果的内生菌。

1.2.3 桑椹菌核病拮抗菌复筛

对初筛拮抗效果较好的拮抗菌进行平板对峙法复筛。用打孔器取直径 5 mm 的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌饼, 接种于培养基中央, 在距中央 2 cm 两侧对称处划线接种拮抗菌, 以只接种病原菌的平板为对照, 25 °C 培养 4 d, 测量与待测细菌划线垂直方向的病原真菌菌落直径, 设置 3 个重复, 并按公式(1)计算抑菌率。

$$\text{抑菌率(\%)} = \frac{(\text{对照组菌落直径} - \text{实验组菌落直径})}{(\text{对照组菌落直径} - \text{菌饼直径})} \times 100 \quad (1)$$

1.3 桑椹菌核病拮抗菌的鉴定

1.3.1 形态学及生理生化特征鉴定

利用平板划线法将筛选获得的拮抗菌接种

于 PDA 和 LB 培养基上, 37 °C 培养 12 h, 观察其菌落形态。在 LB 上培养 24 h 和 48 h 后, 分别进行革兰氏染色和芽孢染色。生理生化特征检测采用新型微生物微量生化鉴定管试剂盒(广东环凯微生物科技有限公司)。

1.3.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

参照文献[25]的方法提取目的菌株基因组, 在 1.5 mL 离心管中加入 30 μ L DNA 提取液(PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent 试剂盒)(Applied Biosystems 公司), 挑取适量菌落与 DNA 提取液混合均匀, 100 °C 金属浴 10 min, 之后 12 000 r/min 离心 3 min, 取 20 μ L 上清液作为模板备用。

以目的菌株基因组为模板, 利用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT-3')扩增拮抗菌 16S rRNA 基因序列。PCR 反应体系: 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, 2 \times Rapid Taq Master Mix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 55 °C 15 s, 72 °C 30 s, 30 个循环。将 PCR 扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 将获得的基因序列在 NCBI 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行比对, 并利用 MEGA 5.0 软件基于 16S rRNA 基因序列构建系统发育树。

1.4 拮抗菌抑菌谱测定

以实验室保存的常见植物病原菌为靶标菌, 用打孔器取直径为 5 mm 的菌饼, 接种于培养基中央, 在距离中央 2 cm 处左右两侧接种拮抗菌, 每个处理设置 3 个重复, 25 °C 培养, 参照公式(1)计算抑菌率。

1.5 拮抗菌对桑椹菌核病的离体防效实验

参考文献[26-29]并微调后进行离体防效实验。

1.5.1 菌悬液及发酵上清液制备

挑取拮抗菌单菌落接种于 10 mL LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 培养过夜, 将种子液接种至 100 mL LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 培养过夜后, 将发酵液 12 000 r/min 离心 3 min 收集菌体, 用无菌水重悬到 OD_{600} 为 0.6 (10^8 CFU/mL) 制成菌悬液。

将拮抗菌接种到 LB 液体培养基, 37 °C、180 r/min 振荡培养 4 d, 取发酵液 12 000 r/min 离心 30 min 后, 上清液过 0.22 μ m 滤膜, 获得无菌发酵上清液。

1.5.2 离体防效实验

将新鲜桑椹置于 75%乙醇浸泡 20-30 s, 无菌水洗去乙醇, 无菌滤纸吸干水分; 无菌针头刺破桑椹后分别在纯水、LB 液体培养基、拮抗菌菌悬液、拮抗菌发酵上清液、甲基硫菌灵(稀释 750 倍)中浸泡 30 min, 取出置于培养皿自然晾干, 取 3 块直径为 8 mm 的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌饼接种在桑椹上针头刺破处, 保鲜膜包裹后放入组培瓶, 室温(15-20 °C)静置培养^[26]。每个处理设置 5 个生物学重复, 每个生物学重复包含 5 个桑椹。室温培养 2 d 后取下保鲜膜^[27], 去除菌饼, 观察记录并按公式(2)^[28]计算病情指数, 菌悬液处理组和甲基硫菌灵以纯水为对照, 发酵上清液处理组以 LB 液体培养基为对照, 均按公式(3)计算防效^[29]。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级病果数} \times \text{发病等级数值})}{(\text{总果数} \times \text{最高发病等级数值})} \times 100 \quad (2)$$

$$\text{防效}(\%) = \frac{[(\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}) / \text{对照组病情指数}] \times 100}{\quad} \quad (3)$$

根据处理后桑椹发病时的表面菌丝覆盖率, 将发病桑椹进行分级: 0 级, 无发病桑椹; 1 级, 桑椹表面菌丝覆盖率 0%-25%; 2 级, 桑椹表面菌丝覆盖率 25%-50%; 3 级, 桑椹表面菌丝覆

盖率 50%–75%；4 级，桑椹表面菌丝覆盖率 75%–100%。

1.6 拮抗菌抑菌机理初探

1.6.1 拮抗菌发酵上清液对病原菌菌丝生长抑制作用

将拮抗菌接种到 PDB 培养基中，37 °C、180 r/min 培养 4 d 后，取发酵液 12 000 r/min 离心 30 min，随后上清液过 0.22 μm 滤膜，获得无菌发酵上清液。

利用菌丝生长速率法^[24]测定拮抗菌无菌发酵上清液对桑椹菌核病原菌 *S. sclerotiorum* PZ-2 的抑制效果。将病原菌 *S. sclerotiorum* PZ-2 分别接种至含有 50%、20%、10%、5%、3% 和 2% 拮抗菌无菌发酵上清液的 PDA 平板，25 °C 培养 48 h，以未添加无菌发酵上清液的 PDA 平板为对照，参照公式(1)计算抑菌率，并在显微镜下观察 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝形态。

1.6.2 拮抗菌对病原菌糖原积累的影响

通过糖原染色^[30]测定拮抗菌对病原菌糖原积累的影响。在铺有玻璃纸的 PDA 平板中央接种直径 5 mm 的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌饼，距中心 2 cm 处两侧接种拮抗菌，取 25 °C 对峙培养 1、2、3、5 d 后的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝置于载玻片上，用 KI-I₂ 染液染色 1 min 后盖上盖玻片，置于显微镜下观察，颜色越深代表菌丝糖原含量越多。以在 PDA 平板上培养相同时间的 *S. sclerotiorum* PZ-2 作为对照。

1.6.3 拮抗菌对病原菌胞内活性氧的影响

采用 DCFH-DA 活性氧荧光探针^[31-32]测定对峙培养 1、2、3、5 d 的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝内活性氧含量。将 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝置于 200 mmol/L HEPES 缓冲液中静置浸润 20 min 后，转移至 15 μmol/L 的 DCFH-DA 溶液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)，25 °C 黑暗标记

1 h，制片，置于荧光显微镜下观察，激发波长 495 nm，发射波长 515 nm。

1.6.4 拮抗菌对病原菌基因表达的影响

根据 1.6.1、1.6.2 和 1.6.3 实验结果，利用实时荧光定量 PCR 检测拮抗菌对 *S. sclerotiorum* PZ-2 基因组中糖代谢、抗氧化酶和细胞壁成分相关基因表达情况的影响。

按 1.6.2 方法收集病原菌菌丝，依据 Omega Fungal RNA Kit R6840 (Omega Bio-Tek 公司)说明书提取 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝总 RNA。

利用一步反转试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)将 RNA 反转成 cDNA。反转体系：5×All-in-one qRT SuperMix 4 μL，Enzyme Mix 1 μL，RNA template 1 μg，RNase-free ddH₂O 补足 20 μL。反应程序：50 °C 15 min；85 °C 5 s。

参考 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中 *S. sclerotiorum* 基因组选取与糖代谢有关的基因 Gene_9536 (己糖激酶)、Gene_3455 (糖基转移酶家族 20)、Gene_7772 (葡萄糖磷酸变位酶)，与病原菌抗氧化相关的基因 Gene_5305 (过氧化氢酶相关的免疫反应性)、Gene_4935 (过氧化氢酶)、Gene_1287 (过氧化物酶体)，与细胞壁组分合成相关的基因 Gene_13 (糖基转移酶、纤维素酶)、Gene_11361 (几丁质合成酶 2)、Gene_622 (细胞壁)。利用软件 Primer 5 设计以上基因引物，内参基因和各基因的引物序列如表 1 所示。

实时荧光定量 PCR：每个样品设置 3 个生物学重复，每个生物学重复含 3 次技术重复。反应体系：TB Green Premix Ex Taq II (2×) 10 μL，正、反向引物(10 μmol/L)各 0.8 μL，cDNA 模板 5 μL，RNase-free ddH₂O 3.4 μL。反应程序：95 °C 30 s；95 °C 10 s，40 个循环；60 °C 30 s。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测病原菌基因表达的引物序列

Table 1 Primer sequences of pathogen genes for real time fluorescent quantitative PCR

Genes name	Sequences of primer (5'→3')	Functional description
<i>actin</i>	F: GAGCTGTTTTCCCTTCCATTGTC R: GACGACACCGTGCTCGATTGG	Actin
Gene_9536	F: TTCAGTTTCCCAGTTCA R: GCCATCAAGGTTCCCAC	Hexokinase
Gene_3455	F: CGTCCTACATTTATCAACA R: ATCCACGTCAAGATCACTA	Glycosyltransferase family 20
Gene_7772	F: GCCCGCAGTATGCCAACA R: GCGACGACAGCCCAAAGA	Phosphoglucomutase
Gene_5305	F: GGTCCAGATGTCATTTCGT R: CCTCTTTGTTACCCACT	Catalase-related immune-responsive
Gene_4935	F: CCAGTTGATTTCCAGCAT R: CTTCATAAAGGCGACGAG	Catalase
Gene_1287	F: GAATCGGTAGCAAACCTCC R: CCGCCTTCTATCATCTCG	Peroxisome
Gene_13	F: ACATTGGTAGCCGTGGTT R: GTCATTGATGGCGTAGAA	Glucanoyltransferase; cellulase
Gene_11361	F: GCTCATCGCCGTCACCTTA R: GGTCCACCGACATTCCAG	Chitin synthase 2
Gene_622	F: CGCTCGCAAGTGAAGTA R: GTGCCATTTGTCCCTAA	Cell wall

1.7 数据统计及分析

数据均采用 Excel 2018 进行分析计算, 利用 GraphPad Prism 8 中 *t* 检验对相对基因表达量进行显著性分析并作图。

2 结果与分析

2.1 桑椹菌核病拮抗菌的分离筛选

从‘川桑 7637’枝条中分离纯化获得 98 株内生细菌, 初筛结果显示有 18 株内生细菌对 *S. sclerotiorum* PZ-2 有拮抗效果, 复筛发现内生细菌 C1R32、C3T5、C3N15、C3N16、C1R38、C3R1-2 对病原菌 PZ-2 有较好的抑制效果(图 1A), 其中 C1R32 抑菌效果稳定且最佳, 抑菌率达 66.47% (图 1A、1B), 因此选择 C1R32 进行后续研究。

2.2 桑椹菌核病拮抗菌的鉴定

2.2.1 形态学和生理生化特征

C1R32 菌株在 PDA 和 LB 培养基中 37 °C 培

养 12 h 后, 其生长形态无明显差别, 均展现出快速生长特性, 单菌落隆起, 呈饱满的圆形, 乳白色, 边缘光滑, 表面有光泽(图 2A、2B); 革兰氏染色和芽孢染色结果显示 C1R32 菌株为革兰氏阳性杆状细菌(图 2C), 产椭圆形芽孢(图 2D); 生理生化指标鉴定结果显示 C1R32 能利用葡萄糖, 水解淀粉、明胶, 还原硝酸盐, 有接触酶, Voges-Proskauer 试验呈阳性(表 2), 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[33]初步将其鉴定为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)。

2.2.2 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

扩增 *Bacillus* sp. C1R32 的 16S rRNA 基因序列, 测序获得长为 1 397 bp 的片段, 其在 NCBI 数据库上 BLAST 比对结果显示, 该片段与 *Bacillus subtilis* 菌株(登录号为 OQ586633.1)的 16S rRNA 基因序列相似度达到了 100%。基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析发现, *Bacillus*

sp. C1R32 与 *B. subtilis* NBRC 13719 (NR112629.1) 和 *B. subtilis* JCM 1465 (NR113265.1) 聚在同一最小分支(图 3), 因此将 C1R32 鉴定为枯草芽孢杆菌, 将其命名为 *B. subtilis* C1R32。

2.3 拮抗菌抑菌谱测定

抑菌谱检测结果显示, *B. subtilis* C1R32 对多种植物病原菌具有抑制作用, 其对 *Botryotinia fuckeliana* 抑菌率高达 78.11%, 对 *Colletrichum lagenarium*、*Botrytis cinerea*、*Cochiobolus sativus* 抑制率超过 60.00%, 对 *Colletotrichum gloeosporioides* 抑制率也超过 50.00%, 表明 *B. subtilis* C1R32 具有一定的广谱抑菌能力(表 3)。

2.4 拮抗菌对桑椹菌核病的离体防效实验

B. subtilis C1R32 对桑椹菌核病的离体防效检测结果表明, 接种病原菌后第 2 天, 纯水和 LB 液体培养基对照处理的桑椹均发病严重。*B. subtilis* C1R32 菌悬液处理组桑椹病情指数为 6.40, 以纯水处理组(病情指数为 13.60)为对照计算其防效为 52.94%。*B. subtilis* C1R32 发酵上清液处理组病情指数为 12.00, 以 LB 液体培养基处理组(病情指数为 22.40)为对照计算其防效为 46.43%。整体而言, *B. subtilis* C1R32 对桑椹菌核病具有良好离体防效, 并且菌悬液防效优于发酵上清液防效(表 4)。

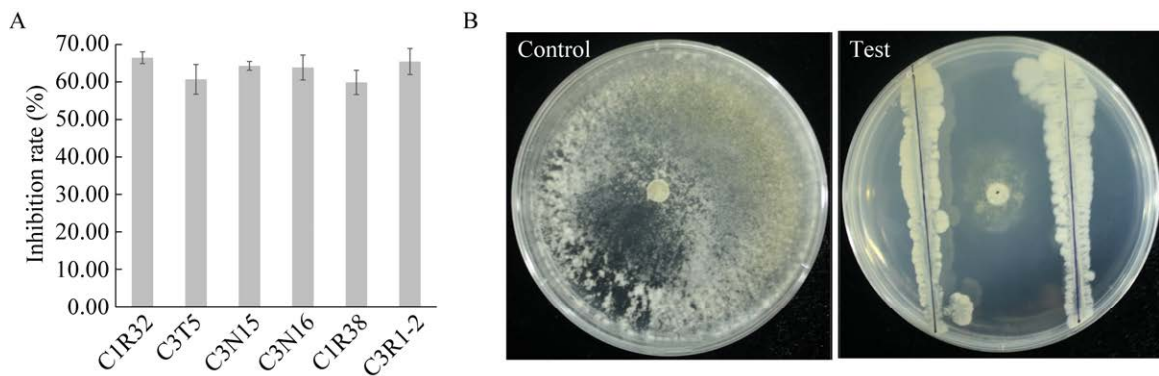


图 1 *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2 拮抗菌的复筛结果

Figure 1 Screening results of antagonistic strains against *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2. A: Screening results of six antagonistic strains against *S. sclerotiorum* PZ-2. The inhibition rate was calculated after 4 days at 25 °C. Three replicates were conducted for each treatment. B: Antagonistic activity of C1R32 against *S. sclerotiorum* PZ-2 cultured 4 days at 25 °C. Control: *S. sclerotiorum* PZ-2 was cultured on the PDA culture; Test: *S. sclerotiorum* PZ-2 and C1R32 were co-cultured on the PDA.

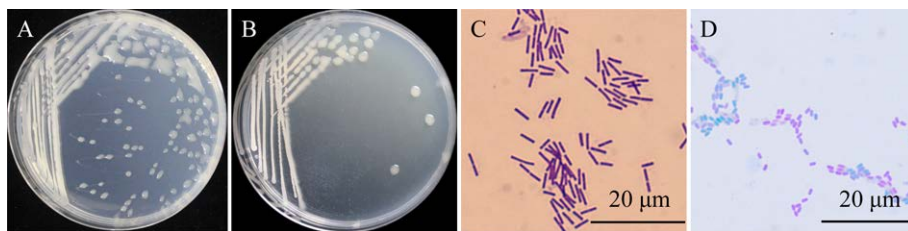


图 2 C1R32 菌株形态特征

Figure 2 The morphological features of strain C1R32. A: The colony characteristic of C1R32 cultured on the PDA medium after 12 h at 37 °C. B: The colony characteristic of C1R32 cultured on the LB medium after 12 h at 37 °C. C: Gram staining result of C1R32, cultured 24 h at 37 °C on the LB medium. D: Spores staining result of C1R32, cultured 48 h at 37 °C on the LB medium.

表 2 C1R32 菌株生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain C1R32

Item tested	Results
Xylose	-
Mannitol	-
Glucose	+
Starch hydrolysis	+
Catalase	+
Nitrate reduction	+
Citrate	-
Voges-Proskauer test	+
Gelatin liquefaction	+

+: Positive (growth or reaction); -: Negative (no growth or no reaction).

2.5 拮抗菌抑菌机理初探

2.5.1 拮抗菌发酵上清液对病原菌菌丝生长抑制作用

病原菌在不同含量 *B. subtilis* C1R32 发酵上清液的 PDA 平板上均明显受到抑制, *S. sclerotiorum* PZ-2 在含 50% 发酵上清液 PDA 平板上生长完全被抑制, 虽然随着 PDA 平板中 *B. subtilis* C1R32 发酵上清液含量减少抑菌率逐渐下降, 但含 2% 发酵上清液的 PDA 平板仍对 *S. sclerotiorum* PZ-2 有 36.77% 的抑制率 (表 5)。

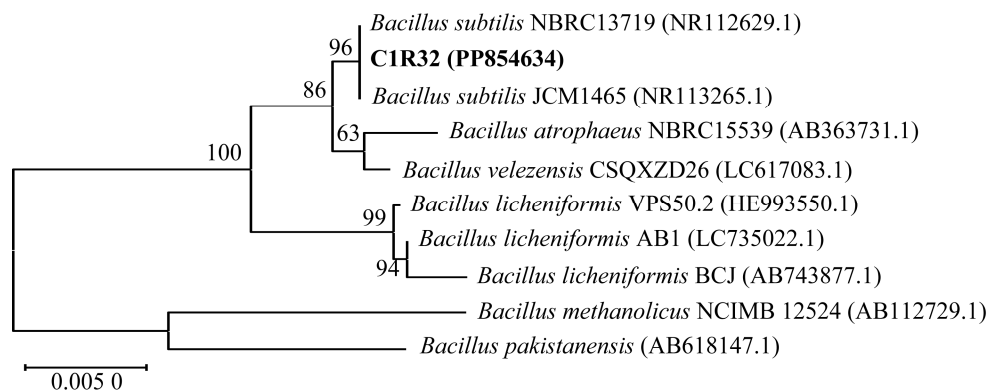
图 3 *Bacillus* sp. C1R32 菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic trees of *Bacillus* sp. C1R32 strain based on 16S rRNA gene sequences. Target strain was labeled in bold; The numbers in the brackets mean accession number of sequences in GenBank; The numbers in the branch points mean the bootstrap values; Scale bar represents genetic distance.

表 3 *Bacillus subtilis* C1R32 抑菌谱检测结果Table 3 The antimicrobial spectrum analysis results of strain *Bacillus subtilis* C1R32

Pathogens	Inhibition rate (%)
<i>Botryotinia fuckeliana</i>	78.11±2.20
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	0.00±0.00
<i>Verticillium dahliae</i>	0.00±0.00
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	54.63±3.00
<i>Colletotrichum lagenarium</i>	63.69±0.44
<i>Rhizoctonia solani</i>	0.00±0.00
<i>Cochiobolus sativus</i>	67.30±2.61
<i>Botrytis cinerea</i>	68.22±2.41

The inhibition rate was calculated after 4 days at 25 °C, three replicates are set for each treatment; Average ± standard deviation.

表 4 *Bacillus subtilis* C1R32 对桑椹菌核病的离体防效Table 4 The effect of *Bacillus subtilis* C1R32 on mulberry fruit sclerotinose *in vitro*

Treatment	Disease index	Control effect (%)
Bacterial suspension	6.40±4.08	52.94
Fermentation supernatant	12.00±2.53	46.43
Thiophanate-methyl	0.00±0.00	100.00
LB	22.40±3.20	-
Water	13.60±4.08	-

The control effects of *B. subtilis* C1R32 bacterial suspension and thiophanate-methyl were compared with pure water, and the control effect of *B. subtilis* C1R32 fermentation supernatant was compared with LB medium; Five replicates are set for each treatment; Average ± standard deviation.

表 5 不同浓度 *Bacillus subtilis* C1R32 无菌发酵上清液对病原菌的抑制活性

Table 5 The inhibitory activity of different contents of *Bacillus subtilis* C1R32 cell-free fermentation supernatant on *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2

Contents of cell-free fermentation supernatant (%)	Inhibition rate (%)
50	100.00±0.00
20	95.02±0.34
10	87.80±0.52
5	63.74±4.70
3	50.31±2.98
2	36.77±1.63

The inhibition rate was calculated after 4 days at 25 °C, three replicates are set for each treatment; Average ± standard deviation.

光学显微镜观察 *B. subtilis* C1R32 发酵上清液对病原菌菌丝的生长抑制作用, 结果显示, 未用发酵上清液处理的病原菌菌丝粗壮, 边缘整齐, 尖端圆润, 菌丝内容物均匀, 菌丝呈现旺盛的生长趋势(图 4A)。接种在含 20%发酵上清液 PDA 平板上的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝变小, 菌丝尖端膨大, 内容物大量流出, 菌丝生长滞缓

(图 4B); 接种在含 10%发酵上清液 PDA 平板上的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝断裂, 尖端不生长, 出现菌丝膨大现象(图 4C, 黄色箭头所指); 接种在含 5%发酵上清液 PDA 平板上的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝与对照组相比显著缩小, 并呈现异常的弯折(图 4D, 蓝色箭头所指); 接种在含 3%和 2%发酵上清液 PDA 平板上的 *S. sclerotiorum* PZ-2 菌丝细小, 显示出异常的弯折生长(图 4E、4F, 蓝色箭头所指)。不同浓度 *B. subtilis* C1R32 发酵上清液处理后的病原菌菌丝生长均被抑制, 并且发酵上清液含量较高时菌丝损伤较严重。

2.5.2 拮抗菌对病原菌糖原积累的影响

利用 KI-I₂ 染色评估 *B. subtilis* C1R32 对 *S. sclerotiorum* PZ-2 糖原积累的影响。结果显示, KI-I₂ 染色后, 对照组 PZ-2 菌丝颜色随培养时间延长而加深(图 5 中 A2), 对峙培养的 PZ-2 菌丝颜色随培养时间的延长越来越浅(图 5 中 B2), 而且均比对照组颜色浅。此外, 对峙培养的 PZ-2 菌丝细胞质减少, 细胞破碎呈空壳状(图 5, 绿色箭头

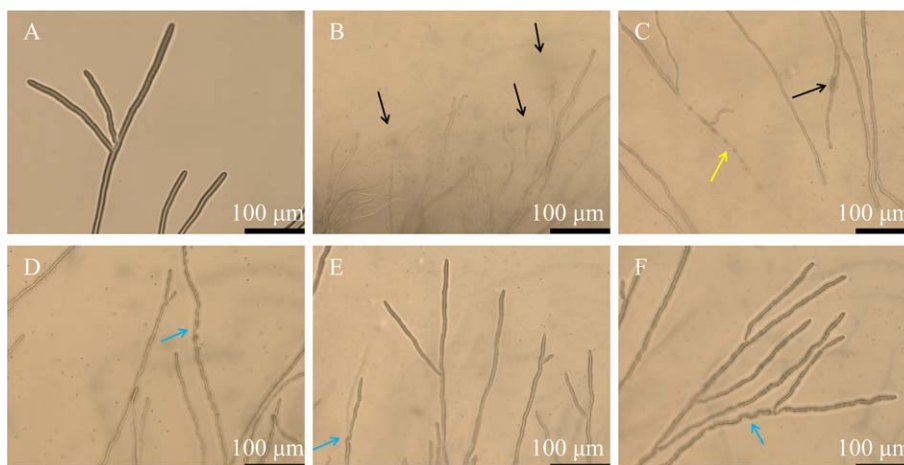


图 4 不同浓度 *Bacillus subtilis* C1R32 无菌发酵上清液对病原菌菌丝形态的影响

Figure 4 The effect of different contents of *Bacillus subtilis* C1R32 cell-free fermentation supernatant on the morphological features of *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2. Pathogens were observed after 24 hours. A: Cultured on the PDA medium. B–F: Cultured on the PDA medium containing different concentration fermentation supernatant (B: 20%; C: 10%; D: 5%; E: 3%; F: 2%). Black arrows indicates that the hyphae are enlarged; Yellow arrows indicates that hyphae content flow out, contracted, broke and appeared honeycomb cavity; Blue arrows indicates that the hyphae bent unusually.

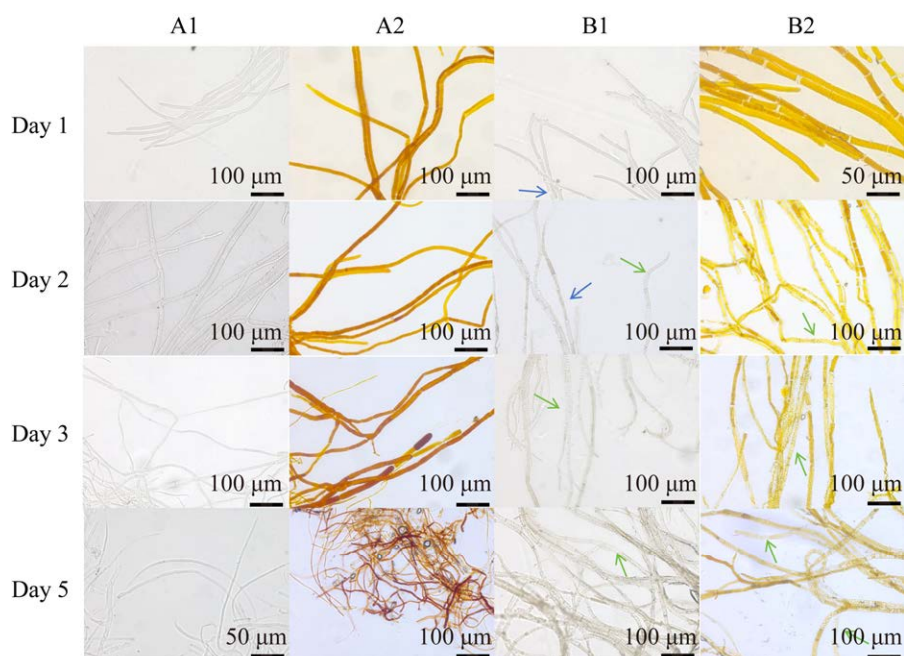


图 5 *Bacillus subtilis* C1R32 对 *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2 糖原积累的影响

Figure 5 Effect of *Bacillus subtilis* C1R32 on glycogen accumulation in *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2. A1, A2: Untreated hyphae of *S. sclerotiorum* PZ-2; B1, B2: Hyphae of *S. sclerotiorum* PZ-2 cultured with *B. subtilis* C1R32; A1, B1: Unstained; A2, B2: Stained with KI-I₂; Green arrow: The cytoplasm of hyphae decreased, and the cells were broken into empty shells; Blue arrow: The septa of hyphae widened.

所指),隔膜明显增宽(图 5 中 B1,蓝色箭头所指),并且随着对峙培养时间的延长,菌丝损伤程度逐渐增加,而对照组 PZ-2 菌丝并未出现明显损伤,结构完整,胞质均匀(图 5 中 A1)。上述结果表明,*B. subtilis* C1R32 影响 *S. sclerotiorum* PZ-2 糖代谢,使病原菌糖原积累量减少,同时影响 *S. sclerotiorum* PZ-2 细胞结构,使菌丝损伤。

2.5.3 拮抗菌对病原菌胞内活性氧的影响

通过 DCFH-DA 活性氧荧光探针染色测定 *B. subtilis* C1R32 对 *S. sclerotiorum* PZ-2 胞内活性氧的影响,结果显示,对照组菌丝呈现较弱绿色荧光(图 6 中 A2);与 C1R32 对峙培养 1、2、3 d 的 PZ-2 菌丝荧光强度均强于对照组(图 6 中 B2),对峙培养第 2 天的荧光最强,活性氧迸发后 PZ-2 菌丝出现损伤,呈现碎片状,至第 5 天则无法观察到荧光。此外,对照组菌丝均无明显

破损(图 6 中 A1),而与 C1R32 对峙培养的 PZ-2 菌丝损伤(图 6 中 B1)。活性氧探针染色结果表明在作用早期,*B. subtilis* C1R32 促使 *S. sclerotiorum* PZ-2 活性氧水平升高,产生氧化胁迫,导致其细胞损伤。

2.5.4 拮抗菌对病原菌基因表达的影响

由于拮抗菌影响 *S. sclerotiorum* PZ-2 糖原合成、活性氧爆发和细胞壁结构,因此通过实时荧光定量 PCR 对 *S. sclerotiorum* PZ-2 糖代谢、抗氧化酶和细胞壁成分相关基因的相对表达情况进行分析。结果显示,对峙培养 24 h 后,*S. sclerotiorum* PZ-2 的糖代谢相关基因有下调表达的趋势, Gene_9536 (己糖激酶)相对表达量为对照组的 80.00%, Gene_7772 (葡萄糖磷酸变位酶)表达量仅为对照组的 34.00%,出现显著下调 ($P<0.001$);

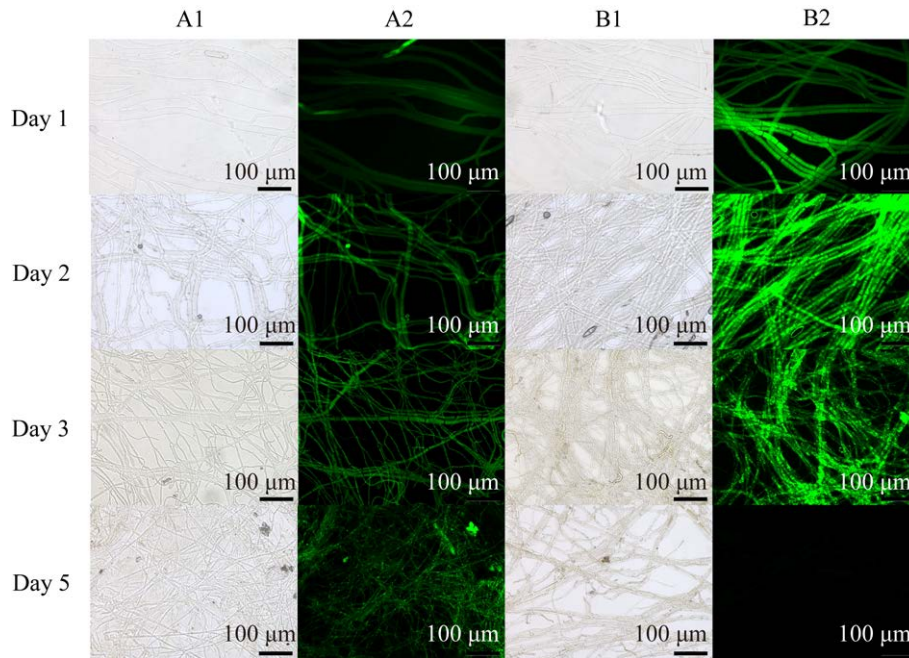


图 6 *Bacillus subtilis* C1R32 对 *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2 胞内活性氧积累的影响

Figure 6 Effect of *Bacillus subtilis* C1R32 on intracellular active oxygen species in *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2. A1, A2: Untreated hyphae of *S. sclerotiorum* PZ-2; B1, B2: Hyphae of *S. sclerotiorum* PZ-2 cultured with *B. subtilis* C1R32; A1, B1: White light; A2, B2: Fluorescent light.

此外,病原菌的抗氧化相关基因会上调表达,其中 Gene_5305 (过氧化氢酶相关的免疫反应性)表达量为对照组的 3 倍, Gene_4935 (过氧化氢酶)表达量为对照组的 3.4 倍,均显著上调 ($P<0.05$), Gene_1287 (过氧化物酶体)的表达量显著 ($P<0.001$) 下调为对照组的 51.00%; *S. sclerotiorum* PZ-2 细胞壁组分相关基因 Gene_13 (糖基转移酶、纤维素酶)、Gene_622 (细胞壁)的表达量与对照组相比分别上调了 47.15%和 78.75%, Gene_11361 (几丁质合成酶 2)的表达略有下调(图 7)。基因表达量分析结果表明, *B. subtilis* C1R32 会影响 *S. sclerotiorum* PZ-2 糖代谢相关基因表达,诱导 *S. sclerotiorum* PZ-2 抗氧化基因和细胞壁成分相关基因上调表达,这也与 *B. subtilis* C1R32 和 *S. sclerotiorum* PZ-2 对峙培养后的糖原染色和活性氧染色结果一致。

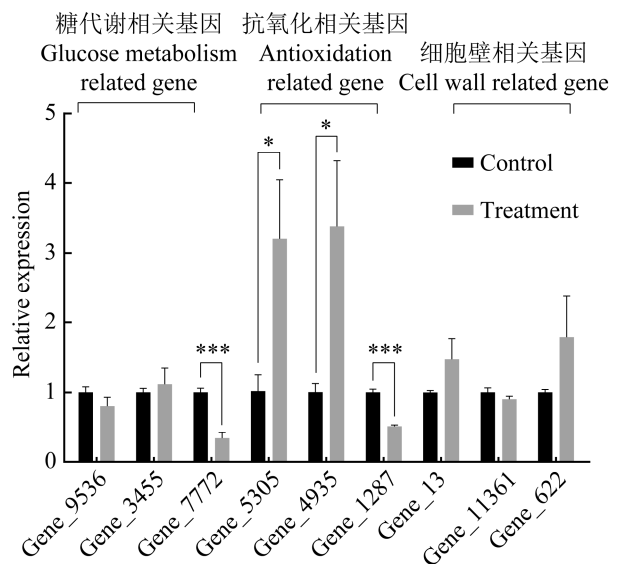


图 7 *Bacillus subtilis* C1R32 对 *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2 基因相对表达情况的影响

Figure 7 Effect of *Bacillus subtilis* C1R32 on relative expression of genes in *Sclerotinia sclerotiorum* PZ-2. “*” and “***” mean significant difference between treatment group and control group, where “*” indicates $P<0.05$ and “***” indicates $P<0.001$.

3 讨论与结论

桑椹菌核病发病率高, 防治困难, 极大影响桑果产量与品质。利用健康桑树内生菌进行桑椹菌核病的绿色防控, 不仅有利于促进产业健康发展, 更能满足人们的食品安全要求。本研究分离获得一株对桑椹菌核病病原菌具稳定拮抗作用的内生细菌 *B. subtilis* C1R32, 该菌株发酵上清液可显著抑制桑椹菌核病病原菌 *S. sclerotiorum* PZ-2 生长, 破坏病原菌细胞结构。桑椹离体防效实验结果表明, *B. subtilis* C1R32 能抑制 *S. sclerotiorum* PZ-2 扩散生长, 延缓桑果发病, 具有良好的生防潜力(表 4)。*B. subtilis* C1R32 抑菌机理初探结果表明, *B. subtilis* C1R32 通过促进病原菌活性氧增加、产生氧化胁迫, 损伤细胞壁, 并影响病原菌糖代谢基因表达, 通过减少病原菌糖原合成等途径来抑制 *S. sclerotiorum* PZ-2 生长(图 7)。

众多研究表明, 内生菌可以通过影响病原真菌细胞结构、代谢物合成及氧化应激来抑制病原真菌, 从而达到防治植物真菌病害的目的^[34-35]。细胞壁是病原真菌的重要细胞结构, 生防菌破坏病原菌细胞壁是防控病害的重要策略。Wang 等^[36]分离到一株内生莫海威芽孢杆菌 (*Bacillus mojavensis*) BQ-33, 该菌株对猕猴桃黑斑病菌 (*Didymella glomerata*) 有良好的拮抗作用, 能破坏病原菌菌丝体细胞壁, 使大量无机盐、蛋白质和核酸外渗。同样, 本研究中 *B. subtilis* C1R32 处理 *S. sclerotiorum* PZ-2 后, 病原菌纤维素酶相关基因上调表达, 引起病原菌细胞壁破碎, 导致细胞质大量流出。氧化应激是指机体活性氧产生和清除失衡, 造成活性氧积累, 从而诱导细胞产生细胞毒素, 进而对细胞结构和生物大分子造成损伤, 诱导病原菌发生氧化应激, 其也为生防菌防治植

物病害的重要机制^[34-35]。Lu 等^[37]报道了一株 *B. subtilis* BS45 的甲醇提取物会引起小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*) 菌丝活性氧水平增加, 进而诱导菌丝细胞氧化应激相关基因表达水平增加。这与本研究中 *B. subtilis* C1R32 对 *S. sclerotiorum* PZ-2 的抑制结果相同, *B. subtilis* C1R32 促进 *S. sclerotiorum* PZ-2 活性氧迸发, 产生氧化胁迫, 促进病原菌凋亡。Han 等^[38]从棉花中分离筛选出一株对棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*) 有拮抗效果的解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) 41B-1, 发现其代谢产物伊枯草菌素 (iturin) 可通过诱导 *V. dahliae* 活性氧升高从而达到杀菌作用。Su 等^[39]报道侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporus*) SN19-1 无菌上清液处理水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*) 后, 病原菌胞内活性氧水平显著增加, 致病力减弱。同时, 生防菌还可以通过影响病原微生物代谢达到防治病害的作用。Hu 等^[40]通过转录组测序发现, *B. amyloliquefaciens* A-1 能通过紊乱黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) NRRL 3357 的淀粉和蔗糖代谢途径基因表达来拮抗黄曲霉, 其在减少梨、花生和玉米腐败方面表现出显著的潜力。张婷婷等^[41]报道, *B. velezensis* SX-45 提取物可以显著减少人参根腐病原菌 (*Fusarium oxysporum*) 还原糖含量。本研究揭示了 *B. subtilis* C1R32 能够通过影响 *S. sclerotiorum* PZ-2 糖代谢相关基因表达, 减少糖原积累, 诱导 *S. sclerotiorum* PZ-2 氧化应激, 以及损伤细胞结构等起到防治桑椹菌核病菌的作用, 结果显示 *B. subtilis* C1R32 具有良好的生物防治潜能。后续研究将进一步鉴定 *B. subtilis* C1R32 菌株抑菌活性物质的主要成分, 确定菌株的生物安全性及评估 *B. subtilis* C1R32 的田间防治效果的基础上, 制备活菌制剂, 将其应用于桑椹菌核病的生防实践。

参考文献

- [1] ZHANG LJ, CHEN QR, CHEN Z, HE TP, YU MJ, ZHANG YH, NAN HJ, HUANG QR, ZHAO TT. Anti-skin aging effects of mulberry fruit extracts: *in vitro* and *in vivo* evaluations of the anti-glycation and antioxidant activities[J]. Journal of Functional Foods, 2024, 112: 105984.
- [2] TORNAGHI M, ALI REDHA A, RONDANELLI M, PERNA S. Exploring the impact of mulberry fruits on metabolic syndrome: a systematic review of current evidence[J]. Pharma Nutrition, 2023, 26: 100363.
- [3] 杨哲, 董帅, 范春艳, 王宏艳. 桑椹多糖对高脂饮食诱导的脂肪肝小鼠的保护作用研究[J]. 中兽医医药杂志, 2023, 42(6): 7-11.
YANG Z, DONG S, FAN CY, WANG HY. Protective effects of Fructus Mori polysaccharides on high-fat diet-induced fatty liver in mice[J]. Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine, 2023, 42(6): 7-11 (in Chinese).
- [4] WANI MY, GANIE NA, WANI DM, WANI AW, DAR SQ, KHAN AH, A KHAN N, MANZAR MS, DEGHANI MH. The phenolic components extracted from mulberry fruits as bioactive compounds against cancer: a review[J]. Phytotherapy Research, 2023, 37(3): 1136-1152.
- [5] 郭铭建, 蒋贵兵. 重庆市蚕业多元化发展模式探索与推广[J]. 蚕学通讯, 2016, 36(4): 34-40.
GUO MJ, JIANG GB. Exploration and popularization of diversified development model of sericulture in Chongqing[J]. Newsletter of Sericultural Science, 2016, 36(4): 34-40 (in Chinese).
- [6] 陈忠艺. 河南果桑产业的发展现状与对策建议[J]. 辽宁丝绸, 2021(1): 12-13.
CHEN ZY. Development status and countermeasures of fruit and mulberry industry in Henan Province[J]. Liaoning Tussah Silk, 2021(1): 12-13 (in Chinese).
- [7] 黄朝举, 胡启华, 骆书芬. 攀枝花市蚕桑产业发展现状及对策[J]. 四川蚕业, 2023, 51(1): 15-18.
HUANG CJ, HU QH, LUO SF. Present situation and countermeasures of sericulture industry in Panzhihua City[J]. Sichuan Canye, 2023, 51(1): 15-18 (in Chinese).
- [8] 万娟, 刘萍, 张海霞, 龚超群. 乡村振兴视域下阿克苏地区果桑产业挖潜增效的思考[J]. 黑龙江粮食, 2023(12): 87-89.
WAN J, LIU P, ZHANG HX, GONG CQ. Thoughts on tapping the potential and increasing efficiency of fruit and mulberry industry in Aksu area from the perspective of rural revitalization[J]. Heilongjiang Grain, 2023(12): 87-89 (in Chinese).
- [9] 吕蕊花, 朱攀攀, 余茂德, 刘长英, 赵爱春. 桑椹肥大性菌核病菌(*Ciboria shiraiana*)分生孢子的形成和致病性[J]. 微生物学报, 2019, 59(12): 2367-2377.
LÜ RH, ZHU PP, YU MD, LIU CY, ZHAO AC. Conidial formation and pathogenicity of *Ciboria shiraiana*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2019, 59(12): 2367-2377 (in Chinese).
- [10] 郑泽林, 王一方, 包立军, 梁嘉俊, 苏超, 焦锋, 张敏娟, 钱永华. 一株桑椹核盘菌的分离鉴定及植物源抑菌剂的筛选[J]. 蚕业科学, 2021, 47(1): 1-7.
ZHENG ZL, WANG YF, BAO LJ, LIANG JJ, SU C, JIAO F, ZHANG MJ, QIAN YH. Isolation and identification of a *Sclerotinia sclerotiorum* strain from mulberry fruit and screening of its plant-derived bacteriostatic agents[J]. Acta Sericologica Sinica, 2021, 47(1): 1-7 (in Chinese).
- [11] 任杰群, 陈力, 张明海, 乔兴华, 王青, 刘格格, 吕志远, 马冠华, 陈国康. 一株桑椹核盘菌的鉴定及拮抗放线菌和化学防治药剂筛选[J]. 蚕业科学, 2020, 46(6): 700-705.
REN JQ, CHEN L, ZHANG MH, QIAO XH, WANG Q, LIU GG, LÜ ZY, MA GH, CHEN GK. Identification of a *Sclerotinia sclerotiorum* strain isolated from mulberry fruit and screening of antagonistic actinomycetes and chemical controlling fungicides[J]. Acta Sericologica Sinica, 2020, 46(6): 700-705 (in Chinese).
- [12] 谢洁, 任慧爽, 唐翠明, 左伟东, 陈洁, 黄传书, 王振江, 戴凡炜, 周泽扬. 一株桑树内生细菌的鉴定和对桑椹核地杖菌的拮抗作用[J]. 蚕业科学, 2015, 41(5): 815-824.
XIE J, REN HS, TANG CM, ZUO WD, CHEN J, HUANG CS, WANG ZJ, DAI FW, ZHOU ZY. Identification of a mulberry endophytic bacterium and its antagonistic activity on *Sclerotinia shiraiana*[J]. Science of Sericulture, 2015, 41(5): 815-824 (in Chinese).
- [13] SULTANA R, JU HJ, CHAE JC, KIM K, LEE KJ. Identification of *Ciboria carunculoides* RS103V, a fungus causing popcorn disease on mulberry fruits in Korea[J]. Research in Plant Disease, 2013, 19(4): 308-312.
- [14] 包立军, 苏超, 张敏娟, 焦锋, 钱永华. 桑椹菌核病病原研究进展[J]. 蚕业科学, 2019, 45(3): 441-446.
BAO LJ, SU C, ZHANG MJ, JIAO F, QIAN YH.

- Research progress on pathogens of mulberry sclerotiniase[J]. *Science of Sericulture*, 2019, 45(3): 441-446 (in Chinese).
- [15] 余武昌, 莫柳静, 杨杰, 黄尚勇, 梁小静, 廖乃有, 彭业成, 张朝华, 磨长寅. 桑椹菌核病病原种类、生物学特性和防控进展[J]. *广西蚕业*, 2023, 60(3): 50-57.
YU WC, MO LJ, YANG J, HUANG SY, LIANG XJ, LIAO NY, PENG YC, ZHANG CH, MO CY. Pathogen species, biological characteristics and control progress of mulberry *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Guangxi Sericulture*, 2023, 60(3): 50-57 (in Chinese).
- [16] 廖友新. 桑椹菌核病防治技术研究进展[J]. *广东蚕业*, 2023, 57(11): 22-24.
LIAO YX. Research progress on the prevention and control technology of mulberry sorosis[J]. *Guangdong Sericulture*, 2023, 57(11): 22-24 (in Chinese).
- [17] 刘玲, 郑丹, 柯皓天, 任建宇, 李琼秀. 碱性电解水防治桑椹菌核病试验初报[J]. *蚕桑通报*, 2022, 53(2): 19-20.
LIU L, ZHENG D, KE HT, REN JY, LI QX. A preliminary report on the control of mulberry Sclerotia disease with alkaline electrolyzed water[J]. *Bulletin of Sericulture*, 2022, 53(2): 19-20 (in Chinese).
- [18] 张健, 马佳慧, 韩蓓蓓, 王俊, 吴福安. 对桑椹菌核病病原菌有拮抗作用的木霉菌菌株筛选及生防效果试验[J]. *蚕业科学*, 2015, 41(5): 825-832.
ZHANG J, MA JH, HAN BB, WANG J, WU FA. Screening and biocontrol efficiency of *Trichoderma* spp. with antagonistic effect against mulberry fruit sclerotiniosis' pathogen[J]. *Science of Sericulture*, 2015, 41(5): 825-832 (in Chinese).
- [19] SULTANA R, KIM K. *Bacillus thuringiensis* C25 suppresses popcorn disease caused by *Ciboria shiraianain* mulberry (*Morus australis* L.)[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2016, 26(2): 145-162.
- [20] 朱志贤, 于翠, 李勇, 莫荣利, 邓文, 胡兴明. 一株桑椹菌核病生防菌分离鉴定及其拮抗作用分析[J]. *中国森林病虫*, 2019, 38(5): 1-7.
ZHU ZX, YU C, LI Y, MO RL, DENG W, HU XM. Isolation and identification of an antagonistic bacterium against mulberry fruit sclerotiniosis and analysis of its antagonistic effects[J]. *Forest Pest and Disease*, 2019, 38(5): 1-7 (in Chinese).
- [21] 朱孔艳, 韩升才, 赵榕, 温玉洁, 胡昊驰, 乔益民, 卢佳锋, 曹凯, 许政晗, 包海柱, 高聚林. 向日葵籽粒拮抗核盘菌的内生菌分离筛选及鉴定[J]. *作物杂志*, 2023(5): 280-284.
ZHU KY, HAN SC, ZHAO R, WEN YJ, HU HC, QIAO YM, LU JF, CAO K, XU ZH, BAO HZ, GAO JL. Isolation and identification of endophytes from sunflower seeds[J]. *Crops*, 2023(5): 280-284 (in Chinese).
- [22] MONTEIRO FP, FERREIRA LC, PACHECO LP, SOUZA PE. Antagonism of *Bacillus subtilis* against *Sclerotinia sclerotiorum* on *Lactuca sativa*[J]. *Journal of Agricultural Science*, 2013, 5(4): 214.
- [23] CAO S, JIANG BX, YANG GG, PAN GX, PAN YM, CHEN FX, GAO ZM, DAI YL. Isolation and evaluation of *Bacillus subtilis* RSS-1 as a potential biocontrol agent against *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2023, 166(1): 9-25.
- [24] 王若琳, 徐伟芳, 王飞, 周小磊, 郑月, 江鸿森, 谢洁. 桑树内生拮抗菌的分离鉴定及其对桑断枝烂叶病的生防初探[J]. *微生物学报*, 2019, 59(11): 2130-2143.
WANG RL, XU WF, WANG F, ZHOU XL, ZHENG Y, JIANG HS, XIE J. Isolation and identification of an antagonistic endophytic bacterium from mulberry for biocontrol against *Boeremia exigua*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(11): 2130-2143 (in Chinese).
- [25] WEISBURG WG, BARNES SM, PELLETIER DA, LANE DJ. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [26] 张婕. 两种酵母拮抗菌对采后李果实褐腐病的生物防治效果及机理研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2017.
ZHANG J. Biocontrol efficacy and mechanism of two antagonistic yeasts against postharvest brown rot in plum fruit[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2017 (in Chinese).
- [27] 聂蓓蓓, 梁嘉俊, 包立军, 董小龙, 郑泽林, 高鸿鹏, 张敏娟, 焦锋, 苏超. 桑椹果腐病的病原菌鉴定[J]. *蚕业科学*, 2020, 46(1): 26-30.
NIE BB, LIANG JJ, BAO LJ, DONG XL, ZHENG ZL, GAO HP, ZHANG MJ, JIAO F, SU C. Identification of pathogen causing mulberry fruit rot disease[J]. *Science of Sericulture*, 2020, 46(1): 26-30 (in Chinese).
- [28] 张小利, 潘洪吉, 陶永梅, 谢爱婷, 梁铁双, 祝宁, 卢志军. 贝莱斯芽孢杆菌 NSZ-YBGJ001 对草莓白粉病的防治效果研究[J]. *农药科学与管理*, 2020, 41(4): 53-56.

- ZHANG XL, PAN HJ, TAO YM, XIE AT, LIANG TS, ZHU N, LU ZJ. Control effect of *Bacillus velezensis* NSZ-YBGJ001 on strawberry powdery mildew[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2020, 41(4): 53-56 (in Chinese).
- [29] 姜莉莉, 孙守民, 杨帅, 武冲, 孙瑞红. 草莓枯萎病拮抗菌 JM-3 的鉴定及生防效果评价[J]. *农学学报*, 2022, 12(7): 26-32.
- JIANG LL, SUN SM, YANG S, WU C, SUN RH. Antagonistic bacterium JM-3 against strawberry *Fusarium* wilt: identification and bio-control efficacy[J]. *Journal of Agriculture*, 2022, 12(7): 26-32 (in Chinese).
- [30] THINES E, WEBER RWS, TALBOT NJ. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12(9): 1703-1718.
- [31] 徐黄玲, 王欢欢. 检测活性氧小分子比例荧光探针研究进展[J]. *广东化工*, 2024, 51(2): 57-59.
- XU HL, WANG HH. Progress in ratiometric fluorescent probes for reactive oxygen species[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2024, 51(2): 57-59 (in Chinese).
- [32] HONG J, MAACHA S, PIDKOVKA N, BATES A, SALARIA SN, WASHINGTON MK, BELKHIRI A. AXL promotes metformin-induced apoptosis through mediation of autophagy by activating ROS-AMPK-ULK1 signaling in human esophageal adenocarcinoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2022, 12: 903874.
- [33] 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: 62-63.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 62-63 (in Chinese).
- [34] 刘群. 链霉菌 N2 防治柑橘青霉病菌的作用机制及其对采后柑橘保鲜的初步研究[D]. 南昌: 江西农业大学硕士学位论文, 2020.
- LIU Q. Effect of *Streptomyces* N₂ on *Penicillium citricum* and its preliminary study on postharvest fresh-keeping of *Citrus*[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [35] 韩丹丹. 链霉菌 HN6 次级代谢物 YY3 对香蕉枯萎病菌的作用机理研究[D]. 海口: 海南大学硕士学位论文, 2018.
- HAN DD. Study on the secondary mechanism of *Streptomyces* HN6 metabolite YY3 against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[D]. Haikou: Master's Thesis of Hainan University, 2018 (in Chinese).
- [36] WANG BC, LEI X, CHEN J, LI WZ, LONG YH, WANG WZ. Antifungal activities of *Bacillus mojavensis* BQ-33 towards the kiwifruit black spot disease caused by the fungal pathogen *Didymella glomerata*[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(10): 2085.
- [37] LU ZY, CHEN ML, LONG XY, YANG HL, ZHU D. Biological potential of *Bacillus subtilis* BS45 to inhibit the growth of *Fusarium graminearum* through oxidative damage and perturbing related protein synthesis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1064838.
- [38] HAN Q, WU FL, WANG XN, QI H, SHI L, REN A, LIU QH, ZHAO MW, TANG CM. The bacterial lipopeptide iturins induce *Verticillium dahliae* cell death by affecting fungal signalling pathways and mediate plant defence responses involved in pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(4): 1166-1188.
- [39] SU XX, WAN TT, GAO YD, ZHANG SH, CHEN X, HUANG LQ, WANG W. Action mechanism of the potential biocontrol agent *Brevibacillus laterosporus* SN19-1 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* causing rice bacterial leaf blight[J]. *Archives of Microbiology*, 2023, 206(1): 40.
- [40] HU YF, YANG X, TAI BW, WANG G, ZHANG XL, YIN YX, XING FG. *Bacillus amyloliquefaciens* A-1 inhibiting fungal spoilage in agricultural products is improved by metabolic engineering of enhancing surfactin yield[J]. *Food Research International*, 2024, 175: 113752.
- [41] 张婷婷, 马贵龙, 谢晓宝, 高新馨, 蔡奇. 贝莱斯芽孢杆菌 SX-45 提取物对人参根腐病菌抑菌机理研究[J]. *中国农学通报*, 2022, 38(33): 124-131.
- ZHANG TT, MA GL, XIE XB, GAO XX, CAI Q. Extract of *Bacillus velezensis* SX-45: the antifungal mechanism against *Fusarium oxysporum* of ginseng[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2022, 38(33): 124-131 (in Chinese).