

引用:冯靖涵,范宗强,郑丽雪,等. 枯草芽孢杆菌 B579 代谢物抑制尖孢镰刀菌生长及作用机理研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2025,38(6):956-965.

Citation:FENG Jinghan, FAN Zongqiang, ZHENG Lixue, CHEN Zihan, LIU Chenke, WANG HUI, PENG Xiangqian, CHEN Fang. Study on the growth inhibition and mechanism of bacillus subtilis B579 metabolites on fusarium oxysporum[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition),2025,38(6):956-965.

文章编号 1672-6634(2025)06-0956-10

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025010007

枯草芽孢杆菌 B579 代谢物抑制尖孢镰刀菌 生长及作用机理研究

冯靖涵^{1,2,3}, 范宗强^{1,2,3}, 郑丽雪^{1,2,3}, 陈子涵^{1,2,3}, 刘晨珂^{1,2,3},
王会^{1,3}, 彭向前^{1,2,3}, 陈芳^{1,2,3}

(1. 聊城大学药学与食品工程学院, 山东 聊城 252059; 2. 聊城大学大分子药物与规模化制备全国重点实验室,
山东 聊城 252059; 3. 山东省蛋白与多肽类药物应用技术重点实验室(筹), 山东 聊城 252059)

摘要 目的:探究枯草芽孢杆菌 B579 对尖孢镰刀菌的抑菌机理。方法:采用共培养和代谢组学技术并结合平板抑菌试验,筛选出具有抑菌作用的差异代谢物。测定差异代谢物对尖孢镰刀菌菌丝胞外相对电导率、丙二醛含量、可溶性蛋白质含量和过氧化氢酶活性的影响,并探究其对黄瓜枯萎病的防治效果。结果:在共培养条件下(B579 和病原菌),共发现 48 种 B579 高分泌的差异代谢物。在所测的 15 种差异代谢物中,抑菌活性较强的为反式肉桂酸(CA)和棕榈酸(PA)。在三种处理浓度下,CA 和 PA 均在 50 $\mu\text{g/mL}$ 显示出最强的抑菌活性,产生的抑菌圈直径分别为 0.63 cm 和 1.27 cm。在液体培养中,CA 和 PA(50 $\mu\text{g/mL}$)处理的菌体胞外相对电导率、丙二醛含量和过氧化氢酶活性显著升高,而胞内可溶性蛋白含量显著降低。盆栽试验表明:CA 和 PA 的应用对黄瓜枯萎病的防治效果分别为 67.58%和 47.29%。结论:共培养条件下所筛选的 CA 和 PA 能引起病原菌细胞膜氧化损伤,导致膜完整性丧失及透性增强,抑制病原菌的生长,从而有效防治尖孢镰刀菌。

关键词 枯草芽孢杆菌 B579;尖孢镰刀菌;代谢组学分析;反式肉桂酸;棕榈酸

中图分类号 S476.1

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Study on the growth inhibition and mechanism of *bacillus subtilis* B579 metabolites on *fusarium oxysporum*

FENG Jinghan^{1,2,3}, FAN Zongqiang^{1,2,3}, ZHENG Lixue^{1,2,3}, CHEN Zihan^{1,2,3},
LIU Chenke^{1,2,3}, WANG HUI^{1,3}, PENG Xiangqian^{1,2,3}, CHEN Fang^{1,2,3}

(1. School of Pharmaceutical Sciences and Food Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. State Key Laboratory of Macromolecular Drugs and Large-scale Preparation, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China;
3. Shandong Key Laboratory of Applied Technology for Protein and Peptide Drugs, Liaocheng 252059, China)

收稿日期:2025-01-09

基金项目:国家自然科学基金项目(31672074);山东省自然科学基金项目(ZR2020MC126);聊城大学畜牧学学科开放课题(31946220729);山东省抗体制药协同创新中心开放课题(CIC-AD1816);聊城大学大学生创新创业计划(CX-CY2023457,CXCY2023458)资助

通信作者:陈芳,女,汉族,博士,教授,研究方向:微生物与生物制药,E-mail:chenfang20045@163.com。

Abstract Objective: To investigate the inhibitory mechanism of *Bacillus subtilis* B579 against *Fusarium oxysporum*. Methods: Co-culture and metabolomics techniques combined with plate inhibition test were used to screen out the differential metabolites with antibacterial effect. The effects of differential metabolites on the extracellular relative conductivity, malondialdehyde content, soluble protein content, and catalase activity of *Fusarium oxysporum* mycelium were determined, and the control efficiency of these metabolites on cucumber *Fusarium* wilt were explored. Result: Under co-culture conditions (B579 and pathogen), 48 differential metabolites were found to be highly secreted by B579. Among the 15 differential metabolites tested, trans-cinnamic acid (CA) and palmitic acid (PA) had the strongest inhibitory activity. At the three treatment concentrations, both CA and PA showed the strongest inhibitory activity at 50 $\mu\text{g/mL}$, resulting in inhibition zone diameters of 0.63 and 1.27 cm, respectively. In liquid culture, the extracellular relative conductivity, malondialdehyde content, and catalase activity of CA and PA (50 $\mu\text{g/mL}$) treated cells were significantly increased, while the intracellular soluble protein content was significantly decreased. The pot experiment showed that the application of CA and PA achieved the disease control efficiency against cucumber wilt, reaching 67.58% and 47.29% respectively. Conclusion: CA and PA screened under co-culture conditions can cause oxidative damage to the cell membrane of pathogenic bacteria, resulting in loss of membrane integrity and enhanced permeability, inhibiting the growth of pathogenic bacteria, thus effectively preventing and treating Fusarium oxysporum.

Keywords *Bacillus subtilis* B579; *Fusarium oxysporum*; metabolomics analysis; trans-Cinnamic acid; Palmitic acid

0 引言

随着全球气候和环境变化,农作物正面临着日益严重的病虫害威胁,其中由尖孢镰刀菌(*Fusarium Oxysporum*)引起的枯萎病对农业生产造成了极大损失,产量损失可达10%~20%,甚至可能导致绝产^[1]。当前防治枯萎病的常见手段是化学防治,通常通过使用甲基硫菌灵、百菌清、吡唑醚菌酯等药剂对种质和苗床进行消毒处理^[2]。尽管化学防治效果显著,但过度 and 频繁地使用化学药剂也会诱发诸多问题,比如土壤环境的污染、病原菌对药剂的抗性增强以及田间药效的下降^[3]。运用可抑制病原菌的微生物及其代谢物所开展的生物防治因其安全、无抗药性风险等特点而备受关注^[4]。枯草芽孢杆菌因具有广谱的抗菌活性与孢的稳定性,而在农业生产中被广泛应用,其防治机理包括严重寄生、竞争营养和生态位、调节根际微生物群落以及诱导植物产生抗性^[5-6]。前期研究表明,分离自黄瓜根际土壤的枯草芽孢杆菌 B579 能够有效抑制病原菌生长及孢子萌发,诱导植物产生抗病性,降低由尖孢镰刀菌引起的黄瓜枯萎病病情指数^[7]。

共培养方法作为一种新的策略,已被广泛应用于寻找新的生物活性化合物。当多种微生物共同生长在固体或液体培养基上时,微生物间相互作用往往能够激活单一培养条件下不表达或弱表达的次生代谢物基因簇,并且增强次生代谢产物的产生^[8]。在早期的研究中,研究者主要通过生物测定引导实验,分析不同的提取物,然后鉴定出特定的拮抗生物活性成分^[9-10]。随着核磁共振、液相色谱-质谱(LC-MS)、气相色谱-质谱等技术的出现,代谢组学迎来了飞速的发展。例如,代谢组学技术已被用于鉴定生防细菌对病原菌的代谢物、靶点及作用机理^[11-13]。共培养状态下两种或者多种生物的相互作用的代谢组并不是各种生物产生的化合物的简单相加,而是相互交联且错综复杂的。与活性靶向分析相结合的共培养是一种在实验室中激活隐蔽代谢物和发现感兴趣分子的有效途径^[14]。例如,徐洋等人通过将枯草芽孢杆菌与变异链球菌共培养以探究其差异代谢物对变异链球菌生长的影响^[15]。滕晨皓等人寻找出一种抑制水绵生长的枯草芽孢杆菌品种,并对其代谢组学分析解释了发挥抑制作用的相关代谢物^[16]。张尹强对棘孢木霉 PT-29 与枯草芽孢杆菌 S-16 单培养、共培养模式下进行的非靶向代谢组学分析,探究二者的拮抗作用^[17]。本研究旨在探讨枯草

芽孢杆菌 B579 与尖孢镰刀菌的液体共培养, 以及其代谢组学分析, 进一步分析主要差异代谢物的抗真菌作用。通过这些研究, 我们期望为枯草芽孢杆菌 B579 在防治尖孢镰刀菌方面的应用提供理论依据, 同时为环保型杀真菌剂的开发提供新思路。

1 材料与方法

1.1 枯草芽孢杆菌与尖孢镰刀菌的活化

枯草芽孢杆菌 B579(保藏号: CGMCC2207)保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ LB 液体培养基。在无菌条件下, 用接种环轻轻蘸取 B579 单菌落, 划线法接种于 PDA(马铃薯葡萄糖琼脂)培养基平板, 于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 24 h。培养后的单菌落被转接至装有 50 mL PDB(马铃薯葡萄糖)培养基的三角瓶中, 180 r/min , $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 3 天。 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $8\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 10 min, 弃去上清液, 用无菌水重悬沉淀物, 调节细菌悬浮液的浓度至 1×10^4 细胞/mL。

尖孢镰刀菌样本由中国农业科学院提供, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存于 PDA 培养基平板。使用无菌打孔器取 7 mm 的菌饼并接种至新鲜的 PDA 平板中央, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 7 天。

为获得尖孢镰刀菌孢子悬浮液, 首先使用无菌水冲洗培养皿表面, 收集液体并经 4 层无菌纱布过滤。然后, 使用血球计数板法在显微镜下测定分生孢子悬浮液的浓度, 并用无菌水稀释至 10^4 分生孢子/mL。

1.2 共培养分析和代谢组学分析

1.2.1 枯草芽孢杆菌培养物滤液对尖孢镰刀菌生长抑制作用的分析。为分析不同浓度的 B579 培养物过滤液(CFs, Culture Filtrates)对枯萎病菌菌丝生长的抑制效果。参照相关研究报道的方法, 将在 PDB 培养基中生长 12 h 的芽孢杆菌培养物(10^4 细胞/mL)通过滤膜($0.22\text{ }\mu\text{m}$)过滤, 并按照不同的体积比(2:1 和 1:2, 滤液:PDB)将培养物过滤液进行稀释(高浓度和低浓度)。将 300 μL 病原菌孢子悬浮液(10^4 分生孢子/mL)接种到装有 30 mL 不同浓度 CFs 稀释液的三角瓶中, 180 r/min , $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育 3 d。将三角瓶中的内容物倒入培养皿中, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干, 直至样品的重量保持恒定, 随后测量菌丝体干重。取 30 mL PDB 培养基, 加入 300 μL 尖孢镰刀菌孢子悬浮液作为对照, 每个处理设置三次重复。

1.2.2 枯草芽孢杆菌与尖孢镰刀菌共培养。为研究单培养和共培养下的微生物外代谢组, 将芽孢杆菌与尖孢镰刀菌共培养。首先, 将 300 μL 病原菌孢子悬浮液(10^4 个分生孢子/mL)接种至含有 30 mL PDB 培养基的三角瓶中, 180 r/min , $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床培养 48 h。然后将 300 μL (10^4 细胞/mL) 芽孢杆菌预培养液添加至生长有枯萎病菌的三角瓶中, 继续培养 12 h, 对照组为枯草芽孢杆菌 B579 与尖孢镰刀菌的单培养物。利用滤膜($0.22\text{ }\mu\text{m}$)对培养物进行过滤, 收集 CFs。取 1 mL CFs 于冻干机中冻干, 然后将其重悬于 100 μL 的甲醇-水溶液中(80:20, v/v), 冰浴静置 6 min。静置物 15 000 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 离心 15 min。将上清液吸取至新管, 并使用质谱级水将甲醇含量稀释至体积分数 53%, 按照上步离心条件进行离心, 保留上清液。各样品吸取 50 μL 用于质量控制分析, 其余样本用于下一步代谢组学分析。

1.2.3 代谢组学分析。将来自 3 种处理的 9 个样本置于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的自动加样器中。使用与 Q ExactiveTM HF (Thermo Fisher, Germany)质谱仪 MS/MS 检测器相连的 Vanquish UHPLC (ThermoFisher, Germany)系统进行分析。(1)色谱条件。进样量: 10 μL ; 色谱柱: Hypersil gold C₁₈ (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.9 μm); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: $40\text{ }^{\circ}\text{C}$; 流动相: A 液(1% 甲酸水溶液)和 B 液(甲醇)。洗脱程序设置如下: 2% B, 1.5 min; 2%~85% B, 3 min; 85%~100% B, 10 min; 100%~2% B, 10.1 min; 2% B, 12 min。(2)质谱条件。电离喷雾装置: QE-HF-X 电喷雾电离仪, 极性: 正、负离子模式; 喷雾电压: 3.50 kV; 鞘气: N₂; 鞘气流速: 35 psi; 辅助气: N₂, 辅助器流速: 10 psi, 离子传输管温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$; 离子导入射频电平: 60; 辅助气加热器温度: $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, MS/MS 二级扫描为数据依赖性扫描, 在 100~1500 m/z 范围内进行扫描。

1.3 抑制尖孢镰刀菌孢子萌发的目标代谢物的体外筛选

为筛选出 CFs 中抗病原菌分生孢子萌发的代谢物, 根据代谢组的信息购买了 15 种相关代谢物的商用标准品。按照厂家所提供的方法制备 100 $\mu\text{g/mL}$, pH 为 7 的储备液。将 100 μL 病原菌孢子悬浮液(10^4 分

生孢子/mL)加入至 PDA 平板上并涂布均匀,于室温下自然风干。将直径为 5 mm 的无菌滤纸片等距离(2.5 cm)置于平板中。向每个滤纸片中加入 10 μ L 代谢物储备液,以加入 10 μ L 溶解代谢物的溶剂作为对照。将培养皿置于 28 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 4 天后,测量滤纸片周围晕圈区的直径(晕圈区直径等于圈落总直径减去滤纸片直径),每种代谢物重复 3 次。

1.4 目标代谢物在不同浓度下对尖孢镰刀菌孢子萌发抑制效果的研究

依照实验 1.3 所筛选的结果,利用储备液配置不同浓度(0、25、50、100 μ g/mL)的反式肉桂酸和棕榈酸,参照 1.3 实验方法分别测定不同浓度下两种代谢物的抑菌效果。

1.5 目标代谢物对尖孢镰刀菌的影响分析

1.5.1 目标代谢物对尖孢镰刀菌膜完整性的影响。将 3 mL 尖孢镰刀菌(10^4 个孢子/mL)接种到含有 100 mL PDB 培养基的三角瓶中,于 28 $^{\circ}$ C 培养 3 天。然后将 5 mL 50 μ g/mL 代谢物加入至生长 3 天的菌丝体培养物中,以加入等体积的相应溶剂作为对照,在 28 $^{\circ}$ C,180 r/min 的摇床中培养 12 h。从三角瓶中收集并洗涤菌体,用吸水纸吸干水分,然后将菌丝体(0.2 g/mL)悬浮在蒸馏水中。使用电导率仪每隔 30 min 测定一次电导率,4 h 后,样品沸水浴 10 min,测定最终电导率,每个处理三次重复。相对电导率计算公式如

$$I_{\text{相对电导率}} = \frac{I_{\text{测定电导率}}}{I_{\text{最终电导率}}} \times 100\%,$$

取 15 mL 与代谢物共培养 12 h 后的菌丝液至新的 EP 管,在 4 $^{\circ}$ C,5 000 g 下离心 8 min,沉淀无菌蒸馏水洗涤,并重悬于 1 mL 无菌蒸馏水中。使用超声波粉碎机,每次处理 30 s,共处理两次。破碎后的混合物在 4 $^{\circ}$ C,20 000 g 离心 15 min,弃上清液,并用 Bradford 测定法来测量剩余的细胞内可溶性蛋白质。每个处理 3 次重复。

1.5.2 病原菌菌丝体中 MDA 含量及 CAT 活性测定。与代谢物共培养 12 h 后的菌丝液,在 4 $^{\circ}$ C 以 8 000 g 离心 5 min,倒掉上清液获得菌丝,根据试剂盒说明书(北京索莱宝科技有限公司)的要求,测定菌丝中 MDA 含量和 CAT 活性。

1.6 盆栽防效试验

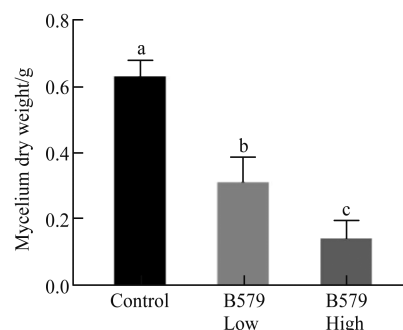
为探究 CA 和 PA 对面临病菌侵袭时的植物的影响,实验组使用无菌注射器将 30 mL 的 CA 和 PA(50 μ g/mL)缓慢注入生长在温室中具有两片真叶的黄瓜根际土壤(距土壤表面约为 4 cm)。对照组和 FOC 组(仅接种病原菌)注入 30 mL 无菌水,在处理 1 天时,对照继续注入 30 mL 无菌水,其余处理均将 30 mL 病原菌孢子悬浮液(10^4 个分生孢子/mL)注入各组黄瓜的根际土壤。室温,高相对湿度(70%~80%)和自然光照条件下生长。每个处理三次重复,3 棵一盆,共计 108 棵。接种病原菌 13 天后,参照 Liu 等人^[18]所使用的标准,调查植株的发病率及病情严重程度。黄瓜枯萎病的发病情况分为 5 级:0 级,未出现症状;1 级,子叶轻微萎靡;2 级,植株出现萎蔫症状(子叶萎黄);3 级,植株枯黄矮化,萎蔫;4 级,植株枯亡。病情指数及防治效果的计算公式如

$$D_{\text{病情指数}} = \frac{\sum(N_{\text{发病植株}} \times G_{\text{发病相应等级}})}{(N_{\text{植株总数}} \times G_{\text{发病最高等级数}})} \times 100,$$

$$C_{\text{防治效果}} = \frac{(D_{\text{对照病情指数}} - D_{\text{处理病情指数}})}{D_{\text{对照病情指数}}} \times 100\%.$$

1.7 数据分析

使用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行作图,使用 SPSS 24(SPSS,Chicago)软件进行统计分析,采用单因素方差分析(ANOVA)和邓肯检验进行多重比较, $p < 0.05$ 被认为差异显著。



注:数据为平均值±标准偏差,柱形图上不同字母表示在 0.05 水平上差异显著。

图 1 不同浓度 CFs 下病原菌菌丝生长干重

Fig. 1 Dry weight of pathogen hyphae growth at different concentrations of CFs

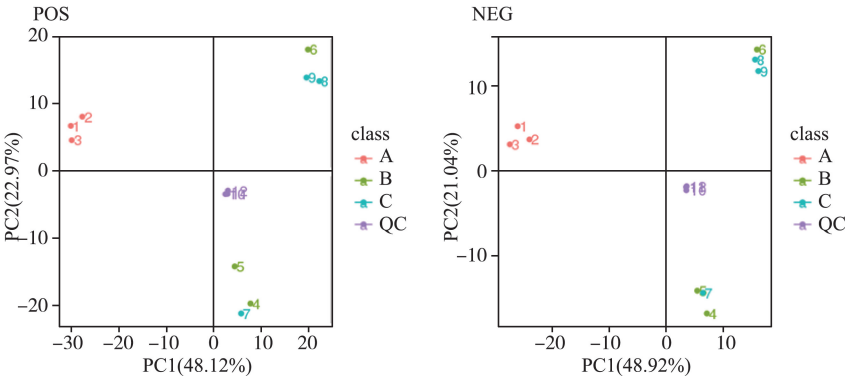
2 结果

2.1 枯草芽孢杆菌 B579 产生对枯萎病菌生长具有拮抗活性的胞外化合物

前期的研究发现,枯草芽孢杆菌 B579 能有效抑制尖孢镰刀菌的生长,降低黄瓜枯萎病发病率。因此我们将枯萎病菌接种至两种不同 B579 培养滤液(CFs)含量的 PDB 的培养基中,以探究菌株 B579 能否分泌抗菌化合物至胞外培养基中。结果表明,CFs 能够抑制尖孢镰刀菌菌丝的生长,且具有浓度依赖性(图 1)。

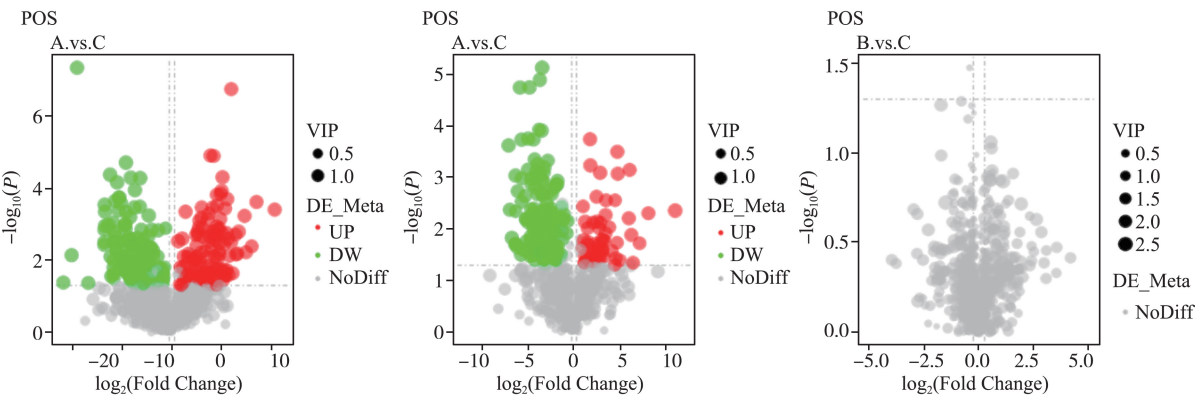
2.2 UPLC-质谱/质谱代谢组分析

将尖孢镰刀菌和 B579 共培养,对 CFs 进行非靶向代谢组学分析,以发现在真菌存在下芽孢杆菌分泌到胞外培养基中的差异代谢物。主成分分析(图 2)表明:无论在正离子还是负离子模式下,QC 样本点和各处理组内的样本点很好地聚集在一起,说明整个方法稳定性好,数据质量高。而不同处理间的样本点在 PCA 图中分布较为分散,证明过滤培养液的外代谢组在各处理间存在明显差异。差异代谢物火山图(图 3)表明:将真菌与细菌共培养后,代谢物质含量变化,红色表示上调,从图中可以看出共培养组相较枯草芽孢杆菌单培养组有代谢物含量变化,共培养组相较尖孢镰刀菌单培养组代谢物含量无明显变化,从上调物质中筛选可抑菌作用代谢物。依照下列标准进行差异物分析(图 4):(1) 单培养 FOC 培养物滤液中未发现的代谢物;(2) 枯草芽孢杆菌 B579 分泌代谢物;(3) 在前两种条件的约束下,在 B579 和 FOC 共培养物滤液中高表达



注:POS:正离子模式下;NEG:负离子模式下;各处理分别为:A:B579 单培养;B:FOC 单培养;C:B579 和 FOC 共培养;QC:质量控制处理。图中相同颜色的数字编号代表每个处理的三个重复,所用培养基均为 PDB 培养基。

图 2 各处理培养滤液不同模式下的主成分分析图
Fig. 2 Principal component analysis diagram of each treatment culture filtrate under different modes



注:POS:正离子模式下;NEG:负离子模式下;绿色:下调,红色:上调,灰色:无明显变化。A:B579 单培养;B:FOC 单培养;C:B579 和 FOC 共培养。

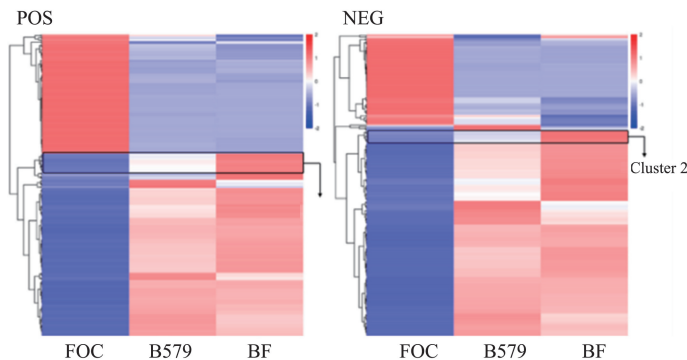
图 3 各处理培养滤液不同模式下的差异代谢物火山图
Fig. 3 Volcano diagram of differential metabolites in different modes of culture filtrate of each treatment

的代谢物,确定了聚类热图中簇 1 和簇 2 包含的代谢物。它们包括多种氨基酸相关化合物、苯丙氨酸衍生物和氧化羧酸。通过对差异代谢物进行筛选,共选出 48 种上调的物质,选取其中显著上调的前 15 个,进行进一步实验验证。表 1 中呈现出 15 上调最高的差异代谢物的保留时间与和质荷比,以确保数据的准确性。

表 1 差异代谢物的保留时间与质荷比

Tab. 1 Retention time to mass-charge ratio of differential metabolites

Name	RT[min]	m/z
Adenosine	2.93	268.101 9
4-Pyridoxic acid	1.306	184.062 5
Indole-3-acrylic acid	5.245	188.069 3
Coumarin	2.41	147.043 0
Indole	5.249	118.064 6
Palmitoleic Acid	7.506	277.214 3
p-Coumaric acid	2.934	165.053 4
Citric acid	1.989	191.020 1
Succinic acid	2.544	117.018 8
L-Tyrosine	2.399	180.066 9
Uric acid	1.766	167.021 2
Adenine	2.921	134.046 9
L-lysine	1.195	145.098 2
L-arginine	1.637	173.104 7
trans-Cinnamic acid	5.699	147.045 1



注:POS:正离子模式下;NEG:负离子模式下;簇 1 和簇 2:在条件筛选后, B579 和 FOC 共培养物中所积累的目标代谢物。

图 4 不同处理的培养滤液中代谢组分的热图分析

Fig. 4 Heatmap analysis of metabolic components in culture filtrate of different treatments

2.3 不同代谢物的体外抗真菌活性

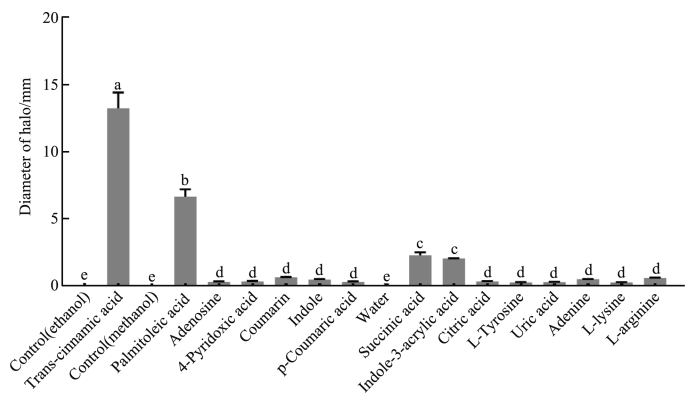
在体外试验中测试了已筛选的商用代谢物标准品,以评价它们对尖孢镰刀菌生长的影响。在平板试验中,共测定了 15 种商用代谢物标准品,其中有 4 种对病原菌孢子萌发具有显著的抑制作用(图 5)。反式肉桂酸(CA)的抑制作用最强,其次为棕榈酸(PA)。

2.4 目标代谢物在不同浓度下对病原菌的抑菌效果

通过体外平板实验,探究不同浓度的 CA 和 PA 处理对尖孢镰刀菌孢子萌发的拮抗作用。结果表明:溶剂对尖孢镰刀菌孢子的萌发无拮抗活性。PA 在浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时无拮抗活性,而 CA 在此浓度下有拮抗活性。CA 和 PA 对病原菌孢子萌发的拮抗能力均在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时最强,所产生的晕圈区直径分别为 0.63 cm 和 1.27 cm(图 6)。相同浓度下,CA 对尖孢镰刀菌孢子萌发的拮抗能力更强。

2.5 目标代谢物对病原菌膜通透性的影响

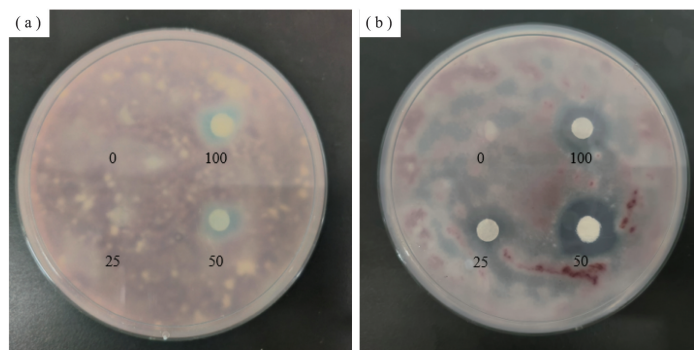
与对照组相比,经代谢物处理的菌丝体电导率随时间延长呈现显著上升趋势,表明 CA 和 PA 能够影响尖孢镰刀菌质膜通透性。相比 PA(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理,CA(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理的镰刀菌质膜在 90~240 min 内具有更高的渗透性,表明 CA 比 PA 造成更严重的质膜损伤,图 7(a)。



注:数据为平均值士标准偏差($n=3$),相应溶剂后的物质为所溶解的代谢物。

图 5 代谢物对尖孢镰刀菌孢子萌发拮抗活性的体外平板测定

Fig. 5 *In vitro* plate determination of antagonistic activity of metabolites against spore germination of *Fusariumoxysporum*

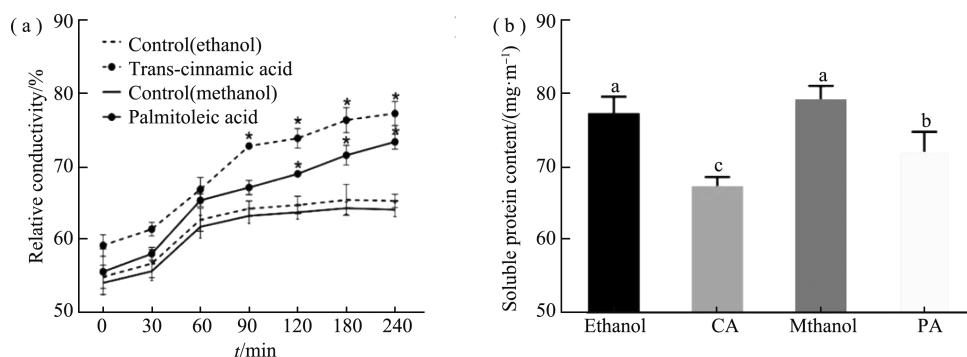


注:对照组(0 µg/mL):采用不含代谢物的溶剂,每个处理重复三次。

图 6 CA(a)和 PA(b)在不同浓度下对病原菌孢子萌发拮抗活性的测定

Fig. 6 Determination of antagonistic activity of CA (a) and PA (b) against spore germination of pathogens at different concentrations.

暴露于两种代谢物下的病原菌菌丝体的蛋白质泄漏测量结果如图 7(b)所示。在处理 12 h 后,用 50 µg/mL 的 CA 或 PA 处理的菌体可溶性蛋白质含量显著降低,分别比对照 36.58% 和 24.71% ($p < 0.05$)。



注:图(a)曲线中的*号表示与对照组相比具有显著差异,由 t 检验确定 ($p < 0.05$)。

图 7 CA 和 PA (50 µg/mL) 对枯萎病菌培养物的菌丝(a) 细胞膜渗透性,(b) 细胞内蛋白质含量的影响

Fig. 7 Effects of CA and PA (50 µg/mL) on mycelial (a) cell membrane permeability, (b) intracellular protein content of *F. oxysporum* cultures

2.6 目标代谢物对病原菌菌丝中 MDA 含量及过氧化氢酶活性的影响

由图 8(a)可知,在 CA 和 PA 浓度为 50 µg/mL 条件下,处理 12 h 时,MDA 含量分别为 9.04 nmol/g 和 7.15 nmol/g,分别比对照提高了 4.04 倍和 3.27 倍。该结果表明 CA 和 PA 可以破坏菌丝细胞膜,进而引发膜脂过氧化反应。

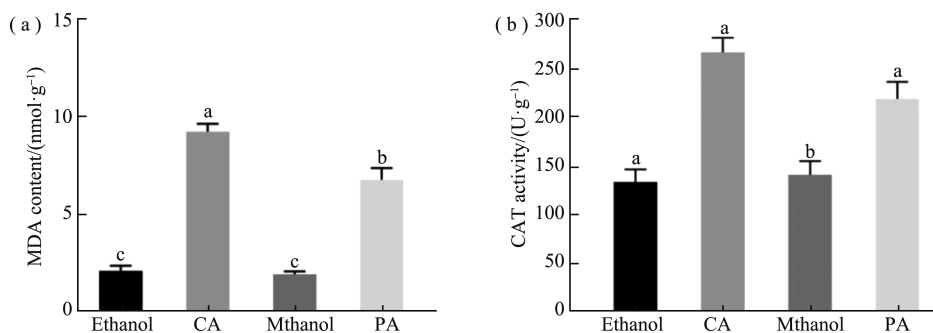


图 8 CA 和 PA (50 µg/mL) 处理下的病原菌菌丝中(a) MDA 含量,(b) CAT 活性

Fig. 8 (a) MDA content, (b) CAT activity in the mycelium of pathogenic bacteria treated with CA and PA (50 µg/mL)

如图 8(b)所示,在与 CA 和 PA(50 µg/mL)共培养 12 h 时,菌丝体内 CAT 活性分别为 266.73 U/g 和

218.91 U/g,分别为对照的1.99倍和1.55倍,这说明CA和PA能够影响CAT活性,受毒害的菌体可通过提高该酶活性进而减弱胁迫程度。

2.7 目标代谢物对枯萎病菌胁迫下黄瓜的保护作用

为验证CA和PA对枯萎病菌胁迫下的黄瓜的保护能力,进行了温室盆栽试验。结果表明:对照组黄瓜幼苗生长正常,而FOC单独处理的黄瓜存在发病现象,病情指数高达45.68%。CA和PA处理的病情指数分别为14.81和24.08,对黄瓜枯萎病的防治率为67.58%和47.29%。

表2 目标代谢物对黄瓜枯萎病的防治效果

Tab. 2 Control effect of target metabolites on cucumber fusarium wilt

组别	疾病指数	防治率/%
CK	0c	-
CA+FOC	14.81±6.41b	-
PA+FOC	24.08±3.22b	47.29
FOC	45.68±7.71a	67.58

注:数据为平均值±标准偏差,同列数据后不同小写字母表示在0.05水平上差异显著。

3 讨论

合成化学杀真菌剂的应用能够产生病原体抗性和环境污染,因此迫切需要开发新的有效策略来控制作物中的真菌感染。随着代谢组学的发展,研究者能在信号和碳图谱方面获得芽孢杆菌代谢的全面概述,以及具有经济相关性或与拮抗作用相关的次级代谢物的信息。对植物病原体与生防菌共培养过程中产生的CFs进行代谢组学分析是一种有效的方法,可用于鉴定生防菌在发挥拮抗作用过程中涉及的代谢物。Millan^[19]等通过将病原菌与生防酵母菌株 *pulcherrima* 共培养,发现了三种由菌株产生的具有体外和体内杀真菌作用的新化合物。在本实验中,非靶向代谢组学研究揭示了芽孢杆菌单一培养物与尖孢镰刀菌共培养物之间的外代谢组的显著差异。经条件筛选,在共培养条件下鉴定出48种芽孢杆菌B579高分泌的代谢物,这些代谢物多与三羧酸循环及氨基酸和嘌呤的生物合成相关。对15种可商购的代谢物进行体外平板抑菌测试,其中CA和PA展现出了较强的抑菌活性。肉桂酸是一种芳香羧酸,通常以反式构型存在^[20]。据报道,CA及其衍生物是诱导植物病原体抗性的次级代谢物,能够通过干扰细胞代以抑制生物膜的生长,还能够抑制真菌细胞壁的形成,对黄曲霉^[21]、炭疽菌属^[22]和核盘菌属^[23]也具有真菌活性。尽管许多微生物物种不合成CA,但在特定条件下,例如与其他生物共培养,往往可以诱导CA的大量合成。脂肪酸及其衍生物在医学应用中的潜力已经被深入研究,但也被发现具有抗真菌活性如月桂酸和棕榈酸,能够通过破坏细胞膜的完整性发挥抑制病原菌菌丝生长和孢子萌发的作用^[24]。但非靶向代谢组学分析也具有一定的局限性,首先,这种分析方法对样本质量以及仪器性能要求较高,其次,组学分析涉及数据量庞大,分析范围广泛,代谢物鉴定的准确性和定量精度可能受到限制。

细胞膜作为真菌的重要组成部分,具有维持细胞内环境稳定、控制物质的运输等作用,常作为抗真菌药物的作用靶点^[25]。许多研究表明抑菌物质可通过破坏细胞膜结构抑制病原菌生长。赵美荣等人研究发现臭椿 canthin-6-one(生物碱)破坏细胞膜的结构,从而抑制禾谷镰刀菌的生长^[26]。窦勇等^[27]研究发现ε-聚赖氨酸破坏苹果灰霉病菌细胞膜,引起可溶性蛋白和核酸的泄露。胞内可溶性蛋白含量和胞外相对电导率可以间接评估细胞膜的完整性,是反映细胞的受损程度的重要指标^[28]。本研究测定了CA和PA处理后病原菌胞内可溶性蛋白质含量和胞外相对电导率,结果表明,CA和PA能够增加菌体细胞膜的透性,造成内容物泄漏。作为膜脂过氧化剂的最终产物,丙二醛(MDA)的含量与膜的破坏程度有很大的关系^[29]。菌体MDA含量在CA和PA处理后明显增加,说明CA和PA可能引起尖孢镰刀菌的细胞膜氧化损伤,从而造成膜透性增加^[30]。

真菌处于逆境时,通常会增加相关防御性酶含量来抵御胁迫^[31]。王兴国等^[32]研究发现大丽轮枝孢激活蛋白能够引起马铃薯晚疫病菌MDA含量增加,破坏膜系统完整性,提高菌丝体苯丙氨酸解氨酶(PAL)和过氧化氢酶(CAT)活性。张超等^[33]发现经过和厚朴酚处理后的红托竹荪腐烂病菌菌丝表面出现不规则的皱缩与扭曲,超氧化物歧化酶(SOD)活性升高,导致活性氧在体内过量积累,引起细胞损伤。本研究结果与

之相似,病原菌经 CA 和 PA 处理后,细胞膜受到氧化损伤,菌体的 CAT 活升高。此外,盆栽试验结果表明 CA 和 PA 能够显著降低黄瓜枯萎病的病情指数,且 CA 的防治效果高于 PA。

4 结论

共培养条件下所筛选的 CA 和 PA 能引起病原菌细胞膜氧化损伤,导致膜完整性丧失及透性增强,对尖孢镰刀菌生长产生抑制作用,从而对黄瓜枯萎病起到有效的防治作用。然而,抑菌机制通常是多种代谢物协同作用的结果,因此还需要进一步探索代谢物的种类,并研究其具体的抑菌机制。

参 考 文 献

- [1] 韩敏. 黄瓜枯萎病的发生原因与防治技术探讨[J]. 特种经济动植物, 2024, 27: 115-117.
- [2] 吴丽霞. 塑料大棚黄瓜枯萎病综合防治措施[J]. 农业工程技术, 2024, 44(15): 90-91.
- [3] 沙月霞, 曾庆超, 王昕, 等. 防治稻瘟病芽孢杆菌的筛选及效果评价[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34: 414-422.
- [4] 姜旭. 利用微生物防治植物病害研究进展[J]. 园艺与种苗, 2018, 6: 57-58.
- [5] 郑丽雪, 康秋艳, 姜静怡, 等. 枯草芽孢杆菌微囊泡的高效分离及其抗炎活性研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2024, 37(3): 90-98.
- [6] 常波. 短小芽孢杆菌防治植物病害研究进展[J]. 现代农业科技, 2024, 12: 65-70.
- [7] 范宗强, 冯靖涵, 郑丽雪, 等. 枯草芽孢杆菌 B579 对黄瓜枯萎病的防治及其诱导抗性研究[J]. 生物技术通报, 2024, 40(7): 226-234.
- [8] MILLAN A F S, GAMIR J, LARRAYA L, et al. Towards understanding of fungal biocontrol mechanisms of different yeasts antagonistic to *Botrytis cinerea* through exometabolomic analysis[J]. *Biological Control*, 2022, 174: 105033.
- [9] XU W, DONG Q, ZHAO G, et al. Analysis of metabolites of bactrain camel milk in Alxa of China before and after fermentation with fermenting agent TR1 based on untargeted LC-MS/MS based metabolomics[J]. *Heliyon*, 2023, 9(8): e18522.
- [10] SILVA A D, AMBROZIN A R P, CAMARGO D A F S, et al. Liquid fungal cocultivation as a strategy to access bioactive metabolites[J]. *Planta Medica*, 2020, 87(1/2): 187-195.
- [11] XU M, SHI Y, FAN D L, et al. Co-culture of white rot fungi *Pleurotus ostreatus* P5 and *Bacillus amyloliquefaciens* B2: A strategy to enhance lipopeptide production and suppress of *Fusarium wilt* of cucumber[J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(11): 1049.
- [12] 王莹, 崔树鹏, 王改进, 等. 球毛壳菌发酵滤液对松树蜂共生真菌的抑菌活性[J]. 西北农业学报, 2024, 33(12): 2388-2398.
- [13] 许沛东, 易剑锋, 陈迪, 等. 组学技术在生防芽孢杆菌的应用进展[J]. 生物技术通报, 2024, 40(10): 208-220.
- [14] NICAULT M, ZAITER A, DUMARCAY S, et al. Elicitation of antimicrobial active compounds by streptomyces-fungus co-cultures[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(1): 178.
- [15] 徐洋, 晁文池, 宋宝莉, 等. 变异链球菌生长受枯草芽孢杆菌抑制机制的代谢组学分析[J]. 医学理论与实践, 2021, 34(2): 184-186.
- [16] 滕晨皓, 王会聪, 王友红, 等. 抑水绵枯草芽孢杆菌的分离、鉴定及代谢组学特征[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2156-2171.
- [17] 张尹强. 棘孢木霉 PT-29 与枯草芽孢杆菌 S-16 共培养对马铃薯主要土传病害的防治及其机理研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2023.
- [18] PU X M, XIE B Y, LI P Q, et al. Analysis of the defence-related mechanism in cucumber seedlings in relation to root colonization by non-pathogenic *Fusarium oxysporum* CS-20[J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2014, 355(2): 142-151.
- [19] MILLAN A F S, GAMIR J, FARRAN I, et al. Identification of new antifungal metabolites produced by the yeast *Metschnikowia pulcherrima* involved in the biocontrol of postharvest plant pathogenic fungi[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 192: 111995.
- [20] RODRIGUES M P, TOMAZ D C, ÂNGELO DE SOUZA L, et al. Synthesis of cinnamic acid derivatives and leishmanicidal activity against *Leishmania braziliensis*[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 183: 111688.
- [21] RIBES S, FUENTES A, TALENS P, et al. Application of cinnamon bark emulsions to protect strawberry jam from fungi[J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 78(3): 265-272.
- [22] BOCK C H, SHAPIRO-ILAN D I, WEDGE D E, et al. Identification of the antifungal compound, trans-cinnamic acid, produced by *Photobacterium luminescens*, a potential biopesticide against pecan scab[J]. *Journal of Pest Science*, 2013, 87(1): 155-162.
- [23] WANG Y, SUN Y, WANG J, et al. Antifungal activity and action mechanism of the natural product cinnamic acid against *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(5): 944-950.
- [24] LIU S, RUAN W, LI J, et al. Biological control of phytopathogenic fungi by fatty acids[J]. *Mycopathologia*, 2008, 166(2): 93-102.
- [25] 刘晓环, 张朝晖. 抗真菌药物作用靶点机理及新药研发进展[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(2): 193-202.
- [26] 赵美荣, 李永春, 李春颖. 臭椿 canthin-6-one 对禾谷镰刀菌的抑菌作用[J]. 湖北农业科学, 2024, 63(9): 84-88.

- [27] 窦勇,董静,陈成,等. ϵ -聚赖氨酸对苹果灰霉病菌的抑菌机制[J]. 食品工业科技, 2025, 46(3): 196-203.
- [28] 陈薇,刘惠芳,马驰宇,等. 香茅醇和柠檬醛对茶炭疽病菌丝结构和酶活性的影响[J]. 贵州农业科学, 2024, 52(9): 90-99.
- [29] 黄伟,王宁,宋博,等. 猫木霉 M6-5 挥发性物质对香梨采后链格孢细胞膜和细胞壁的影响[J]. 食品科学, 2024, 45(22): 247-254.
- [30] 范宗强,李欣苒,冯靖涵,等. 解淀粉芽孢杆菌 9-2 防控黄瓜枯萎病及其诱导系统抗性研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2025, 38(4): 625-632.
- [31] 乔奕,郑美辰,盛鑫如,等. 瓦尼木层孔菌培养基优化及抗炎作用研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版), 2023, 36(5): 91-98.
- [32] 王兴国,刘霞,张哲,等. 大丽轮枝孢激活蛋白(VdAL)对马铃薯晚疫病发生的影响[J]. 江西农业学报, 2022, 34(10): 101-107.
- [33] 张超,文庭池,曾祥宇,等. 和厚朴酚对红托竹荪腐烂病菌抑菌活性的影响[J]. 北方园艺, 2024, 21: 92-98.

(责任编辑:刘庆松)

(上接第 890 页)

- [34] WANG J J, JIA Z H. Metal nanoparticles/porous silicon microcavity enhanced surface plasmon resonance fluorescence for the detection of DNA[J]. Sensors, 2018, 18(2): 661.
- [35] LIANG Y X, JIANG L, XU S T, et al. Synthesis and characterization of Fe_3O_4 nanoparticles prepared by solvothermal method[J]. Journal of Materials Engineering and Performance, 2023, 33(13): 6804-6815.
- [36] YADAV M, ARORA R, DHANDA M, et al. TiO_2 -guanine as a new amalgamation compound for fabrication of a disposable biosensor with high sensitivity and rapid detection of H1N1 swine flu virus[J]. Microchimica Acta, 2023, 190(10): 412.
- [37] PARK J A, KIM J, KIM S M, et al. Fabrication of electrochemical influenza virus (H1N1) biosensor composed of multifunctional DNA four-way junction and molybdenum disulfide hybrid material[J]. Materials, 2021, 14(2): 343.
- [38] RAVINA, MOHAN H, GILL P S, et al. Hemagglutinin gene based biosensor for early detection of swine flu (H1N1) infection in human[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 130: 720-726.
- [39] BAO Q W, LI G, YANG Z C, et al. Electrochemical biosensor based on antibody-modified Au nanoparticles for rapid and sensitive analysis of influenza A virus[J]. Ionics, 2023, 29(5): 2021-2029.
- [40] LIN J C, LIU J J, XU J. Ultrasensitive electrochemical immunoassay for screening the influenza A (H1N1) virus based on atomically Ru-dispersed nitrogen-doped carbon[J]. New Journal of Chemistry, 2023, 47(4): 1685-1690.

(责任编辑:蒲锡鹏)