



青皮核桃采后病害生防菌贝莱斯芽胞杆菌 XRD006 全基因组分析及防治效果研究

席飞¹, 汤静¹, 吕凤霞¹, 孙佩馨¹, 张国华², 肖红梅^{1*}

1 南京农业大学食品科技学院, 江苏 南京 210095

2 山东五康轩现代农林发展有限公司, 山东 邹城 273519

席飞, 汤静, 吕凤霞, 孙佩馨, 张国华, 肖红梅. 青皮核桃采后病害生防菌贝莱斯芽胞杆菌 XRD006 全基因组分析及防治效果研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(1): 303-322.

XI Fei, TANG Jing, LÜ Fengxia, SUN Peixin, ZHANG Guohua, XIAO Hongmei. *Bacillus velezensis* XRD006: genomic characteristics and biocontrol effects on diseases of postharvest green walnuts[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(1): 303-322.

摘要:【目的】探究生防菌贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*) XRD006 对青皮核桃采后病害的生防能力及其贮藏保鲜效果, 解析菌株的基因特性和次级代谢产物, 了解菌株的抑菌机制。【方法】通过抑菌试验确定 XRD006 对青皮核桃采后病原菌的抑制能力。利用活体抑菌及贮藏试验探究生防菌对青皮核桃采后病原菌的抑制能力及对青皮核桃贮藏品质的影响。以全基因组测序了解菌株 XRD006 的基因组特征及潜在抑菌相关基因; 利用 antiSMASH 软件预测 XRD006 的次级代谢产物; 结合比较基因组学分析 XRD006 和贝莱斯芽胞杆菌标准株 FZB42、SQR9 之间的共线性关系和次级代谢产物基因簇差异。利用高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和质谱鉴定 XRD006 次级代谢产物并通过牛津杯法测定其抑菌能力。【结果】抑菌试验表明菌株 XRD006 对青皮核桃采后病原菌隐秘刺盘孢(*Colletotrichum aenigma*)、暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)和藤仓镰刀菌(*Fusarium fujikuroi*)的抑菌率分别为 49.22%、50.61%、53.83%和 58.71%。活体抑菌试验表明, XRD006 在果实上能有效抑制病原菌的侵染与生长。贮藏试验显示, XRD006 发酵上清液可以显著延缓果实的失重、减少微生物的生长, 降低过氧化物酶(peroxidase, POD)和多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)酶活变化的同时, 保持杏仁品质。全基因组测序显示 XRD006 基因组长 4 371 975 bp, GC 含量为 46.07%, 含蛋白编码基因 4 362 个, 具有胞外水解酶、生物膜等抑菌促生相关基因; antiSMASH 预测显示 XRD006 分别含有 9 种已知和 5 种未知的次级代谢产物的编码基因簇。菌株 XRD006 与 FZB42 和

资助项目: 江苏省农业科技自主创新资金[CX(21)3038]

This work was supported by the Jiangsu Agricultural Science and Technology Independent Innovation Fund Project (CX(21)3038).

*Corresponding author. E-mail: xhm@njau.edu.cn

Received: 2023-06-21; Accepted: 2023-07-18; Published online: 2023-08-21

SQR9 亲缘关系密切, 三者有 8 种相同的次级代谢产物基因簇, 但是基因簇的位置和编码基因有差异。次级代谢产物鉴定显示, XRD006 可以产生伊枯草菌素(iturin)和丰原素(fengycin)两种脂肽家族; 抑菌试验表明, 相比于 C13-iturin、C14-iturin、C15-iturin 和 C17-fengycin C, fengycin 家族的 C16-fengycin B 对暹罗炭疽菌(*C. siamense*) HT12 的抑菌效果最好。【结论】贝莱斯芽胞杆菌 XRD006 对青皮核桃采后病害具有良好生防能力, 具备实际应用潜力。

关键词: 生防菌; 贮藏品质; 全基因组; 比较基因组学; 次级代谢产物

***Bacillus velezensis* XRD006: genomic characteristics and biocontrol effects on diseases of postharvest green walnuts**

XI Fei¹, TANG Jing¹, LÜ Fengxia¹, SUN Peixin¹, ZHANG Guohua², XIAO Hongmei^{1*}

1 College of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China

2 Shandong Wukangxuan Modern Agriculture and Forestry Development Co., Ltd., Zoucheng 273519, Shandong, China

Abstract: [Objective] To investigate *Bacillus velezensis* XRD006 in terms of the inhibitory effects on diseases of postharvest green walnuts, the fresh-keeping effect on green walnuts, genetic characteristics, secondary metabolites, and antifungal mechanism. [Methods] The activities of XRD006 against pathogens of postharvest green walnuts were determined by the inhibition experiments. *In vivo* fungal inhibition and storage quality experiments were conducted to investigate the inhibitory effects of the strain on pathogens and the effect of the strain on the storage quality of postharvest green walnuts. The genomic characteristics and potential antifungal genes of XRD006 were investigated by whole genome sequencing. The secondary metabolites of XRD006 were predicted by antiSMASH, and the collinearity and differences of the secondary metabolite gene clusters between strains XRD006, FZB42, and SQR9 were analyzed by comparative genomics. The secondary metabolites of XRD006 were identified by high performance liquid chromatography (HPLC) and mass spectrometry. The antagonistic ability of the strain was tested by the oxford cup method. [Results] The inhibition rates of XRD006 against *Colletotrichum aenigma*, *Colletotrichum siamense*, *Botryosphaeria dothidea*, and *Fusarium fujikuroi* of postharvest green walnuts were 49.22%, 50.61%, 53.83%, and 58.71%, respectively. *In vivo* antifungal experiments showed that XRD006 effectively inhibited the infection and growth of pathogenic fungi on the fruits. The fermentation supernatant of XRD006 significantly retarded the weight loss, inhibited the microbial growth, and reduced changes in peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) activities while maintaining the kernel quality. The whole genome sequencing showed that the genome of XRD006 was 4 371 975 bp in length, containing 46.07% GC and 4 362 protein-coding genes (including antifungal and plant growth-promoting genes such as extracellular hydrolase and biofilm genes). The antiSMASH predicted that XRD006 had nine known and five unknown gene clusters of secondary

metabolites. XRD006 was closely related to FZB42 and SQR9, and they shared eight secondary metabolite gene clusters, which showed varied location and coding genes. XRD006 produced two families of lipopeptides: iturin and fengycin. Compared with C13-iturin, C14-iturin, C15-iturin, and C17-fengycin C, C16-fengycin B of the fengycin family had the strongest inhibitory effect on *C. siamense* HT12. **[Conclusion]** *B. velezensis* XRD006 has good biocontrol effects on diseases of postharvest green walnuts and the potential for application in production.

Keywords: biocontrol bacteria; storage quality; whole genome; comparative genomics; secondary metabolites

核桃(*Juglans regia* L.)是胡桃科胡桃属植物,是中国重要的经济林种。核桃含有丰富的不饱和脂肪酸、维生素、蛋白质、矿物质和多酚等营养物质,具备抗炎、抗氧化、延缓记忆衰退的功能^[1-2]。青皮核桃因其清脆香甜的口感成为核桃产业新的经济增长点,但青皮核桃果实采后病害导致的腐烂霉变严重影响果实贮藏期和食用安全,制约了青皮核桃产业的快速发展。传统果实采后病害的防治仍以化学杀菌剂为主,但长期化学药剂的施用会导致环境污染、农药残留及病原菌耐药性等问题^[3]。随着人们健康环保意识的提高和我国农业绿色发展规划的实施,使用绿色安全的生物农药防治核桃等采后病害成为极具潜力的防控手段。

芽胞杆菌类生防菌是目前生物农药的研究热点和产业化开发的主要来源。其中属于解淀粉芽胞杆菌群(*Bacillus amyloliquefaciens* group)的贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)来源广泛,已分别从土壤^[4]、植物内生环境^[5]、天然食物^[6]等各类环境中筛选出对扩展青霉(*Penicillium expansum*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、灰霉菌(*Botrytis cinerea*)和链格孢菌(*Alternaria alternata*)具有广谱抑菌活性的菌株。目前,多种组学技术被应用于探究生防菌的抑菌机制,全基因组技术可以准确预测生防菌的抗菌次级代谢产物^[7]、比较基因组技术可以分析各生防菌的特点^[8]。贝莱斯芽胞杆菌具备产生丰原素

(fengycins)、伊枯草菌素(iturins)、表面活性肽(surfactins)等脂肽抑制病原菌生长与侵染的能力,且脂肽作用机制多样。研究表明, fengycins 可以侵入禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)细胞膜内,与病原菌 DNA 结合,造成 DNA 碎片化,丧失功能^[9]。Iturins 则可以破坏尖孢炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)细胞壁、细胞膜,引起细胞内容物泄漏,造成细胞死亡^[10]。

本研究以一株来自海洋生境的贝莱斯芽胞杆菌 XRD006 为主要研究对象,探究其对青皮核桃采后病原菌的抑制能力,并通过活体抑菌试验及贮藏试验探究 XRD006 对青皮核桃采后病原菌的拮抗能力及其对青皮核桃贮藏品质的影响;利用全基因组测序、比较基因组学分析,挖掘 XRD006 潜在的抗病基因和抗菌产物,分析其可能的抗菌机制;使用层析、高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)和质谱手段分离鉴定 XRD006 的次级代谢产物。这些研究充分表明菌株 XRD006 是一株能显著抑制青皮核桃采后病害的生防菌株。

1 材料与方法

1.1 试供材料

青皮核桃,品种“辽宁一号”,2022年8月14日采摘自山东省邹城市五康轩郭里庄园,成熟度为八九成。采样后以汽车运输形式运送至实验室,选取无病虫害侵染、无机械损伤、大小一致

和色泽相同的青皮核桃为试材。

贝莱斯芽胞杆菌(*B. velezensis*) XRD006, 前期于黄海海泥中分离获得, 溶菌肉汤(lysogeny broth, LB)培养基、细菌常规培养温度 37 °C 培养。保藏于南京农业大学食品科技学院农产品贮藏与加工试验室。

青皮核桃病原菌隐秘刺盘孢(*Colletotrichum aenigma*) HT11、暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*) HT12、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*) JNHT01、藤仓镰刀菌(*Fusarium fujikuroi*) JNHT04, 前期从山东省采后青皮核桃中分离获得, 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、真菌常规培养温度 28 °C 培养。保藏于南京农业大学食品科技学院农产品贮藏与加工试验室。

1.2 XRD006 对核桃采后病原菌拮抗能力测定

用灭菌打孔器在病原菌平板边缘取直径 6 mm 的菌碟接种至新的 PDA 培养基平板中央, 随后立即在其四边(距中央菌碟 2.50 cm), 接种 2 μL 1×10⁸ 菌落形成单位(colony-forming units, CFU)/mL 的 XRD006 菌液, 以接种 LB 液体培养基的 PDA 平板为对照, 28 °C 培养 6 d。测量各组菌落直径, 计算抑菌率(公式 1), 每个试验设置 3 个重复。

$$\text{抑菌率(\%)} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径}} \times 100 \quad (1)$$

1.3 生防菌 XRD006 发酵上清液对青皮核桃炭疽病抑制能力测定

选择青皮核桃采后主要病原菌暹罗炭疽菌(*C. siamense*) HT12 作为以下抑菌试验指示菌^[11]。

青皮核桃果实经 75%酒精消毒 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 室温中晾干备用。用无菌打孔器在青皮核桃赤道处制造直径为 0.60 cm 圆形伤口, 在伤口中注入 20 μL 发酵上清液, 接无菌水作为对

照; 2 h 后伤口中再接入 20 μL 1×10⁵ spores/mL HT12 孢子悬浮液, 室温晾干后装于塑料果盒中, 25 °C、相对湿度 85%恒温恒湿放置。每组处理设置 3 个平行, 每个平行 8 个果实, 在第 5 天和第 7 天时采用十字交叉法测量病斑直径。

1.4 生防菌 XRD006 发酵上清液对青皮核桃贮藏品质的影响

青皮核桃随机分为 2 组, 每组约 540 个果实, 设为 3 个平行。处理组(treatment, T)为发酵上清液处理, 对照组(control check, CK)采用无菌水处理。将果实在 2 种处理液中浸泡 1 min (果实与处理液的料液比为 3:7), 自然风干后套上塑料袋放入塑料筐中, 置于 4 °C、相对湿度 90%–95% 冷库中贮藏 56 d, 每日观察, 每隔 14 d 取样测定相关指标。

1.4.1 果实失重率

称量果实样品贮藏前与贮藏后的质量, 根据公式(2)计算其失重率。

$$\text{失重率(\%)} = \frac{\text{贮藏前质量} - \text{贮藏后质量}}{\text{贮藏前质量}} \times 100 \quad (2)$$

1.4.2 果实青皮色差测定

使用色差仪在青皮核桃赤道处选取固定 3 个点测量 L*、a*、b*值, 计算核桃表皮色差变化。

1.4.3 核仁粗脂肪含量测定

参照国标 GB/T 14488.1—2008 测定。取 10 g 新鲜核仁样品碾碎, 于恒温鼓风干燥箱中 105 °C 杀青 2 h, 随后 85 °C 烘干至恒重, 称量纸包装起来称其质量为 F_1 。将包装好的核仁放置于索氏提取器中, 在 40–60 °C 水浴提取 8 h, 用恒温鼓风干燥箱去除残留的石油醚, 称其质量为 F_2 , 计算粗脂肪含量(公式 3)。

$$\text{粗脂肪含量(\%)} = \frac{F_1 - F_2}{F_1} \times 100 \quad (3)$$

1.4.4 核仁可溶性蛋白含量测定

参考曹建康等方法略作修改^[12]。称取 2 g 核

仁, 加入 5 mL 蒸馏水研磨成匀浆, 收集上清液即为可溶性蛋白质提取液, 吸取 1 mL 提取液与 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液充分混合, 以蒸馏水为参比, 放置 2 min 后测量 OD_{595} , 计算可溶性蛋白含量(公式 4)。

$$\text{可溶性蛋白质的含量(mg/g)} = \frac{M_1 \times V_1}{V_2 \times M_2 \times 1000} \quad (4)$$

式中 M_1 : 从标准曲线查得的蛋白质的质量, μg ; V_1 : 样品提取液总体积, mL; V_2 : 测定时所取样品提取液体积, mL; M_2 : 样品质量, g。

1.4.5 核仁水分含量测定

采用差重法进行测定, 先称出核仁首重 M_1 , 然后将核仁放置到恒温鼓风干燥箱中, 105 °C 烘干至恒重(约 6 h), 记为 M_2 , 计算含水率(公式 5)。

$$\text{含水率(\%)} = \frac{M_1 - M_2}{M_2} \times 100 \quad (5)$$

1.4.6 核仁总酚含量测定

称量 0.50 g 核仁混合 9 mL 70%乙醇, 70 °C 水浴提取 20 min。取出后用流动水快速冷却, 8 000 r/min 离心 10 min。取 0.50 mL 上清液和 2.50 mL 稀释 10 倍的福林酚在黑暗中静置反应 5 min。加入 2 mL 7.50% Na_2CO_3 , 5 mL 蒸馏水反应 1 h, 于 760 nm 处测定吸光值。总酚含量由没食子酸标准曲线计算得出(公式 6)。

$$\text{总酚(mg/g)} = \frac{C \times V \times n}{m} \quad (6)$$

式中 C : 从标准曲线查得的没食子酸浓度, mg/g ; V : 提取液总体积, mL; n : 稀释倍数; m : 样品质量, g。

1.4.7 青皮过氧化物酶(peroxidase, POD)酶活测定

参照曹建康等方法略作修改^[12]。称取青皮组织 1 g 置于预冷的研钵中, 加入 5 mL pH 7.80、50 mmol/L 磷酸钠缓冲液: 1% 聚乙烯吡咯烷酮

(polyvinyl pyrrolidone, PVP)和 1.33 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), 冰浴研磨, 将匀浆于 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液即为酶提取液。取 0.50 mL 酶提取液, 分别混合 3 mL 25 mmol/L 愈创木酚溶液及 0.20 mL 0.50 mol/L H_2O_2 溶液启动反应。以蒸馏水为参比调零, 在反应 15 s 时开始记录反应体系在 470 nm 处吸光值, 记为初始值, 每隔 1 min 记录一次连续测定获取 6 个点的数据, 计算过氧化物酶(公式 7)。

$$\text{过氧化物酶活性[U/(min} \cdot \text{g)]} = \frac{V_1 \times \Delta OD_{470}}{V_2 \times m} \quad (7)$$

式中 V_1 : 样品提取液总体积, mL; ΔOD_{470} : 每分钟吸光度变化值; V_2 : 测定时所取样品提取液体积, mL; m : 样品质量, g。

1.4.8 青皮多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)酶活测定

参照曹建康等方法略作修改^[12], 酶提取液同 POD 测定。取 0.1 mL 酶提取液, 分别混合 4 mL 50 mmol/L pH 5.50 乙酸-乙酸钠缓冲液和 1 mL 50 mmol/L 邻苯二酚溶液。以蒸馏水为参比调零, 在反应 15 s 时开始记录反应体系在 420 nm 处吸光值, 记为初始值, 然后每隔 1 min 记录一次连续测定 6 个点的数据, 计算方法同 1.4.7。

1.4.9 菌落总数测定

取青皮核桃约 250 g 加入 500 mL 无菌生理盐水漩涡振荡 30 min 制成样品液, 梯度稀释 10、 10^2 、 10^3 倍, 分别取 1 mL 10^2 、 10^3 样液与 20 mL LB 培养基混合倒平板。28 °C, 培养 3 d 计数, 结果以 lg (CFU/g)表示。

1.4.10 霉菌、酵母数测定

使用平板计数琼脂(plate count agar, PCA)培养基, 其余处理方法同 1.4.9。

1.5 XRD006 全基因组测序与分析

1.5.1 XRD006 全基因组测序

挑取 XRD006 单菌落转接至 LB 液体培养基 37 °C 培养 16 h, 5 000 r/min 离心 5 min 取沉淀。用 1×磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗沉淀, 相同离心条件获得沉淀菌体, 此操作重复 2 次。液氮速冻菌体-80 °C 保存, 送南京擎科生物科技有限公司进行全基因组测序。

1.5.2 比较基因组分析

美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)下载贝莱斯芽胞杆菌标准株 FZB42 和 SQR9 的序列信息与菌株 XRD006 进行比较基因组分析; 运用 antiSMASH 网站预测 3 株菌的次级代谢产物基因簇并比较分析差异; 利用 mauve 软件对 3 株菌进行共线性分析; 利用 BPGA v1.3 软件对 3 株菌进行核心基因组、泛基因组分析。

1.6 XRD006 次级代谢产物分离鉴定与抑菌性能测定

1.6.1 粗提物制备

取发酵 3 d 的发酵液, 8 000 r/min 离心 15 min 收集上清液, 用 6 mol/L 的盐酸调节上清液 pH 为 2, 置于 4 °C 酸沉过夜, 10 000 r/min 离心 10 min 收集沉淀物, 加入 100 mL 色谱级甲醇溶解沉淀, NaOH 调节 pH 至 7, 于 20 °C 环境中磁力搅拌 5 h 抽提, 10 000 r/min 离心 10 min 获得次级代谢产物粗提物溶液, 于 40 °C 条件下减压旋蒸浓缩至 10 mL。

1.6.2 HPLC 分离

将 1.6.1 中获得的粗提物经葡聚糖凝胶柱(Sephadex LH-20)层析过滤并冻干。用 600 μL 50%乙腈溶解 30 mg 样品, 12 000 r/min 离心 3 min, 上清液过 0.22 μm 滤膜去除杂质, 取 20 μL 手动上样, 采用 C18 反相分析柱, 流速 1.20 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 214 nm, 具体分析液相程序如表 1 所示。

表 1 HPLC 分离程序

Table 1 HPLC separation procedure

t/min	Speed (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water (%)
0	1.2	0	100
2	1.2	0	100
47	1.2	90	10
48	1.2	95	5
55	1.2	95	5
56	0.01	95	5

1.6.3 质谱鉴定

取分析液相信号峰样品, 采用正离子模式电喷雾, 获得信号峰的质谱图。质谱条件为: 上样量 50 μL, 采集范围 200–2 000 *m/z*, 毛细管电压 35 V, 毛细管温度 275 °C, 喷雾电压 4 500 V, 脱溶剂气速 800 L/h。

1.6.4 抑菌代谢产物制备

样品处理方法同 1.6.2。取 600 μL 样品手动上样, 采用 C₁₈ 反相制备柱, 流速 15 mL/min, 柱温 25 °C, 检测波长 214 nm, 收集目标代谢产物流动相, 并于 1 MPa、-40 °C 条件下冻干获得样品纯品。分别稀释所有样品, 浓度均为 420 μg/mL, 用于抑菌活性的测定。具体制备液相程序如表 2 所示。

表 2 HPLC 制备程序

Table 2 HPLC preparation procedure

t/min	Speed (mL/min)	Acetonitrile (%)	Water (%)
0	5	20	80
1	5	20	80
2	15	20	80
7	15	35	65
12	15	45	55
17	15	50	50
27	15	55	45
42	15	60	40
62	15	65	35
66	15	95	5
72	15	95	5
73	0.1	95	5

1.6.5 抑菌活性测定

取 $\Phi 6$ mm 的暹罗炭疽菌(*C. siamense*) HT12 菌碟接种在 PDA 培养基平板中央。在距离菌碟 2 cm 处对称放置 2 个牛津杯, 一个加入 200 μ L 制备样品溶液, 一个加入 200 μ L 50%乙腈作为对照。28 $^{\circ}$ C 培养, 每日观察菌落生长情况, 记录抑菌圈大小。每个处理设置 3 个平行, 试验重复 2 次。

1.7 数据统计及分析

除特殊说明外, 所有试验处理均设 3 个平行; 试验数据统计分析采用 SPSS 软件进行方差分析和最小显著性差异法 (least significant difference, LSD) 多重比较 ($P < 0.05$), 采用 Excel 和 Origin2018 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 XRD006 抑制核桃采后病原菌能力分析

抑菌结果如图 1 所示, XRD006 对青皮核桃采后病害隐秘刺盘孢(*C. aenigma*) HT11、暹罗炭疽菌(*C. siamense*) HT12、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*) JNHT01 和藤仓镰刀菌(*F. fujikuroi*) JNHT04 皆具有抑制效果, 对峙 6 d 时抑菌率分别为 $49.22\% \pm 0.03\%$ 、 $50.61\% \pm 0.01\%$ 、 $53.83\% \pm 0.05\%$ 和 $58.71\% \pm 0.05\%$ 。这说明 XRD006 具备成为青皮核桃采后病害生防菌的潜力。

2.2 生防菌 XRD006 发酵上清液对青皮核桃炭疽病的影响

抑菌结果如图 2 所示, 在贮藏 5 d 时, 处理组个别果实开始发病, 病斑直径为 (2.01 ± 0.34) cm, 对照组没有出现发病现象。贮藏 7 d 时, 对照果实全部发病, 而处理组仅部分果实发病, 对照组病斑直径为 (4.53 ± 0.26) cm 显著大于处理组的 (1.81 ± 0.46) cm (表 3, $P < 0.05$)。试验表明, XRD006 发酵上清液对青皮核桃炭疽病有较好的防治效果。

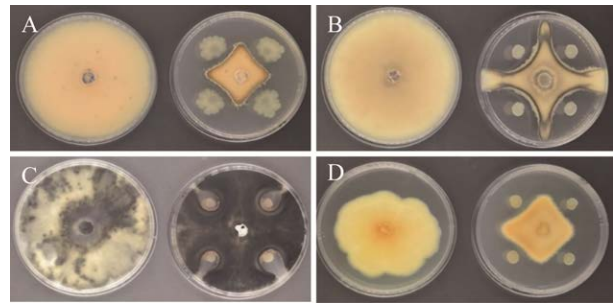


图 1 XRD006 对青皮核桃采后病原菌的拮抗作用 (6 d)

Figure 1 The antagonistic activity of XRD006 against postharvest pathogens of green walnut (6 d). A: *Colletotrichum aenigma* HT11. B: *Colletotrichum siamense* HT12. C: *Botryosphaeria dothidea* JNHT01. D: *Fusarium fujikuroi* JNHT04.



图 2 XRD006 发酵上清液处理对炭疽病防治效果的影响

Figure 2 Effect of XRD006 fermentation supernatant treatment on the prevention and treatment effect of anthracnose.

表 3 XRD006 发酵上清液处理对青皮核桃炭疽病病斑直径的影响

Table 3 Effect of XRD006 fermentation supernatant treatment on the diameter of anthracnose on green walnut

Storage time (d)	Disease diameter (cm)	
	CK	T
5	$2.01 \pm 0.34a$	$1.62 \pm 0.19b$
7	$4.53 \pm 0.26a$	$1.81 \pm 0.46b$

Different lowercase letters in the table indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$).

2.3 生防菌 XRD006 发酵上清液对青皮核桃贮藏品质的影响

2.3.1 整果失重率

如图 3 所示, 随着时间延长, 2 组果实的失重率都呈上升趋势, 在贮藏第 42 天和 56 天两组出现显著性差异, 处理组失重率显著低于对照组 ($P < 0.05$), 贮藏时间越长, 差异越大。说明发酵上清液处理可以显著降低青皮核桃的失重率。

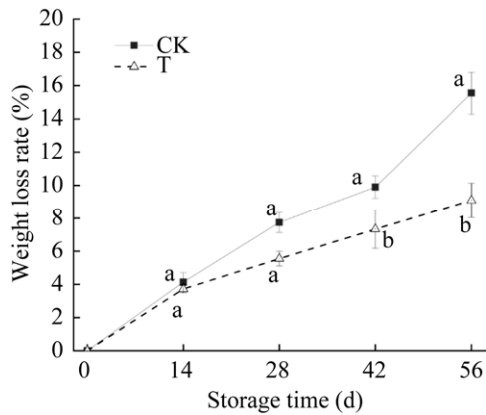


图3 XRD006 发酵上清液对青皮核桃失重率影响
Figure 3 Effect of XRD006 fermentation supernatant on the weight loss rate of green walnuts. Different lowercase letters in the table indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$).

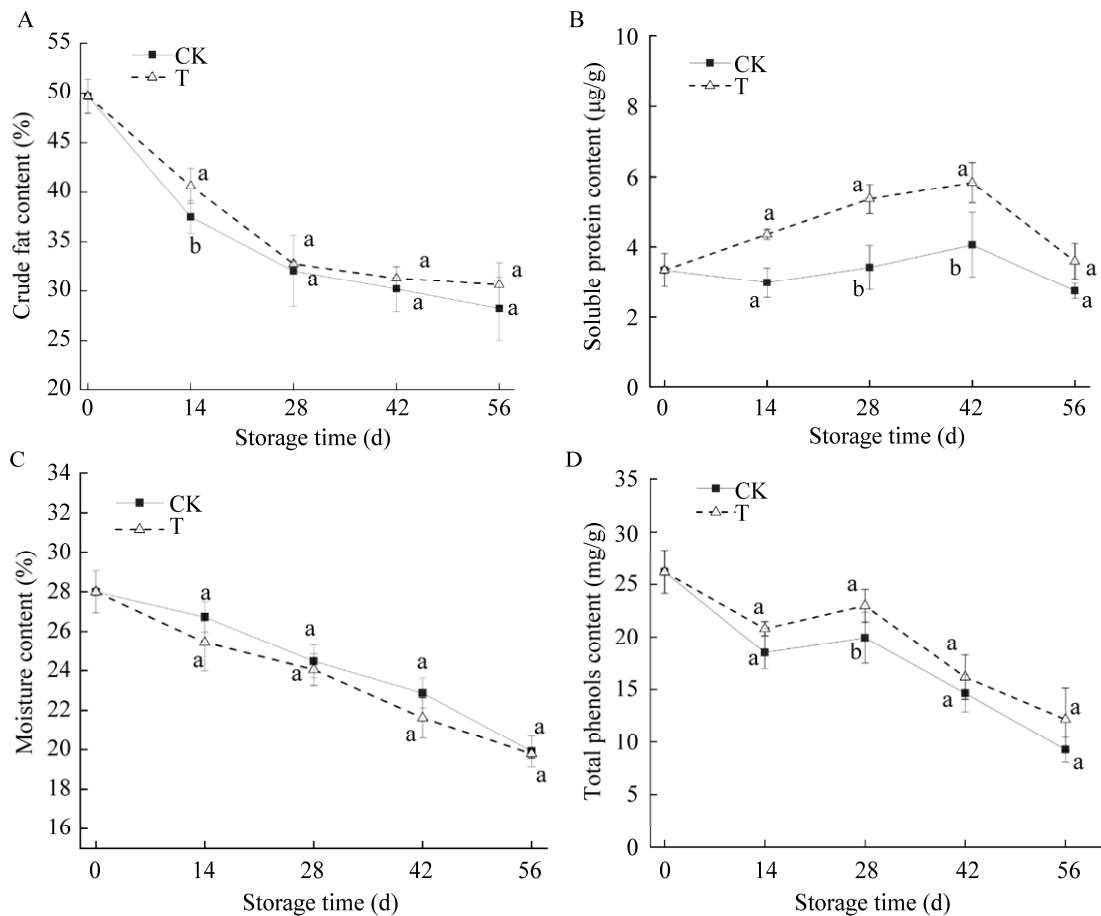


图4 XRD006 发酵上清液对青皮核桃核仁品质的影响

Figure 4 Effect of XRD006 fermentation supernatant on walnut kernel quality. A: Crude fat content. B: Soluble protein content. C: Moisture content. D: Total phenols content. Different lowercase letters in the table indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$).

2.3.2 核仁品质

如图 4A 所示, 处理组与对照组粗脂肪含量在贮藏期间均呈现下降趋势, 处理组粗脂肪含量始终高于对照组, 但两者之间没有显著差异 ($P > 0.05$); 贮藏期间对照组和处理组可溶性蛋白含量均出现先增加后降低趋势(图 4B), 42 d 时, 处理组的青皮核桃核仁可溶性蛋白含量最高为 $5.82 \mu\text{g/g}$, 显著高于对照组的 $4.11 \mu\text{g/g}$ ($P < 0.05$), 这表明发酵液可以减缓核仁可溶性蛋白含量下降; 水分含量试验(图 4C)显示, 处理组与对照组水分含量均不断下降, 两者之间差异不显著 ($P > 0.05$); 总酚含量如图 4D 所示, 两组总酚含量变化趋势相同, 28 d 时, 处理组总酚含量为

22.98 mg/g, 显著高于对照组的 19.92 mg/g ($P<0.05$)。以上试验说明, 发酵上清液可以有效减少果实可溶性蛋白和总酚的消耗, 保持果实的贮藏品质。

2.3.3 POD 及 PPO 酶活

结果如图 5A 所示, POD 酶活随着贮藏时间的增加, 总体呈现下降趋势, 但是处理组 POD 酶活始终显著高于对照组 ($P<0.05$)。PPO 酶活如图 5B 所示呈现波动趋势, 56 d 时, 处理组酶活 4.29 U/(min·g) 显著低于对照组的 5.61 U/(min·g)

($P<0.05$)。以上结果说明, 发酵上清液可以显著影响 POD 及 PPO 的酶活。

2.3.4 微生物

如图 6 所示, 随着贮藏时间的增加, 处理组与对照组的菌落总数、霉菌、酵母数量均不断上升, 但处理组微生物数量始终少于对照组, 56 d 时处理组菌落总数和霉菌、酵母数显著低于对照组 ($P<0.05$), 说明发酵上清液能有效抑制果实表明微生物的繁殖生长。

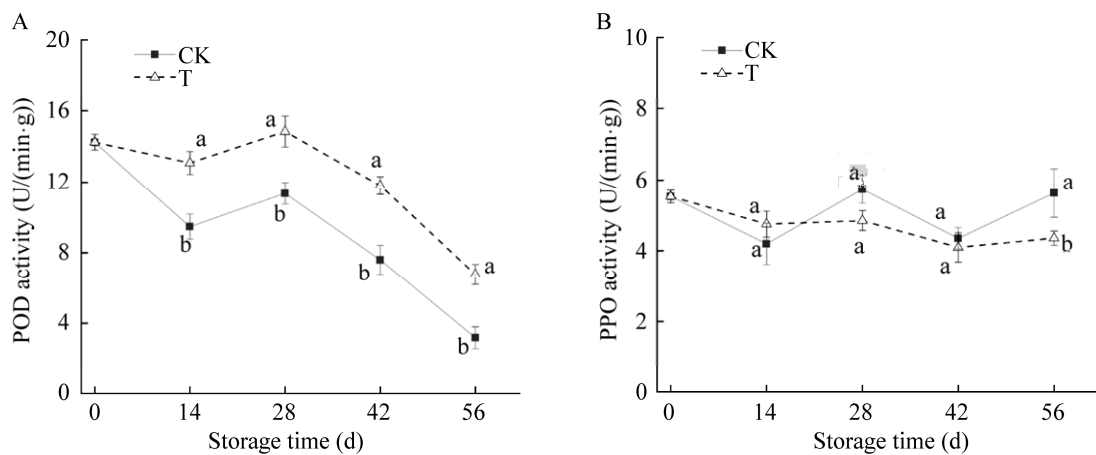


图 5 XRD006 发酵上清液对青皮核桃 POD 和 PPO 酶活影响

Figure 5 Effect of XRD006 fermentation supernatant on POD and PPO enzyme activities of green walnut. A: POD. B: PPO. Different lowercase letters in the table indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

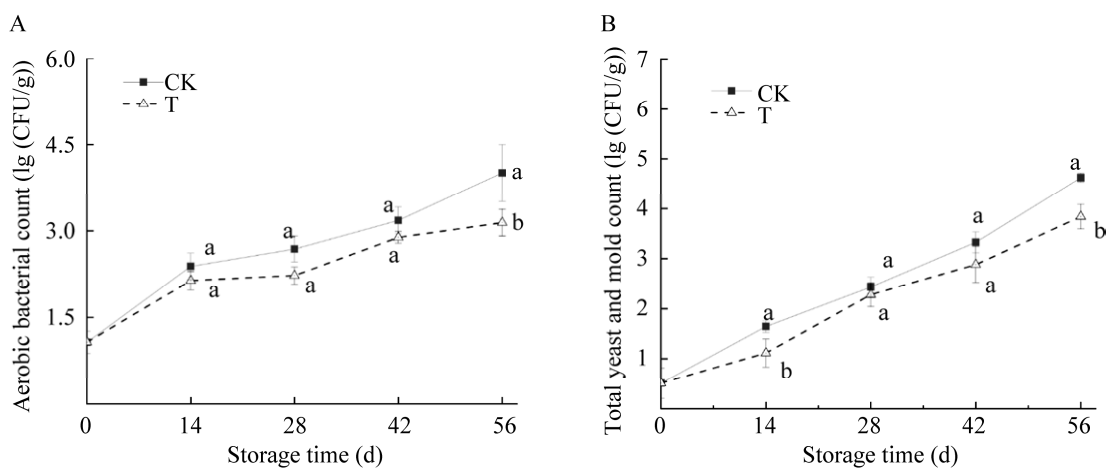


图 6 XRD006 发酵上清液对青皮核桃菌落总数和霉菌、酵母数的影响

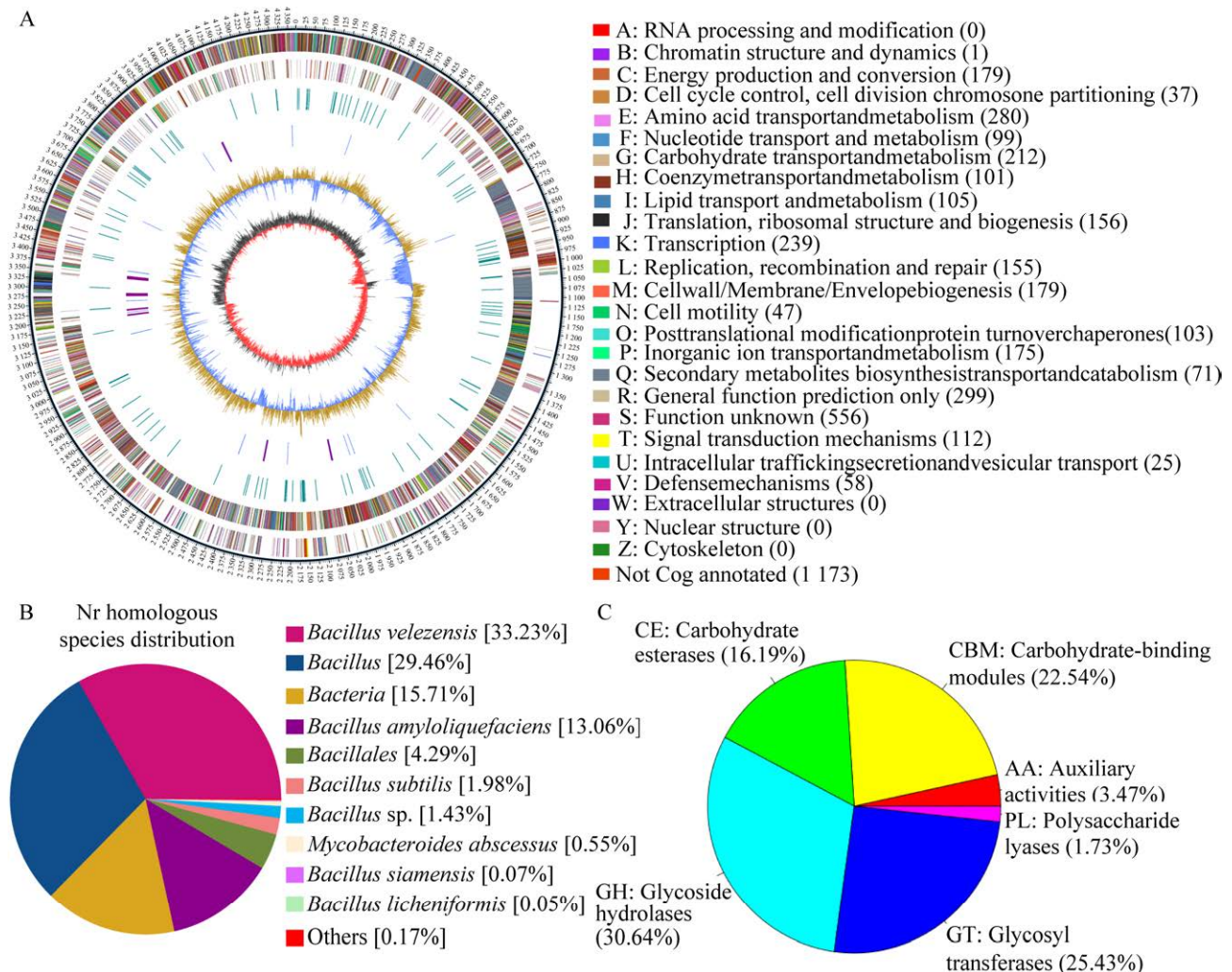
Figure 6 Effect of XRD006 fermentation supernatant on the total number of colonies and the number of molds and yeasts. A: Total number of colonies. B: Mold/Yeast number. Different lowercase letters in the table indicate significant differences between different groups ($P<0.05$).

2.4 XRD006 全基因组分析

2.4.1 全基因组分析

序列已上传 NCBI (accession No: CP118911)。菌株 XRD006 基因组长 4 371 975 bp, GC 占比 46.07%, 含有 4 362 个蛋白质编码基因, 27 个 rRNA 和 87 个 tRNA (图 7A)。Nr (non-redundant protein database) 显示 33.23% 的基因注释为贝莱斯芽胞杆菌, 29.46% 的基因注释为芽胞杆菌属, 证明 XRD006 为贝莱斯芽胞杆菌 (图 7B)。CAZy 数据库 (carbohydrate-active enzymes database) (图 7C) 注释到 XRD006 含有 53 个糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GHs)、44 个糖基转移酶 (glycosyl transferases, GTs)、3 个多糖裂解酶

(polysaccharide lyases, PLs)、28 个碳水化合物酯酶 (carbohydrate esterases, CEs)、6 个辅助氧化还原酶 (auxiliary activities, AAs) 和 39 个非催化的结合碳水化合物的功能域 (carbohydrate-binding modules, CBMs)。进一步分析显示 XRD006 含有几种关键的糖苷水解酶 (GHs): 内切- β -1,4-葡聚糖酶 (GH5)、麦芽糖-6-磷酸葡萄糖苷酶 (GH4)、 β -葡萄糖苷酶 (GH1)、 β -木糖苷酶 (GH43)、内切- β -1,4-半乳糖苷酶 (GH53), 这些酶可以催化水解病原菌细胞壁成分多糖, 说明 XRD006 能降解病原菌细胞壁, 抑制病原菌生长。基因本体论 (gene ontology, GO) 富集显示催化活性 (catalytic activity) 富集到的基因最多有 1 757 个, 其次为



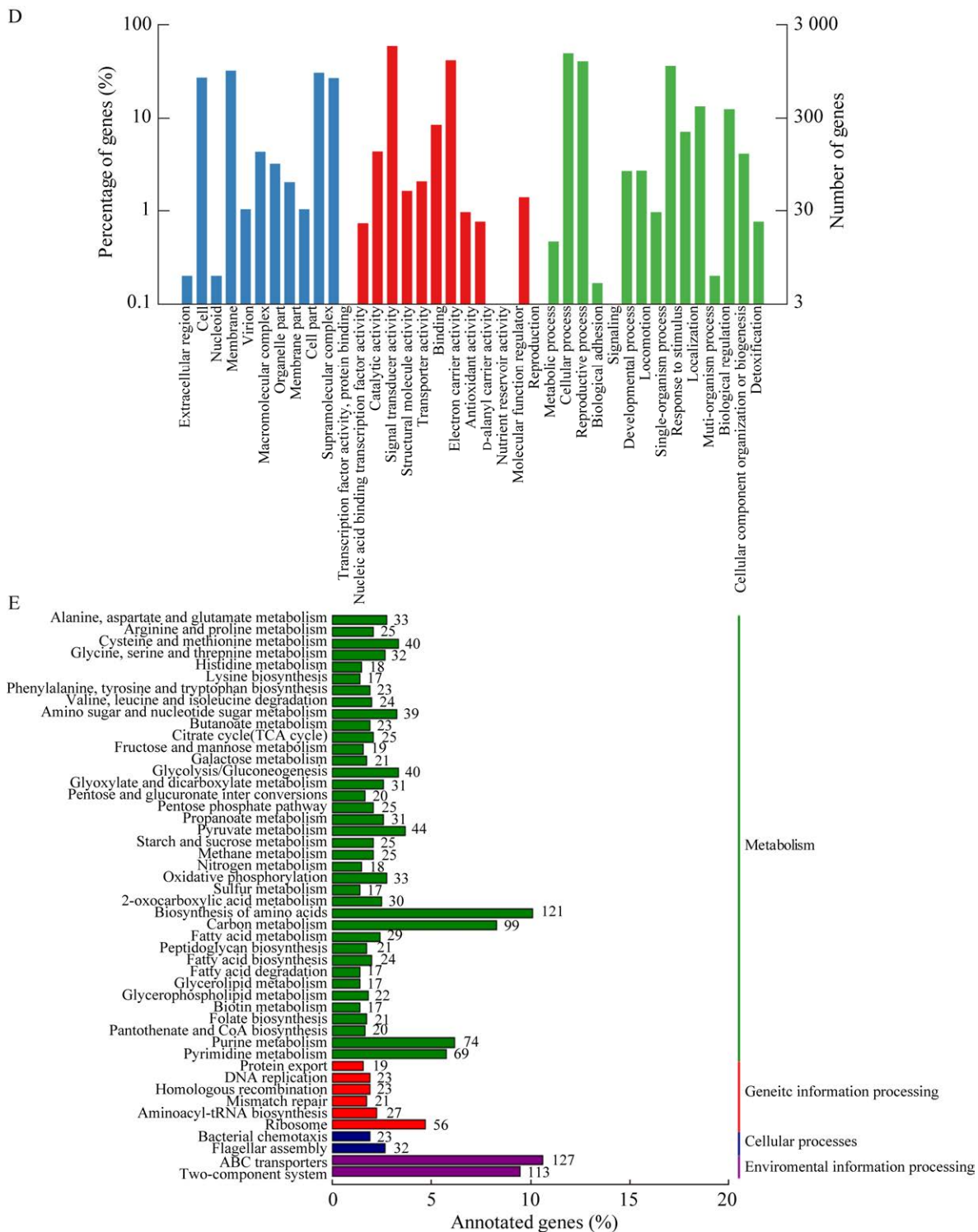


图 7 全基因组分析

Figure 7 Diagram of whole genome analysis. A: Circular genome map of strain XRD006. The circular distribution from outside to inside indicates genome size, positive chain gene, negative chain gene, repeat sequence, tRNA (blue) and rRNA (purple), GC content and GC-skew. B: Non-redundant (Nr) protein database of XRD006, FZB42 and SQR9. C: Carbohydrate enzyme activity (CAZy) of XRD006. D: Gene ontology (GO) annotation of XRD006. E: Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) annotation of XRD006.

代谢过程(metabolic process) 1 477 个基因,再次为结合类功能分类(binding) (图 7D)。GO 注释分析发现菌株含有可以分解病原菌细胞壁主要成分几丁质、多糖等成分的水解酶基因:几丁质酶(GO: 0004568)、纤维素酶(GO: 0008810)和葡聚糖酶(GO: 0052861、GO: 0052862)^[13-14]; 以及与定殖促生相关的基因:群体感应(GO: 0009372)、生物膜形成(GO: 0032022、GO: 1900192)、亚精胺合成(GO: 0008792、GO: 0008783),这说明 XRD006 可能具有抑菌、定殖能力^[15-16]。京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库共注释到 48 个代谢通路,其中 ABC 转运蛋白(ABC transporters)注释到的基因最多 127 个,其次为氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)有 121 个基因,再次为双组分代谢(two-component system)注释到 113 个基因(图 7E),分析显示在 KEGG 途径中存在一些与植物促生物质合成相关的基因,如参与吡啶-3-乙酸的合成途径的 *trpC* (K01609)和参与植酸酶的生物合成的 *phy* (K01083),这说明 XRD006 可能具有促生能力。

2.4.2 比较基因组学分析

菌株 XRD006、FZB42 和 SQR9 基因组特征比较见表 4。3 株菌的共线性分析结果如图 8A 所示, XRD006 与 FZB42、SQR9 之间存在局部共线块排列顺序颠倒、翻转和缺失的现象,这可能是 XRD006 为适应海洋环境压力而发生的改变。同源性分析显示 3 株菌共有 3 280 个相同的

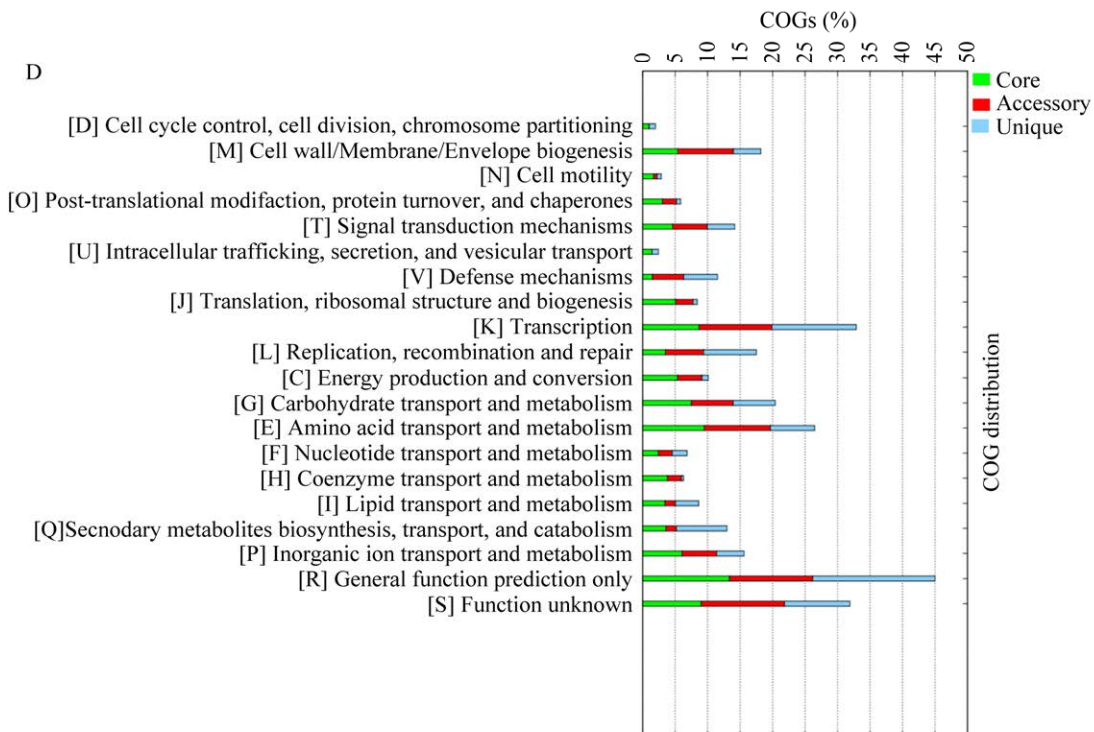
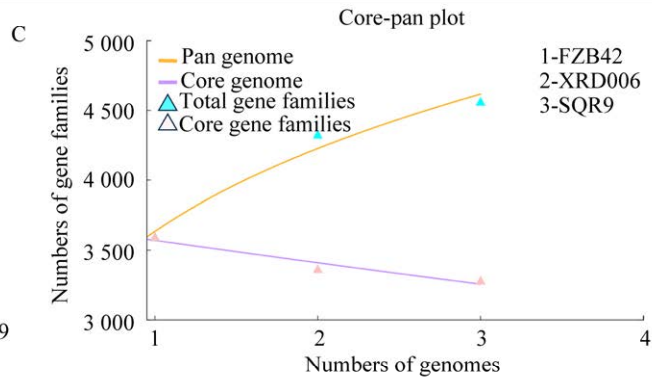
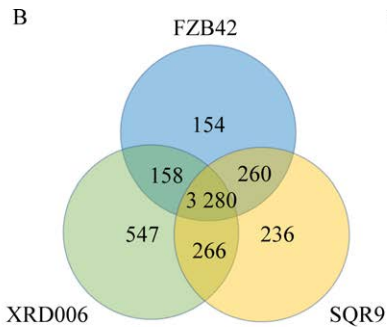
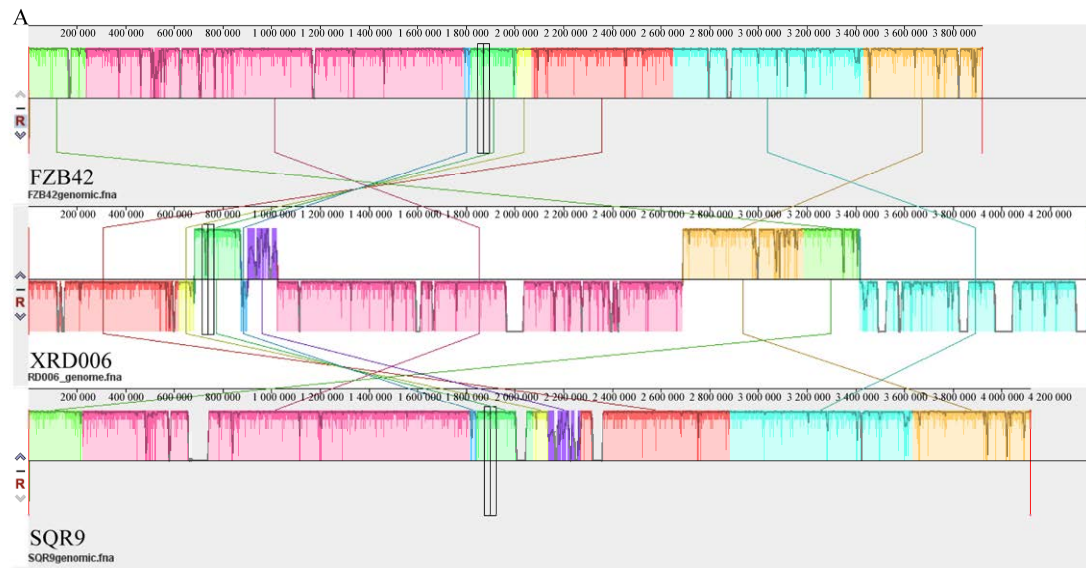
核心基因,占 XRD006 总基因数 78.67%,证明 XRD006 与 FZB42 和 SQR9 之间存在很高的相似性(图 8B)。泛基因组分析如图 8C 所示,3 株菌的核心基因组趋势明显比泛基因组趋势更平稳,这说明核心基因组更保守^[17]。直系同源蛋白质组簇(clusters of orthologous groups of proteins, COGs)聚类显示最多有 13.35%的核心基因与一般功能预测有关,值得注意的是还有 9%的核心基因功能未知,这表明 3 株菌可能具有未知的抗菌机制(图 8D)。

通过 antiSMASH 预测 XRD006 的次级代谢产物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs)。结果显示(图 8E), XRD006 含有 14 个 BGCs,包括 9 种已知 BGCs:表面活性肽(surfactin)、丰原素(fengycin)、嗜铁素(bacillibactin)、聚酮类(difficidin)、多烯类(bacillaene)、大环内酯(macrolactin)、杆菌溶素(bacilysin)、细菌素(plantazolicin)和丁酰苷菌素(butirosin A&B)。比对 XRD006、FZB42 和 SQR9 BGCs 的位置和产物显示,FZB42 和 SQR9 之间除 cluster 2 不同外,其他 BGCs 均是直接的线性对应,但是 XRD006 与两者比对,BGCs 更多的是异位对应,这与共线性分析吻合。有研究发现从枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)中分离得到的 fengycin 和 surfactin 对胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)具有抑制作用^[18],这可能是 XRD006 对暹罗炭疽菌(*C. siamense*)的抑制机理之一。此外, surfactin 与群体感应、生物膜形

表 4 菌株 XRD006、FZB42 和 SQR9 基因组特征比较

Table 4 Comparison of genomic characteristics of strain XRD006, FZB42 and SQR9

Features	XRD006	FZB42	SQR9
Genome size (bp)	4 371 975	3 918 589	4 117 023
G+C ratio (%)	46.07	46.4	46
Protein-coding genes	4 362	3 734	3 912
rRNA	27	29	21
tRNA	87	88	72
Genomic islands	16	12	11



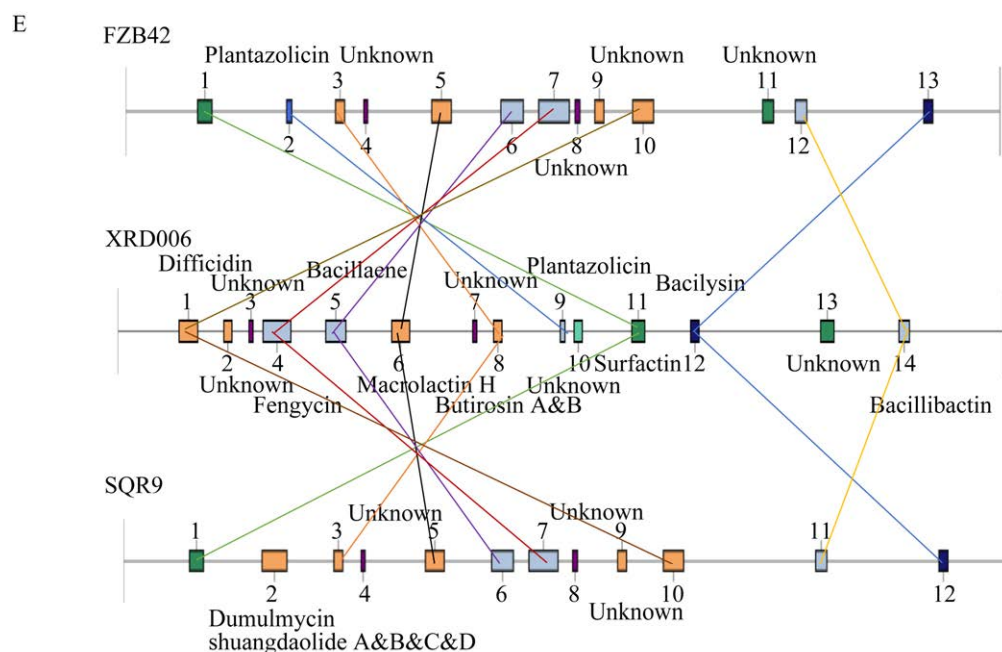


图 8 菌株 XRD006、FZB42 和 SQR9 比较基因组分析

Figure 8 Comparative genomic analysis among strain XRD006, FZB42 and SQR9. A: Collinearity analysis. B: Venn diagram of core genes, unique genes and accessory genes of strain XRD006, FZB42 and SQR9. C: Core-pan-genome plot of strain XRD006, FZB42 and SQR9. D: Comparison of the COG annotation of strain XRD006, FZB42 and SQR9. E: Comparison of the locations and products of the secondary metabolite gene clusters of XRD006, FZB42 and SQR9.

成和根定殖有关^[19], 这表明 XRD006 可能也有成为植物促生菌的潜力。值得注意的是, 相比 SQR9、XRD006 和 FZB42 含有 plantazolicin 的合成基因簇, 有试验证明 plantazolicin 具有杀线虫能力^[20], 这扩大了 XRD006 的应用前景和范围。

对 XRD006、FZB42 和 SQR9 的 BGCs 合成基因比对显示(图 9), 虽然三者 plantazolicin 的合成基因一致, 但 antiSMASH 预测显示 XRD006 的 plantazolicin 与已知 BGCs 比对相似性为 7%, 这表明产物可能具备全新的结构。与 XRD006 和 SQR9 相比, 在 FZB42 bacillibactin 基因簇中 *dhbA* 和 *dnbC* 是其他生物合成基因, 但是在 XRD006 和 SQR9 中这两者是核心生物合成基因, 说明

XRD006 和 SQR9 产生的 bacillibactin 可能具有更强的抑菌活性。Surfactin 基因簇基因比对显示, 相比 FZB42 和 SQR9, XRD006 在核心基因 *SrfAB* 和 *SrfAA* 之间多出了一个额外合成基因, 这可能产生新结构的, 具备更强抑菌活性的 surfactin。

2.5 XRD006 次级代谢产物分离及鉴定

2.5.1 HPLC 分离及质谱鉴定分析

结果如图 10 所示, 对分析液相可能的抗菌产物信号峰进行收集并通过质谱确定分子量, 共收集到 5 个脂肽类次级代谢产物, 查阅文献发现质荷比 1 030.4 m/z 的为 C13-iturin, 1 044.5 m/z 的为 C14-iturin, 1 058.4 m/z 的为 C15-iturin, 1 463.4 m/z 的为 C16-fengycin B, 1 476.8 m/z 的为 C17-fengycin C^[21-22]。

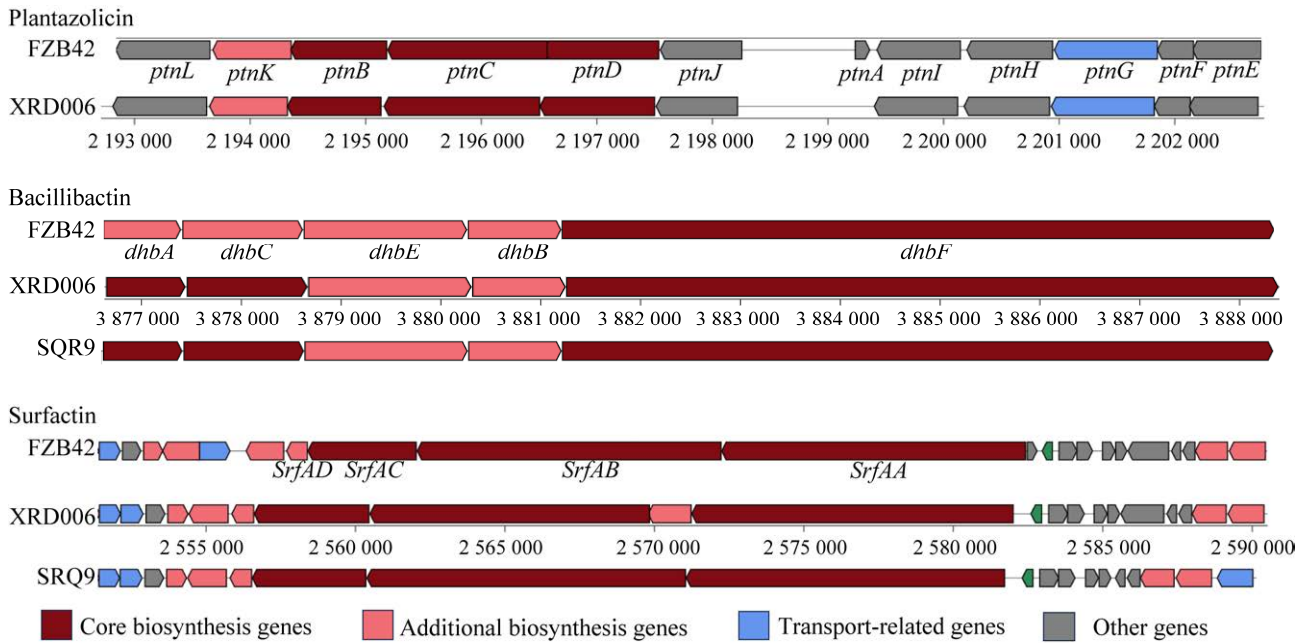
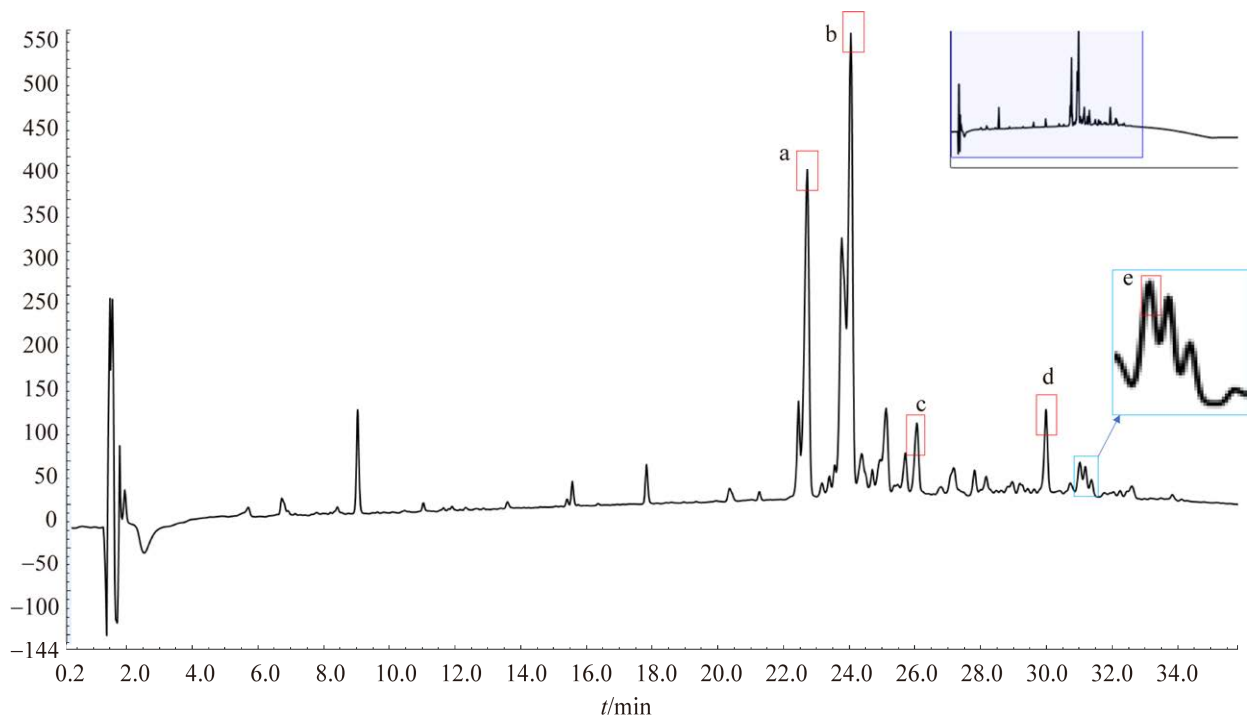


图 9 菌株 XRD006、FZB42 和 SQR9 中次级代谢产物基因簇的比较

Figure 9 Comparison of secondary metabolite gene clusters of strain XRD006, FZB42 and SQR9. The red, pink, blue and gray represent core biosynthetic genes, additional biosynthetic genes, transport-related genes and other genes, respectively.



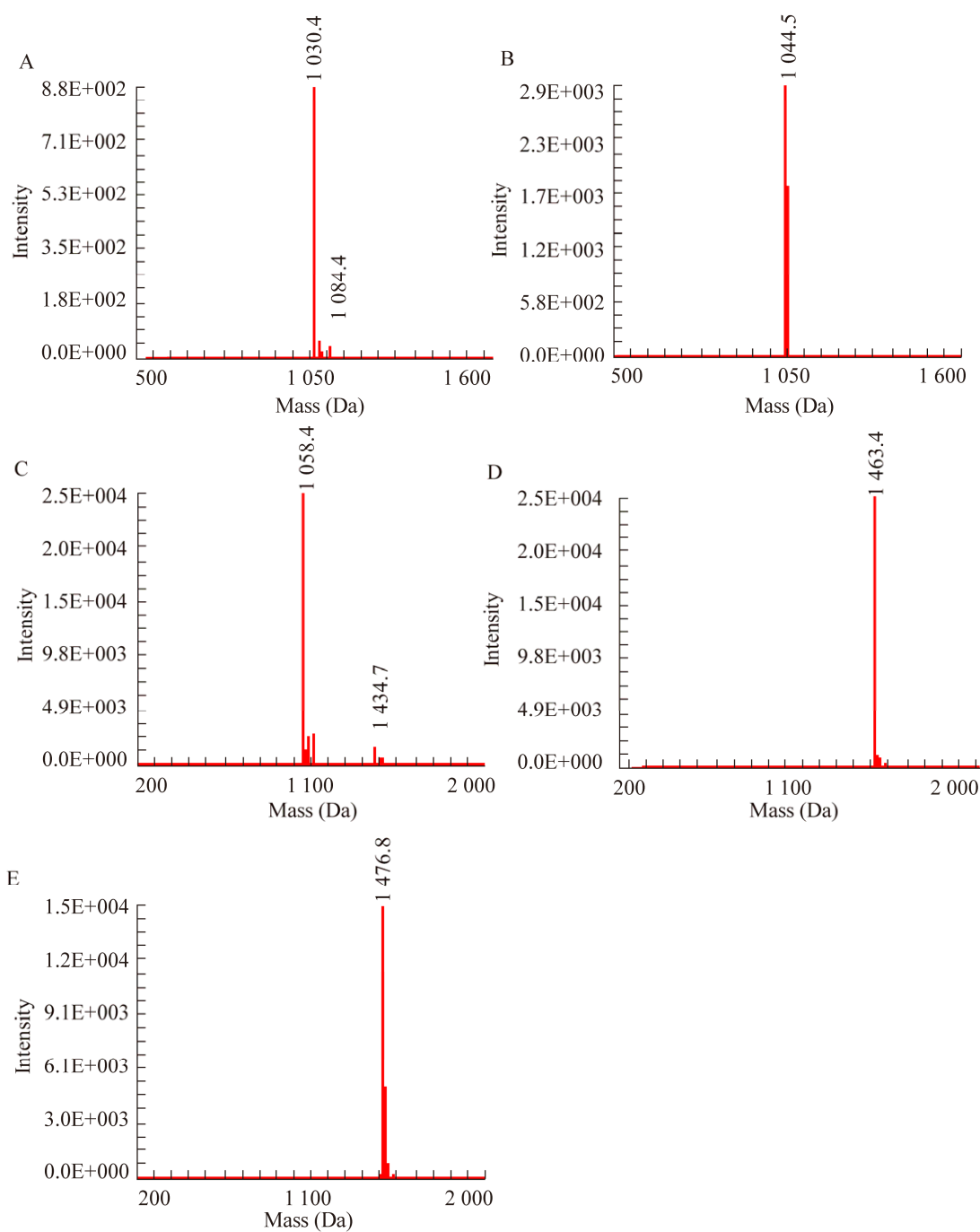


图 10 HPLC 与质谱图

Figure 10 HPLC and mass spectrometry. A: C13-iturin. B: C14-iturin. C: C15-iturin. D: C16-fengycin B. E: C17-fengycin C.

2.5.2 代谢产物抑菌活性测定

制备液相制备得到 C13-iturin、C14-iturin、C15-iturin、C16-fengycin B 和 C17-fengycin C 的纯品，抑菌试验结果如图 11 所示，C13-iturin、C15-iturin 对暹罗炭疽菌(*C. siamense*) HT12

抑菌活性较弱，抑菌率为 $3.71\% \pm 0.07\%$ 和 $4.21\% \pm 0.04\%$ ；C14-iturin 抑菌活性较强，抑菌率为 $17.94\% \pm 0.1\%$ ；C16-fengycin B、C17-fengycin C 抑菌率最强，分别为 $34.63\% \pm 0.09\%$ 和 $33.32\% \pm 0.04\%$ 。

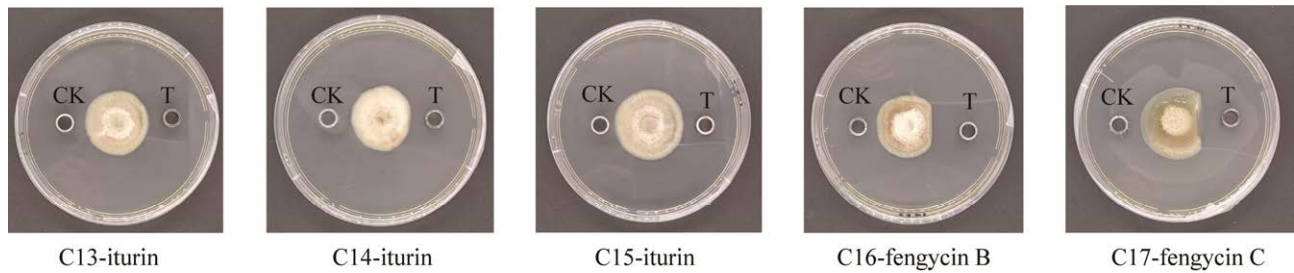


图 11 抑菌产物活性测定(4 d)

Figure 11 Determination of activity of antifungal products (4 d).

3 讨论

目前已有多种生防菌展现出了对青皮核桃采后病害的抑菌潜力。例如, 利诺霉素链霉菌 (*Streptomyces lienomycini*) 可以有效抑制由黄单胞菌引起的核桃黑斑病, 这主要是利诺霉素链霉菌产生的化合物 1H-吡咯-2-羧酸和 1H-吡咯-2-甲酰胺起作用^[23]。核桃内生菌暹罗芽胞杆菌 (*B. siamensis*) WB1 通过产生脂肽、胞外水解酶和激活植物系统抗性抑制尖孢炭疽菌 (*C. acutatum*) 的生长与侵染, 同时 WB1 产生铁载体和吡啶-3-乙酸, 溶解无机磷酸盐促进植物的生长^[24]。解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) SDF-005 处理胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) TS-09R, 造成 TS-09R 菌丝增大、畸变、扭曲和细胞壁的破裂^[25]。虽然生防菌种类多样, 但对青皮核桃采后病原菌具备抑制作用的贝莱斯芽胞杆菌报道较少, 本文确定了海洋源菌株贝莱斯芽胞杆菌 XRD006 能有效抑制青皮核桃采后病害, 这丰富了青皮核桃生防菌的微生物资源。

贮藏试验表明, 发酵上清液处理显著降低了青皮核桃的失重, 且处理组微生物含量显著低于对照组, 这可能是因为发酵上清液抑制了微生物的生长, 并因此减少了因病原菌侵染导致的果实腐烂失水。诱导抗性是生物防治技术抑制果蔬采后病害的机制之一^[26]。POD 在木质素合成的催

化作用中起着关键作用, 木质素可以形成交织的网络, 使细胞壁变硬, 从而提高抗病性^[27]。本研究中, 处理组的 POD 酶活显著高于对照组 ($P < 0.05$), 说明发酵上清液可以提高果实的抗性。PPO 是果蔬褐变中主要的酶类, 酚类化合物在多酚氧化酶的催化下, 极易氧化成醌并发生羟基化, 生成羟基醌, 醌聚合并与细胞内蛋白质的氨基酸反应形成黑褐色聚合物, 发生褐变^[28]。本研究发现, 处理组 PPO 酶活显著低于对照组 ($P < 0.05$), 表明发酵上清液处理可能可以抑制青皮核桃褐变。核仁粗脂肪含量、可溶性蛋白含量、水分含量、总酚含量在贮藏结束时, 处理组与对照组差异并不显著, 这表明发酵上清液处理在显著抑制病原菌侵染的情况下, 并不会导致果实品质的劣变, 说明 XRD006 具有良好的应用前景。

生防菌生境的差异会赋予菌株独特的性状与功能。XRD006 与贝莱斯芽胞杆菌标准菌株 (*B. velezensis*) FZB42 和 SQR9 基因组特征比较显示, XRD006 的环状染色体最长为 4 371 975 bp, 拥有最多蛋白编码基因 4 362 个, 这可能是由于分离生境不同, XRD006 分离自黄海海泥, FZB42 分离自西班牙维河含盐水样, SQR9 分离自中国植物根际土壤, XRD006 在海洋高盐、高压和低温等不利环境下可能扩充新基因添加新功能以更好扩展生存空间和能力, XRD006 可能因此具备更强的抗逆性。泛基因组分析则显示,

XRD006 拥有最多的特有基因 547 个,这共同表明 XRD006 可能具备特定表型或能力。以上说明 XRD006 是一株新的、独特的生防菌。

贝莱斯芽胞杆菌(*B. velezensis*)可以通过产抗菌次级代谢产物、胞外溶酶,诱导系统抗性等手段抑制病原菌生长及侵染。iturins 可以有效抑制稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)的生长^[29]。Surfactin^[30]和 fengycin^[31]对胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)皆具备拮抗作用,前者同时能引发植物的诱导系统抗性,提升植物的抗病能力。Macrolactin 被发现在防治由青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的烟草青枯病中起主要作用^[32]。最新研究显示, bacilysin 不仅对细菌病原菌具有拮抗作用,对大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)这种真菌病害也具备拮抗作用^[33]。此外,试验证明贝莱斯芽胞杆菌(*B. velezensis*)产生的几丁质酶、蛋白酶和 β -1,3-葡聚糖酶可以抑制胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)孢子萌发和芽管生长,破坏菌丝细胞壁造成胞质分布不均^[34]。以上研究表明,贝莱斯芽胞杆菌(*B. velezensis*)产生的多种次级代谢产物和胞外溶酶可以抑制多样的病原菌,甚至引发植物的诱导系统抗性。本研究中全基因组研究显示, XRD006 具备产生胞外溶酶和生物膜的基因, HPLC 与质谱结果也表明, XRD006 可以产生 iturin 和 fengycin 这 2 种脂肽类抗菌物质,且 fengycin 家族对青皮核桃病原菌 HT12 具有较高的抑菌活性。

4 结论

本研究首先通过抑菌试验确定了菌株 XRD006 对青皮核桃采后病原菌具有抑菌活性,随后通过活体抑菌试验和贮藏试验,表明 XRD006 具备良好的活体抑菌能力及保持青皮核桃贮藏品质的能力;利用组学技术挖掘了

XRD006 的抗病基因和抗菌产物,揭示了 XRD006 和 FZB42、SQR9 之间的亲缘关系;利用凝胶层析、HPLC 和质谱证明了 XRD006 能够产生具有抑菌能力的次级代谢产物脂肽。本研究表明 XRD006 对青皮核桃采后病害具有良好的抑制作用,可以较好地保持青皮核桃果实品质,且 XRD006 具有多种潜在抗菌产物,其中 fengycin 家族脂肽抑菌潜力最强。本研究最终为青皮核桃采后病害生物防治研究提供了理论基础,并丰富了生防菌资源。

参考文献

- [1] ZHONG LZ, BORNMAN JF, WU GC, HORNOFF A, DOVI KAP, AL-ALI H, ASLAM N, JOHNSON SK. The nutritional and phytochemical composition of the indigenous Australian pindan walnut (*Terminalia cunninghamii*) kernels[J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2018, 73(1): 40-46.
- [2] 刘丹丹. 核桃蛋白的抗氧化与降血压活性评价及酶解必要性研究[D]. 镇江: 江苏大学硕士学位论文, 2020. LIU DD. Evaluation of antioxidant and antihypertensive activities of walnut protein and study on the necessity of enzymatic hydrolysis[D]. Zhenjiang: Master's Thesis of Jiangsu University, 2020 (in Chinese).
- [3] 刘斌. 商洛市核桃病虫害现状及防治对策[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2018. LIU B. Current situation and control countermeasures of walnut diseases and insect pests in Shangluo city[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2018 (in Chinese).
- [4] SUN PP, CUI JC, JIA XH, WANG WH. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* L-1 for biocontrol of pear ring rot[J]. Horticultural Plant Journal, 2017, 3(5): 183-189.
- [5] YUAN HB, SHI BK, WANG L, HUANG TX, ZHOU ZQ, HOU H, TU HT. Isolation and characterization of *Bacillus velezensis* strain P2-1 for biocontrol of apple postharvest decay caused by *Botryosphaeria dothidea*[J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 12: 808938.
- [6] CHACÓN FI, SINELI PE, MANSILLA FI, PEREYRA MM, DIAZ MA, VOLENTINI SI, POEHLEIN A, MEINHARDT F, DANIEL R, DIB JR. Native cultivable bacteria from the blueberry microbiome as novel

- potential biocontrol agents[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5): 969.
- [7] CHEN XH, KOUMOUTSI A, SCHOLZ R, EISENREICH A, SCHNEIDER K, HEINEMEYER I, MORGENSTERN B, VOSS B, HESS WR, REVA O, JUNGE H, VOIGT B, JUNGBLUT PR, VATER J, SÜSSMUTH R, LIESEGANG H, STRITTMATTER A, GOTTSCHALK G, BORRISS R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(9): 1007-1014.
- [8] WANG JR, XING JY, LU JK, SUN YJ, ZHAO JJ, MIAO SH, XIONG Q, ZHANG YG, ZHANG GS. Complete genome sequencing of *Bacillus velezensis* WRN014, and comparison with genome sequences of other *Bacillus velezensis* strains[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(5): 794-808.
- [9] LIU YN, LU J, SUN J, LU FX, BIE XM, LU ZX. Membrane disruption and DNA binding of *Fusarium graminearum* cell induced by C16-fengycin A produced by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Food Control*, 2019, 102: 206-213.
- [10] PARK JS, RYU GR, KANG BR. Target mechanism of iturinic lipopeptide on differential expression patterns of defense-related genes against *Colletotrichum acutatum* in pepper[J]. *Plants*, 2022, 11(9): 1267.
- [11] WANG QH, FAN K, LI DW, NIU SG, HOU LQ, WU XQ. Walnut anthracnose caused by *Colletotrichum siamense* in China[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2017, 46(6): 585-595.
- [12] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.
CAO JK, JIANG WB, ZHAO YM. Guidance on Postharvest Physiological and Biochemical Experiments of Fruits and Vegetables[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007 (in Chinese).
- [13] ZHENG TW, LIU L, NIE QW, HSIANG T, SUN ZX, ZHOU Y. Isolation, identification and biocontrol mechanisms of endophytic bacterium D61-A from *Fraxinus hupehensis* against *Rhizoctonia solani*[J]. *Biological Control*, 2021, 158: 104621.
- [14] DAMASCENO CL, ALVES DUARTE EA, dos SANTOS LBPR, ALVES SANTOS de OLIVEIRA T, de JESUS FN, de OLIVEIRA LM, GÓES-NETO A, SOARES ACF. Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil[J]. *Biological Control*, 2019, 137: 104016.
- [15] NIE LJ, YE WQ, XIE WY, ZHOU WW. Biofilm: new insights in the biological control of fruits with *Bacillus amyloliquefaciens* B4[J]. *Microbiological Research*, 2022, 265: 127196.
- [16] XU ZH, ZHANG HH, SUN XL, LIU Y, YAN WX, XUN WB, SHEN QR, ZHANG RF. *Bacillus velezensis* wall teichoic acids are required for biofilm formation and root colonization[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(5): e02116-e02118.
- [17] CHEN M, XU CY, WANG X, REN CY, DING J, LI L. Comparative genomics analysis of c-di-GMP metabolism and regulation in *Microcystis aeruginosa*[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 1-17.
- [18] KIM PI, RYU J, KIM YH, CHI YT. Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, fengycin and surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 20(1): 138-145.
- [19] ANCKAERT A, ARIAS AA, HOFF G, CALONNE-SALMON M, DECLERCK S, ONGENA M. The use of *Bacillus* spp. as bacterial biocontrol agents to control plant diseases[M]//Microbial Bioprotectants for Plant Disease Management. Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing, 2021: 247-300.
- [20] LIU ZZ, BUDI HARJO A, WANG PF, SHI H, FANG J, BORRISS R, ZHANG KQ, HUANG XW. The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematocidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23): 10081-10090.
- [21] BASHYAL BM, CHAND R, KUSHWAHA C, SEN D, PRASAD LC, JOSHI AK. Association of melanin content with conidiogenesis in *Bipolaris sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.)[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(2): 309-316.
- [22] LUO CP, LIU XH, ZHOU HF, WANG XY, CHEN ZY. Nonribosomal peptide synthase gene clusters for lipopeptide biosynthesis in *Bacillus subtilis* 916 and their phenotypic functions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 81(1): 422-431.
- [23] HE H, HAO X, ZHOU W, SHI N, FENG J, HAN L. Identification of antimicrobial metabolites produced by a potential biocontrol actinomycete strain A217[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128(4): 1143-1152.
- [24] FENG XF, XU R, ZHAO N, WANG DM, CUN MR, YANG B. Isolation, identification, and characterization

- of endophytic *Bacillus* from walnut (*Juglans sigillata*) root and its biocontrol effects on walnut anthracnose[J]. *Agriculture*, 2022, 12(12): 2102.
- [25] WANG HQ, JI YP, QU YY, QI YK, LI DW, LIU ZY, WU XQ. The response strategies of *Colletotrichum gloeosporioides* s.s. due to the stress caused by biological control agent *Bacillus amyloliquefaciens* deciphered by transcriptome analyses[J]. *Biological Control*, 2020, 150: 104372.
- [26] WANG XL, WANG J, JIN P, ZHENG YH. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2013, 164(2/3): 141-147.
- [27] 卢麒宇. 解淀粉芽孢杆菌 JK-1 对蓝莓灰霉病生物防治效果评估及抑菌机理初探[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2022.
- LU QY. Evaluation of biocontrol effect of *Bacillus amyloliquefaciens* JK-1 on blueberry *Botrytis cinerea* and preliminary exploration of its antibacterial mechanism[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [28] 李京赞, 刘玉德, 石文天, 陶春生. 植物果蔬的褐变及抑制的研究[J]. *包装与食品机械*, 2019, 37(1): 63-68.
- LI JZ, LIU YD, SHI WT, TAO CS. Advances in research on browning and inhibition of plant fruits and vegetables[J]. *Packaging and Food Machinery*, 2019, 37(1): 63-68 (in Chinese).
- [29] ZHANG RS, WANG FG, QI ZQ, QIAO JQ, DU Y, YU JJ, YU MN, LIANG D, SONG TQ, PAN XY, CAO HJ, ZHANG H, LIU YF. Iturins produced by *Bacillus velezensis* Jt84 play a key role in the biocontrol of rice blast disease[J]. *Biological Control*, 2022, 174, 105001.
- [30] YAMAMOTO S, SHIRAISHI S, SUZUKI S. Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*?[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2015, 60(4): 379-386.
- [31] JUMPATHONG W, INTRA B, EUANORASETR J, WANAPAIAN P. Biosurfactant-producing *Bacillus velezensis* PW192 as an anti-fungal biocontrol agent against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum musae*[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(5): 1017.
- [32] SUI XN, HAN XB, CAO JM, LI YQ, YUAN Y, GOU JY, ZHENG YF, MENG C, ZHANG CS. Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* EM-1 associated with suppressive rhizosphere soil microbes against tobacco bacterial wilt[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 940156.
- [33] HAN XS, SHEN DX, XIONG Q, BAO BH, ZHANG WB, DAI TT, ZHAO YJ, BORRIS R, FAN B. The plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 controls the soybean pathogen *Phytophthora sojae* due to bacilysin production[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(23): e0160121.
- [34] CHOUB V, AJUNA HB, WON SJ, MOON JH, CHOI SI, MAUNG CEH, KIM CW, AHN YS. Antifungal activity of *Bacillus velezensis* CE 100 against anthracnose disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) and growth promotion of walnut (*Juglans regia* L.) trees[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(19): 10438.