



# 小麦赤霉病拮抗菌 JB7 的拮抗活性及鉴定

毕钰<sup>1,2,3</sup>, 张琳<sup>1,2,3</sup>, 余红凤<sup>1,2,3</sup>, 王志刚<sup>1,2,3</sup>, 徐伟慧<sup>1,2,3\*</sup>, 李阳<sup>1</sup>

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

毕钰, 张琳, 余红凤, 王志刚, 徐伟慧, 李阳. 小麦赤霉病拮抗菌 JB7 的拮抗活性及鉴定[J]. 微生物学报, 2024, 64(5): 1580-1592.

BI Yu, ZHANG Lin, YU Hongfeng, WANG Zhigang, XU Weihui, LI Yang. Antagonistic activity and identification of antagonistic bacteria JB7 against *Fusarium* head blight[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(5): 1580-1592.

**摘要:** 由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*, Fg)引起的赤霉病是限制小麦生产的主要病害之一。生物防治是一种高效且可持续的防治方法。【目的】从小麦种子内筛选具有抑制禾谷镰刀菌的菌株并对其生防潜力进行评估, 为小麦赤霉病生防制剂的开发与利用提供菌种资源及理论支撑。【方法】采用平板对峙、孢子萌发法和无菌上清液抑菌试验筛选小麦种子内对禾谷镰刀菌具有拮抗活性的内生菌株; 利用扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)和共聚焦扫描电镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察并分析无菌上清液对 Fg 的分生孢子形态、膜完整性以及胞内活性氧的影响; 通过盆栽试验验证内生菌对小麦赤霉病的生防效果; 应用二代 Illumina HiSeq 测序平台进行全基因组测序。【结果】从小麦种子中分离出一株高效抑制 Fg 生长的内生菌株 JB7, 其衰亡期无菌上清液对 Fg 孢子萌发抑制率高达 85.23%。菌株 JB7 的无菌上清液使 Fg 孢子表面凹陷, 破坏其细胞膜, 造成核酸和蛋白质的渗漏, 诱导 Fg 菌丝活性氧的累积, 引起 Fg 菌丝可溶性蛋白和丙二醛含量的显著升高。该菌株具有分泌蛋白酶、纤维素酶、葡聚糖酶和产铁载体的能力。盆栽试验表明菌株 JB7 能显著降低小麦赤霉病的病情指数( $P<0.05$ )。经全基因组学鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*) JB7, 该菌株基因组中含有 12 个抑菌功能的次级代谢产物合成基因簇。【结论】菌株 JB7 能抑制禾谷镰刀菌的生长, 对小麦赤霉病有较强的防效, 可作为生物防治小麦赤霉病的候选菌株。

资助项目: 黑龙江省重点研发计划(GA23B018); 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)

This work was supported by the Key Research and Development Project of Heilongjiang Province (GA23B018), the Qiqihar Food Industry Research Institute Project (SXSP-2021004), and the Basic Research Fees of Universities in Heilongjiang Province (145209808).

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

Received: 2023-12-07; Accepted: 2024-02-01; Published online: 2024-02-19

关键词: 小麦赤霉病; 禾谷镰刀菌; 甲基营养型芽孢杆菌; 生物防治; 活性氧积累

## Antagonistic activity and identification of antagonistic bacteria JB7 against *Fusarium* head blight

BI Yu<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Lin<sup>1,2,3</sup>, YU Hongfeng<sup>1,2,3</sup>, WANG Zhigang<sup>1,2,3</sup>, XU Weihui<sup>1,2,3\*</sup>, LI Yang<sup>1</sup>

1 College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, 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:** *Fusarium* head blight (FHB) caused by *Fusarium graminearum* is one of the major diseases limiting wheat production. Biocontrol has been considered an effective and sustainable method for the control of crop diseases. **[Objective]** To screen out endophytic strains with inhibitory effects on *F. graminearum* from wheat grains and evaluate their biocontrol potential, providing strain resources and theoretical support for the development and utilization of biocontrol agents against FHB in wheat. **[Methods]** Plate confrontation, spore germination, and cell-free supernatant (CFS) inhibition experiments were carried out to screen out the endophytic strains with antagonistic activity against *F. graminearum* from wheat grains. Scanning electron microscopy (SEM) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) were employed to observe the conidial morphology, membrane integrity, and mycelial reactive oxygen species of *F. graminearum* treated with the CFS. Pot experiments were performed to verify the biocontrol effects of the endophytic bacteria on FHB. Illumina HiSeq was used for whole genome sequencing. **[Results]** A highly efficient endophytic strain JB7 inhibiting the growth of *F. graminearum* was isolated from wheat grains. The CFS of strain JB7 in the decline stage showed the inhibition rate of 85.23% on the spore germination of *F. graminearum*. Moreover, it led to concavity on spore surface, cell membrane damage, leakage of nucleic acids and proteins, and accumulation of reactive oxygen species in the mycelia of *F. graminearum*. The CFS of strain JB7 significantly increased the content of soluble protein and malondialdehyde. Strain JB7 could produce protease, cellulase, glucanase, and siderophores. Pot experiments showed that strain JB7 decreased the disease index of FHB ( $P < 0.05$ ) in wheat. The strain was identified as *Bacillus methylotrophic* JB7 by whole genome sequencing, and it carried 12 gene clusters for the synthesis of secondary metabolites with antimicrobial functions. **[Conclusion]** Strain JB7 could inhibit the growth of *F. graminearum* and demonstrated a strong control effect on FHB, serving as a candidate strain for the biocontrol of FHB in wheat.

**Keywords:** *Fusarium* head blight; *Fusarium graminearum*; *Bacillus methylotrophicus*; biocontrol; accumulation of reactive oxygen species

小麦(*Triticum aestivum* L.)是人类最主要的粮食作物之一,但近年来由于气候和种植方式的变化,小麦赤霉病大规模流行与暴发,对全球小麦种植和食品安全构成了严重威胁。小麦赤霉病主要由禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*, Fg)引起,在小麦整个生长阶段都可受其浸染,可引起小麦根腐、茎腐和穗腐等问题,其中以穗腐的危害最为严重<sup>[1]</sup>。植物内生菌不仅能够促进植物生长,同时也是新型活性化合物的储存库。利用内生菌作为生物接种剂,在保护作物免受植物病原体侵害和促进植物健康生长方面取得了显著进展<sup>[2]</sup>。Catambacan等从杂草中分离得到内生真菌,接种后大矮蕉的枯萎病发病率、叶片变黄程度、根茎变色程度均显著降低<sup>[3]</sup>。利用从提摩西草中分离的柱香菌降低了由枝孢菌引起的寄主植物的发病率<sup>[4]</sup>。

芽孢杆菌是国内外研究和应用最多的生防菌类群,全基因组测序是认识和利用生防菌株的重要基础。生防微生物可以通过多种机制控制植物病原菌,包括葡聚糖酶、几丁质酶、纤维素酶和果胶酶,以及产生拮抗代谢物来抑制真菌分生孢子萌发,靶标真菌细胞膜和细胞壁<sup>[5]</sup>,使胞内大分子物质泄漏,诱导菌丝细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累从而对病原真菌产生损害<sup>[6-7]</sup>。

低浓度活性氧作为细胞内许多分子事件的信使,也在次生代谢合成中发挥重要作用<sup>[8-9]</sup>。然而,体内积累过量的ROS会引起氧化应激反应(oxidative stress, OS),进而损伤细胞<sup>[7]</sup>。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。

本研究以内蒙古牙克石市特尼河农场的小麦种子为试验材料,筛选种子内拮抗禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*, Fg)的内生菌,研究优良菌株上清液对Fg的抑菌效果及田间防效,

以期小麦赤霉病生防菌剂的开发与应用提供菌种资源和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、培养基和试剂

供试病原真菌Fg由内蒙古农业大学植物病理实验室提供,于-80℃超低温冰箱中保存。分离拮抗菌来自内蒙古牙克石市特尼河农场中患有小麦赤霉病的地块,选取健康和患病小麦植株,样品被装在密封塑料袋中,以种子为分离材料。

肉汤培养基/培养液(LB)、小麦培养基(agar and wheat, AW)用于细菌菌株的分离和扩繁;马铃薯葡萄糖培养基/培养液(potato dextrose medium, PDA)用于真菌菌株的生长及抑菌谱的测定;4%绿豆汤培养液,用于诱导Fg分生孢子的产生;酵母培养基(yeast extract peptone dextrose, YEPD),用于悬浮Fg分生孢子。分别采用铁载体培养基(chrome azurol s, CAS)、葡聚糖酶培养基<sup>[1]</sup>、纤维素酶培养基<sup>[1]</sup>和蛋白酶培养基<sup>[10]</sup>进行微生物产铁载体、葡聚糖酶、纤维素酶和蛋白酶能力的鉴定。

基因组DNA纯化试剂盒,普洛麦格(北京)生物技术有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所。

### 1.2 小麦赤霉病菌拮抗内生菌株的筛选

分别称取健康和患赤霉病的小麦种子20g置于250mL三角瓶中,先用无菌水冲洗2-3次后用75%的乙醇洗涤2-3次,放入已灭菌的钵中研磨,待研磨充分后加入适量无菌水,摇匀后进行梯度稀释,取稀释倍数为 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 稀释液100 $\mu$ L,分别涂布在LB、PDA、AW培养基上,每个梯度稀释液涂布3个平板,30℃倒置培养2-3d,获得内生菌,根据菌落颜色和形状挑取不同的单菌落进行多次纯化,

用浓度为 20% 的无菌甘油置于 -20 °C 保存。

拮抗内生菌的筛选采用平板对峙培养法<sup>[11]</sup>。用直径 1 cm 的打孔器取培养 5 d 的 Fg 菌饼, 接种于 PDA 培养基中央, 将待测内生菌接种距病原真菌 2 cm 处, 以单接 Fg 为对照, 每个处理重复 3 次, 25 °C 培养 7 d, 选取对病原真菌具有拮抗作用的细菌。

采用定量平板对峙法筛选对禾谷镰刀菌具有显著拮抗作用的菌株。将所有筛选的拮抗内生菌的浓度调整为  $1 \times 10^8$  CFU/mL, 参照初筛方法, 在距 Fg 菌饼 2 cm 处接种 5  $\mu$ L, 将平板置于 25 °C 恒温培养箱培养至对照组 Fg 菌丝长满皿底, 测量对照组 Fg 菌落半径和 Fg 菌落边缘到拮抗内生菌接种点间的距离, 抑菌率参照文献<sup>[12]</sup>计算, 每组处理重复 3 次。

### 1.3 拮抗菌生长曲线测定

将拮抗菌株活化后接种于 100 mL 的 LB 液体培养基中, 于 30 °C、180 r/min 条件下振荡培养 24 h 至  $OD_{600}$  为 0.8–1.0, 得到种子液。将种子液以 1% 接种量接种于 250 mL 的 LB 液体培养基中, 30 °C、180 r/min 摇床培养, 每隔 3 h 用分光光度计测定  $OD_{600}$  处吸光度, 根据培养 87 h 的数据绘制菌株的生长曲线。

### 1.4 内生拮抗菌无菌上清液 (cell-free supernatant, CFS) 对禾谷镰刀菌孢子萌发及菌丝生长的影响

将纯化后的拮抗内生菌以 1% 的接种量接种于盛有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 180 r/min 振荡培养至衰亡期, 12 000 r/min 离心 10 min, 上清液用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌得到 CFS。Fg 分生孢子的制备: 挑取禾谷镰刀菌菌丝于 4% 绿豆汤培养液中, 25 °C、150 r/min 振荡培养 2–5 d。培养液用 2 层纱布进行过滤, 3 500 r/min 离心 10 min 收集孢子, 然后用 YEPD 培养基重悬, 并调整孢子浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL。在

孢子悬浮液中, 按照体积分数 50% 加入内生拮抗菌的 CFS, 以加等量的 LB 液体培养基为对照。25 °C、180 r/min 条件下培养 12 h, 利用光学显微镜对孢子的萌发情况进行观察与统计<sup>[13]</sup>, 根据公式 1 和公式 2 分别计算 Fg 分生孢子萌发率和 CFS 对其抑制率。每组处理重复 3 次。

$$\text{萌发率} = (\text{孢子萌发数} / \text{孢子总数}) \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{抑制率} = (\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}) / \text{对照萌发率} \times 100\% \quad (2)$$

将未凝固的 PDA 培养基和内生拮抗菌无菌上清液按照体积比 1:1 混合后倒入培养皿, 以 PDA 培养基与 LB 培养基(不含菌)混合作为对照。待培养基凝固后, 取直径相同的禾谷镰刀菌菌饼接入平板中央(每皿一个菌饼), 每组处理重复 3 次。将培养皿置于 25 °C 黑暗条件下倒置培养, 72 h 后测量菌落直径大小, 按照公式 3 计算抑菌率。

$$\text{抑菌率} = (\text{对照 Fg 菌落直径} - \text{处理 Fg 菌落直径}) / (\text{对照 Fg 菌落直径}) \times 100\% \quad (3)$$

根据平板对峙试验、孢子萌发抑制率和无菌上清液对 Fg 菌丝的抑菌效果筛选拮抗能力最强的内生菌株

### 1.5 内生拮抗菌无菌上清液对禾谷镰刀菌分生孢子形态的影响

采用扫描电镜观察 JB7 的 CFS 对 Fg 分生孢子的影响。按照 1.4 的方法处理 Fg 分生孢子, 以同等条件下加入无菌 LB 培养基为阴性对照 (negative control, NC), 以两性霉素 B (1.25  $\mu$ g/mL) 为阳性对照 (positive control, PC), 25 °C、180 r/min 条件下培养 12 h。将处理过的分生孢子 8 000 r/min 离心 5 min 后, 弃上清, 加入 2.5% 戊二醛固定 4 h。固定后的分生孢子用 PBS 洗涤 3 次后, 依次用 50%、70%、80%、90% 和 100% 乙醇梯度脱水, 每次 10 min, 于 -20 °C 冷冻干燥 12 h, 取完全干燥的样品喷金, 并在扫描电子显微镜上观察<sup>[14]</sup>。

## 1.6 内生拮抗菌无菌上清液对禾谷镰刀菌膜完整性的影响

为了评估内生拮抗菌 CFS 对禾谷镰刀菌细胞膜的损伤情况, 使用吖啶橙/碘化丙啶(acridine orange/propidium iodide, AO/PI)双荧光染色。AO 染料可以通过完整的细胞膜, 呈现绿色荧光; PI 染料则通过破损的细胞膜, 呈现橙红色荧光。将菌株 JB7 衰亡期 CFS 加入等体积禾谷镰刀菌的分生孢子悬浮液中, 在 25 °C 的培养箱中混合培养 12 h。以同等条件下加入无菌 LB 培养基为阴性对照。以两性霉素 B (1.25 µg/mL) 为阳性对照。将培养的分生孢子悬液 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 用无菌生理盐水洗涤 2 次, 使用 AO/PI 双染试剂盒 4 °C 避光孵育 10–20 min, 10 000 r/min 离心 5 min 后取适量生理盐水洗涤沉淀, 摇匀吸取 10 µL 孢子染液于载玻片上, 利用共聚焦激光扫描电镜(confocal laser scanning microscope, CLSM)观察其颜色变化。

由于核酸和蛋白质在  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  处具有较强的吸收值, 因此,  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  处的变化可以反映核酸和蛋白质从细胞中泄漏, 从而可研究细胞膜的完整性。取 10 mL PDB 液体培养基与 10 mL 拮抗菌 JB7 CFS 混匀, 加入 5 个禾谷镰刀菌菌饼, 培养 48 h 后 8 000 r/min 离心 5 min, 利用酶标仪检测  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  的吸光度, 以 10 mL PDB 液体培养基与 10 mL 无菌 LB 混合培养禾谷镰刀菌作为对照。

取 10 个禾谷镰刀菌菌饼加入 PDA 与 JB7 CFS 等量混合的培养液中, 设置 3 个重复。在 0、1、3、6 和 9 h 时间点上借助电导率仪确定菌丝溶液的电导率<sup>[15]</sup>, 以评估 CFS 对 Fg 菌丝体细胞含量的浸出程度。

## 1.7 Fg 菌丝活性氧检测

取菌株 JB7 衰亡期 CFS 4 mL 与 4 mL 的 PDB 液体培养基混匀后加入 4 个 Fg 菌饼, 孵育

12 h 后重悬于 10 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.4)中, 将样品与 10 mmol/L 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH)于 25 °C 黑暗下处理 30 min 后用荧光共聚焦扫描电镜在激发波长 488 nm 和发射波长 535 nm 下观察<sup>[16]</sup>, 以 4 mL PDB 液体培养基与 4 mL 无菌 LB 混合孵育的 Fg 菌饼作为对照。

## 1.8 Fg 菌丝中 MDA 和可溶性蛋白含量检测

将菌株 JB7 衰亡期 CFS 与 PDB 液体培养基按照体积比 1:1 混合, 在 40 mL 混合培养基中加入 6 个 Fg 菌饼, 25 °C、180 r/min 培养 72 h, 对照为相同体积无菌 LB 与 PDB 液体培养基按照 1:1 的体积比混合。8 000 r/min 离心 5 min 后倒掉上清液得到菌丝, 采用南京建成生物工程研究所的丙二醛(MDA)测定试剂盒, 并按照说明书确定菌丝中 MDA 的含量。采用考马斯亮蓝 G-250 染色法测定可溶性蛋白含量<sup>[17]</sup>。

## 1.9 菌株 JB7 的产胞外水解酶活性及促生长特性检测

采用琼脂扩散法检测胞外水解酶以及促生能力, 以葡聚糖为底物检测葡聚糖酶, 以羧甲基纤维素钠为底物检测纤维素酶, 以酪蛋白为底物检测蛋白酶活性, 在特定的琼脂培养基中生长的菌落周围形成透明圈, 被认为具有产水解酶活性的能力。

定性测定拮抗菌 JB7 的铁载体合成能力。菌株接种于 CAS 固体培养基上, 30 °C 培养 7 d, 观察是否有橙黄色晕圈出现。

## 1.10 盆栽防效试验

选取颗粒饱满的克春 33 号种子进行消毒: 75%乙醇漂洗 3–5 min, 置于 3% NaClO 溶液浸泡 5 min, 蒸馏水冲洗 3–5 次。

制备菌悬液: 将拮抗菌 JB7 接种至 LB 液体培养基中 30 °C、180 r/min 培养 3 d, Fg 菌接种至绿豆汤液体培养基中 25 °C、180 r/min 培养 5 d,

调整拮抗菌的浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL, 真菌孢子浓度为  $1 \times 10^5$  个/mL。

于小麦 5%扬花期进行喷雾防治, 每穗喷雾量约 1 mL, 使麦穗湿润但无水珠滑落。JB7 处理先喷施拮抗菌 JB7 菌悬液, 48 h 后再喷施禾谷镰刀菌孢子, 在孢子接种后 10 d 观察发病情况、统计病情指数和防治效果, 以多菌灵 (80%, 稀释 500 倍液) 作为阳性对照, 以灭菌后的 LB 液体培养基和清水作为阴性对照。

小麦赤霉病(以穗为单位)病情分级标准, 0 级: 无病; 1 级: 枯穗面积占全穗面积的 1/4 以下; 2 级: 枯穗面积占全穗面积的 1/4–1/2; 3 级: 枯穗面积占全穗面积的 1/2–3/4 以下; 4 级: 枯穗面积占全穗面积的 3/4 以上。计算方法<sup>[18]</sup>见公式 4 和公式 5。

病情指数 =  $\frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{该病级值})}{\text{调查总株数} \times \text{最高级值}} \times 100\%$  (4)

防病效果 =  $\frac{\text{清水对照的病情指数} - \text{处理的病情指数}}{\text{清水对照的病情指数}} \times 100\%$  (5)

### 1.11 内生拮抗菌株 JB7 的全基因组测序

将保存的 JB7 于 LB 液体培养基中活化 12 h, 将培养液  $10\ 000 \times g$  离心 5 min 收集菌体, Wizard<sup>®</sup> 基因组 DNA 纯化试剂盒提取菌株 JB7 的基因组 DNA。提取的 DNA 采用上海美吉生物医药科技有限公司的 Illumina HiSeq 和 PacBio RS II 单分子实时(single-molecule sequencing in real time, SMRT)平台进行测序。利用 Circos v 0.69-6 (<http://www.circos.ca>) 绘制基因组圈图。菌株 JB7 系统发育树利用菌株基因组服务器 (<https://tygs.dsmz.de/>) 来构建, 为了评估菌株 JB7 的次级代谢潜力, 通过 antiSMASH 6.6.0 (<https://dl.secondarymetabolites.org/releases/6.0.0/>) 预测负责次级代谢产物生物合成的基因簇和数量。

### 1.12 数据分析

利用 Microsoft Excel 2019 整理数据; 利用

SPSS 22.0 软件的 Duncan 检验进行显著差异性分析 ( $P < 0.05$ )。利用 GraphPad Prism 8.0.2 软件绘图。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦种子内生拮抗 Fg 内生菌的分离

共分离得到 40 株内生细菌。初筛发现 21 株内生拮抗细菌对 Fg 菌产生拮抗作用。

通过定量平板对峙试验筛选出对 Fg 抑制效果高于 50% 的 6 株菌。对其生长趋势进行测定, 结果如图 1A 所示。所测菌株的生长趋势相似, 在 0–3 h 内生长处于迟缓期, 在培养 3–51 h 进入快速生长期, JB7、H1 在培养 51–78 h 进入稳定期, 在 78 h 后进入衰亡期, 而 JB2、A、JK 和 H4 在培养 51–81 h 进入稳定期, 在 84 h 后开始衰亡。

在定量平板对峙试验中菌株 JB7 处理的 Fg 的菌落生长直径仅为 16.45 mm, 对病原菌的抑制率高达 55.30% (图 1B), 其 CFS 对 Fg 孢子萌发抑制率 85.23% (图 1C), CFS 与 PDA 混合培养基中接种 Fg 的菌落生长直径仅为 25.77 mm, 抑菌率达 40.26% (图 1D), 从以上结果看出, 菌株 JB7 对 Fg 拮抗效果优于其他供试菌株。

### 2.2 内生拮抗菌株 JB7 无菌上清液对 Fg 分生孢子微观形态的影响

扫描电镜显示, 阴性对照组(图 2A)中的 Fg 分生孢子形态饱满, 表面光滑。由菌株 JB7 的 CFS (图 2B)和两性霉素 B (图 2C)处理 12 h 后的 Fg 分生孢子表面严重凹陷变形。

### 2.3 内生拮抗菌株 JB7 无菌上清液对 Fg 质膜完整性影响

如图 3 所示, 通过 CLSM 观察发现, 阴性对照组 Fg 孢子发出绿色荧光(图 3A), 拮抗菌 JB7 CFS (图 3B)和阳性对照组(图 3C)处理后的 Fg 分生孢子(图 3B)内部发出红色荧光, 说明拮抗菌内生菌株 JB7 的 CFS 会使 Fg 细胞膜受到不

同程度的损伤。

JB7 CFS 处理后 Fg 的核酸和蛋白质泄漏量如图 3D 所示。经 JB7 CFS 处理 Fg 细胞悬液  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  的吸光值显著高于对照。说明 JB7 的 CFS 影响了 Fg 菌丝细胞膜的完整性，致

其细胞内核酸和蛋白质外渗。

采用电导率法测定了 CFS 对 Fg 菌丝细胞膜渗透性的影响，结果见表 1。由表 1 可见，随着培养时间的延长电导率也升高，说明菌丝细胞膜被严重破坏。

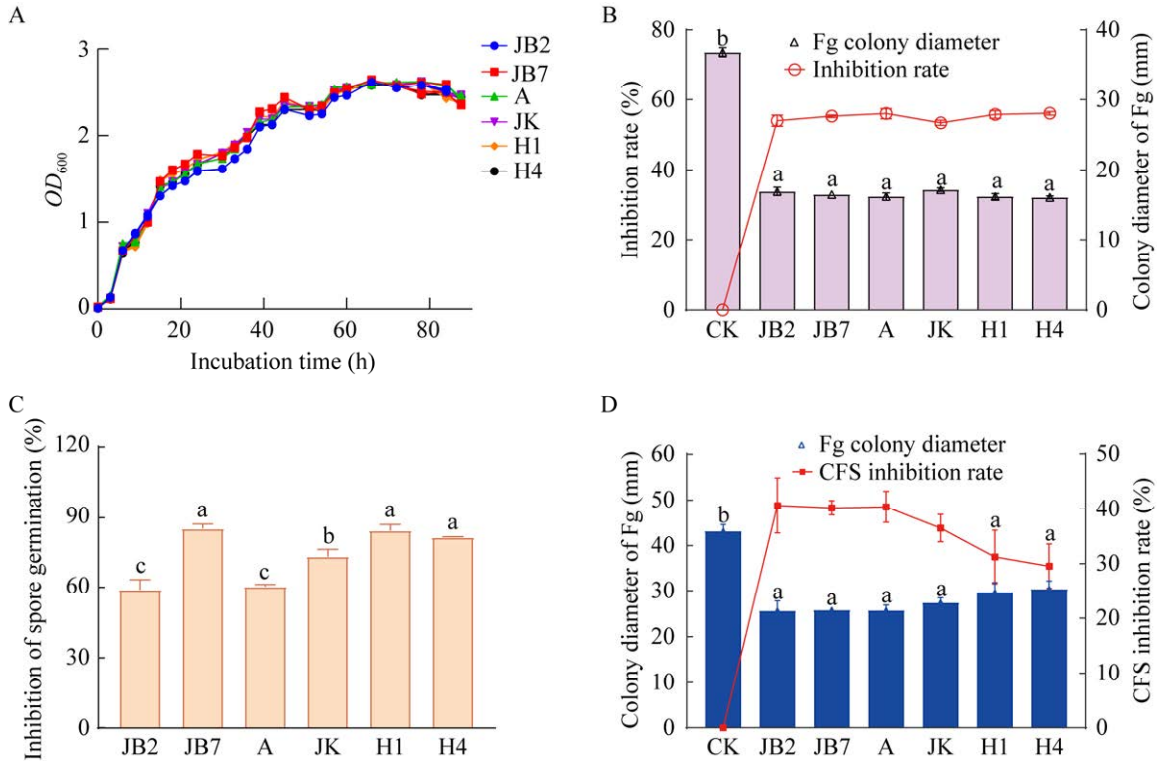


图 1 拮抗菌株对禾谷镰刀菌的抑制效果

Figure 1 Inhibitory effect of antagonistic strains against *Fusarium graminearum*. A: Growth curve of antagonistic strains. B: Inhibition effect of biocontrol strains on Fg in plate confrontation experiment. C: Inhibitory effect of cell-free supernatant (CFS) from the antagonistic strains on germination of Fg spores. D: Inhibitory effect of CFS from the antagonistic strains on Fg colony. The data with different letters on column chart are significantly different at  $P < 0.05$ . The same below.

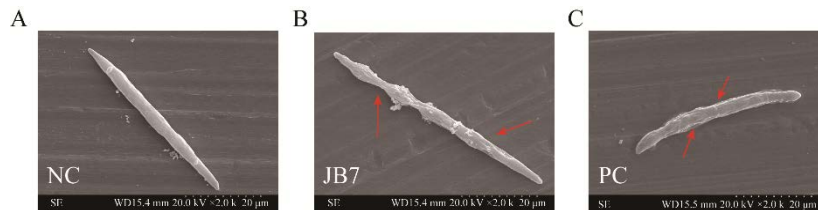


图 2 不同处理下 Fg 分生孢子的扫描电镜成像

Figure 2 SEM images of Fg conidia exposed to various treatments. A: Sterile LB medium (negative control). B: CFS from strain JB7. C: Amphotericin B (positive control). NC: Negative control; PC: Positive control. The same below. The red arrow indicates the obvious wrinkling of the cell membrane.



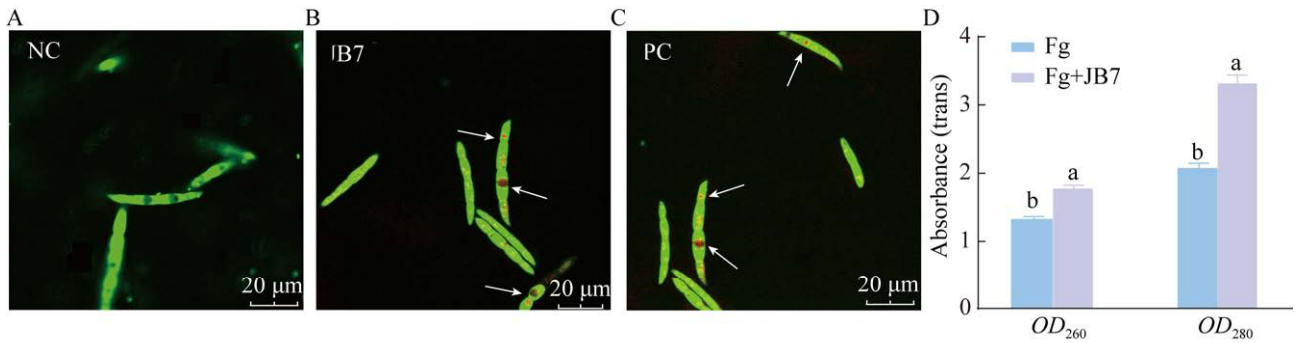


图 3 不同处理对 Fg 细胞膜完整性的影响

Figure 3 Effects of different treatments on the integrity of Fg membrane. A: Sterile LB medium. B: CFS from strain JB7. C: Amphotericin B. D: Leakage of nucleic acid ( $OD_{260}$ ) and proteins ( $OD_{280}$ ). The arrow indicates the site of cell membrane damage.

表 1 JB7 CFS 对禾谷镰刀菌培养液电导率的影响  
Table 1 Effect of JB7's cell-free supernatant on the electric conductivities of *Fusarium graminearum* culture

Stress time (h)	Electric conductivity (mS/cm)
0	10.72±0.02e
1	10.88±0.02d
3	10.90±0.03c
6	11.09±0.02b
9	11.28±0.02a

Data in the table are mean ± standard deviation. Different letters indicated significant differences among values at  $P < 0.05$ .

#### 2.4 内生拮抗菌株 JB7 无菌上清液对 Fg 菌丝细胞内活性氧的影响

利用荧光探针 DCFH 检测 Fg 细胞内 ROS 的产生。在活性氧的存在下, DCFH 会被氧化生成 DCF, 并发出绿色荧光, 荧光越强代表积累的 ROS 越多。如图 4 所示, 共聚焦电子扫描

电镜下 JB7 的 CFS 处理过的 Fg 菌丝(图 4B)的绿色荧光强度大于对照(图 4A), 表明菌株 JB7 的 CFS 可以诱导 Fg 菌丝细胞中 ROS 的积累, 刺激氧化应激反应, 扰乱细胞氧化还原稳态, 从而抑制 Fg 的生长。用 Image J 软件分析表明, 经过 JB7 的 CFS 处理的菌丝 ROS 荧光强度比对照组高 2.99 倍(图 4C)。

#### 2.5 内生拮抗菌株 JB7 无菌上清液对 Fg 菌丝抗氧化活性酶活性的影响

如图 5 所示, 经 JB7 CFS 处理后的 Fg 菌丝细胞中的 MDA (A)和可溶性蛋白(B)含量与对照组相比分别提高了 0.50 倍和 0.41 倍。

#### 2.6 菌株 JB7 产胞外水解酶和铁载体的能力

如图 6 所示, JB7 菌株具有分泌铁载体、产蛋白酶、纤维素酶和葡聚糖酶的能力。

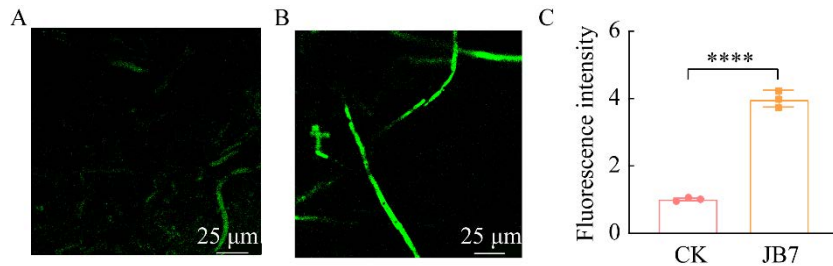


图 4 DCFH 染色法检测细胞内活性氧的产生

Figure 4 Determination of intracellular ROS production by DCFH staining. A: Fg mycelia were cultured in CFS from JB7. B: Fg mycelia were cultured in LB medium. C: Fluorescence intensity was quantified by Image J.



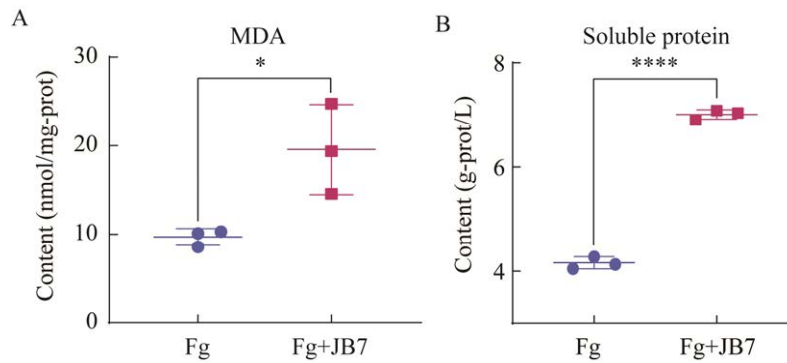


图 5 Fg 菌丝中 MDA 和可溶性蛋白含量

Figure 5 The content of MDA and soluble protein in Fg mycelia. A: MDA. B: Soluble protein. \* indicates a significant difference ( $P < 0.05$ ) compared with control; \*\*\*\* was  $P < 0.0001$ .

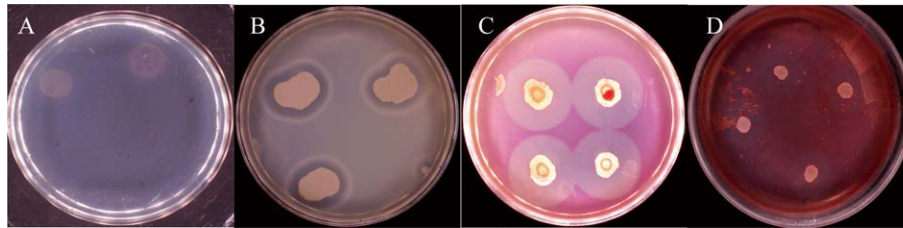


图 6 菌株 JB7 分泌铁载体及胞外水解酶

Figure 6 Strain JB7 secreted siderophores and extracellular hydrolase. A: Siderophores. B: Protease. C: Cellulase. D: Dextranase.

## 2.7 盆栽防效结果

盆栽试验结果显示(表 2), 在禾谷镰刀菌孢子悬液接种 10 d 后, 清水、LB 液体培养基以及多菌灵 3 组对照的病情指数分别为 56.63、45.20、43.84, 拮抗菌 JB7 处理后的小麦赤霉病病情指数为 23.15 显著低于对照组, 拮抗菌株对小麦赤霉病的防治效果达 59.13%。

## 2.8 内生拮抗菌株 JB7 的系统发育分析和基因组特征

通过系统发育分析, 菌株 JB7 与甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*) KACC 13105 亲缘关系最近, 因此, 菌株 JB7 最终被鉴定为 *B. methylotrophicus*, 将其基因组序列上传至 NCBI 中 GenBank 数据库, 其序列登录号为 CP119394 (图 7A)。全基因组测序结果表明, *B. methylotrophicus* JB7 的全基因组是由一条 3 929 792 bp 的完整环状染色体组成, 其中染色体平均 G+C

含量为 46.5%。该基因组包含 3 747 个编码 DNA 序列, 27 个 rRNA 基因、86 个 tRNA 基因, 根据 COG、GO 和 KEGG 功能注释, 获得注释的基因数量分别为 3 009、2 852 和 2 230 个, 使用 Circos v0.69-6 生成菌株 JB7 的基因组图谱(图 7B)。antiSMASH 分析结果发现, 菌株 JB7 共预

表 2 不同处理对小麦赤霉病防治效果

Table 2 Effect of different treatments on field control of *Fusarium* head blight

Treatment group	Disease index	Prevention effect (%)
Water	56.63±0.52a	—
JB7	23.15±0.80c	59.13±1.42a
LB	45.20±0.35b	20.20±0.62b
Carbendazim	43.84±1.51b	22.59±2.67b

Data in the table are mean ± standard deviation, blank means no such item. Different letters indicated significant differences among values at  $P < 0.05$ .

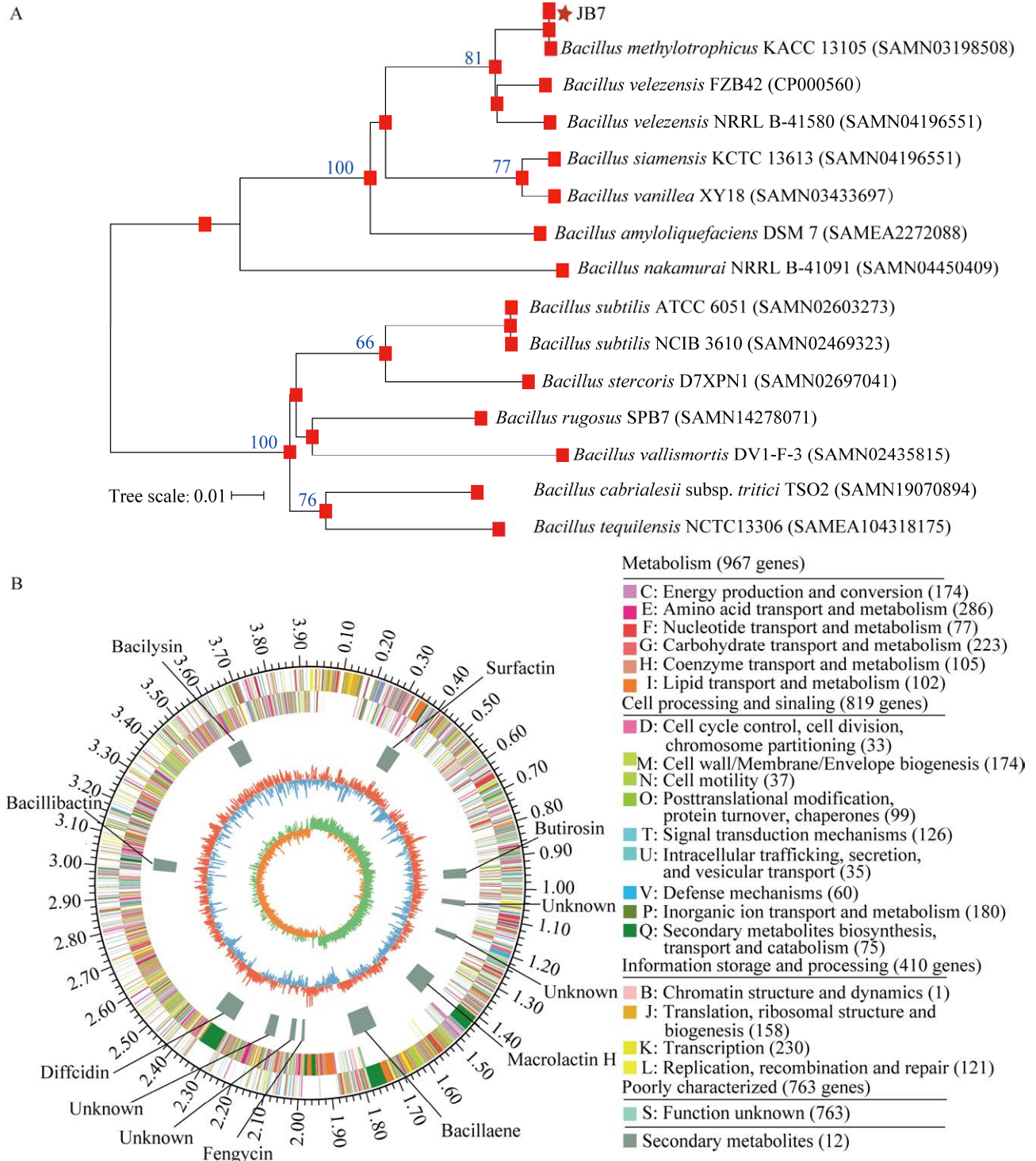


图 7 菌株 JB7 的系统进化树及基因组图谱分析

Figure 7 Genomic map of strain JB7 and phylogenetic tree analysis. A: Phylogenetic tree of strain JB7. B: Genome map of strain JB7, circles from outer to inner: genome size (Mb), forward-strand genes, reverse-strand genes, nomenclature and position of predicted secondary metabolite gene clusters, G+C content, G+C-skew value.

测到 12 个次级代谢产物合成基因簇，其中有 8 个已知基因簇，分别是表面活性素 (surfactant)、丁胺菌素 (butirosin A/butirosin B)、大环内酯抗生素 (macrolactin H)、聚酮化合物 (difficidin)、丰原素 (fengycin)、多烯类 (bacillaene)、杆菌素 (bacillibactin) 和杆菌溶素 (bacilysin)，以及 4 类未知基因簇 (图 7B)。

### 3 讨论

随着全球气温变暖，小麦赤霉病频发且日趋严重，不仅造成了严重的经济损失<sup>[19-20]</sup>，还会污染粮食作物种子<sup>[21]</sup>。本研究分离出一株拮抗菌株，通过系统发育进化分析鉴定为甲基营养型芽孢杆菌 JB7，在平板试验中能够有效地抑制禾谷镰刀菌的生长，抑菌率为 55.30%，其无菌上清液的抑菌率为 40.26%，对孢子萌发的抑制率甚至高达 85.23%。根据基因组学和生物信息学的预测，甲基营养型芽孢杆菌 JB7 中存在拮抗功能相关的基因簇和代谢产物，包括表面活性肽、丁菌素、大环内酯抗生素、聚酮化合物、丰原素、多烯类、杆菌素和杆菌溶素。据报道，*B. methylotrophicus* NJ13 产生的抑菌代谢物可以抑制人参锈腐病原真菌菌丝生长，并在田间试验中具有较好的生物防治效果<sup>[22]</sup>，其全基因组学测序分析结果与本研究中有 8 个相同次级代谢产物基因簇。然而菌株 JB7 无菌上清液中何种物质起主要的抑菌作用抑或多种物质协同抑菌？其抑菌机制等有待进一步研究。本研究中 JB7 可以产生多种胞外水解酶，如蛋白酶、纤维素酶和葡聚糖酶，研究表明有些拮抗菌株也可以通过分泌胞外水解酶来发挥对致病真菌抑制作用<sup>[11]</sup>。因此，*B. methylotrophicus* JB7 具有潜在的生物防治应用价值。

研究证实孢子萌发是真菌病害早期发展的关键步骤，抑制孢子的萌发在保护植物免受真

菌侵害方面具有良好的效果<sup>[17]</sup>。本研究中菌株 JB7 的无菌上清液干扰了禾谷镰刀菌的分生孢子萌发。与此同时，扫描电镜结果显示置于菌株 JB7 的 CFS 中的健康分生孢子，其分隔处凹陷，孢子萌发试验中观察到分生孢子末端肿胀。芽孢杆菌代谢产物已被证实与分生孢子细胞质膜相互作用，并干扰分生孢子萌发和芽管伸长<sup>[23]</sup>。

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<sup>[24]</sup>。本研究中通过共聚焦扫描电镜观察发现，经菌株 JB7 无菌上清液处理后，Fg 孢子内的核酸被染料染成红色，说明 Fg 细胞膜遭到破坏。进一步实验表明，在  $OD_{260}$  和  $OD_{280}$  处吸光度值升高，以及电导率测定结果均说明细胞膜受损，导致内容物渗漏。扫描电镜观察发现 CFS 可使 Fg 孢子变形，对其生长发育造成威胁。菌株 JB7 上清液中的抑菌物质靶标 Fg 孢子的细胞膜可能是其控制赤霉病的原因之一。

镰刀菌、稻瘟病菌、疫霉菌和大丽轮枝菌等病原真菌经拮抗菌处理后其细胞中的 ROS 含量较高，表明拮抗菌诱导 ROS 积累导致病原真菌死亡可能是一种常见的机制<sup>[6-7,25]</sup>。质膜受损导致氧化过程中电子泄露，泄露的少量电子与氧结合形成超氧自由基<sup>[26]</sup>。本研究证明了拮抗菌株 JB7 CFS 可以诱导 Fg 菌丝的 ROS 水平，并且观察到处理组的荧光强度显著高于对照组。

MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一，它的产生还能加剧膜的损伤，可通过 MDA 了解膜脂过氧化的程度，从而间接测定膜系统受损程度<sup>[27]</sup>。本研究中 MDA 和可溶性蛋白的含量升高，说明菌株 JB7 CFS 处理造成了 Fg 菌丝的脂膜过氧化，细胞膜的通透性也不断增大，使菌丝细胞受损，膜的完整性和核酸、蛋白质的渗漏实验也说明了菌株 JB7 CFS 造成了 Fg 细胞

膜的损伤。这与何林鑫等<sup>[28]</sup>的报道中生物体在受到胁迫时 MDA 和可溶性蛋白含量增加的结论一致。

在温室环境下,拮抗菌 JB7 对小麦赤霉病的病情指数仅为 23.4%,防效达 59%。本研究证实了甲基营养芽孢杆菌 JB7 对小麦赤霉病具有防治效果。

综上所述,本研究从小麦种子中分离到一株优良的拮抗 Fg 的菌株 JB7,该菌株可产生蛋白酶、纤维素酶和葡聚糖酶并具有分泌铁载体的能力,其衰亡期的 CFS 导致 Fg 孢子表面凹陷,破坏膜的完整性,引起核酸和蛋白质的外渗,诱导 Fg 菌丝体 ROS 的累积,使菌丝中的 MDA 和可溶性蛋白含量升高。其对小麦赤霉病的防治效果达到 59%,经基因组学分析该菌株为甲基营养型芽孢杆菌,其基因组中携带 12 个生防基因簇。

## 参考文献

- [1] 韩传玉. 小麦赤霉病生防菌的筛选及 Frenolicin B 抗病活性研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文, 2020.  
HAN CY. Screening of biocontrol bacteria against wheat scab and study on disease resistance of frenolicin B[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Northeast Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [2] ADELEKE BS, BABALOLA OO. Roles of plant endosphere microbes in agriculture: a review[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2022, 41(4): 1411-1428.
- [3] CATAMBACAN DG, CUMAGUN CJR. Weed-associated fungal endophytes as biocontrol agents of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* TR4 in Cavendish banana[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(3): 224.
- [4] O'HANLON KA, KNORR K, JØRGENSEN LN, NICOLAISEN M, BOELT B. Exploring the potential of symbiotic fungal endophytes in cereal disease suppression[J]. *Biological Control*, 2012, 63(2): 69-78.
- [5] WU T, CHEN MR, ZHOU LB, LU FX, BIE XM, LU ZX. Bacillomycin D effectively controls growth of *Malassezia globosa* by disrupting the cell membrane[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(8): 3529-3540.
- [6] 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.
- [7] ZHANG LL, SUN CM. Fengycins, cyclic lipopeptides from marine *Bacillus subtilis* strains, kill the plant-pathogenic fungus *Magnaporthe grisea* by inducing reactive oxygen species production and chromatin condensation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(18): e00445-18.
- [8] CADENAS E, DAVIES KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, 29(3/4): 222-230.
- [9] JING Z, FENGLI W, SINING Y, CHEN C, SHU QS, HUI W, MING WZ. Functions of reactive oxygen species in apoptosis and ganoderic acid biosynthesis in ganoderma lucidum[J]. *Fems Microbiology Letters*, 366(23): 23.
- [10] 要雅倩, 成娜娜, 李培根, 卢毅, 王彦刚, 林榕珊, 周波, 王冰. 解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* T-6 的分离鉴定及抗病促生潜力[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(9): 202-210.  
YAO YQ, CHENG NN, LI PG, LU Y, WANG YG, LIN RS, ZHOU B, WANG B. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* T-6 and its potential of resisting disease and promoting growth[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(9): 202-210 (in Chinese).
- [11] 杨艺炜, 黎妍妍, 张安盛, 周建云, 李斌, 王静, 陈德鑫. 烟草黑胫病拮抗菌 XF10 的筛选与鉴定[J]. *烟草科技*, 2018, 51(4): 20-27.  
YANG YW, LI YY, ZHANG AS, ZHOU JY, LI B, WANG J, CHEN DX. Screening and identification of an antagonistic bacterium XF10 against tobacco black shank[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2018, 51(4): 20-27 (in Chinese).
- [12] 巩文峰, 孙玉, 王瑞琪, 魏丽萍. 西藏油菜种子内生菌分离及具有多种促生特性的拮抗菌筛选[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(4): 1053-1062.  
GONG WF, SUN Y, WANG RQ, WEI LP. Isolation of endophytes from rapeseeds in Tibet and screening of antagonistic bacteria with multiple plant growth promoting traits[J]. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49(4): 1053-1062 (in Chinese).

- [13] 张强, 张艳茹, 霍云凤, 韩阳超, 王朋, 陆宁海. 禾谷镰刀菌拮抗菌 21-6 的鉴定及其抑菌活性测定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4144-4157.  
ZHANG Q, ZHANG YR, HUO YF, HAN YC, WANG P, LU NH. Identification and activity of *Streptomyces* sp. 21-6 against *Fusarium graminearum*[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(10): 4144-4157 (in Chinese).
- [14] 宁亚维, 付浴男, 何建卓, 苏丹, 侯琳琳, 王志新, 贾英民. 苯乳酸和醋酸联用对单核细胞增生李斯特菌的协同抑菌机理[J]. 食品科学, 2020, 41(23): 70-76.  
NING YW, FU YN, HE JZ, SU D, HOU LL, WANG ZX, JIA YM. Synergistic antibacterial mechanism of phenyllactic acid combined with acetic acid against *Listeria monocytogenes*[J]. *Food Science*, 2020, 41(23): 70-76 (in Chinese).
- [15] DUAN YB, GE CY, LIU SM, CHEN CJ, ZHOU MG. Effect of phenylpyrrole fungicide fludioxonil on morphological and physiological characteristics of *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2013, 106(1-2): 61-67.
- [16] 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.
- [17] 李合生. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000.  
LI HS. Principles and Techniques of Plant Physiological Biochemical Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2000 (in Chinese).
- [18] 刘锐. 小麦赤霉病生防菌的筛选与研究[D]. 贵阳: 贵州大学硕士学位论文, 2020.  
LIU R. Screening and study on biocontrol bacteria against wheat scab[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou University, 2020 (in Chinese).
- [19] CHEN Y, CHEN CJ, WANG JX, JIN LH, ZHOU MG. Genetic study on JS399-19 resistance in hyphal fusion of *Fusarium graminearum* by using nitrate nonutilizing mutants as genetic markers[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2007, 34(5): 469-476.
- [20] 史建荣, 仇剑波, 董飞, 徐剑宏, 祭芳, 刘馨, 俞明正. 小麦镰刀菌毒素及其发生风险研究进展[J]. 麦类作物学报, 2016, 36(2): 129-135.  
SHI JR, QIU JB, DONG F, XU JH, JI F, LIU X, YU MZ. Risks of *Fusarium* toxins of wheat in China[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2016, 36(2): 129-135 (in Chinese).
- [21] BUERSTMAYR H, BAN T, ANDERSON JA. QTL mapping and marker assisted selection for *Fusarium* head blight resistance in wheat[J]. *Cereal Research Communications*, 2008, 36(6): 1-3.
- [22] 李想. *Bacillus methylotrophicus* NJ13 菌株抑菌代谢产物诱导 *Ilyonectria robusta* 耐受相关基因挖掘[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2023.  
LI X. Gene mining of *Ilyonectria robusta* tolerance induced by antimicrobial metabolites of *Bacillus methylotrophicus* NJ13 strain[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [23] JIN PF, WANG HN, TAN Z, XUAN Z, DAHAR GY, LI QX, MIAO WG, LIU WB. Antifungal mechanism of bacillomycin D from *Bacillus velezensis* HN-2 against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020, 163: 102-107.
- [24] LI LR, SHI YH, CHENG XR, XIA SF, CHESEREK MJ, LE GW. A cell-penetrating peptide analogue, P7, exerts antimicrobial activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 via penetrating cell membrane and targeting intracellular DNA[J]. *Food Chemistry*, 2015, 166: 231-239.
- [25] WANG YY, ZHANG CY, LIANG J, WANG L, GAO WB, JIANG JZ, CHANG RX. Surfactin and fengycin B extracted from *Bacillus pumilus* W-7 provide protection against potato late blight via distinct and synergistic mechanisms[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(17): 7467-7481.
- [26] WU RY, LI SY, HUDLIKAR R, WANG LJ, SHANNAR A, PETER R, CHOU PJ, KUO HC D, LIU ZG, KONG AN. Redox signaling, mitochondrial metabolism, epigenetics and redox active phytochemicals[J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2022, 179: 328-336.
- [27] 张树生, 胡蕾, 刘忠良, 何美仙, 方勇. 植物体内抗病相关酶与植物抗病性的关系[J]. 安徽农学通报, 2006, 12(13): 48-49, 5.  
ZHANG SS, HU L, LIU ZL, HE MX, FANG Y. Relationship between the disease defense-related enzymes and the disease resistance of plants[J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 2006, 12(13): 48-49, 5 (in Chinese).
- [28] 何林鑫, 黄荣, 田望军, 靳振海, 赵亮, 陈海雁, 张振粉. 欧文氏菌 DE2 对三种豆科牧草幼苗生长的影响[J]. 草地学报, 2023, 31(9): 2642-2652.  
HE LX, HUANG R, TIAN WJ, JIN ZH, ZHAO L, CHEN HY, ZHANG ZF. Effects of *Erwinia* sp. DE2 on the growth of three leguminous forage seedlings[J]. *Acta Agraria Sinica*, 2023, 31(9): 2642-2652 (in Chinese).