

## 研究报告

# 基于转录组学分析枯草芽孢杆菌 J-15 次级代谢产物对酿酒酵母的抑菌作用机制

李浩然<sup>#</sup>, 赵晶晶<sup>#</sup>, 杨军, 周东元, 马超越, 陈佳一, 赵惠新<sup>\*</sup>

新疆师范大学生命科学学院 新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室 新疆特殊环境物种多样性应用与调控重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830054

李浩然, 赵晶晶, 杨军, 周东元, 马超越, 陈佳一, 赵惠新. 基于转录组学分析枯草芽孢杆菌 J-15 次级代谢产物对酿酒酵母的抑菌作用机制[J]. 微生物学通报, 2024, 51(3): 880-897.

LI Haoran, ZHAO Jingjing, YANG Jun, ZHOU Dongyuan, MA Chaoyue, CHEN Jiayi, ZHAO Huixin. Mechanism of *Bacillus subtilis* J-15 secondary metabolites in inhibiting *Saccharomyces cerevisiae*: based on transcriptomics[J]. Microbiology China, 2024, 51(3): 880-897.

**摘要:**【背景】真菌病害逐渐成为制约我国作物增产的主要原因, 亟须开发新型抗真菌药物进行病害防治。【目的】在分子水平上探究枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) J-15 次级代谢产物(secondary metabolites, SMs)抑制真菌生长发育的作用机制, 为其应用于真菌病害防治提供理论依据。【方法】以酿酒酵母 S288C 为模式真菌材料, 测定 SMs 作用后酿酒酵母细胞活性变化, 流式细胞术检测酿酒酵母细胞坏死情况。利用转录组测序技术分析 SMs 对酿酒酵母基因表达的影响, 并进行实时荧光定量 PCR 验证。【结果】SMs 以时间依赖性方式引起酿酒酵母 S288C 细胞核膜裂解、DNA 弥散, 诱导细胞坏死。在转录组水平, SMs 处理 12 h 后筛选出 1 627 个差异表达基因, 其中 851 个基因上调, 776 个基因下调; SMs 处理 24 h 后共 512 个基因差异表达, 包括 300 个基因上调, 212 个基因下调。差异表达基因涉及细胞自噬、糖类、脂类和氨基酸代谢等多条通路, 细胞壁合成过程和细胞周期等途径也受到影响。【结论】探究了 SMs 对酿酒酵母产生抑菌作用的分子机制, 为进一步揭示 SMs 抑菌作用机理提供了试验基础, 并为其应用于作物真菌病害防治提供了理论依据。

**关键词:** 枯草芽孢杆菌 J-15 次级代谢产物; 酿酒酵母; 转录组; 抑菌机制

资助项目: 国家自然科学基金(32160074); 新疆师范大学研究生科研创新项目(XSY202301015)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160074) and the Xinjiang Normal University Graduate Student Research and Innovation Program (XSY202301015).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. E-mail: zhaohuixin101@sina.com

Received: 2023-07-18; Accepted: 2023-10-07; Published online: 2023-11-21

## Mechanism of *Bacillus subtilis* J-15 secondary metabolites in inhibiting *Saccharomyces cerevisiae*: based on transcriptomics

LI Haoran<sup>#</sup>, ZHAO Jingjing<sup>#</sup>, YANG Jun, ZHOU Dongyuan, MA Chaoyue, CHEN Jiayi, ZHAO Huixin<sup>\*</sup>

Xinjiang Key Laboratory of Special Species Conservation and Regulatory Biology, Key Laboratory of Special Environment Biodiversity Application and Regulation in Xinjiang, School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830054, Xinjiang, China

**Abstract:** [Background] Fungal diseases have gradually become a major factor restricting the crop production in China, and thus it is urgent to develop antifungal agents for disease prevention and control. [Objective] To investigate the mechanism of *Bacillus subtilis* J-15 secondary metabolites (SMs) in inhibiting fungal growth and development at the molecular level, so as to provide a theoretical basis for their application in fungal disease control. [Methods] The cell viability of *Saccharomyces cerevisiae* S288C treated with SMs was measured, and the cell necrosis was detected by flow cytometry. Transcriptome sequencing was performed to analyze the effects of SMs on the gene expression in *S. cerevisiae*, and real-time fluorescence quantitative PCR was employed to verify the results. [Results] SMs caused nuclear membrane lysis, DNA diffusion, and cell necrosis of *S. cerevisiae* S288C in a time-dependent manner. A total of 1 627 differentially expressed genes were screened out after the treatment with SMs for 12 h, including 851 up-regulated genes and 776 down-regulated genes. A total of 512 genes were differentially expressed after the treatment with SMs for 24 h, including 300 up-regulated genes and 212 down-regulated genes. The differentially expressed genes were involved in multiple pathways such as autophagy, sugar, lipid, and amino acid metabolism, cell wall synthesis, and cell cycle. [Conclusion] The findings provide an experimental basis for revealing the mechanism of SMs in inhibiting fungal growth and a theoretical basis for the application of SMs in the prevention and control of crop fungal diseases.

**Keywords:** *Bacillus subtilis* J-15 secondary metabolite; *Saccharomyces cerevisiae*; transcriptome; antifungal mechanism

真菌病害严重威胁作物生产安全，化学农药的不合理使用使得环境污染和病害耐药性等生态安全问题日益凸显，生物防治成为作物病害防治中安全、高效的新选择<sup>[1]</sup>。生防细菌 (biocontrol bacteria) 作为天然生物防治手段可通过产生高活性次级代谢产物抑制病原菌的生长发育、提高作物系统抗病性从而达到良好的病害防治效果<sup>[2]</sup>。近年来，枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 的抗真菌活性受到广泛关注，

由于其能形成内生抗逆芽孢，产生不同生物活性的代谢物质，因而在作物真菌病害的防治工作中被广泛应用<sup>[3]</sup>。王晓琼等<sup>[4]</sup>发现枯草芽孢杆菌发酵产生的脂肽类化合物伊枯草菌素 A 可破坏真菌细胞膜，导致核酸蛋白质的泄漏从而抑制草莓腐败菌镰刀霉 (*Fusarium fujikuroi*) 和灰葡萄孢霉 (*Botrytis cinerea*) 的生长。朱华珺等<sup>[5]</sup>发现枯草芽孢杆菌 JN005 胞外抗菌物质对稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae* Cav.) 的菌丝生长和孢

子萌发有直接抑制作用,在稻瘟病中具有良好的预防和治疗效果。枯草芽孢杆菌产生的次级代谢物可作用于病原菌细胞膜的磷脂双分子层,改变细胞膜通透性和功能,抑制作物病原真菌的生长发育,从而表现出良好的农业生物防治剂开发潜力<sup>[6]</sup>。

随着组学技术的不断进步,转录组学技术逐渐成为真菌药物杀菌反应研究的有力工具<sup>[7]</sup>。因其既能获得基因的构成、基因功能等信息,又能反映在特殊环境下基因表达的调控机制,从而可为天然活性产物的抗菌机制研究提供更加全面可靠的见解<sup>[8]</sup>。酿酒酵母具有与作物致病真菌(如曲霉菌和镰刀菌)相似的细胞壁成分<sup>[9]</sup>。此外,酿酒酵母作为一种单细胞真核生物,其结构相对简单、蛋白相对较少,被认为是研究真核生物生理过程的良好模式生物<sup>[10]</sup>。曾燕<sup>[11]</sup>以酿酒酵母为模式真菌材料探究了吩嗪-1-羧酸杀抑真菌的机理。郭娜<sup>[12]</sup>探究了白鲜碱的体外抗真菌活性,并以酿酒酵母为模式真菌研究对象从分子生物学角度阐明了其抑菌的作用机制。通过对酿酒酵母处理得出的一些试验结果具有代表性及普遍性,因此酿酒酵母成为研究其他真核生物的一种模式生物并提供相应的研究工具<sup>[13]</sup>。

前期研究发现 J-15 次级代谢产物(secondary metabolites, SMs)能够有效抑制棉花黄萎病致病菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)的生长及孢子萌发<sup>[14]</sup>,对实验室盆栽棉花黄萎病具有良好的防治作用<sup>[15]</sup>。在另外一项研究中,通过高通量测序技术探讨 SMs 对土壤真菌多样性和丰度的影响,初步证明 SMs 作用能引起土壤中优势真菌的相对丰度显著上升、病原真菌相对丰度减少,提示 SMs 具有良好的农业生物防治剂开发潜力<sup>[16]</sup>。此外,通过测定 SMs 抑菌谱发现,SMs 对青霉(*Penicillium*)、毛霉(*Mucor*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)和黄

曲霉(*Aspergillus flavus*)等多种致病真菌的生长具有显著抑制效果<sup>[17]</sup>。SMs 表现出诱导真菌细胞核裂解、核膜破裂引起细胞坏死的抑菌作用特性,这与其他枯草芽孢杆菌次级代谢产物直接作用于细胞膜,改变细胞膜结构、诱导膜分裂机制发挥抑菌作用不同<sup>[18-20]</sup>,因此有必要借助转录组学技术从分子水平探究其发挥抑菌作用的分子机制。本文通过高通量测序技术对酿酒酵母 S288C 进行转录组测序分析,旨在挖掘 SMs 作用酵母后转录组信息变化,探究其发挥抗真菌作用的关键基因及关键代谢通路。以期揭示枯草芽孢杆菌 J-15 次级代谢产物的抑菌作用机理奠定理论基础,并为其开发应用于作物真菌病害防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) S288C、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) J-15 均来自新疆师范大学生命科学学院新疆特殊环境物种保护与调控生物学实验室。

#### 1.1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨培养基(g/L):牛肉膏 5.0,蛋白胨 10.0, NaCl 5.0; 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基(g/L):蛋白胨 10.0,葡萄糖 20.0,酵母浸出粉 5.0。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

真菌总 RNA 快速抽提试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司; FastKing cDNA 第一链合成试剂盒及 SuperReal 荧光定量预混试剂盒(SYBR Green),天根生化科技(北京)有限公司; MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒及 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒,上海碧云天生物技术有限公司; Hoechst 33342 染色试剂盒,北京索莱宝科技有限公司。实时荧光定量 PCR 仪

和酶标仪, 赛默飞世尔科技公司; 流式细胞仪, Becton Dickinson 公司; 共聚焦显微镜, Nexcope 公司, HiSeq X Ten 高通量测序仪, Illumina 公司; 实时荧光 PCR 检测系统, Bio-Rad 公司。

## 1.2 J-15 次级代谢产物的制备和纯化

枯草芽孢杆菌 J-15 次级代谢产物(secondary metabolites, SMs)的制备流程及纯化方法参考文献[21]: 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集枯草芽孢杆菌 J-15 发酵上清液以去除细菌残留物, 在无菌发酵液中加入盐酸调节 pH 值为 2.0, 并在 4 °C 冷藏过夜进行沉淀。随后, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 收集酸沉淀物质, 并将沉淀溶解在 80% 预冷丙酮中, -20 °C 放置 4 h。将丙酮萃取得到的上层相液体加入同等体积的三氯甲烷, 搅拌混匀 30 min。随后 4 °C、12 000 r/min 离心 20 min 收集上层相液体物质。加入同等体积的正丁醇充分混合, 收集上层正丁醇相, 自然风干获得 J-15 次级代谢产物。参照 J-15 次级代谢产物对棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌发挥抑菌作用的相关浓度<sup>[22]</sup>, 选定 0.3 mg/mL 和 3 mg/mL J-15 次级代谢产物处理酿酒酵母。

## 1.3 MTT 法测定酿酒酵母细胞活性

将浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的酿酒酵母按照 1% 的接种量接种至酵母浸出粉胨葡萄糖培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 24 h 至对数生长期( $OD_{600}$  值约为 0.6)。加入 0.3 mg/mL J-15 次级代谢产物, 28 °C、180 r/min 黑暗条件下振荡培养, 在培养 6、12、18、24 和 36 h 的细胞悬浮液中加入 MTT 工作液, 按照 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒说明书操作, 酶标仪 560 nm 处读取 OD 值以测定酿酒酵母的细胞活性。

## 1.4 Annexin V-FITC/PI 双染流式细胞术检测细胞活力

在浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的酿酒酵母菌悬

液中加入 0.3 mg/mL 和 3 mg/mL 的 J-15 次级代谢产物, 28 °C、180 r/min 黑暗条件下振荡培养 12 h 和 24 h。按照 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒说明书操作, PBS 清洗 2 次后加入 5  $\mu$ L Annexin V 和 10  $\mu$ L 碘化丙啶(propidium iodide, PI), 避光孵育 15 min。采用流式细胞仪测定细胞坏死情况, 共聚焦显微镜观察细胞荧光状态。

## 1.5 Hoechst 33342 染色、共聚焦显微镜观察酿酒酵母细胞形态

参照 1.4 中酿酒酵母处理方法, 0.3 mg/mL 和 3 mg/mL J-15 次级代谢产物处理酿酒酵母 12 h 和 24 h, PBS 清洗 2 次后加入 100  $\mu$ L Hoechst 33342 染色液, 按照 Hoechst 33342 染色试剂盒说明书操作, 避光条件下孵育 15 min, 弃染色液后 PBS 洗涤 2 次, 共聚焦显微镜分析酿酒酵母细胞形态。

## 1.6 J-15 次级代谢产物作用下酵母转录组数据测序及分析

将浓度为  $1 \times 10^6$  CFU/mL 的酿酒酵母按照 1% 的接种量接种至酵母浸出粉胨葡萄糖培养基中, 28 °C、180 r/min 培养 24 h 至对数期( $OD_{600}$  值约为 0.6)。根据酿酒酵母生长曲线, 按照 3% 的接种量转接至 60 mL 含 0.3 mg/mL J-15 次级代谢产物的酵母浸出粉胨葡萄糖培养基中, 28 °C、180 r/min 处理酿酒酵母样品 12 h (对数生长期)和 24 h (典型平台期), 以不加 J-15 次级代谢产物培养 12 h 和 24 h 的酿酒酵母作为空白对照。样品液氮保存送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行转录组测序分析。质量合格的总 RNA 和 mRNA 用于后续建库测序, 测序结果的原始数据经进一步过滤后得到 clean reads。构建参考基因组索引, 将 clean reads 与参照基因组进行比对以获得用于后续分析的 mapped data (reads)。基于负二项分布的 DESeq 软件进行

统计分析, 定义 $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1.5$  且  $P < 0.05$  以获得显著差异表达基因并进行后续分析。

### 1.7 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 验证

以  $\beta$ -actin 为内参基因, 选取 8 个关键差异表达基因进行 RT-qPCR, 验证转录组数据可靠性。利用 Primer 5.0 设计特异性引物(表 1), 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成特异性引物。按照真菌总 RNA 快速抽提试剂盒说明书提取酵母细胞总 RNA; 使用 FastKing cDNA 第一链合成试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA; 使用 SuperReal 荧光定量预混试剂盒对部分差异表达基因的表达水平进行相对定量检测。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): SYBR Green qPCR 预混液 10  $\mu$ L、cDNA 样品 2  $\mu$ L、上、下游引物(终浓度为 0.3  $\mu$ mol/L)各 0.6  $\mu$ L, RNase-free 水 6.8  $\mu$ L。PCR 反应条件及相对定量结果分析方法参考文献[23]。

## 2 结果与分析

### 2.1 SMs 对酿酒酵母细胞活性的影响

MTT 法测定 SMs 处理对酿酒酵母细胞活性的影响, 结果如图 1 所示。0.3 mg/mL SMs 处理 12 h 后酿酒酵母的细胞活性仅为对照组的

30%, 表明 SMs 处理对酵母细胞生长发育具有显著的抑制作用。酿酒酵母的细胞活性随着 SMs 处理时间的增加而持续下降, 但处理 24 h 后, 随着处理时间的增加, 酿酒酵母细胞活性变化不显著, 这可能是由于 SMs 对酵母的毒害作用有限, 抑或是酵母细胞在 SMs 处理较长时间后能够通过自身的调节以适应此胁迫。综合考虑, 最终选择 0.3 mg/mL SMs 处理酿酒酵母 12 h 和 24 h 进行后续试验。

### 2.2 SMs 诱导酿酒酵母坏死

流式细胞术检测结果如图 2 所示, 与对照组相比, 0.3 mg/mL 和 3 mg/mL SMs 处理组酿酒酵母受 SMs 胁迫 12 h、24 h 后细胞坏死率显著上升。共聚焦显微镜进一步观察细胞荧光状态(图 3), 对照组中只有极少数细胞被激发出绿色和红色荧光, 表明只有少数细胞发生早期凋亡和坏死。SMs 处理组中绿色荧光极少, 红色荧光随处理时间的延长明显增多, SMs 处理增加了细胞坏死的数量。以上结果表明, SMs 处理引起酿酒酵母细胞膜通透性增大, 并且以浓度依赖和时间依赖性方式增加酿酒酵母细胞坏死的数量。

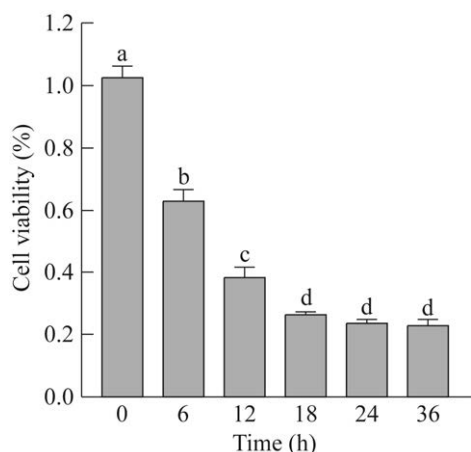
### 2.3 SMs 作用核膜导致核酸外泄

共聚焦显微镜观察 SMs 处理后酿酒酵母母

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	Description
<i>PCK1</i>	TTACTGTCTGGAACGCTGGT	TGTGGGTCTGCGGATAAAGT	Phosphoenolpyruvate carboxykinase PCK1
<i>CIT2</i>	CACTTCATGGGCGTGCTAAT	CCATGGCAAACCTTACGCTGA	Citrate (Si)-synthase CIT2
<i>ATG2</i>	GGACGGTTAATTGGTAGGTTGG	CTGCATGGGTCGATTTTTTCCT	Atg2p
<i>FBP1</i>	CTCACACCATCAGACGTGCT	TGTTGTCTGCTTGGGGTTGT	Fructose 1,6-bisphosphate 1-phosphatase
<i>CHS1</i>	GGGCATTTGAAGGCTTTGCA	AACCAACGCCTCCTCTGAAG	Chitin synthase CHS1
<i>KRE9</i>	TTGTTTCCCCAGCTCCAAG	CCATGTGGTAGCGGTCACTT	Kre9p
<i>SNX41</i>	TCCACCCATTCCATCCAAGC	CAGATTCGCGAAGGCTGTT	Snx41p
<i>ATG5</i>	GTTTCATCAAGACCGCGACAT	CAGAGGAAGCTTTATCGCCG	Atg5p
$\beta$ -actin	ACTTTCAACGTTCCAGCCTTC	CGTAAATTGGAACGACGACGTGAGTA	Reference gene



**图 1 J-15 SMs 对酿酒酵母细胞活性的影响** 不同小写字母表示各组别平均数之间的差异显著性 ( $P < 0.05$ )

Figure 1 Effect of J-15 SMs on the cellular activity of *Saccharomyces cerevisiae*. Different lowercase letters indicate the significance of the difference between the average numbers of each group ( $P < 0.05$ ).

胞核的形态变化(图 4)。对照组中细胞核染色质紧密分布在核区,细胞核周围透明,呈现出完整细胞核形态。0.3 mg/mL SMs 处理后酿酒酵母的细胞核型发生改变,核膜破裂、核酸弥散到整个细胞中,核膜损伤程度随处理时间增加越来越明显。值得注意的是,弥散出的核酸仅局限分布在细胞膜内,并且未观察到其他与细胞凋亡相关的细胞形态特征改变。因此,可以谨慎地认为 SMs 可能通过作用于细胞核膜导致核膜破裂,核酸泄出核区从而诱导酵母细胞发生坏死。这与先前在 SMs 诱导大丽轮枝菌分生孢子坏死作用机制研究中得出的 SMs 发挥抑菌作用方式的结论<sup>[22]</sup>一致。

#### 2.4 高通量测序质控及序列比对分析

借助转录组学技术进一步探究 SMs 抑菌作用的分子机制。对测序结果进行质控分析,将原始数据(raw reads)过滤后获得高质量的干净数据(clean reads)。由表 2 可知各样品的有效

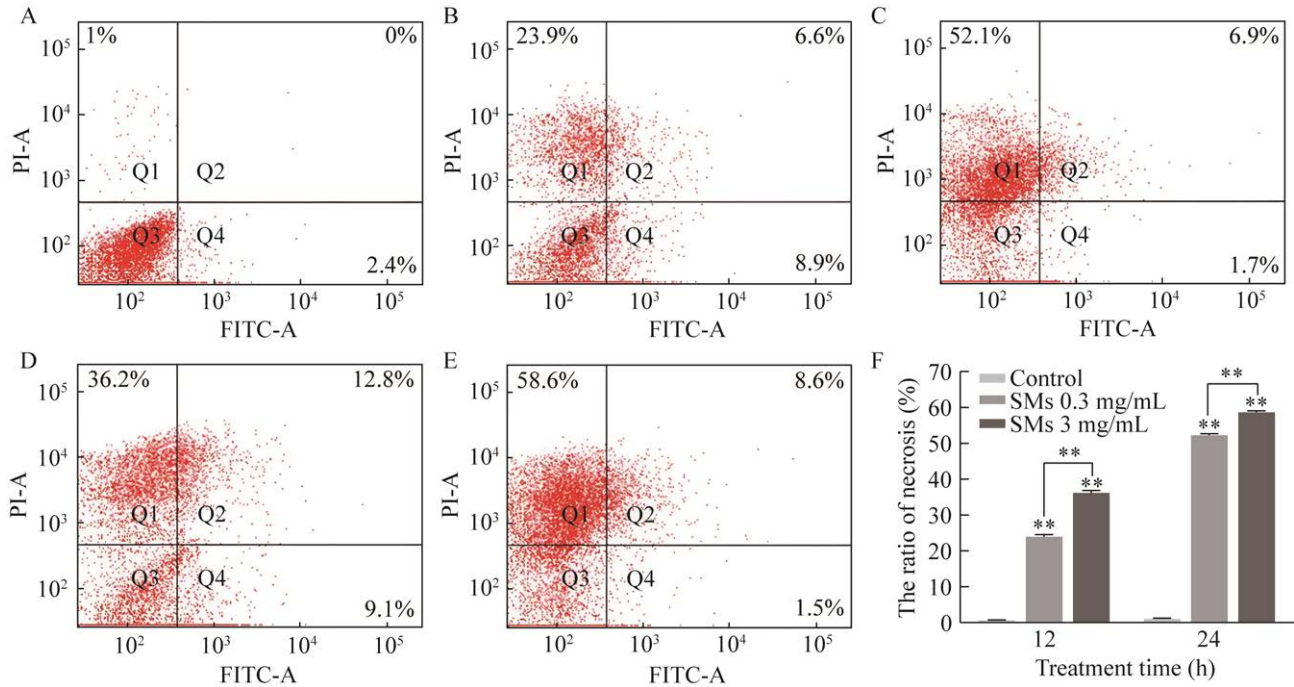
clean reads 比例均在 97.06%以上, clean bases 高于 6.93 Gb,样品 clean reads 的错误率均低于 0.04%,样品 Q20 和 Q30 值均高于 97.38%和 92.57%,G+C 含量及碱基质量分布均较优,表明各组样品的 RNA 序列数据质量较高,可用于后续分析。

#### 2.5 差异表达基因的筛选

对样本采用 DESeq 分析,筛选条件设为  $P_{adj} < 0.05$  且  $|\log_2(\text{fold change})| \geq 1.5$  以获得差异显著表达基因。与 CK12 相比,P12 中有 1 627 个基因差异表达,其中 851 个基因上调表达,776 个基因下调表达。与 CK24 相比,P24 中有 512 个基因差异表达,包括 300 个基因上调表达,212 个基因下调表达。0.3 mg/mL SMs 处理 12 h 后差异表达基因较多,上调基因略多于下调基因(图 5A)。0.3 mg/mL SMs 处理 24 h 后,由于随着 SMs 处理时间变长细胞坏死数量增加,差异表达基因数量变少,但仍以上调基因居多,数据可视化为火山图(图 5B)。对 12 h 和 24 h 差异表达基因进行关联分析,结果表明在 SMs 处理 12 h 和 24 h 后的差异表达基因中共有 197 个相同上调表达基因(图 6A)和 155 个相同下调表达基因(图 6B)。对不同处理时间变化趋势相同的差异表达基因做进一步分析,以明确 SMs 发挥抑菌作用的相关途径。

#### 2.6 差异表达基因基因本体论 (Gene Ontology, GO)分类与注释

通过 BLAST 2GO 对基因进行功能预测,在 0.3 mg/mL SMs 处理 12 h 条件下差异表达基因被分为 73 个显著丰富的基因本体论(Gene Ontology, GO)术语( $P < 0.05$ ),其中 49 项对应于生物过程(biological process),16 项对应于分子功能(molecular function),8 项对应于细胞成分(cellular component)。其中差异表达基因主要作用于细胞的组分和生物过程,引起包括能量合

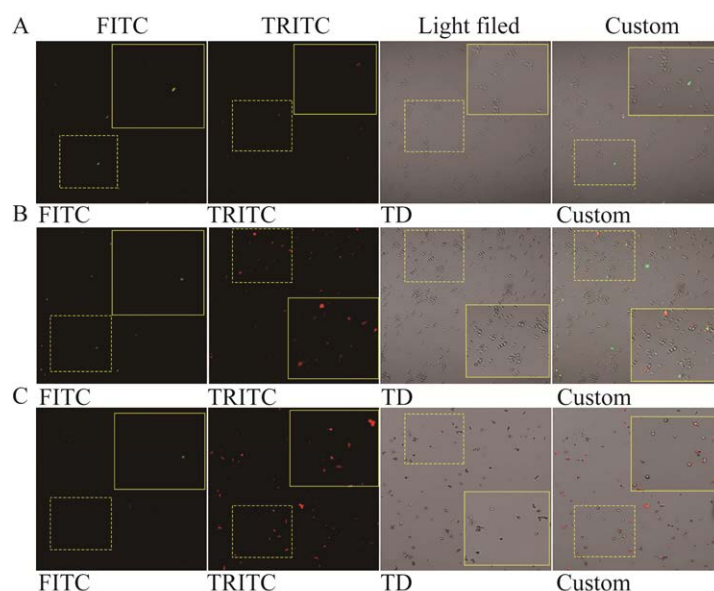


**图 2 SMs 作用酿酒酵母 Annexin V-FITC/PI 双染流式散点图** A: 空白对照组, 酿酒酵母细胞培养生长 24 h. B、C: 酿酒酵母在 0.3 mg/mL SMs 的条件下分别培养 12 h 和 24 h. D、E: 酿酒酵母在 3 mg/mL SMs 的条件下分别培养 12 h 和 24 h. 在 Annexin V-FITC/PI 双染二维散点图中, 根据细胞荧光标记状态分为以下四个象限. Q1: (AnnexinV-FITC)-/PI+, 此区域的细胞为坏死细胞; Q2: (AnnexinV-FITC)+/PI+, 此区域的细胞为晚期凋亡细胞; Q3: (AnnexinV-FITC)-/PI-, 此区域的细胞为活细胞; Q4: (AnnexinV-FITC)+/PI-, 此区域的细胞为早期凋亡细胞. 双染流式散点图横坐标代表 Annexin-FITC 光信号强度, 纵坐标代表 PI 光信号强度. F: 荧光强度散点图数据统计, \*\*:  $P < 0.01$

Figure 2 Annexin V-FITC/PI double dye flow scatter plot of *Saccharomyces cerevisiae* by SMs. A: Blank control group, culture of *Saccharomyces cerevisiae* cells for 24 hours. B, C: *Saccharomyces cerevisiae* cultured at 0.3 mg/mL SMs for 12, 24 hours. D, E: *Saccharomyces cerevisiae* cultured at 3 mg/mL SMs for 12, 24 hours. In the 2D scatter plot of Annexin V-FITC/PI double staining, the cells were divided into the following four quadrants according to their fluorescent labeling. Q1: (AnnexinV-FITC)-/PI+, necrotic cells; Q2: (AnnexinV-FITC)+/PI+, the cells in this area were late apoptotic cells; Q3: (AnnexinV-FITC)-/PI-, cells in this region were considered viable cells; Q4: (AnnexinV-FITC)+/PI-, cells in this area were early apoptotic cells. The horizontal coordinate of the double dye flow scatter diagram represents the Annexin-FITC optical signal intensity, the ordinate represents the PI optical signal intensity. F: Fluorescence intensity scatter plot data, \*\*:  $P < 0.01$ .

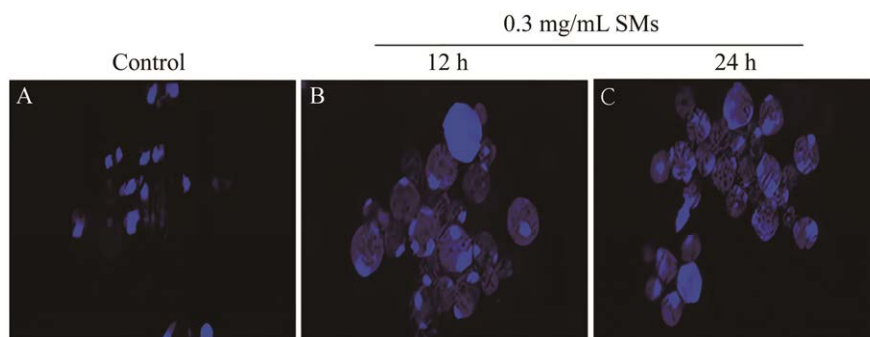
成相关生物过程和细胞质膜组分等生物进程的改变, 如 ATP 代谢、磷酸核糖代谢、翻译和氮代谢过程等(图 7)。0.3 mg/mL SMs 处理 24 h 条件下差异表达基因被分为 12 个显著丰富的 GO 术语, 主要引起膜成分及结构分子活性的变化(图 8)。综合来看 SMs 处理后上调的差异表达

基因被显著富集在各种生物过程中, 包括有机氮化合物生物合成、翻译、肽生物合成与代谢和羧酸合成与代谢; 分子功能被显著富集在结构分子活性、核糖体的结构成分、转移酶活性和裂解酶活性中。下调的差异表达基因被显著富集在包括 ATP 代谢、磷酸核糖代谢、氧化还



**图 3 0.3 mg/mL SMs 作用酿酒酵母 Annexin V-FITC/PI 荧光图(10×)** A: 空白对照组, 酿酒酵母细胞培养生长 24 h. B: 酿酒酵母在 0.3 mg/mL SMs 的条件下培养 12 h. C: 酿酒酵母在 0.3 mg/mL SMs 的条件下培养 24 h. FITC: 在荧光显微镜 FITC 通道下观察酵母细胞的荧光发光状态. TRITC: 在荧光显微镜 TRITC 通道下观察酵母细胞的荧光发光状态. Light filed (TD): 在荧光显微镜明视场通道下观察酵母细胞状态. Custom: 荧光场、明视场融合图像

Figure 3 Fluorogram of 0.3 mg/mL SMs acting on *Saccharomyces cerevisiae* Annexin V-FITC/PI (10×). A: Blank control group, culture *Saccharomyces cerevisiae* cells for 24 hours. B: Culture *Saccharomyces cerevisiae* cells at 0.3 mg/mL SMs for 12 hours. C: Culture *Saccharomyces cerevisiae* cells at 0.3 mg/mL SMs for 24 hours. FITC: The fluorescent luminescence state of yeast cells was observed under the FITC channel of fluorescence microscope. TRITC: The fluorescent luminescence state of yeast cells was observed under TRITC channel of fluorescence microscope. Light filed (TD): Yeast cell state was observed under fluorescence microscope under bright field channel. Custom: Fluorescent, bright field fusion image.



**图 4 SMs 作用酿酒酵母核型分析(40×)** A: 空白对照组, 酿酒酵母培养生长 24 h. B: 酿酒酵母在 0.3 mg/mL SMs 的条件下培养 12 h. C: 酿酒酵母在 0.3 mg/mL SMs 的条件下培养 24 h

Figure 4 Karyotyping of *Saccharomyces cerevisiae* by SMs (40×). A: Blank control group, culture *Saccharomyces cerevisiae* cells for 24 h. B: Culture *Saccharomyces cerevisiae* cells at 0.3 mg/mL SMs for 12 h. C: Culture *Saccharomyces cerevisiae* cells at 0.3 mg/mL SMs for 24 h.



表 2 高通量测序质控数据统计

Table 2 Quality control data statistics of RNA-seq sequence

Sample	Raw reads	Clean reads (%) <sup>a</sup>	Clean bases (Gb)	Error rate (%) <sup>b</sup>	Q20 (%) <sup>c</sup>	Q30 (%) <sup>d</sup>	Reads GC (%) <sup>e</sup>
CK12_1	59 796 090	59 064 810 (98.78%)	8.86	0.03	97.74	93.38	41.55
CK12_2	49 934 988	48 979 608 (98.09%)	7.35	0.03	97.70	93.32	41.29
CK24_1	54 790 870	53 393 703 (97.45%)	8.01	0.03	97.47	92.81	41.41
CK24_2	60 180 866	59 193 899 (98.36%)	8.88	0.03	97.64	93.16	41.55
P12_1	55 869 980	55 143 670 (98.70%)	8.27	0.03	97.45	92.72	41.06
P12_2	57 427 344	56 778 415 (98.87%)	8.52	0.03	97.54	92.93	41.16
P24_1	63 603 500	62 108 817 (97.65%)	9.32	0.03	97.38	92.57	41.13
P24_2	47 575 616	46 175 064 (97.06%)	6.93	0.03	97.61	93.06	41.22

<sup>a</sup>: 原始数据(raw reads)过滤后的 clean reads 数目及所占百分比. <sup>b</sup>: 数据整体测序错误率. <sup>c</sup>: Q20: Phred 数值大于 20 的碱基占总碱基的百分比. <sup>d</sup>: Q30: Phred 数值大于 30 的碱基占总碱基的百分比. <sup>e</sup>: Clean reads 中 G 与 C 占 4 种碱基的百分比

<sup>a</sup>: The number and percentage of clean reads filtered from raw data. <sup>b</sup>: Overall sequencing error rate of data. <sup>c</sup>: Percentage of bases with a Phred value greater than 20 in total bases. <sup>d</sup>: Percentage of bases with a Phred value greater than 30 in total bases. <sup>e</sup>: Percentage of G and C in the four bases of clean reads.

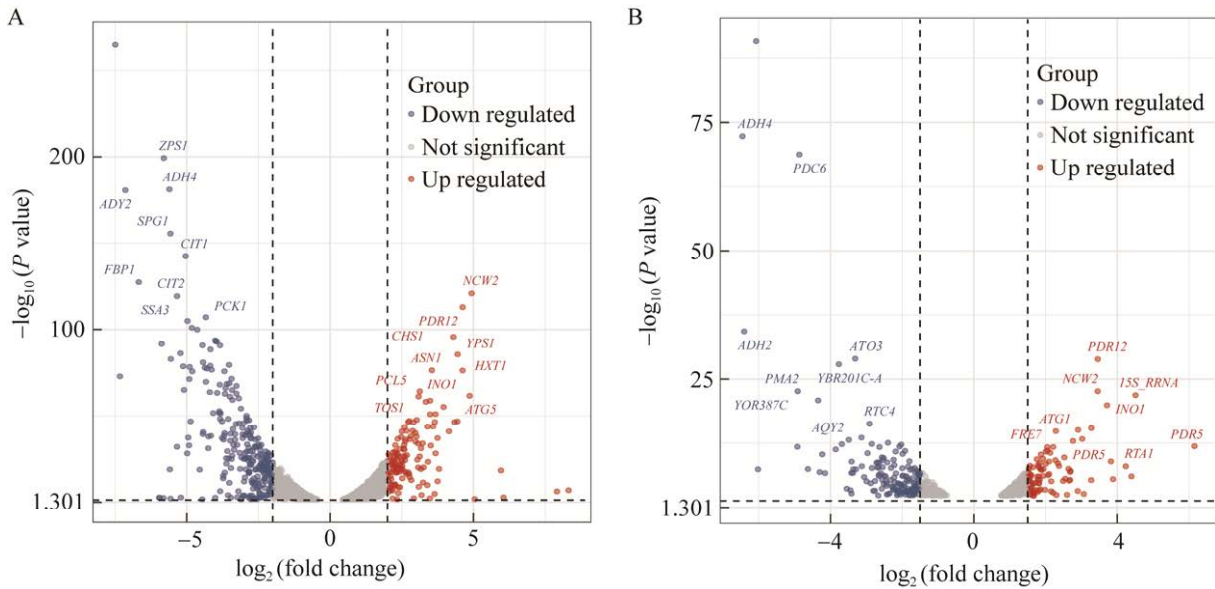


图 5 SMs 处理 12 h (A)和 24 h (B)差异表达基因火山图

Figure 5 Volcano map of differentially expressed genes treated with SMs for 12 h (A) and 24 h (B).

原、磷代谢过程和核糖核苷酸代谢等能量合成相关的生物过程中；在分子功能上主要被显著富集在氧化还原酶活性和电子载流子活性中。由此推测，SMs 可能会对酵母生长发育、酶或功能蛋白等生物过程或细胞结构起作用。

## 2.7 糖类、脂类和氨基酸代谢通路相关差异表达基因变化

通过京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)功能富集分析发现，0.3 mg/mL SMs 处理会使酵

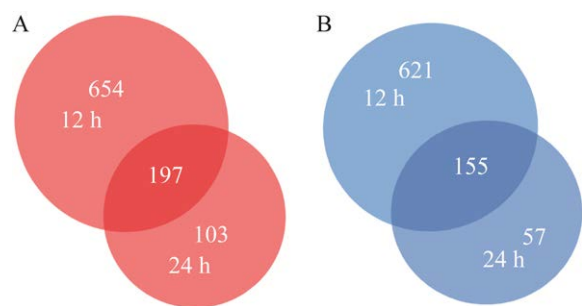


图 6 12 h 和 24 h 差异表达基因关联性分析 A: 上调基因. B: 下调基因

Figure 6 Correlation analysis of 12 h and 24 h differentially expressed genes. A: Up-regulated genes. B: Down-regulate genes.

母细胞糖类、脂类和氨基酸代谢通路发生显著变化。糖类、脂类和氨基酸代谢是机体维持正常生命活动所必需的重要代谢通路，SMs 处理酿酒酵母 12 h 后，糖酵解途径中有 5 个基因上调表达，36 个基因显著下调表达；处理 24 h 后，

3 个基因上调表达，13 个基因显著下调表达 ( $P < 0.05$ )，其中参与糖酵解/糖异生途径和乙醛酸循环的 4 种关键限速酶基因(编码糖酵解/糖异生的磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因 *PCK1*、果糖-1,6-双磷酸酶基因 *FBP1*、异柠檬酸裂合酶基因 *ICL1* 和苹果酸合酶基因 *MLS1*) 表达量在 SMs 处理酿酒酵母 12 h 和 24 h 后均被显著下调，表明 SMs 可能通过抑制乙醛酸循环关键酶活性和糖酵解中的磷酸烯醇式丙酮酸转化过程抑制酿酒酵母的能量供应，从而抑制酿酒酵母的生长发育。SMs 处理酿酒酵母 12 h 后脂肪酸代谢通路中有 4 个基因上调表达，41 个基因显著下调表达；处理 24 h 后 2 个基因上调表达，23 个基因显著下调表达，表明 SMs 抑制了脂类代谢的相关生物过程。SMs 处理 12 h 后 5 个氨基酸代谢途径中有 64 个基因显著上调表达，4 个基因下调表达；处理 24 h 后 2 个氨基酸代谢途径中

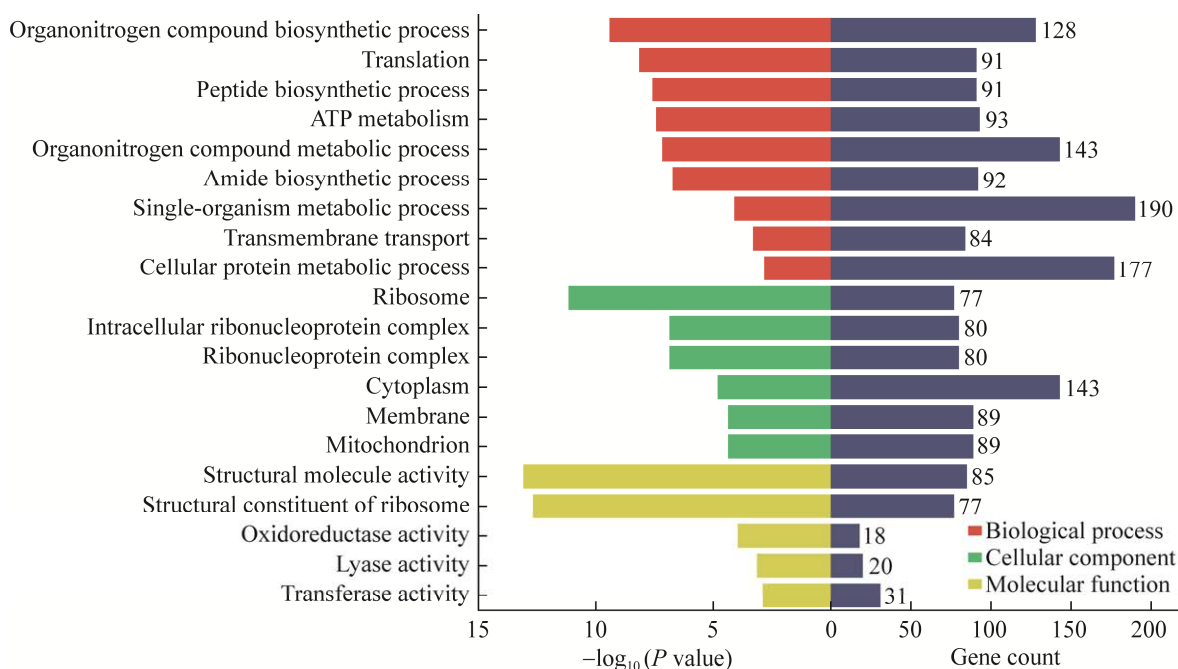


图 7 SMs 作用酿酒酵母 12 h 后差异表达基因的 GO 注释分类图

Figure 7 GO annotation classification diagram of differentially expressed genes in *Saccharomyces cerevisiae* after 12 h of SMs treatment.

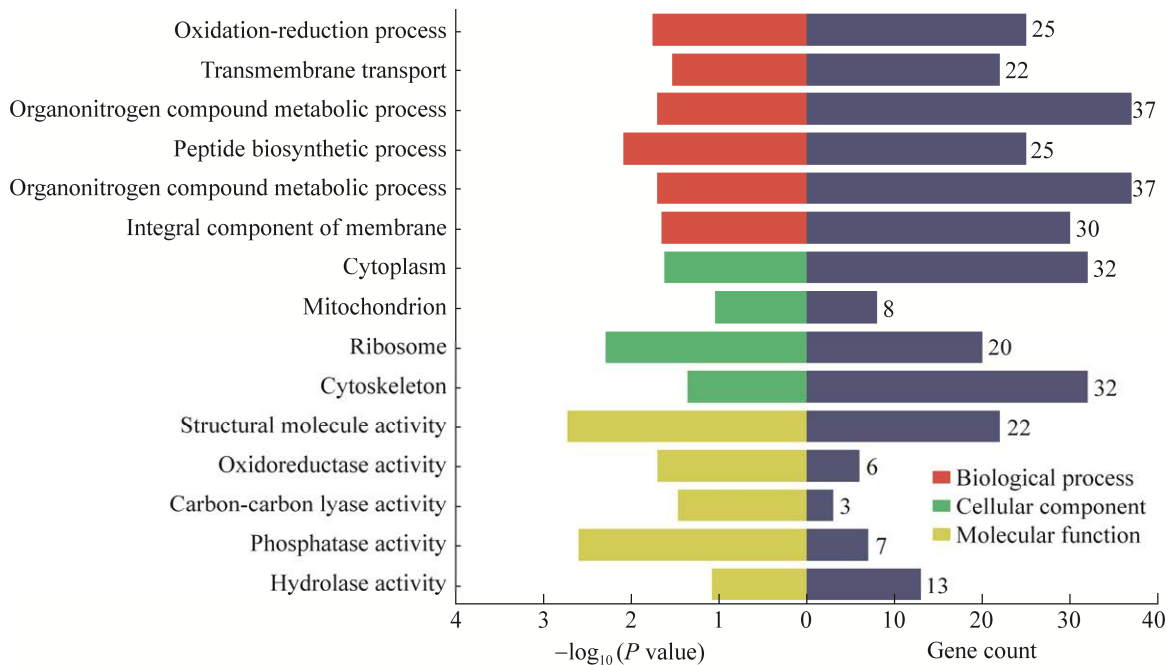


图 8 SMs 作用酿酒酵母 24 h 后差异表达基因的 GO 注释分类图

Figure 8 GO annotation classification diagram of differentially expressed genes in *Saccharomyces cerevisiae* after 24 h of SMs treatment.

有 17 个基因显著上调表达, 3 个基因下调表达, 表明 SMs 促进氨基酸生物合成的相关生物过程 (表 3)。以上结果表明 SMs 作用抑制酿酒酵母细胞中糖类、脂类代谢通路相关基因的表达, 促进氨基酸生物合成通路相关基因的表达。由此推测, SMs 作用可引起酵母细胞糖类、脂类代谢途径代谢流下调, 阻滞酿酒酵母能量供应机制, 抑制酿酒酵母的生长, 从而发挥一定的抑菌作用。

## 2.8 细胞自噬通路相关差异表达基因变化

通过 KEGG 功能富集分析发现, 23 个上调基因被注释到自噬途径, 其中 6 个基因在 12 h 时显著上调表达, 但在 24 h 时发生回落 (表 4), 提示 SMs 发挥抑菌作用可能与酵母细胞的自噬通路有关。自噬是一种从酵母到人类高度保守的细胞内降解途径<sup>[24]</sup>, 真核细胞在能量供给被抑制条件下可通过溶酶体降解胞内物质的自噬过

程来调整细胞能量供应的稳定。现阶段研究认为自噬与细胞程序性死亡有关<sup>[25]</sup>, ATG2-ATG18 蛋白复合物启动自噬体形成过程中的膜扩张过程<sup>[26]</sup>, 在本研究中 ATG2、ATG18 基因在 SMs 作用后显著上调表达, 表明 SMs 处理可加速酵母细胞启动自噬体的膜扩张过程, 促进细胞自噬进程的发生。自噬体组装位点中存在 2 个泛素样结合系统成分<sup>[27]</sup>, 其中一种以 ATG12 和 ATG5 的共轭形式存在<sup>[28]</sup>。在本研究中, SMs 诱导 ATG5 基因显著上调表达, 提示 SMs 在自噬体形成过程中发挥积极作用。Scott 等<sup>[29]</sup>发现 ATG1 可强烈诱导细胞自噬、抑制细胞生长, 诱导细胞死亡。Yeh 等<sup>[30]</sup>发现 ATG13 蛋白可与 ATG1 蛋白的 C 末端结合, 促进特定自关联 ATG1-ATG13 蛋白复合物的形成, 并证明其最终与自噬活性增加相关。在本研究中, ATG1 基因表达量在 SMs 处理后显著上调, 表明 SMs

表 3 酿酒酵母糖类、脂类和氨基酸代谢通路相关基因变化

Table 3 Changes in genes associated with sugar, lipid and amino acid metabolic pathways in *Saccharomyces cerevisiae*

Metabolic pathway	12 h		24 h	
	Up-regulation	Down-regulation	Up-regulation	Down-regulation
糖酵解 Glycolysis	5	36	3	13
柠檬酸循环 Citrate cycle	1	24	0	9
氧化磷酸化 Oxidative phosphorylation	7	45	2	15
丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism	0	29	0	15
脂肪酸降解 Fatty acid degradation	4	12	2	8
脂肪酸代谢 Fatty acid metabolism	4	41	2	23
丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism	0	0	0	2
苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸生物合成 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	16	1	0	0
半胱氨酸和蛋氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism	28	2	17	1
缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	10	1	0	0
赖氨酸生物合成 Lysine biosynthesis	10	0	0	0

表 4 酿酒酵母细胞自噬通路相关基因变化

Table 4 Changes in autophagy pathway related genes in *Saccharomyces cerevisiae* cells

Gene ID	Gene name	Description	12 h		24 h	
			$ \log_2(\text{fold change}) $	<i>P</i> value	$ \log_2(\text{fold change}) $	<i>P</i> value
855479	<i>ATG2</i>	Atg26p	2.78	$1.42 \times 10^{-6}$	2.19	$2.53 \times 10^{-7}$
850577	<i>ATG18</i>	Atg18p	1.93	$1.27 \times 10^{-7}$	1.55	$3.18 \times 10^{-6}$
852200	<i>ATG41</i>	Atg41p	2.25	$1.41 \times 10^{-4}$	1.84	$2.36 \times 10^{-4}$
855954	<i>ATG5</i>	Atg5p	3.61	$9.95 \times 10^{-7}$	2.51	$7.49 \times 10^{-6}$
852695	<i>ATG1</i>	ATg1p	2.49	$1.15 \times 10^{-5}$	1.67	$5.63 \times 10^{-3}$
852035	<i>SNX41</i>	Snx41p	2.31	$5.95 \times 10^{-9}$	2.06	$3.71 \times 10^{-5}$

可能诱导 ATG1-ATG13 复合物结合增强并最终引起酵母自噬依赖性细胞死亡。此外, 研究发现 SMs 诱导 *SNX41* 基因的上调表达, Ma 等<sup>[31]</sup> 研究表明 *SNX41* 可形成二元复合体促进自噬体与质膜的融合。以上结果表明, SMs 作用引起酿酒酵母自噬通路基因表达水平显著上调, 这可能是由于 SMs 处理导致酿酒酵母能量供应机制发生紊乱, 酿酒酵母依靠自噬进程以维持细胞能量供应的稳定。而自噬通量的巨大变化

最终引起酿酒酵母自噬依赖性死亡的发生, 从而发挥一定的抑菌作用。

## 2.9 细胞壁生物发生途径相关差异表达基因变化

KEGG 功能富集分析发现, SMs 诱导酿酒酵母的细胞壁生物途径发生改变。酿酒酵母等真菌细胞壁由  $\beta$ -1,3-葡聚糖网络、甘露糖蛋白和几丁质等成分共价结合构成<sup>[32]</sup>。在恶劣环境中几丁质相关基因和蛋白的上调表达被认为是真菌

细胞适应恶劣环境的主要机制<sup>[33-34]</sup>。酿酒酵母中 7 个细胞壁通路相关基因显著上调表达(表 5), 表明酵母细胞在受到 SMs 刺激后可较快启动应激保护机制, 通过细胞壁补偿途径以应对 SMs 产生的不利影响。Huang 等<sup>[35]</sup>研究显示, 姜黄素处理申克链霉菌后能够促进几丁质合成酶相关基因 *CHS1* 的上调表达并通过细胞壁补偿途径克服姜黄素对细胞的不利影响。SMs 处理酿酒酵母后 *CHS1* 显著上调表达, 表明 SMs 处理可导致酿酒酵母几丁质及 1,3- $\beta$ -葡聚糖合成通路的激活, 诱导酿酒酵母启动细胞壁相关补偿机制。此外, Klis 等<sup>[36]</sup>研究认为 *TOS1* 蛋白是构建和扩大细胞壁 1,3- $\beta$ -葡聚糖层所必需的, 在本研究中, *TOS1* 基因在 SMs 处理后表达量显著上调。糖基磷脂酰肌醇锚定的天冬氨酸蛋白酶对真菌细胞壁的完整性发挥重要作用<sup>[37]</sup>。本研究中, 编码天冬氨酸蛋白酶相关基因 *YPS1*、*YPS3* 被诱导上调表达。此外, 细胞壁相关蛋白的编码基因如参与细胞壁  $\beta$ -葡聚糖组装的糖蛋白 *KRE9P* 基因、参与细胞壁几丁质沉积的膜蛋白 *RCR1P* 基因以及编码细胞壁糖蛋白的 *CCW14P* 基因表达量均被显著诱导上调表达。以上结果表明, 在受到 SMs 作用后, 功能基因的上调表达在维持细胞壁完整性、减轻细胞壁损伤、形态发生和致病性方面发挥重要作用。

功能基因的上调表达可能是酵母细胞在应对细胞壁攻击时发生的相关应激作用, 这些应激作用途径包括 1,3- $\beta$ -葡聚糖合酶合成通路、糖基磷脂酰肌醇锚定蛋白合成通路以及细胞壁几丁质沉积通路等与细胞壁补偿机制相关的代谢通路。

## 2.10 转录组数据 RT-qPCR 验证

为验证转录组数据的质量, 以  $\beta$ -actin 作为内参基因, 筛选出 8 个糖异生、TCA 循环和细胞自噬途径的关键差异表达基因进行实时荧光定量 PCR 验证。对基因表达水平进行标准化处理后将基因差异倍数以 2 为底求对数, 得到结果与 RNA-Seq 数据进行对比(图 9)。RT-qPCR 基因表达趋势与转录组数据中基因表达趋势具有良好的一致性, 证明了本研究中 RNA-Seq 分析结果的可靠性。

此外, 为验证在模式真菌酿酒酵母中所获得结果的可靠性, 在棉花黄萎病致病菌大丽轮枝菌中检测相关作用通路基因的表达情况, 以对本研究结果作进一步的解释说明。SMs 处理后大丽轮枝菌相关通路基因的表达情况与模式真菌酿酒酵母的基因表达具有良好的一致性(图 10), 证明本研究通过酿酒酵母所获得结果的可靠性, 提示可通过分析酿酒酵母中基因的表达变化去推测 SMs 在其他致病真菌中的相关作用。

表 5 酿酒酵母细胞壁生物发生途径相关基因变化

Table 5 Changes in genes associated with the cell wall biogenesis pathway in *Saccharomyces cerevisiae*

Gene ID	Gene Name	Description	12 h		24 h	
			$ \log_2(\text{fold change}) $	<i>P</i> value	$ \log_2(\text{fold change}) $	<i>P</i> value
855529	<i>CHS1</i>	Chitin synthase	4.29	$1.32 \times 10^{-12}$	3.25	$1.48 \times 10^{-5}$
852459	<i>TOS1</i>	Tos1p	2.20	$9.74 \times 10^{-16}$	1.83	$1.86 \times 10^{-7}$
850811	<i>YPS1</i>	YPS1p	2.65	$4.11 \times 10^{-14}$	2.34	$6.01 \times 10^{-5}$
850812	<i>YPS3</i>	YPS3p	2.37	$8.54 \times 10^{-8}$	2.11	$7.91 \times 10^{-6}$
853265	<i>KRE9</i>	Kre9p	1.95	$4.18 \times 10^{-6}$	1.87	$9.27 \times 10^{-4}$
852290	<i>RCR1</i>	RCR1P	2.83	$2.32 \times 10^{-14}$	2.04	$2.16 \times 10^{-7}$
851107	<i>SNX41</i>	SNX41P	2.46	$6.14 \times 10^{-8}$	1.79	$7.23 \times 10^{-3}$

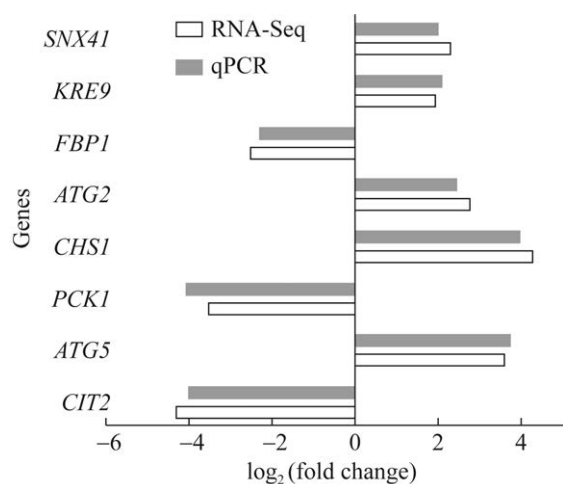


图9 RNA-Seq 转录组数据 RT-qPCR 验证  
Figure 9 RT-qPCR validation of RNA-Seq transcriptome data.

### 3 讨论与结论

微生物次级代谢产物发挥抑菌作用的机理主要通过以下 3 种方式：对细胞壁或细胞膜系统起作用；对遗传物质或遗传微粒结构起作用；对酶或功能蛋白起作用<sup>[38-39]</sup>。前期研究发现枯草芽孢杆菌 J-15 次级代谢产物(SMs)对大丽轮枝菌、黄曲霉等多种作物病害真菌表现出独特的抑菌特性<sup>[40-41]</sup>。进一步通过高效液相色谱(HPLC)、串联质谱(MS/MS)等手段对 SMs 中具有拮抗植物病原真菌作用的成分进行纯化表征，最终发现枯草芽孢杆菌 J-15 次级代谢产物中抑制真菌活性的主成分被鉴定为伊枯草菌素

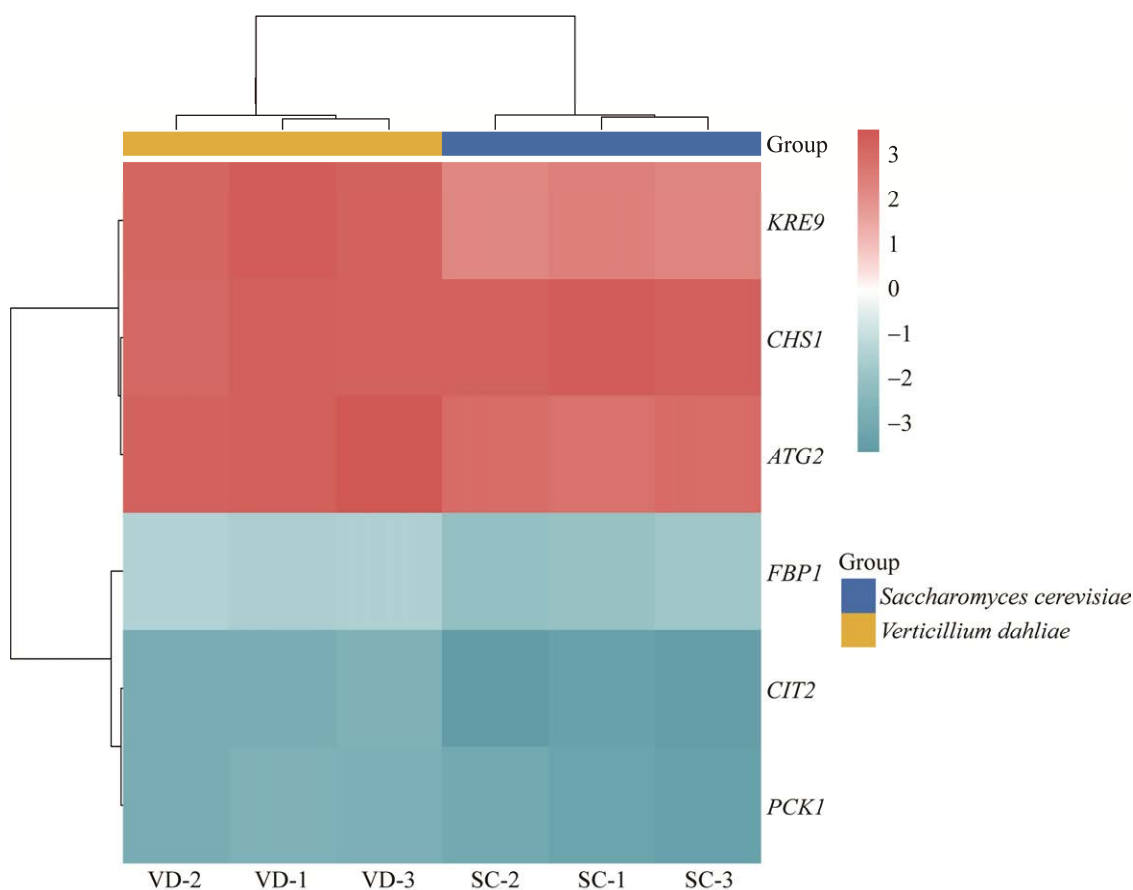


图10 大丽轮枝菌相关功能基因的表达验证 SC: 酿酒酵母; VD: 大丽轮枝菌

Figure 10 Expression verification of functional genes related to *Verticillium dahliae*. SC: *Saccharomyces cerevisiae*; VD: *Verticillium dahliae*.

家族中具有 C17 脂肪酸链的脂肽类化合物<sup>[40]</sup>。基于前期 SMs 发挥独特抑制真菌活性作用的发现,本研究对 SMs 抑菌作用的分子机制做了进一步的科学探讨。流式细胞术及共聚焦显微镜观察结果表明 SMs 作用诱导酿酒酵母核膜破裂,核酸泄出核区,引起酿酒酵母细胞坏死。转录组结果显示,在 SMs 作用条件下,酿酒酵母细胞内一系列基因的表达水平发生变化,差异表达基因较多集中在糖类、脂类和氨基酸代谢;细胞自噬和细胞壁生物发生途径等信号通路。

碳代谢是机体内最重要的基础代谢,本研究中,糖酵解途径和乙醛酸循环的关键限速酶基因以及线粒体丙酮酸载体蛋白基因在 SMs 处理后下调表达,表明 SMs 处理可能抑制了酿酒酵母乙醛酸循环关键酶的活性以及糖酵解过程中磷酸烯醇式丙酮酸的转化过程,从而在糖酵解和乙醛酸循环通路上扰乱酿酒酵母的能量供应机制,导致酿酒酵母的碳代谢过程被极大地抑制或破坏。此外, RNA 转运基因、细胞周期蛋白基因的下调表达可能诱导酿酒酵母的细胞周期被延滞在细胞间期,导致 DNA 复制过程受到极大抑制。这些变化可能均限制细胞的增殖,起到一定的抑菌作用。自噬依赖性细胞死亡的发生通常被认为是自噬通量(包括自噬活性、自噬持续时间和自噬内容物)增强的结果<sup>[42]</sup>。在本研究中,自噬通路基因的显著上调表达提示 SMs 处理可能引起自噬通量的改变,诱导酿酒酵母发生自噬依赖性死亡。除糖脂代谢、细胞壁完整性等途径外,其他信号转导通路基因的差异表达也调控着酵母细胞的代谢过程,如细胞内酶活性、氨基酸运输代谢等途径也受到影响,提示 SMs 可能通过作用酿酒酵母细胞的多个效应靶点从而发挥诱导酿酒酵母坏死的相关抑菌特性。而对于 SMs 抑菌作用机理更深入的探究,还有待于进一步分析挖掘转录组数据,

以及在作物致病真菌中继续开展对关键基因表达的相关验证。

本研究初步探究了 J-15 次级代谢产物(SMs)抑制酿酒酵母的作用分子机制,为探明 SMs 抑制真菌生长的作用机理及其应用于作物真菌病害防治提供了重要的试验依据和理论基础,对于有效开发微生物资源进行生物防治具有重要的指导意义。

## 致谢

本研究得到新疆师范大学校级重点学科生物学学科的大力支持和帮助,在此表示衷心的感谢。

## REFERENCES

- [1] WULF BB, HORVATH DM, WARD ER. Improving immunity in crops: new tactics in an old game[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2011, 14(4): 468-476.
- [2] 李凯,袁鹤. 植物病害生物防治概述[J]. *山西农业科学*, 2012, 40(7): 807-810.  
LI K, YUAN H. Review on biological control of plant diseases[J]. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2012, 40(7): 807-810 (in Chinese).
- [3] 李怡洁,杨佐忠. 枯草芽孢杆菌主要作用机制与应用研究进展[J]. *四川林业科技*, 2019, 40(4): 126-130.  
LI YJ, YANG ZZ. Advances in researches on main action mechanism and application of *Bacillus subtilis*[J]. *Journal of Sichuan Forestry Science and Technology*, 2019, 40(4): 126-130 (in Chinese).
- [4] 王晓琼,毕秀芳,谢晓凤,邢亚阁,李明元. 伊枯草菌素 A 对草莓腐败菌的抑制效果研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2020, 32(11): 1889-1895.  
WANG XQ, BI XF, XIE XF, XING YG, LI MY. Antibacterial effect of iturin A on strawberry spoilage mold[J]. *Natural Product Research and Development*, 2020, 32(11): 1889-1895 (in Chinese).
- [5] 朱华珺,周瑚,任佐华,刘二明. 枯草芽孢杆菌 JN005 胞外抗菌物质及对水稻叶瘟防治效果[J]. *中国水稻科学*, 2020, 34(5): 470-478.  
ZHU HJ, ZHOU H, REN ZH, LIU EM. Extracellular antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis*

- JN005 and its control efficacy on rice leaf blast[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2020, 34(5): 470-478 (in Chinese).
- [6] TIMMUSK S, GRANTCHAROVA N, WAGNER EGH. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(11): 7292-7300.
- [7] DOMÍNGUEZ Á, MUÑOZ E, CORDERO M, MARTÍNEZ JP, VIÑAS M. Transcriptomics as a tool to discover new antibacterial targets[J]. Biotechnology Letters, 2017, 39(6): 819-828.
- [8] 叶晗, 李啸, 张小龙, 肖泽涛, 许超群, 黄聪. 基于转录组学分析的丙酸钙对酿酒酵母的抑菌机制[J]. 微生物学通报, 2021, 48(2): 437-448.  
YE H, LI X, ZHANG XL, XIAO ZT, XU CQ, HUANG C. Antimicrobial mechanism of calcium propionate on *Saccharomyces cerevisiae* based on transcriptomics analysis[J]. Microbiology China, 2021, 48(2): 437-448 (in Chinese).
- [9] KUBO K, ITTO-NAKAMA K, OHNUKI S, YASHIRODA Y, LI SC, KIMURA H, KAWAMURA Y, SHIMAMOTO Y, TOMINAGA KI, YAMANAKA D, ADACHI Y, TAKASHIMA S, NODA Y, BOONE C, OHYA Y. Jerveratrum-type steroidal alkaloids inhibit  $\beta$ -1,6-glucan biosynthesis in fungal cell walls[J]. Microbiol Spectrum, 2022, 10(1): e0087321.
- [10] GRANER JA, MURRAY D, KAYRKÇI Ö, MAGWENE PM. The genetic architecture of biofilm formation in a clinical isolate of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genetics, 2013, 193(2): 587-600.
- [11] 曾燕. 以酿酒酵母为模式真菌初探吩嗪-1-羧酸杀抑真菌的机理[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2013.  
ZENG Y. Preliminary studies on the antimicrobial mechanism of phenazine-1-carboxylic acid (PCA) on fungi through model organism *Saccharomyces cerevisiae*[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2013 (in Chinese).
- [12] 郭娜. 呋喃喹啉类生物碱白鲜碱体外抗真菌活性及作用机制研究[D]. 长春: 吉林大学博士学位论文, 2009.  
GUO N. Study on the in vitro antifungal activities and actions mechanism of furoquinoline alkaloid dictamnine[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin University, 2009 (in Chinese).
- [13] LIESBETH D. Can *Saccharomyces cerevisiae* keep up as a model system in fungal azole susceptibility research?[J]. Drug Resistance Updates, 2019, 42: 22-34.
- [14] 赵君洁, 曾卫军, 李艳红, 葛风伟, 杜钰, 袁琳琳, 赵歉歉, 王敏, 谢红桃, 白若翔, 韩生成, 赵和平, 赵惠新. 大丽轮枝菌拮抗芽孢菌株的分离、鉴定及两株菌抑菌特性研究[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2017, 53(3): 294-300.  
ZHAO JJ, ZENG WJ, LI YH, GE FW, DU Y, YUAN LL, ZHAO QQ, WANG M, XIE HT, BAI RX, HAN SC, ZHAO HP, ZHAO HX. Isolation and identification of antagonistic *Bacillus* spp. against *Verticillium dahliae*: the antibacterial properties of two strains[J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science Edition), 2017, 53(3): 294-300 (in Chinese).
- [15] 吴梦君, 杨启林, 李艳红, 葛风伟, 赵歉歉, 袁琳琳, 宁焕宸, 陈忠宜, 李金玉, 赵惠新. BS-Z15 代谢产物防治棉花黄萎病的作用及对棉花生长的影响[J]. 分子植物育种, 2019, 17(24): 8237-8244.  
WU MJ, YANG QL, LI YH, GE FW, ZHAO QQ, YUAN LL, NING HC, CHEN ZY, LI JY, ZHAO HX. Effect of BS-Z15 metabolites on cotton *Verticillium* wilt prevention and cotton growth[J]. Molecular Plant Breeding, 2019, 17(24): 8237-8244 (in Chinese).
- [16] 谢尔瓦尼木·阿不都艾尼, 海孜尼姑力·努尔, 赵歉歉, 李淑婷, 刘佳奇, 赵和平, 赵惠新. 枯草芽孢杆菌 J-15 抗大丽轮枝菌次级代谢产物对棉田土壤真菌多样性的影响[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 1997-2007.  
Xierwanimu·Abuduaini, Haiziniguli·Nuer, ZHAO QQ, LI ST, LIU JQ, ZHAO HP, ZHAO HX. Effects of *Bacillus subtilis* J-15 secondary metabolites against *Verticillium dahliae* on diversity of soil fungi[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 1997-2007 (in Chinese).
- [17] 吴梦君. 枯草芽孢杆菌 BS-Z15 全基因组分析及其次级代谢产物发酵条件的优化[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2019.  
WU MJ. Sequencing and functional annotation of the whole genome of *Bacillus* sp. strain BS-Z15 and optimization of fermentation conditions[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2019 (in Chinese).
- [18] SAJITHA KL, DEV SA, MARIA FLORENCE EJ. Identification and characterization of lipopeptides from *Bacillus subtilis* B1 against sapstain fungus of rubberwood through MALDI-TOF-MS and RT-PCR[J]. Current Microbiology, 2016, 73(1): 46-53.
- [19] THIMION L, PEYPOUX F, WALLACH J, MICHEL G. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on



- morphology and membrane ultrastructure of yeast cells[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 128(2): 101-106.
- [20] DELEU M, PAQUOT M, NYLANDER T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface—implications for the effect of fengycin on biological membranes[J]. Journal of Colloid and Interface Science, 2005, 283(2): 358-365.
- [21] 赵君洁. 棉花黄萎病拮抗芽孢菌的筛选及其活性物质研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2017.
- ZHAO JJ. Screening, identification and characterization of the antifungal substance of antagonistic *Bacillus* against *Verticillium dahliae*[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2017 (in Chinese).
- [22] XIEERWANIMU A, AILINA A, LIN RR, SONG GG, HUANG Y, CHEN ZY, ZHAO HP, LUO Q, ZHAO HX. The lethal effect of *Bacillus subtilis* Z15 secondary metabolites on *Verticillium dahliae*[J]. Natural Product Communications, 2021, 16(1): 1934578X20986728.
- [23] 魏小文, 马翠, 熊亮, 张明明, 赵心清, 白凤武. 液泡蛋白酶 B 对酿酒酵母高温乙醇发酵效率的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(10): 1841-1846.
- WEI XW, MA C, XIONG L, ZHANG MM, ZHAO XQ, BAI FW. Effect of vacuolar proteinase B on high temperature ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology China, 2015, 42(10): 1841-1846 (in Chinese).
- [24] MIZUSHIMA N, YOSHIMORI T, OHSUMI Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2011, 27: 107-132.
- [25] GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy and cell death[J]. Current Topics in Developmental Biology. Amsterdam: Elsevier, 2007: 217-245.
- [26] KOTANI T, KIRISAKO H, KOIZUMI M, OHSUMI Y, NAKATOGAWA H. The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(41): 10363-10368.
- [27] SUZUKI K, KIRISAKO T, KAMADA Y, MIZUSHIMA N, NODA T, OHSUMI Y. The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of *APG* genes is essential for autophagosome formation[J]. The EMBO Journal, 2001, 20(21): 5971-5981.
- [28] KUMA A, MIZUSHIMA N, ISHIHARA N, OHSUMI Y. Formation of the ~350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast[J]. Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(21): 18619-18625.
- [29] SCOTT RC, GABOR J, NEUFELD TP. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death[J]. Current Biology, 2007, 17(1): 1-11.
- [30] YEY YY, SHAH KH, HERMAN PK. An Atg13 protein-mediated self-association of the Atg1 protein kinase is important for the induction of autophagy[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(33): 28931-28939.
- [31] MA MX, KUMAR S, PURUSHOTHAMAN L, BABST M, UNGERMANN C, CHI RJ, BURD CG. Lipid trafficking by yeast Snx4 family SNX-BAR proteins promotes autophagy and vacuole membrane fusion[J]. Molecular Biology of the Cell, 2018, 29(18): 2190-2200.
- [32] ORLEAN P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall[J]. Genetics, 2012, 192(3): 775-818.
- [33] BIZERRA FC, MELO ASA, KATCHBURIAN E, FREYMÜLLER E, STRAUS AH, TAKAHASHI HK, COLOMBO AL. Changes in cell wall synthesis and ultrastructure during paradoxical growth effect of caspofungin on four different *Candida* species[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(1): 302-310.
- [34] PREECHASUTH K, ANDERSON JC, PECK SC, BROWN AJP, GOW NAR, LENARDON MD. Cell wall protection by the *Candida albicans* class I chitin synthases[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 82: 264-276.
- [35] HUANG LL, ZHANG J, SONG TZ, YUAN LY, ZHOU JJ, YIN HL, HE TL, GAO WC, SUN Y, HU XC, HUANG HQ. Antifungal curcumin promotes chitin accumulation associated with decreased virulence of *Sporothrix schenckii*[J]. International Immunopharmacology, 2016, 34: 263-270.
- [36] KLIS FM, BRUL S. Adaptations of the secretome of *Candida albicans* in response to host-related environmental conditions[J]. Eukaryotic Cell, 2015, 14(12): 1165-1172.
- [37] MORENO-RUIZ E, ORTU G, de GROOT PWJ, COTTIER F, LOUSSERT C, PRÉVOST MC, de

- KOSTER C, KLIS FM, GOYARD S, D'ENFERT C. The GPI-modified proteins Pga59 and Pga62 of *Candida albicans* are required for cell wall integrity[J]. *Microbiology*, 2009, 155(6): 2004-2020.
- [38] 李芙蓉, 丁涛, 白林含. 拟茎点霉属 *Phomopsis* sp. S4 菌株发酵产物对稻瘟病菌细胞膜的抑制作用[J]. *应用与环境生物学报*, 2018, 24(2): 342-346.
- LI FR, DING T, BAI LH. Inhibition mechanism of fermentation broth extract of *Phomopsis* sp. strain S4 on cell membranes of *Magnaporthe oryzae*[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2018, 24(2): 342-346 (in Chinese).
- [39] 辛维岗, 江宇航, 陈诗雨, 徐美余, 周红兵, 张棋麟, 林连兵. 滇池金线鲃肠道产细菌素细菌的筛选鉴定及细菌素 LSP01 的抑菌作用[J]. *微生物学通报*, 2022, 49(1): 242-255.
- XIN WG, JIANG YH, CHEN SY, XU MY, ZHOU HB, ZHANG QL, LIN LB. Screening and identification of bacteriocin-producing bacteria in the intestines of *Sinocyclocheilus grahami* in Dianchi and the antibacterial effect of bacteriocin LSP01[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(1): 242-255 (in Chinese).
- [40] LIN RR, ZHANG Q, YIN L, ZHANG YW, YANG QL, LIU K, WANG YD, HAN SC, ZHAO HX, ZHAO HP. Isolation and characterization of a mycosubtilin homologue antagonizing *Verticillium dahliae* produced by *Bacillus subtilis* strain Z15[J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0269861.
- [41] 宁焕宸. 枯草芽孢杆菌 J-15 代谢产物抑制黄曲霉生长及产毒作用[D]. 乌鲁木齐: 新疆师范大学硕士学位论文, 2022.
- NING HC. Inhibition of *Aspergillus flavus* growth and toxin production by metabolites of *Bacillus subtilis* J-15[D]. Urumqi: Master's Thesis of Xinjiang Normal University, 2022 (in Chinese).
- [42] WU JH, YE J, XIE Q, LIU B, LIU M. Targeting regulated cell death with pharmacological small molecules: an update on autophagy-dependent cell death, ferroptosis, and necroptosis in cancer[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 65(4): 2989-3001.