

防御假单胞菌 FD6 抗菌代谢物鉴定及其对灰霉病菌的抑制作用

杨晶龙, 宋琦, 胡婕妤, 焦永鑫, 吴涛, 张清霞*

扬州大学 植物保护学院, 江苏 扬州

杨晶龙, 宋琦, 胡婕妤, 焦永鑫, 吴涛, 张清霞. 防御假单胞菌 FD6 抗菌代谢物鉴定及其对灰霉病菌的抑制作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(7): 2965-2975.

YANG Jinglong, SONG Qi, HU Jieyu, JIAO Yongxin, WU Tao, ZHANG Qingxia. Identification of an antifungal compound produced by *Pseudomonas protegens* FD6 and determination of its inhibitory effect against *Botrytis cinerea*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(7): 2965-2975.

摘要: 【目的】研究防御假单胞菌(*Pseudomonas protegens*) FD6 发酵粗提物的抑菌活性及其作用机制, 解析粗提物中主要的活性物质。【方法】通过平板对峙试验筛选发酵最佳的培养基、萃取剂、溶剂, 以及发酵粗提物抑菌活性的稳定性。利用 MALDI-TOF/TOF 质谱鉴定粗提物中主要抗菌物质, 并探究粗提物的抑菌谱。通过菌丝形态观察、孢子萌发试验、PI 染色及电导率测定, 探究粗提物对番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)的抑菌作用机制。【结果】平板对峙试验表明, 菌株 FD6 以不添加碳源马铃薯汁培养基进行发酵的粗提物抑菌活性最强。以乙酸乙酯作为萃取剂, 通过甲醇溶解所得的粗提物抑菌活性最强。质谱分析表明, 粗提物中含有环脂肽 orfamide A。进一步检测粗提物抑菌谱, 发现其对桃枝枯病菌(*Phomopsis amygdali*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、梨炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和桃褐腐病菌(*Monilinia fructicola*)均具有抑制作用。稳定性试验发现, 粗提物在 121 °C 处理 20 min 以及 pH 4.0–10.0 条件下抑菌活性稳定, 且蛋白酶 K 和胰蛋白酶处理不影响其抑菌活性。粗提物处理 *B. cinerea* 菌丝可导致其形态异常, *B. cinerea* 分生孢子经 2.0 mg/mL 粗提物处理后萌发被完全抑制, 50% 的细胞膜受到破坏, 电导率增加, 细胞内核酸与蛋白外渗。【结论】防御假单胞菌 FD6 产生的代谢物抑菌谱广且稳定性强, 为发掘新型绿色农药提供先导化合物。

关键词: 防御假单胞菌; 抑菌活性; 番茄灰霉病菌; 作用机制; orfamide A

资助项目: 国家自然科学基金(32072471, 32472628); 扬州市重点研发项目(YZ2023056); 扬州大学自制实验仪器设备项目(zzyq2024dy03)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072471, 32472628), the Yangzhou Key Research and Development Program (YZ2023056), and the Self-made Experimental Instruments and Equipment Project of Yangzhou University (zzyq2024dy03).

*Corresponding author. E-mail: zqx817@sina.com

Received: 2024-12-17; Accepted: 2025-02-15; Published online: 2025-04-09

Identification of an antifungal compound produced by *Pseudomonas protegens* FD6 and determination of its inhibitory effect against *Botrytis cinerea*

YANG Jinglong, SONG Qi, HU Jieyu, JIAO Yongxin, WU Tao, ZHANG Qingxia*

College of Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu, China

Abstract: [Objective] To explore the antifungal activity and inhibitory mechanism and identify the main antagonistic substances of the crude extract of *Pseudomonas protegens* FD6 in fermentation. [Methods] The plate confrontation test was employed to screen the optimal medium, extractant, and solvent and determine the antifungal activity stability of the crude extract. The main antifungal substances in the crude extract were identified by MALDI-TOF/TOF mass spectrometry, and the antifungal spectrum of the crude extract was explored. The inhibition mechanism of the crude extract against *Botrytis cinerea* was investigated by mycelial morphology observation, spore germination test, PI staining, and conductivity determination. [Results] The crude extract of FD6 in the potato juice medium without any carbon source displayed the strongest antifungal activity. The methanol-solved crude extract obtained with ethyl acetate as the extractant had the strongest inhibitory activity. The main antifungal substance of the crude extract was identified as a cyclic lipopeptide, orfamide A, based on mass spectrometry data. In addition, the crude extract displayed broad-spectrum inhibitory activities against *Phomopsis amygdali*, *Fusarium graminearum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Monilinia fructicola*. The antifungal activity of the crude extract was stable after treatment at 121 °C for 20 min, within the range of pH 4.0–10.0, and with protease K and trypsin. The mycelial morphology of *B. cinerea* became abnormal after treatment with the crude extract. The treatment with 2.0 mg/mL crude extract completely inhibited the conidial germination of *B. cinerea*, caused a 50% damage of the cell membrane, increased the conductivity, and led to leakage of intracellular nucleic acids and proteins. [Conclusion] The metabolites produced by *P. protegens* FD6 have broad-spectrum and stable antifungal activities, serving as lead compounds for exploration of new green fungicides.

Keywords: *Pseudomonas protegens*; antifungal activity; *Botrytis cinerea*; mechanism; orfamide A

由无性菌类灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)引起的灰霉病在番茄棚室栽培中发生面积逐年增加,已严重影响番茄的产量和品质^[1-2]。*B. cinerea*主要危害果实,每年造成产量损失高达50%,严重威胁我国番茄产业的可持续发展^[3-4]。*B. cinerea*的寄主范围广且致病性强,据报道约有1 400多种植物可被*B. cinerea*侵染^[5]。当前

灰霉病的防治主要依靠化学农药,然而化学农药的过度使用不仅影响人类健康、引发食品安全问题,还会造成环境污染,并且易导致病原菌产生抗药性。因此,寻找绿色高效的灰霉病防治方法已成为当前农业生产亟待解决的问题^[6]。

假单胞菌属(*Pseudomonas*)在自然界中分布

广泛, 具有广谱的植物病原菌抑制作用。它们不仅能在植物根际定殖并促进植物生长, 还能通过生态位竞争和利用植物分泌物作为自身营养物质来抑制病原物的生长^[7-8]。此外, 假单胞菌能产生多种天然抗菌物质, 如 2,4-二乙酰基间苯三酚 (2, 4-diacetylphloroglucinol, 2, 4-DAPG)、硝吡咯菌素 (pyrrolnitrin, PRN)、藤黄绿脓菌素 (pyoluteorin, PLT)、氢氰酸 (hydrogen cyanide, HCN)、环脂肽 (cyclic lipopeptides, CLP)、吩嗪-1-羧酸 (phenazine-1-carboxylic acid, PCA) 等^[9]。其中, CLP 是一类由细菌通过非核糖体肽合成酶合成的脂肽类化合物, 主要由假单胞菌、芽孢杆菌 (*Bacillus*) 和链霉菌 (*Streptomyces*) 产生^[10-11]。CLP 作为一种新型表面活性剂, 对部分病原菌具有较好的生防活性。宋晓雅等^[12]发现, 贝莱斯芽孢杆菌 (*B. velezensis*) QZ-1 产生的伊枯草菌素可以有效抑制番茄灰霉菌的扩展。Nielsen 等^[13]发现, 荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 96.578 产生的环脂肽类抗生素 tensin 能够显著抑制立枯丝核菌菌丝的延伸, 可用于防治水稻纹枯病。*P. fluorescens* SS101 产生的环脂肽 massetolide A 可以裂解腐霉属 (*Pythium*) 真菌产生的游动孢子^[14]。此外, 环脂肽 orfamide 能够诱导植物产生系统获得抗性 (systemic acquired resistance, SAR), 帮助植物抵御多种病原菌的侵染^[15]。目前, 已有假单胞菌商品化制剂登记, 如在美国环境保护署注册的 Bio-Save 10 LP、Bio-Save 11 LP 和 BlightBan A506^[16]。

防御假单胞菌 (*P. protegens*) FD6 分离自青菜根际土壤, 可有效抑制番茄灰霉病菌、桃褐腐病菌 (*Monilinia fructicola*)、小麦根腐病菌等多种病原物的生长^[17-19]。前期研究表明 FD6 可产生多种抗菌代谢产物, 如 PLT、2,4-DAPG、PRN、HCN 和嗜铁素等^[17]。通过 antiSMASH 预测, FD6 全基因组可能还含有 orfamide 类环脂肽、甲烷氧化菌素及 3 种未知次生代谢产物合成基因簇^[20]。本研究分析鉴定 *P. protegens* FD6 产生的新型抗菌物质, 明确其对 *B. cinerea* 的作用机

制, 旨在为利用生防菌绿色高效防控植物病害奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

P. protegens FD6 (GenBank 登录号为 CP031396.1) 分离自福建闽侯青口青菜根围^[17]。所使用的植物病原真菌包括桃枝枯病菌 (*Phomopsis amygdali*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、梨炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、桃褐腐病菌 (*M. fructicola*)、番茄灰霉病菌 (*B. cinerea*)、水稻恶苗病菌 (*F. moniliforme*)、茭白黑粉病菌 (*Ustilago esculenta*)、小麦全蚀病菌 (*Gaeumannomyces graminis*) 和水稻纹枯病菌 (*Rhizoctonia solani*)。小麦全蚀病菌由南京农业大学伍辉军课题组提供, 其余菌株由本课题组保存。

1.2 培养基

马铃薯汁培养基 (PA) (g/L): 马铃薯 200.0, 琼脂 20.0。

马铃薯葡萄糖培养基 (PDA) (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0。

马铃薯蔗糖培养基 (PSA) (g/L): 马铃薯 200.0, 蔗糖 20.0, 琼脂 20.0。

1.3 不同碳源对菌株 FD6 抑菌活性和抗生素产量的影响

采用平板对峙法测定菌株 FD6 在 PA、PDA 和 PSA 上对 *B. cinerea* 和 *R. solani* 的抑菌活性, 每个处理重复 3 次。

取 100 μ L FD6 菌液涂布在 20 mL 上述 3 种培养基平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后切碎并添加等体积的乙酸乙酯, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 避光振荡 90 min, 蒸干有机相, 用 1 mL 甲醇溶解后经 0.22 μ m 滤膜过滤得到粗提物。利用 HPLC 进行抗生素定量检测。2,4-DAPG 的 HPLC 条件: 乙腈的体积分数为 55%, 水的体积分数为 44.9%, 甲酸的体积分数为 0.1%, 流速为

1.0 mL/min, 紫外检测器波长 270 nm; PLT 的 HPLC 条件: 甲醇的体积分数为 70%, 水的体积分数为 30%, 流速为 1.0 mL/min, 紫外检测器波长 308 nm。

1.4 抗菌物质萃取剂及溶剂的筛选及其鉴定

参照 1.3 节粗提物提取方法, 以三氯甲烷、乙酸乙酯和正丁醇 3 种有机溶剂分别萃取 FD6 产生的代谢物再用甲醇溶解; 将乙酸乙酯萃取物蒸干后, 分别用 0.5 mL 1% DMSO、甲醇、ddH₂O 溶解获得粗提物。取 100 μ L 不同处理的粗提物, 以 100 μ L 甲醇作为阴性对照, 采用打孔法检测抑菌活性。待对照组病原真菌长满平板后, 分别测量其抑菌带宽, 每组设 3 个重复。

将上述粗提物送至中国科学院生物物理研究所蛋白质组学技术实验室进行质谱分析。将样品溶液与 CHCA 基质饱和溶液等体积充分混合, 取 0.7 μ L 样品与基质混合液滴加至不锈钢 MALDI 靶板上, 并在室温下自然干燥。样品用 MALDI-TOF MS (Bruker 公司) 进行质谱分析, 激光源为 200 Hz (紫外波长 355 nm) 的 Nd:YAG 激光器, 加速电压为 20 kV, MS 采用反射正离子模式, 质量范围 800–4 000 Da, 每个图谱采集 4 000 shots。

1.5 抗菌粗提物抑菌谱及稳定性的研究

利用 1.3 节方法制备的粗提物, 采用打孔法检测对供试 8 种植物病原真菌的抑菌活性。

以 *B. cinerea* 为指示菌, 测定粗提物对温度、pH 和蛋白酶的敏感性, 每组处理设 3 次重复。设置粗提物在 20、40、60、80、100 和 121 $^{\circ}$ C 条件下孵育 20 min, 室温未处理为空白对照; 将粗提物加入 0.2 mol/L Na₂HPO₄-0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液(pH 4.0–10.0)中, 置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, pH 7.0 为空白对照, 测定其抑菌活性; 将蛋白酶 K 和胰蛋白酶的浓度定为 2 mg/mL, 分别以 1:1 的比例与粗提物混合,

37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h 后测定抑菌活性, 以未添加蛋白酶为空白对照。

1.6 抗菌粗提物对 *B. cinerea* 抑菌机理的研究

1.6.1 抗菌粗提物对 *B. cinerea* 菌丝形态的影响

分别挑取未经粗提物处理和经粗提物处理后的 *B. cinerea* 菌丝体, 置于已滴加无菌水的载玻片上, 使菌丝体展开后, 通过显微镜观察菌丝体的形态。

1.6.2 抗菌粗提物对 *B. cinerea* 分生孢子萌发和芽管伸长的影响

在 PDB 培养基中分别添加浓度为 0、0.3、0.6、1.0、1.5 和 2.0 mg/mL 的粗提物, 再加入孢子悬浮液, 使最终孢子浓度为 10⁵ 个/mL。取 20 μ L 滴于凹玻片上, 在 25 $^{\circ}$ C 条件下培养至对照组孢子完全萌发, 测定处理组孢子萌发率和芽管伸长情况^[21]。当芽管长度等于或大于孢子直径时, 表明孢子已萌发。使用显微镜测微计测定芽管长度。每组随机观察约 200 个孢子, 试验重复 3 次。

1.6.3 抗菌粗提物对 *B. cinerea* 分生孢子细胞膜完整性的影响

参考 Jeong 等^[22]的方法, 采用碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色法检测孢子细胞膜是否受到破坏。取 *B. cinerea* 分生孢子悬浮液 240 μ L (10⁵ 个/mL), 加入到 240 μ L PDB 中, 再加入 20 μ L 不同浓度的粗提物, 在 25 $^{\circ}$ C、180 r/min 振荡培养 4 h。8 000 r/min 离心 5 min 后去掉上清液, 加入 1 mL PI 染色液(终浓度 10 μ g/mL)室温染色 30 min, 用 PBS 缓冲液洗涤 3 次后定容至 240 μ L。在荧光显微镜下随机观察约 100 个孢子, 显示红色荧光的孢子即为细胞膜受损。设置空白对照组, 每组处理 3 次重复。

1.6.4 抗菌粗提物对 *B. cinerea* 分生孢子细胞质渗漏的影响

参考 Tao 等^[23]方法测定细胞渗漏。取 *B.*

cinerea 分生孢子悬浮液 100 μL (10^5 个/mL), 加入到 20 mL PDB 中, 置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下振荡培养 3 d。4 000 r/min 离心 30 min, 用无菌蒸馏水洗涤 3 次后定容至 20 mL。将粗提物分别以 0、0.3、1.0 和 2.0 mg/mL 的浓度加入上述 4 mL 孢子悬浮液中。测定处理后 2 h 内细胞外电导率、 OD_{260} 以及 OD_{280} 。设置空白对照组, 每组处理 3 次重复。

1.7 统计分析

所有试验处理均设 3 个重复。数据显著性分析采用方差分析 (IBM SPSS Statistics 25, ANOVA) 进行, 使用 GraphPad Prism 8.4.3 软件对平均值进行 Tukey 检验 ($P < 0.05$) 并绘图。

2 结果与分析

2.1 不同碳源对菌株 FD6 抑菌能力及抗生素产量的影响

在 PA 培养基中, FD6 对 *B. cinerea* 和 *R. solani* 的抑菌活性最强, 抑菌带宽分别为 1.4 cm 和 1.3 cm; 其次为 PSA 培养基, 抑菌带宽分别为 0.6 cm 和 0.5 cm; 而在 PDA 培养基中, FD6 的抑菌活性最弱 (图 1A、1B)。FD6 主要产生抗生素 2,4-DAPG 和 PLT。通过 HPLC 定量分析 FD6 在不同培养基上 2,4-DAPG 和 PLT 的产生情况, 结果显示 FD6 在 PDA 和 PSA 培养基上均可产生较高水平的 2,4-DAPG, 但在 PA 培养基上, 2,4-DAPG 的产量显著低于 PSA 和 PDA (图 1C)。在这 3 种培养基中均未检测到 PLT (数据未显示)。然而, 在 PA 培养基中, FD6 的抑菌活性最强, 推测 FD6 在 PA 培养基中可能产生其他新型抗菌物质。

2.2 抗菌粗提物提取条件优化及活性物质鉴定

使用不同萃取剂提取 FD6 抑菌粗提物后检测其对 *B. cinerea* 的平板抑制效果。结果显示, 3 种有机溶剂均能萃取到抗菌物质, 其中三氯甲烷提取物的抑菌活性最强, 抑菌带宽为 1.57 cm,

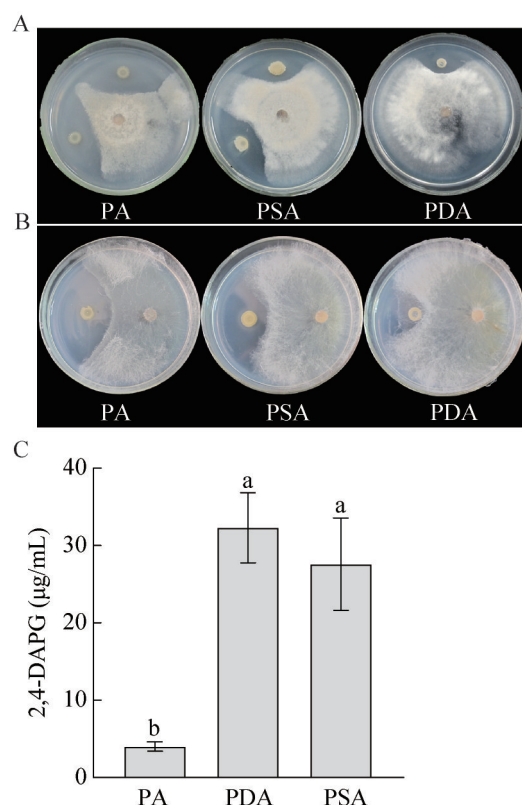


图1 不同碳源对FD6抑菌活性及2,4-DAPG产生的影响

Figure 1 The effects of different carbon sources on the antifungal activity and 2,4-DAPG production. A: *Botrytis cinerea*; B: *Rhizoctonia solani*; C: 2,4-DAPG yield. Different lowercase letters in the graphs indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$).

其次是乙酸乙酯和正丁醇 (图 2A)。由于三氯甲烷属于管控化学品, 因此后续研究选择乙酸乙酯作为萃取剂。经乙酸乙酯萃取的粗提物旋蒸后, 使用不同溶剂溶解粗提物并检测其对 *B. cinerea* 的平板抑制效果。结果显示, 甲醇溶解的粗提物对 *B. cinerea* 的抑制效果最显著, 其次为 DMSO, 而无菌水处理组未表现出抑菌效果 (图 2B)。因此, 后续研究选定甲醇溶解 FD6 粗提物。对上述所得粗提物进行 MALDI-TOF MS 检测, 结果显示粗提物中可检测到多个质谱峰, 主峰为 1 317.906 m/z ($[M+Na]^+$), 特征峰为

1 295.914 m/z ($[M+H]^+$) 和 1 333.886 m/z ($[M+K]^+$), 结合 orfamide A 的分子量大小可以确定抗菌粗提物中含有脂肽类化合物 orfamide A (图 2C)。

2.3 粗提物抑菌谱测定及稳定性研究

粗提物对桃枝枯病菌和小麦赤霉病菌的抑

菌能力最强, 抑菌带宽分别达 2.68 cm 和 2.36 cm; 其次为梨炭疽病菌、桃褐腐病菌、水稻恶苗病菌和番茄灰霉病菌; 对茭白黑腐病菌和小麦全蚀病菌的抑菌作用较弱(图 3)。稳定性分析结果表明, pH 在 4.0–10.0 (图 4A)、121 °C 高温处理

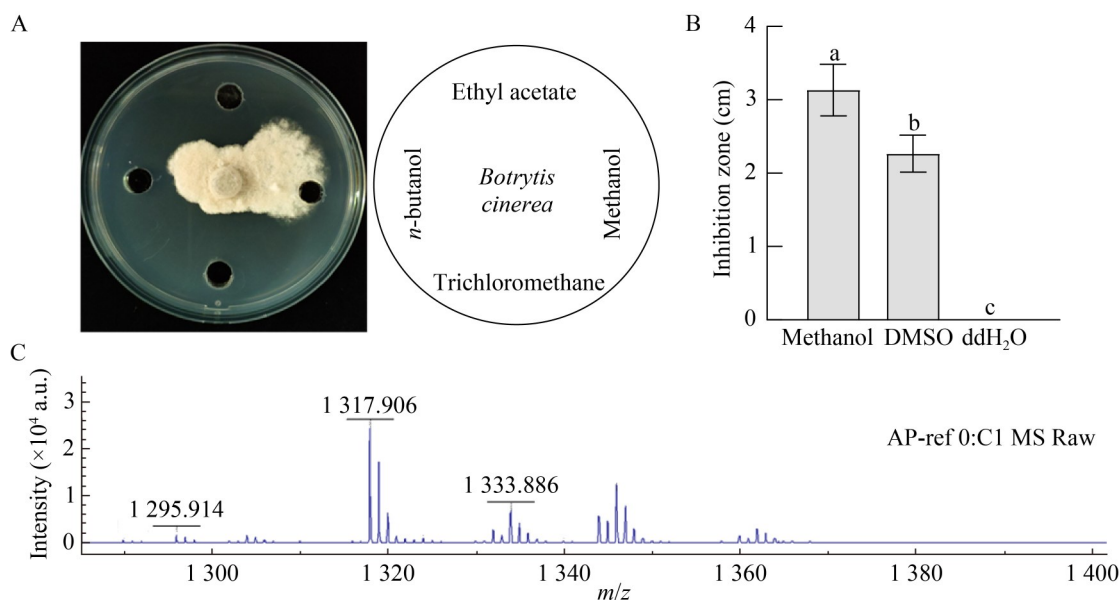


图2 FD6粗提物萃取剂和溶剂的筛选以及质谱鉴定

Figure 2 Screen of different extractants and solvents and identification of substances in FD6 crude extracts. A: Extraction solvent; B: Dissolving agents; C: MALDI-TOF MS spectrum of crude extract. Different lowercase letters in the graphs indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$).

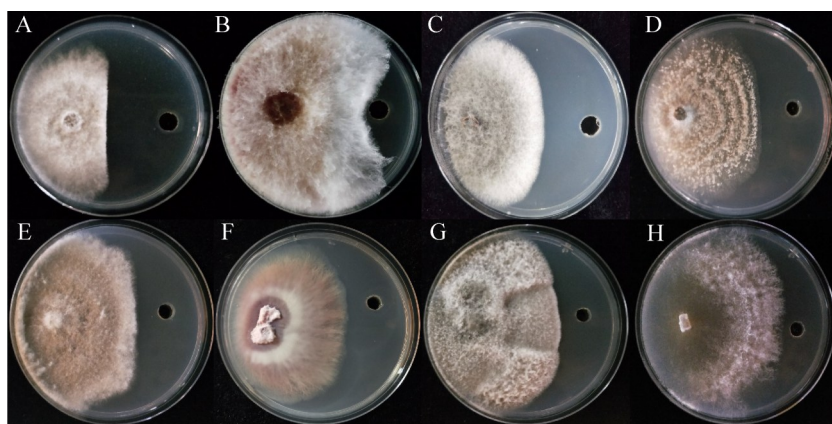


图3 FD6粗提物对不同病原真菌的抑菌活性

Figure 3 Antifungal activity of FD6 crude extract against different pathogenic fungi. A: *Phomopsis amygdali*; B: *Fusarium graminearum*; C: *Colletotrichum gloeosporioides*; D: *Monilinia fructicola*; E: *Botrytis cinerea*; F: *Fusarium moniliforme*; G: *Ustilago esculenta*; H: *Gaeumannomyces graminis*.

(图 4B)、胰蛋白酶及蛋白酶 K 处理(图 4C)对粗提物的抑菌活性均无显著影响。

2.4 粗提物对灰霉病菌抑菌机理的研究

2.4.1 粗提物对菌丝形态的影响

与对照组(图 5A)相比, FD6 粗提物处理 *B. cinerea* 菌丝体后, 菌丝体和细胞质均发生明显变化。处理组的菌丝体出现无规则分枝(图 5B)、细胞内原生质体皱缩(图 5C)及菌丝体顶端膨大(图 5D)。

2.4.2 粗提物对孢子萌发和芽管伸长的影响

结果显示, FD6 粗提物处理 *B. cinerea* 分生孢子 4 h 后, 对分生孢子的萌发具有明显的抑制作用。使用 0.6 mg/mL 粗提物处理 *B. cinerea* 分生孢子时, 能显著抑制孢子的萌发和芽管伸长; 而使用 2.0 mg/mL 粗提物处理时, 完全抑制了 *B. cinerea* 分生孢子的萌发和芽管伸长(图 6)。

2.4.3 粗提物对孢子细胞膜完整性的影响

PI 染色结果显示, 当用 1.0 mg/mL 粗提物

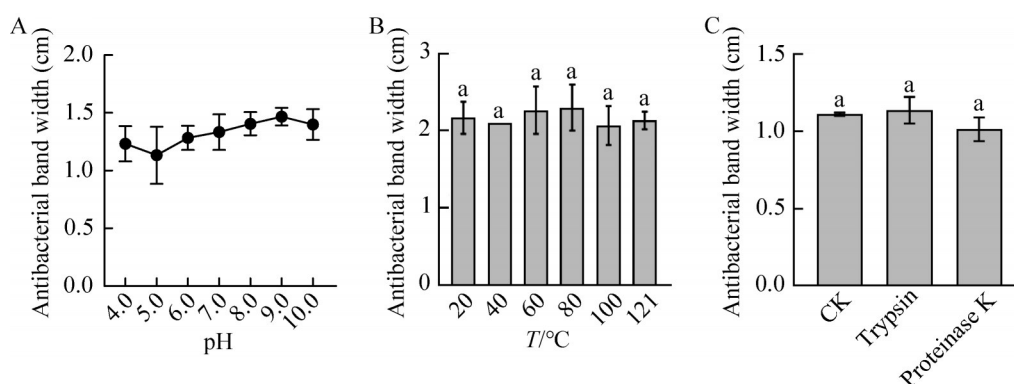


图4 不同处理对FD6粗提物抑菌活性的影响

Figure 4 Effects of different treatments on antifungal activity of FD6 crude extract. A: pH; B: Temperature; C: Protease K and trypsin. Different lowercase letters in the graphs indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$).

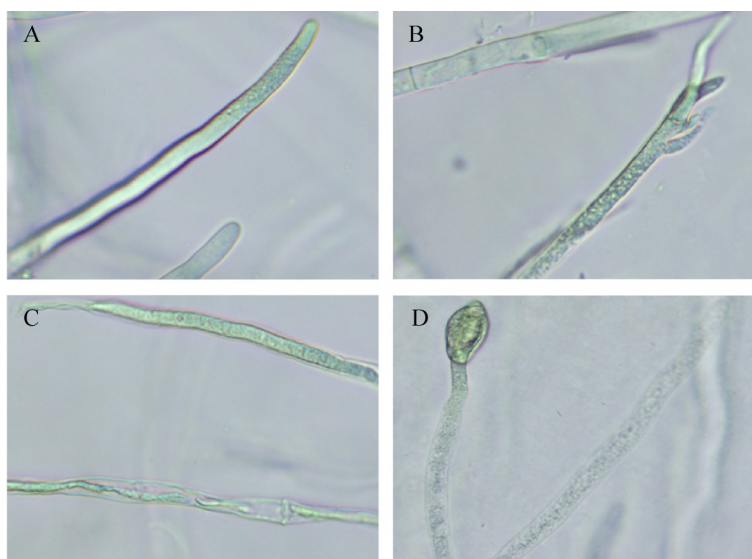


图5 FD6粗提物对灰霉病菌菌丝形态的影响

Figure 5 Effect of the FD6 crude extract on mycelial morphology. A: CK; B-D: Treatments.

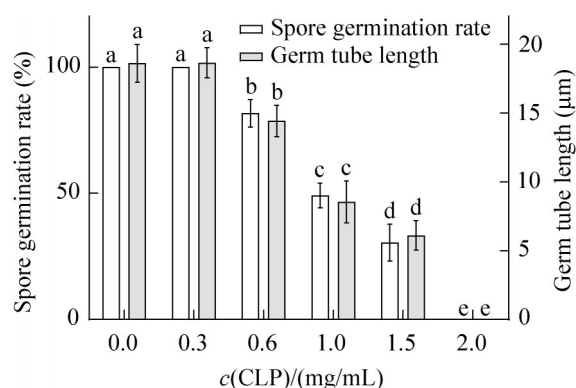


图6 FD6粗提物对孢子萌发和芽管伸长的影响

Figure 6 Effects of FD6 crude extracts on spore germination rate and germ tube length. Different lowercase letters in the graphs indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$).

处理 *B. cinerea* 分生孢子时, 约 33.34% 的分生孢子细胞膜完整性被破坏; 而当用 2.0 mg/mL 粗提物处理时, 50% 左右的 *B. cinerea* 分生孢子可以被染色(图 7)。这表明 FD6 粗提物能够破坏 *B. cinerea* 分生孢子的细胞膜完整性。

2.4.4 粗提物对孢子细胞质渗漏的影响

如图 8A 所示, 1.0 mg/mL 和 2.0 mg/mL FD6 粗提物处理 *B. cinerea* 分生孢子 30 min 后, 细胞电导率显著升高; 处理 90 min 后, 电导率开始下降。细胞外核酸和蛋白质检测结果显示, 粗提物处理后, 胞外核酸和蛋白质逐渐增多(图 8B、8C)。这表明 FD6 粗提物能够破坏 *B. cinerea* 分生孢子的细胞膜完整性, 导致细胞膜通透性增强, 从而促使胞内离子、核酸和蛋白

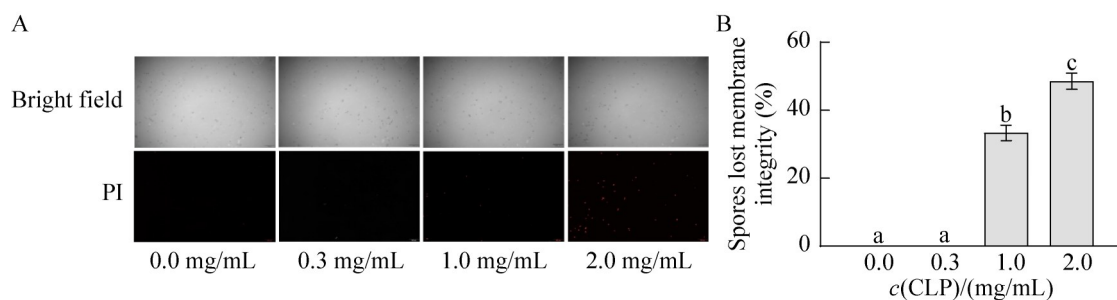


图7 FD6粗提物对灰霉病菌分生孢子细胞膜的影响

Figure 7 Effect of FD6 crude extract on cell membrane of conidia of *Botrytis cinerea*. A: Spores with damaged plasma membranes emitted red fluorescence; B: Membrane integrity rate. Different lowercase letters in the graphs indicate significant differences between different groups ($P < 0.05$).

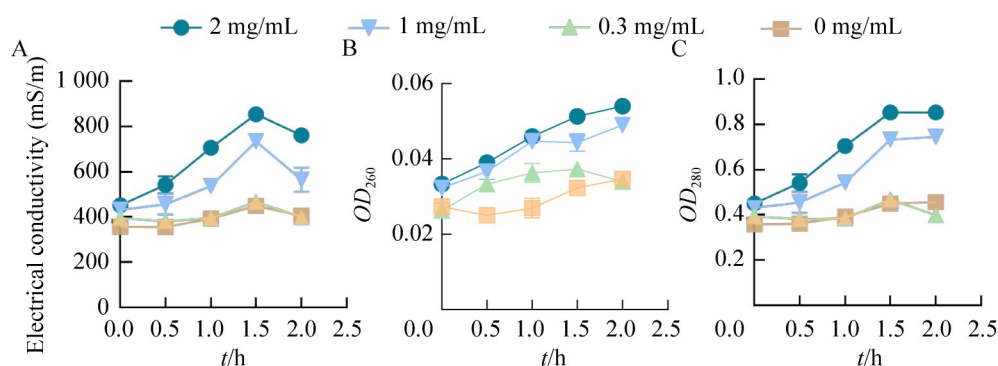


图8 FD6粗提物对灰霉病菌细胞质渗漏的影响

Figure 8 Effect of FD6 crude extract on cytoplasmic leakage of *Botrytis cinerea*. A: Conductivity; B: Nucleic acids; C: Protein.

质渗漏。

3 讨论与结论

分泌抗菌物质是生防细菌防治植物病害的主要方式之一。抗生素的产生通常受到环境因子的影响,其中碳源对生防菌抗生素的产生影响较大。例如,葡萄糖可以促进 *P. fluorescens* CHA0 中 2,4-DAPG 的产生,但抑制 PLT 的合成^[24]。本研究发现,使用蔗糖作为碳源更有利于 *P. protegens* FD6 中 2,4-DAPG 的产生。然而,在不添加任何碳源的 PA 培养基中, *P. protegens* FD6 产生的代谢物对 *B. cinerea* 和 *R. solani* 的拮抗能力最强。前期报道显示, PLT 和 2,4-DAPG 是 *P. protegens* FD6 产生的主要活性抑菌物质^[20]。然而本研究发现,在 PA 培养基中 *P. protegens* FD6 不产生 2,4-DAPG 和 PLT,说明 *P. protegens* FD6 在碳源匮乏的 PA 培养基中可能产生其他抗菌物质。James 等^[25]报道 *P. fluorescens* HV37a 在 PDA 培养基中代谢物的抑菌活性要高于 PA 培养基,说明以葡萄糖作为培养基碳源对不同假单胞菌的抗生素产生具有差异性。

环脂肽类通常由 8-25 个氨基酸的环状寡肽链和一个脂肪酸链组成,是具有双亲功能的大分子化合物。假单胞菌产生的环脂肽根据寡肽链的长度和特点可以分为 14 个组,其中包括 orfamide^[26]。截至目前,从不同细菌中已经鉴定到 8 种 orfamide 同源物(A-H),这些 orfamides 在肽序列中第 4 位氨基酸(Ile 或 Val)的组成上或脂肪酸部分的长度(或饱和度)上有差异^[27]。通常分离自植物根际的假单胞菌可产生环脂肽,且 *P. protegens* 主要分泌 orfamide A 类环脂肽^[28]。本研究通过质谱检测证实,分离自油菜根际的 *P. protegens* FD6 在 PA 培养基中也能产生 orfamide A。

P. protegens FD6 粗提物具有广谱的病原真菌抑制作用。0.6 mg/mL 粗提物能显著抑制 *B. cinerea* 分生孢子的萌发和芽管伸长,而 2.0 mg/mL

粗提物则可完全抑制 *B. cinerea* 分生孢子的萌发。Geudens 等^[26]报道指出,细胞膜的扰动,尤其是膜孔的形成造成细胞内容物外泄,是抗菌物质的主要抑菌机制。本研究发现,FD6 粗提物处理 *B. cinerea* 分生孢子可促使其膜内物质泄漏,导致细胞外电导率显著增强。通过 PI 染色后在荧光显微镜下观察,发现 FD6 粗提物处理 *B. cinerea* 分生孢子可破坏其细胞膜,且 2.0 mg/mL 粗提物处理可导致接近 50% 的分生孢子细胞膜受到破坏。此外,粗提物处理菌丝后,使菌丝原生质体皱缩、菌丝顶端出现膨大以及无规则分叉。Ma 等^[28]报道,环脂肽 orfamide A-C 这 3 种化合物均可抑制 *R. solani* 菌丝生长,导致菌丝产生更多的分枝。假单胞菌产生的环脂肽粗提物也可以抑制稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)分生孢子萌发及附着胞的形成^[27]。因此, *P. protegens* FD6 可能通过合成环脂肽类物质抑制植物病原真菌的孢子萌发并破坏细胞膜。

抗菌肽是微生物产生的具有广谱抑菌作用的天然产物,可以影响微生物的细胞膜结构,具有快速、高效和持久的抑菌活性且不易产生耐药性等优点,在病害防治方面具有潜在的研究价值^[29]。已有相关抗菌肽的报道,例如抗菌肽 O3TR 和 C12O3TR 在高温和强酸强碱条件下仍能保持对甜菜根腐病菌(*F. culmorum*)的抑菌活性^[30];抗菌肽 GNU6 和 GNU7 在胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和金属蛋白酶处理后仍有抑菌活性^[31]。本研究发现,包含环脂肽的 *P. protegens* FD6 粗提物具有热稳定性和耐酸碱性,并且对蛋白酶 K 和胰蛋白酶不敏感,说明粗提物中的环脂肽具有较好的稳定性。后续试验将进一步优化 *P. protegens* FD6 发酵条件,以提高环脂肽类抗生素的产量,从而提高 *P. protegens* FD6 的防病效果,为生防菌剂的开发奠定基础。

作者贡献声明

杨晶龙:实验操作和论文撰写;宋琦:协助实验操作;胡婕妤:数据收集;焦永鑫:数

据处理；吴涛：文章修改及论文润色；张清霞：研究构思和设计并参与论文讨论。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 赵新贝, 王娟, 上官妮妮, 刘红彦, 马青. 番茄灰霉病生防细菌 TD-7 的鉴定、发酵条件优化及其防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(2): 226-239.
- ZHAO XB, WANG J, SHANGGUAN NN, LIU HY, MA Q. Identification, fermentation condition optimization and control efficiency of biocontrol bacterium TD-7 against the tomato grey mould[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(2): 226-239 (in Chinese).
- [2] SADFI-ZOUAOUI N, HANNACHI I, ANDURAND D, ESSGHAIER B, BOUDABOUS A, NICOT P. Biological control of *Botrytis cinerea* on stem wounds with moderately halophilic bacteria[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(12): 2871-2877.
- [3] XU DD, YU G, XI PG, KONG XY, WANG Q, GAO LW, JIANG ZD. Synergistic effects of resveratrol and pyrimethanil against *Botrytis cinerea* on grape[J]. Molecules, 2018, 23(6): 1455.
- [4] 李宝聚, 陈立芹, 孟伟军, 王福建. 湿度调控对番茄灰霉病菌侵染的影响[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 167-169.
- LI BJ, CHEN LQ, MENG WJ, WANG FJ. Effects of humidity regulation on the infection of *Botrytis cinerea* to tomato[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(2): 167-169 (in Chinese).
- [5] ROCA-COUSO R, FLORES-FÉLIX JD, RIVAS R. Mechanisms of action of microbial biocontrol agents against *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Fungi, 2021, 7(12): 1045.
- [6] FILLINGER S, ELAD Y. Botrytis-the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems[M]. Cham: Springer, 2016.
- [7] HAAS D, KEEL C. Regulation of antibiotic production in root-colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease[J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 41: 117-153.
- [8] LUGTENBERG BJJ, CHIN-A-WOENG TFC, BLOEMBERG GV. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2002, 81 (1/2/3/4): 373-383.
- [9] HAAS D, DÉFAGO G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads[J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(4): 307-319.
- [10] GROSS H, LOPER JE. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. [J]. Natural Product Reports, 2009, 26(11): 1408-1446.
- [11] RAAIJMAKERS JM, de BRUIJN I, NYBROE O, ONGENA M. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2010, 34(6): 1037-1062.
- [12] 宋晓雅, 毛子玥, 温德宇, 朱宇昕, 张清霞. 番茄灰霉病生防细菌 QZ-1 生防潜力研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2024, 45(2): 93-101.
- SONG XY, MAO ZY, WEN DY, ZHU YX, ZHANG QX. Study on biocontrol potential of antagonistic bacterium QZ-1 against tomato *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2024, 45(2): 93-101 (in Chinese).
- [13] NIELSEN TH, THRANE C, CHRISTOPHERSEN C, ANTHONI U, SØRENSEN J. Structure, production characteristics and fungal antagonism of tensin-a new antifungal cyclic lipopeptide from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(6): 992-1001.
- [14] MAZZOLA M, ZHAO X, COHEN MF, RAAIJMAKERS JM. Cyclic lipopeptide surfactant production by *Pseudomonas fluorescens* SS101 is not required for suppression of complex *Pythium* spp. populations[J]. Phytopathology, 2007, 97(10): 1348-1355.
- [15] MA ZW, ONGENA M, HÖFTE M. The cyclic lipopeptide orfamide induces systemic resistance in rice to *Cochliobolus miyabeanus* but not to *Magnaporthe oryzae*[J]. Plant Cell Reports, 2017, 36(11): 1731-1746.
- [16] STOCKWELL VO, STACK JP. Using *Pseudomonas* spp. for integrated biological control[J]. Phytopathology, 2007, 97(2): 244-249.
- [17] 常琳, 李倩, 童蕴慧, 徐敬友, 张清霞. 生防细菌 FD6 的鉴定及其对番茄灰霉病菌的作用机制[J]. 植物保护学报, 2011, 38(6): 487-492.
- CHANG L, LI Q, TONG YH, XU JY, ZHANG QX. Identification of the biocontrol bacterial strain FD6 and antimicrobial study of this bacterium against tomato grey mould pathogen *Botrytis cinerea*[J]. Journal of Plant Protection, 2011, 38(6): 487-492 (in Chinese).
- [18] 常琳, 肖琦, 童蕴慧, 徐敬友, 张清霞. *gacS* 基因在荧光假单胞菌 FD6 防治番茄灰霉病中的功能分析[J]. 园艺学报, 2014, 41(4): 681-686.
- CHANG L, XIAO Q, TONG YH, XU JY, ZHANG QX. Functional analysis of the *gacS* gene in a tomato grey mould suppressive bacterium *Pseudomonas fluorescens* FD6[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(4): 681-686 (in Chinese).
- [19] ZHANG QX, STUMMER BE, GUO QG, ZHANG W, ZHANG XJ, ZHANG LQ, HARVEY PR. Quantification of *Pseudomonas protegens* FD6 and *Bacillus subtilis* NCD-2 in soil and the wheat rhizosphere and suppression of root pathogenic *Rhizoctonia solani* AG-8[J]. Biological Control, 2021, 154: 104504.
- [20] ZHANG QX, KONG XW, LI SY, CHEN XJ, CHEN XJ. Antibiotics of *Pseudomonas protegens* FD6 are essential for biocontrol activity[J]. Australasian Plant Pathology, 2020, 49: 307-317.
- [21] ZHANG QX, XING CL, LI SY, HE LL, QU TL, CHEN XJ. *In vitro* antagonism and biocontrol effects of *Paenibacillus polymyxa* JY1-5 against *Botrytis cinerea* in tomato[J]. Biological Control, 2021, 160.

- [22] JEONG RD, CHU EH, LEE GW, CHO C, PARK HJ. Inhibitory effect of gamma irradiation and its application for control of postharvest green mold decay of *Satsuma* mandarins[J]. International Journal of Food Microbiology, 2016, 234: 1-8.
- [23] TAO NG, JIA L, ZHOU HE. Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*[J]. Food Chemistry, 2014, 153: 265-271.
- [24] DUFFY BK, DÉFAGO G. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2429-2438.
- [25] JAMES DW Jr, GUTTERSON NI. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37a and their differential regulation by glucose[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1986, 52(5): 1183-1189.
- [26] GEUDENS N, MARTINS JC. Cyclic lipodepsipeptides from *Pseudomonas* spp.-biological Swiss-army knives[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 1867.
- [27] MA ZW, ZHANG SY, LIANG JY, SUN K, HU JC. Isolation and characterization of a new cyclic lipopeptide orfamide H from *Pseudomonas protegens* CHA0[J]. The Journal of Antibiotics, 2020, 73(3): 179-183.
- [28] MA ZW, GEUDENS N, KIEU NP, SINNAEVE D, ONGENA M, MARTINS JC, HÖFTE M. Biosynthesis, chemical structure, and structure-activity relationship of orfamide lipopeptides produced by *Pseudomonas protegens* and related species[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 382.
- [29] BUNDÓ M, MONTESINOS L, IZQUIERDO E, CAMPO S, MIEULET D, GUIDERDONI E, ROSSIGNOL M, BADOSA E, MONTESINOS E, SAN SEGUNDO B, COCA M. Production of cecropin A antimicrobial peptide in rice seed endosperm[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 102.
- [30] THERY T, O'CALLAGHAN Y, O'BRIEN N, ARENDT EK. Optimisation of the antifungal potency of the amidated peptide H-Orn-Orn-Trp-Trp-NH₂ against food contaminants[J]. International Journal of Food Microbiology, 2018, 265: 40-48.
- [31] KIM H, JANG JH, KIM SC, CHO JH. *De novo* generation of short antimicrobial peptides with enhanced stability and cell specificity[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2014, 69(1): 121-132.