

## 链霉菌 ZH-356 的植病生防作用

刘安东<sup>1,2#</sup>, 宁婉清<sup>1,2,3#</sup>, 朱旭飞<sup>1</sup>, 张博琳<sup>1</sup>, 屈小娜<sup>1</sup>, 张晋龙<sup>1</sup>, 徐成楠<sup>1</sup>,  
李广伟<sup>1</sup>, 张向前<sup>1</sup>, 王延峰<sup>1</sup>, 成娟丽<sup>1,2,3\*</sup>, 林金水<sup>1,2,3\*</sup>

- 1 延安大学 生命科学学院, 陕西省黄土高原资源植物研究与利用重点实验室, 陕西 延安
- 2 延安柯龙尼生物科技有限公司, 陕西 延安
- 3 西北农林科技大学, 作物抗逆与高效生产全国重点实验室, 陕西 杨凌

刘安东, 宁婉清, 朱旭飞, 张博琳, 屈小娜, 张晋龙, 徐成楠, 李广伟, 张向前, 王延峰, 成娟丽, 林金水. 链霉菌 ZH-356 的植病生防作用[J]. 微生物学报, 2025, 65(3): 1219-1240.

LIU Andong, NING Wanqing, ZHU Xufei, ZHANG Bolin, QU Xiaona, ZHANG Jinlong, XU Chengnan, LI Guangwei, ZHANG Xiangqian, WANG Yanfeng, CHENG Juanli, LIN Jinshui. Biocontrol effects of *Streptomyces* sp. ZH-356 on plant diseases[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(3): 1219-1240.

**摘要:** 【目的】对具有拮抗植物病原真菌作用的链霉菌 ZH-356 进行定殖能力和生防作用评价, 并结合组学分析初步揭示其植病生防机制。【方法】采用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)荧光标记法, 检测链霉菌 ZH-356 在植物体内的定殖情况; 同时, 通过测定不同剂型菌剂(种子包衣剂、可湿性粉剂、胶水菌剂和骨胶菌剂)对植物真菌病害的生防效果来评价链霉菌 ZH-356 的植病生防作用及潜力; 利用三代测序技术分析链霉菌 ZH-356 的全基因组信息, 并对其基因功能进行注释; 结合转录组学对比分析链霉菌 ZH-356 在拮抗植物病原真菌过程中表达发生显著改变的基因, 预测其拮抗活性物质的合成基因。【结果】通过 GFP 荧光标记的植物定殖分析, 发现链霉菌 ZH-356 能在番茄和小麦的根茎中稳定定殖; 同时, 基于 ZH-356 制备的不同剂型菌剂对番茄早疫病和苹果树腐烂病均具有良好防效作用。其中, 链霉菌 ZH-356 制成的种子包衣剂处理后不影响番茄种子的发芽率, 且能有效保护番茄苗免受番茄早疫病菌的侵染; 基于 ZH-356 制备的

资助项目: 国家自然科学基金(32070103); 作物抗逆与高效生产全国重点实验室开放课题(SKLC SRHPKF12); 陕西省“特支计划”区域发展人才项目(2020-44); 陕西省普通高等学校青年杰出人才支持计划(2018-111); 陕西高校青年创新团队(2022-943); 陕西省“两链”融合重点专项(2023LLRH-01); 延安市科技计划(2024-JBZ-001); 延安大学科研计划(2023HBZ-001, 2023CGZH-007); 陕西省大学生创新创业训练项目(S202310719112)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32070103), the Open Project Program of State Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-efficiency Production (SKLC SRHPKF12), the Regional Development Talent Project of the “Special Support Plan” of Shaanxi Province (2020-44), the Outstanding Young Talent Support Plan of the Higher Education Institutions of Shaanxi Province (2018-111), the Youth Innovation Team of Shaanxi Universities (2022-943), the “Two Chains” Integration Key Project of Shaanxi Province (2023LLRH-01), the Yan’an Science and Technology Plan (2024-JBZ-001), the Research Project of Yan’an University (2023HBZ-001, 2023CGZH-007), and the Shaanxi University Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (S202310719112).

#These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. E-mail: CHENG Juanli: chengjl-1981@163.com; LIN Jinshui: linjinshui@yau.edu.cn

Received: 2024-12-02; Accepted: 2024-12-31; Published online: 2025-01-02

可湿性粉剂对番茄早疫病具有良好的预防与治疗效果，且预防作用优于治疗作用；由链霉菌 ZH-356 制成的液体菌剂，无论是否刮除发病处的树皮，对苹果树腐烂病均具有一定的防治效果，刮除病斑上的树皮后防治效果更好，且这种防治效果优于甲基硫菌灵农药。通过对链霉菌 ZH-356 的全基因组测序分析发现，其基因组含有一条线状染色体，大小为 9 435 898 bp，G+C 含量平均为 70.82%，共预测到 8 432 个编码基因、69 个 tRNA 基因和 18 个 rRNA 基因。物种注释结果显示，链霉菌 ZH-356 不属于任何已完成基因组测序的链霉菌种类。经全基因组分析预测，链霉菌 ZH-356 中含有 32 个次级代谢产物合成基因簇。通过转录组学分析发现，在拮抗植物病原真菌过程中，NRPS/T1PKS 基因簇 ZH\_356\_GM000343–ZH\_356\_GM000422 的表达显著上调，推测它可能是链霉菌 ZH-356 中介导其抗植物病原真菌活性物质生物合成基因簇，而 ZH\_356\_GM000409 可能是该活性物质的核心生物合成基因。【结论】链霉菌 ZH-356 能在植物体内稳定定殖，基于该菌株制备的生防菌剂对植物真菌病害具有良好防治效果，其拮抗植物病原真菌的活性物质可能由 ZH\_356\_GM000343–ZH\_356\_GM000422 基因簇负责合成。本研究为菌株 ZH-356 的产业化应用和拮抗植物病原真菌的机制研究奠定了基础。

关键词：链霉菌；定殖；菌剂；基因组测序；转录组测序；次级代谢产物

## Biocontrol effects of *Streptomyces* sp. ZH-356 on plant diseases

LIU Andong<sup>1,2#</sup>, NING Wanqing<sup>1,2,3#</sup>, ZHU Xufei<sup>1</sup>, ZHANG Bolin<sup>1</sup>, QU Xiaona<sup>1</sup>, ZHANG Jinlong<sup>1</sup>, XU Chengnan<sup>1</sup>, LI Guangwei<sup>1</sup>, ZHANG Xiangqian<sup>1</sup>, WANG Yanfeng<sup>1</sup>, CHENG Juanli<sup>1,2,3\*</sup>, LIN Jinshui<sup>1,2,3\*</sup>

1 Shaanxi Key Laboratory of Research and Utilization of Resource Plants on the Loess Plateau, College of Life Sciences, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi, China

2 Yan'an Colony Biological Technology Co., Ltd., Yan'an, Shaanxi, China

3 State Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-efficiency Production, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi, China

**Abstract: [Objective]** To evaluate the colonization ability and biocontrol effects of *Streptomyces* sp. ZH-356 with antagonistic effects on plant pathogenic fungi and reveal the biocontrol mechanism of *Streptomyces* sp. ZH-356 by omics analysis. **[Methods]** The colonization of *Streptomyces* sp. ZH-356 in plants was detected by the GFP fluorescent labeling method. The biocontrol effects and potential of *Streptomyces* sp. ZH-356 on plant fungal diseases were evaluated based on the biocontrol effects of the inoculant in different dosage forms (seed coating agent, wettable powder, gum inoculant, and bone glue inoculant). The whole genome information of *Streptomyces* sp. ZH-356 was analyzed by third-generation sequencing, and its gene functions were annotated. The comparative transcriptome analysis was performed to screen the differentially expressed genes during the antagonizing process of *Streptomyces* sp. ZH-356 against plant pathogenic fungi, and thus the genes involved in the synthesis of antagonistic substances were predicted. **[Results]** *Streptomyces* sp. ZH-356 stably colonized the roots and stems of tomato and

wheat plants. Different dosage forms of inoculants prepared based on *Streptomyces* sp. ZH-356 demonstrated strong control effects on tomato early blight and apple valsa canker. Among them, the seed coating agent prepared with *Streptomyces* sp. ZH-356 did not affect the germination rate of tomato seeds after treatment while protecting tomato seedlings from the infection of *Alternaria solani*. The wettable powder prepared with *Streptomyces* sp. ZH-356 showed both prevention and treatment effects on tomato early blight, with the prevention effect stronger than the treatment effect. The liquid inoculants prepared from *Streptomyces* sp. ZH-356 had control effects on apple Valsa canker, regardless of whether the diseased bark was scraped or not, while the control effect was better when the diseased bark was scraped and better than that of thiophanate-methyl. The whole genome sequencing results showed that *Streptomyces* sp. ZH-356 contained only one linear chromosome with a size of 9 435 898 bp and the average G+C content of 70.82%. A total of 8 432 coding genes, 69 tRNA genes, and 18 rRNA genes were predicted. Species annotation results showed that *Streptomyces* sp. ZH-356 did not belong to any *Streptomyces* species whose genome has been sequenced. Genome-wide analysis showed that there were 32 biosynthetic gene clusters (BGCs) for secondary metabolites in ZH-356. Transcriptomic analysis showed that the expression of the NRPS/T1PKS gene cluster ZH\_356\_GM000343–ZH\_356\_GM000422 was significantly up-regulated in the process of antagonizing plant pathogenic fungi, suggesting that it may be a BGC mediating the biosynthesis of active substances against plant pathogenic fungi in *Streptomyces* sp. ZH-356. Moreover, ZH\_356\_GM000409 may be the core biosynthetic gene of the active substances.

**[Conclusion]** *Streptomyces* sp. ZH-356 can colonize plants, and the biocontrol agents prepared based on this strain demonstrate good control effects on plant fungal diseases. The active substances for the antagonistic effects may be synthesized by the gene cluster ZH\_356\_GM000343–ZH\_356\_GM000422. The above work lays a foundation for the industrial application of strain ZH-356 and the research on the mechanism of antagonizing plant pathogenic fungi.

**Keywords:** *Streptomyces*; colonization; inoculant; genome sequencing; transcriptome sequencing; secondary metabolites

链霉菌(*Streptomyces*)属于放线菌目,是具有高度分支营养菌丝的革兰氏阳性菌<sup>[1]</sup>。长久以来,作为备受关注的放线菌之一,链霉菌相关领域的研究发展态势迅猛,成果显著。目前,已报道的微生物来源的生物活性物质约有40%来源于链霉菌中,这些物质包括多种抗生素、除草剂及其他生物活性物质等<sup>[2-6]</sup>。随着科学技术的进步,测序技术为基因组学研究带来了革命性的突破<sup>[7]</sup>。对链霉菌基因组数据的深入研究发现,其基因组量级偏大,且普遍具有较高的G+C含量<sup>[8]</sup>。进一步探索链霉菌基因组后,人

们发掘出了众多后来得到广泛应用的抗生素<sup>[9]</sup>。例如,通过对天蓝色链霉菌基因组信息的探索和分析,发现该菌能够产生放线紫红素、十一烷基灵菌红素、次甲霉素和钙依赖抗生素等4种抗生素<sup>[10-12]</sup>。同时,利用基因组信息可以预测链霉菌次级代谢基因簇的数量、类别,以及编码基因的位置、序列、大小和功能,进而推测其代谢产物<sup>[13-15]</sup>。殷瑜等<sup>[16]</sup>利用比较基因组学和泛基因组学推测出一株植物内生链霉菌具备产生默诺霉素的能力。Rath等<sup>[17]</sup>利用全基因组分析发现,从湖底分离出的一株链霉菌

HB2AG 存在天冬酰胺合酶基因 *ansB*。天冬酰胺合酶在抗恶性肿瘤和急性淋巴白血病的细胞毒性治疗中有着潜在的应用价值<sup>[18-19]</sup>。

同时, 链霉菌在农业方面也展现出很高的应用价值, 例如利用链霉菌农用抗生素、活菌菌剂等来防治植物病害。然而, 随着农业的高质量发展, 长期滥用化学农药防治植物病害已引发了一系列严重问题, 如病原菌抗药性增强、环境污染和农产品农药残留等<sup>[20-24]</sup>。因此, 亟需生态友好型的生物制剂来替代化学农药。目前, 开发以活菌为有效成分的微生物生防菌剂来防治植物病害已成为研究热点<sup>[25-26]</sup>。链霉菌因其能产生丰富多样的抗生素而备受关注。随着对其应用价值和生态功能的深入挖掘, 生物防治领域方面也取得了显著进展。例如, 骆焱平等<sup>[27]</sup>将金黄垂直链霉菌 HN6 的液体发酵物加工制成用于防治香蕉枯萎病的可湿性粉剂; Gomes 等<sup>[28]</sup>利用利迪链霉菌 WYEC108 制成的活菌粉剂产品 Actinovate<sup>®</sup>, 该产品可有效防治白粉病、霜霉病、灰霉病、菌核病等叶部病害。然而, 目前对链霉菌制成的生防活菌菌剂应用相对较少。一方面, 链霉菌生长周期慢, 发酵时间长, 且培养条件要求严格, 导致培养成本较其他细菌和真菌更高<sup>[29]</sup>; 另一方面, 链霉菌在应用中对生存环境要求高, 适应外界条件能力弱, 作为外来菌株难以迅速定殖在植物体内<sup>[30-31]</sup>。因此, 生防链霉菌在植物体内的定殖能力成为评估其在植物病害生物防治领域应用潜力的重要因素<sup>[32-34]</sup>。

链霉菌 ZH-356 是本课题组前期从枣树枝条中分离得到的一株具有广谱拮抗植物病原真菌活性的植物内生菌, 其产生的抑菌活性物质对温度和酸碱度具有高度稳定性, 并且该活性物质仅存在于胞内; 只有当 ZH-356 遇到植物病原真菌时, 才会被分泌到胞外来抑制它们的生长,

这种抑制作用可导致苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*) 菌丝变粗、交叉扭曲、分枝变少且容易断裂<sup>[35]</sup>。防治试验结果显示, ZH-356 对于受苹果树腐烂病菌侵染的苹果树离体枝条及盆栽苗具有良好的防治效果, 极具开发前景<sup>[35]</sup>。然而, 链霉菌 ZH-356 是否能够在植物体内稳定定殖, 以及其拮抗植物病原真菌的具体机制尚不清楚<sup>[35]</sup>。

为进一步研究链霉菌 ZH-356 的生防机制, 本研究通过构建携带 GFP 基因的 ZH-356/pIJ8660Ep 菌株, 以小麦和番茄盆栽为植物模型对该菌在植物体内的定殖情况进行分析; 针对不同植物真菌病害开发不同剂型的菌剂(种子包衣剂、可湿性粉剂、胶水菌剂和骨胶菌剂), 并对其生防作用进行探究, 测定其生防效果。在此基础上, 对链霉菌 ZH-356 进行全基因组测序, 分析并预测其可能的次级代谢产物合成基因簇; 结合转录组学分析, 发掘菌株 ZH-356 在拮抗植物病原真菌过程中表达发生明显改变的次级代谢产物合成基因簇, 并鉴定在菌株 ZH-356 中介导拮抗植物病原真菌的关键基因, 以期在菌株 ZH-356 拮抗植物病原真菌的机制研究及其在农业生物防治领域的开发利用奠定基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株

供试菌株链霉菌 ZH-356 为实验室分离得到, 保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号: CCTCC No.M2020690。供试菌株大肠杆菌 ET12567/pUZ8002/pIJ8660Ep<sup>[36]</sup>由北京林业大学马玉超教授惠赠。5 种供试病原真菌: 苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokinianum*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*) 和玉米大斑病菌(*Exserohilum turcicum*), 均由延

安大学生命科学学院病害绿色防控研究室提供。

## 1.2 培养基

高氏一号培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.00, NaCl 0.50, KNO<sub>3</sub> 1.00, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 0.50, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 琼脂粉 15.00, 双蒸水定容, pH 7.2。

胰蛋白胨大豆肉汤培养基(TSB) (g/L): tryptone soya broth 30, 琼脂粉 15, 双蒸水定容, pH 7.2。

LB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, 琼脂粉 15, 双蒸水定容, pH 7.2。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA) (g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂粉 15, 双蒸水定容, pH 自然。

2×酵母提取物胰蛋白胨培养基(2×YT) (g/L): 蛋白胨 16, 酵母提取物 10, NaCl 5, 双蒸水定容, pH 7.2。

M1 培养基(g/L): 天冬酰胺 1.00, 酵母浸膏粉 5.00, 丙三醇 10.00, KNO<sub>3</sub> 5.00, 甜菜碱 1.25, 琼脂粉 15.00, 双蒸水定容, pH 7.2。

YME 培养基(g/L): 酵母提取物 4, 可溶性淀粉 4, 麦芽糖 10, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 5, 琼脂粉 20, 双蒸水定容, pH 7.2。

2CMY 培养基(g/L): 可溶性淀粉 10, 胰蛋白胨 2, NaCl 1, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, CaCO<sub>3</sub> 2, 无机盐溶液(FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.1, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1) 1 mL, 琼脂粉 15, 双蒸水定容, pH 7.2。

ISP2 培养基(g/L): 麦芽提取物 10, 酵母提取物 4, 葡萄糖 4, 琼脂粉 15, 双蒸水定容, pH 7.2。

以上培养基除 ISP2 培养基 115 °C 灭菌 30 min, 其余培养基均 121 °C 灭菌 20 min。

## 1.3 主要试剂和抗生素

胰蛋白胨、酵母提取物, OXOID 公司; 天

冬酰胺、甜菜碱, 北京索莱宝科技有限公司; 壳聚糖、聚乙烯醇, 上海麦克林生化科技股份有限公司; 骨胶, 青州亿博新材料有限公司, 硅藻土, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

卡那霉素和氯霉素, 北京索莱宝科技有限公司, 使用浓度为 30 μg/mL; 安普霉素使用浓度为 50 μg/mL, 萘啶酮酸使用浓度为 25 μg/mL, 均为阿拉丁试剂(上海)有限公司。

## 1.4 链霉菌 ZH-356 在植物中的定殖

### 1.4.1 链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 的构建

大肠杆菌和链霉菌属的间接合转移参考《链霉菌操作手册》<sup>[37]</sup>。将链霉菌 ZH-356 在 YME 培养基上划线, 于 28 °C 培养 4–6 d 后, 用无菌接种环刮下孢子, 将孢子悬液转移至无菌离心管中。使用无菌脱脂棉过滤孢子悬液除去菌丝片段与培养基碎片, 3 000 r/min 离心 10 min 收集孢子, 用 50% 无菌甘油保存于 -20 °C 备用。将大肠杆菌 ET12567/pUZ8002/pIJ8660Ep 在 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜, 以 1% 的比例转接至新鲜 LB 液体培养基中, 37 °C、180 r/min 振荡培养至 OD<sub>600</sub> 值为 0.4–0.6, 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体。使用新鲜 LB 液体培养基悬浮菌体, 6 000 r/min 离心 5 min 去上清, 重复 2 次, 加入 100 μL 液体 LB 培养基重新悬浮菌体备用。新鲜链霉菌 ZH-356 孢子按照 1:10 比例加入 1 mL 2×YT 培养基中, 50 °C 水浴锅热激 10 min, 6 000 r/min 离心 5 min, 去除大部分上清, 重悬孢子。将悬浮的大肠杆菌 ET12567/pUZ8002/pIJ8660Ep 菌液加入孢子悬液中, 混匀后涂布于无抗性的 2CMY 培养基上, 28 °C 倒置培养 16–20 h, 用安普霉素(50 μg/mL)和萘啶酮酸(25 μg/mL)覆盖 2CMY 平板, 28 °C 继续培养 2 d 左右得到接合转移子。挑取接合转移子在安普

霉素(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和萘啶酮酸(25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的 2CMY 双抗培养基上划线传代培养, 得到链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep。

#### 1.4.2 链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 的 GFP 表达检测和拮抗活性测定

GFP 荧光表型检测方法参考刘晓瑜等<sup>[36]</sup>的研究。将链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 使用插片培养法接种至 ISP2 固体培养基, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d, 取出盖玻片制成临时装片。使用荧光显微镜(上海缔伦光学公司, TL3201-LED)进行 GFP 荧光(激发光波长 420–485 nm)表型检测。采用平板对峙培养法测定链霉菌 ZH-356、ZH-356/pIJ8660Ep 对植物病原真菌的拮抗作用。在 PDA 培养基中心点将供试真菌的菌饼菌面朝下接种至培养皿中心点, 在四侧对称的 2.5 cm 处各滴加 15  $\mu\text{L}$  的链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 菌液, 以滴加链霉菌 ZH-356 菌液作为对照, 25  $^{\circ}\text{C}$  培养 5–7 d 后观察拮抗结果。

#### 1.4.3 链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 在植物体内的定殖

定殖测定参考周林等<sup>[38]</sup>的研究。以矮化番茄盆栽苗(北京东升种业有限公司矮生盆栽红番茄)和小麦苗作为实验材料进行定殖实验。将链霉菌 ZH-356 和 ZH-356/pIJ8660Ep 接种至 TSB 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 3 d 得到种子液, 以 1% 的比例接种至含有玻璃珠的 ISP2 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 d。挑取完整光滑番茄种子在穴盘中播种, 25  $^{\circ}\text{C}$  培养 7–10 d 发芽, 21 d 左右移栽, 长至 50 d 左右的番茄苗备用。挑取饱满完整的小麦种子播种于穴盘中, 25  $^{\circ}\text{C}$  培养 5–7 d 左右至种子发芽, 14 d 左右移栽至大盆, 长至 30 d 左右的小麦苗备用。轻轻去除植株根茎交界处覆盖的土壤, 用无菌刀片给植株根茎交界处的根和茎部制造伤口, 将链霉菌 ZH-356 和 ZH-356/pIJ8660Ep 菌液以灌根法

缓慢沿着植株茎秆灌注至植株根部, 覆土掩盖根茎交界处。每棵植株施用 100 mL 菌液, 25  $^{\circ}\text{C}$  培养 21 d, 以施用同体积水处理作为对照组。采集植株根茎, 使用无菌水冲洗干净土壤, 制成临时装片, 置于荧光显微镜下蓝光激发(波长 420–485 nm)观测链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 菌株在植株体内的定殖情况。

### 1.5 基于链霉菌 ZH-356 的菌剂制备及生物防治

#### 1.5.1 基于链霉菌 ZH-356 的菌剂制备

链霉菌 ZH-356 种子包衣剂的制备方法参考王易<sup>[39]</sup>的研究: 挑取链霉菌 ZH-356 单菌落接种至 TSB 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 3 d, 得到种子液; 以 1% 的比例将种子液转接至含有玻璃珠的 M1 液体培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 振荡培养 15 d 至菌液变成黑褐色, 即为链霉菌 ZH-356 发酵液; 将 200 mL 4% 壳聚糖溶液、640 mL 4% 聚乙烯醇溶液混合制成种子包衣剂基质, 再加入 160 mL 链霉菌 ZH-356 发酵液, 制成 1 L 链霉菌 ZH-356 种子包衣剂。

链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂的制备方法参考朱海霞等<sup>[40]</sup>的研究: 称取十二烷基硫酸钠(SDS) 60 g、羧甲基纤维素钠(CMCC-Na) 60 g、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  20 g 和硅藻土 860 g, 充分搅拌混匀, 121  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 20 min; 灭菌后 70  $^{\circ}\text{C}$  烘干, 加入链霉菌 ZH-356 发酵液 2 L, 充分搅拌均匀, 25  $^{\circ}\text{C}$  烘干至粉末状。

链霉菌 ZH-356 液体菌剂, 包括胶水菌剂和骨胶菌剂的制备。

(1) 链霉菌 ZH-356 胶水菌剂制备: 用 0.8 mL 无水乙醇溶解 0.8 g 水杨酸, 向溶解好的水杨酸溶液中加入 320 g 阿拉伯树胶、40 mL 甘油和 960 mL ZH-356 发酵液, 充分搅拌溶解混匀后室温储存备用。

(2) 链霉菌 ZH-356 骨胶菌剂制备: 取天然

骨胶 333.3 g, 用 333.3 mL H<sub>2</sub>O 浸泡过夜, 70 °C 水浴搅拌融化, 放至温度为 30 °C, 加入甘油 166.7 mL, CaCO<sub>3</sub> 3.33 g, 搅拌均匀得到基质。在基质中加入链霉菌 ZH-356 发酵液 500 mL, 搅拌混匀, 制备得到骨胶菌剂, 室温储存备用。

### 1.5.2 链霉菌 ZH-356 种子包衣剂盆栽防效实验

取打制好备用的番茄早疫病菌饼接种至 PDA 液体培养基中, 25 °C、180 r/min 振荡培养 10–15 d 至菌丝球充满培养基, 得到番茄早疫病菌发酵液。分别在 50 mL 包衣剂基质和链霉菌 ZH-356 种子包衣剂中加入 30 颗矮生盆栽红番茄种子(北京东升种业有限公司), 待其完全被种子包衣剂包裹后, 取出晾干成膜备用。在无菌营养土中按 500 mL/kg 加入制备好的番茄早疫病菌发酵液搅拌均匀, 备用。分别将链霉菌 ZH-356 种子包衣剂处理、包衣剂基质处理和无处理对照组的种子播种在上述加番茄早疫病菌发酵液的营养土中。每个处理组 3 个生物学重复, 每个重复播种 10 颗种子。测量各处理组的种子发芽率、植株根长、株高、鲜重、干重和长势。

### 1.5.3 链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂盆栽防效实验

以培养 50 d 的番茄苗(番茄苗培育方法同 1.4.3)作为实验材料进行防效实验, 防效实验方法参考朱海霞等<sup>[40]</sup>的研究。1.5.2 节番茄早疫病菌发酵液, 用振荡器振荡 2 min 使其孢子从菌丝上脱落。使用无菌脱脂棉过滤番茄早疫病菌发酵液, 将滤液 3 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 用 20% 甘油悬浮沉淀的孢子, 得到番茄早疫病菌孢子液。在番茄叶片上使用无菌刀片划出伤口, 将番茄早疫病菌孢子液喷洒在划伤的叶片上, 待叶片上孢子液被吸收之后再重复喷洒 2 次, 以保证番茄早疫病菌的成功感染。间隔一段时间后在划伤的番茄叶片上喷洒链霉菌

ZH-356 可湿性粉剂的 20 倍体积兑水稀释液, 待叶片上链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂干燥之后再重复喷洒 2 次。番茄早疫病菌孢子液和链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂喷洒间隔时间 3 d, 根据其先后顺序不同, 分为链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂对番茄早疫病的预防和治疗作用。实验分为 8 个处理组: a1: 先施用可湿性粉剂再接种番茄早疫病菌; a2: 先接种番茄早疫病菌再施用可湿性粉剂; a3: 施用可湿性粉剂; b1: 先施用可湿性粉剂基质再接种番茄早疫病菌; b2: 先接种番茄早疫病菌后施用可湿性粉剂基质; b3: 施用可湿性粉剂基质; CK1: 接种番茄早疫病菌; CK2: 无处理对照组。将处理后的番茄苗套上塑料薄, 在保温保湿的暗环境培养 14 d。

统计各处理组番茄早疫病的病情指数[计算如公式(1)所示]、番茄苗的发病等级、发病面积、菌剂防效等。发病等级以叶片病斑面积占整个叶面积的百分率分级: 0 级: 无, 1 级: 5% 以下, 3 级: 6%–10%, 5 级: 11%–20%, 7 级: 21%–50%, 9 级: 50% 以上, 每个处理随机调查 50 片叶的发病等级。

$$\text{病情指数} = 100 \times \frac{\sum(\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值})}{\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值}} \quad (1)$$

### 1.5.4 链霉菌 ZH-356 液体菌剂的大田防效测定

选取陕西省延安市安塞区高桥镇南沟村(36°35′29″N, 109°17′59″E)山地苹果园中已感染苹果树腐烂病的苹果树枝干作为实验对象进行大田试验。

2022 年 3 月 15 日, 在果园中随机选取发病的苹果树枝干, 刮除发病处的树皮后, 分别涂抹链霉菌 ZH-356 胶水菌剂、甲基硫菌灵糊剂, 不做处理作为空白对照等 3 个处理组, 每组 3 个生物学重复, 每个重复 15 棵树。2023 年

4月15日,在果园中随机选取发病的苹果树枝干,分为6个处理组:刮除发病处的树皮后分别涂抹骨胶菌剂、甲基硫菌灵糊剂和无处理,以及在不刮除发病处树皮的情况下涂抹骨胶菌剂、涂抹甲基硫菌灵糊剂和无处理,每个处理组5个生物学重复,每个重复20棵树。在涂抹处理后每1-2月进行病害进程调查,统计每棵树的苹果树腐烂病复发率[计算如公式(2)所示]、发病等级、病情指数[计算如公式(3)所示]和愈伤组织宽度等数据。发病等级以苹果树腐烂病病斑扩散长度分级。0级:无,1级:1 cm以下,2级:1-2 cm,3级:2-3 cm,4级:3-4 cm,5级:4-5 cm,6级:6-7 cm,7级:7 cm以上。

$$\text{复发率}P = \left( \frac{\text{复发棵数}}{\text{总棵数}} \right) \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{病情指数} = 100 \times \frac{\sum(\text{各级植株数} \times \text{各级代表值})}{\text{调查总植株数} \times \text{最高级代表值}} \quad (3)$$

## 1.6 链霉菌 ZH-356 基因组测序

### 1.6.1 链霉菌 ZH-356 基因组测序及拼接

将链霉菌 ZH-356 接种于高氏一号培养基,在 28 °C 活化培养 4-6 d,然后挑取单菌落接种至 TSB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d,6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体进行全基因组测序。链霉菌 ZH-356 的全基因组测序由天津诺禾致源生物信息科技有限公司完成。采用 PacBio 和 Illumina 测序平台构建 SMRT Bell 文库和 350 bp 小片段文库,使用 PacBio Sequel II/PacBio Sequel Iie 和 Illumina NovaSeq PE150 进行测序。基于测序结果使用 Canu 软件(version 2.0)对 reads 进行基因组组装。

### 1.6.2 基因预测与注释

使用 GeneMarkS 软件(v4.17)预测编码基因。通过 RepeatMasker 软件(version open-4.0.5)进行散在重复序列预测,并利用 tRNAscan-SE

软件(v1.3.1)对 tRNA 进行预测。利用通用数据库将预测基因的蛋白序列与 NR 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>); GO 数据库(<https://www.geneontology.org/>); KEGG 数据库(<http://www.genome.jp/kegg/>); COG 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>); Swiss-Prot 数据库(<http://www.ebi.ac.uk/uniprot/>)进行 Diamond 比对,过滤比对结果选取 score 最高的结果进行注释,分别得到 non-redundant protein database (NR)、gene ontology (GO)、Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)、cluster of orthologous groups of proteins (COG)和 Swiss-Prot 蛋白注释结果,使用 Type Strain Genome Server (dsmz.de) (TYGS)在线工具(<https://tygs.dsmz.de/>)和 DNA 杂交法进行物种分类注释以及构建物种发育树,得到构树结果使用 itol 在线工具(<https://itol.embl.de/>)美化。

### 1.6.3 链霉菌 ZH-356 次级代谢产物合成基因簇预测

利用 antiSMASH 网站 (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>)预测链霉菌 ZH-356 的次级代谢物合成基因簇,通过比较每个基因簇与已知化合物的生物合成基因簇,得知每个基因簇的代谢产物存在的可能性,并推测其生物合成途径。

## 1.7 链霉菌 ZH-356 转录组分析

### 1.7.1 链霉菌 ZH-356 与苹果树腐烂病菌平板对峙样品制备

挑取链霉菌 ZH-356 单菌落至 5 mL TSB 液体培养基中,28 °C、180 r/min 振荡培养 3 d。在 PDA 培养基中心接种苹果树腐烂病菌,25 °C 培养 5-7 d 至菌丝铺满培养基,使用无菌打孔器将其打制成直径为 5 mm 菌饼。在 PDA 培养基中心滴加 15 μL 的链霉菌 ZH-356 菌液,在距离中心点 2.5 cm 四侧对称点接种菌面向下的苹果树

腐烂病菌菌饼, 对照组只在 PDA 培养基中心滴加 15  $\mu$ L 链霉菌 ZH-356 菌液, 25  $^{\circ}$ C 培养 5–7 d 后, 待培养基形成圆形抑菌圈, 刮取 PDA 培养基中心的链霉菌 ZH-356 菌体至无菌 1.5 mL 离心管中, 液氮速冻 10 min, 放置于  $-80^{\circ}$ C 保存, 将样品送至上海美吉生物医药科技有限公司进行转录组测序分析。

### 1.7.2 链霉菌 ZH-356 转录组测序与分析

从链霉菌 ZH-356 组织样品中提取总 RNA, 利用 NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific 公司) 对所提 RNA 的浓度和纯度进行检测, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 并使用 Agilent 2100 测定 RNA 完整值 (RNA integrity number, RIN)。去除 rRNA 后, 加入 Fragmentation Buffer, 将完整的 mRNA 随机断裂成约 200 bp 的小片段。随后加入逆转录酶, 使用随机引物, 以 mRNA 为模板反转录合成一链 cDNA。用 dUTP 代替 dTTP 合成 cDNA 二链, 加入 End Repair Mix 将其补成平末端, 并在 3' 末端加上 1 个 A 碱基, 用于连接 Y 字形接头。使用 UNG 酶消化 cDNA 第二链, 使文库中仅包含 cDNA 第一链。最终利用 Illumina 平台和华大平台上机测序。

使用 RSEM 软件 (<http://deweylab.github.io/RSEM/>) 对基因的表达水平进行定量分析。根据基因在不同样本间的表达情况, 分析样本间共有与特有表达基因的相关性。对获得的基因 Read Counts 数进行样本间基因的差异表达分析, 以差异倍数 (fold change, FC) 和校正后的  $P$  值 ( $P$ -adjust) 作为筛选差异基因的阈值, 并对差异基因进行统计分析。采用上海美吉生物医药科技有限公司自主研发的流程对基因集进行 KEGG PATHWAY 功能富集分析, 从而获得该基因集中的 KEGG PATHWAY 功能富集情况以推测链霉菌 ZH-356 在面对植物病原真菌胁迫时产生拮抗作用的潜在机制。

## 1.8 统计及分析

使用 Microsoft Excel 软件分析原始数据, 利用 GraphPad Prism 软件 (v7.00) 进行差异显著性分析, 使用 Adobe Illustrator 2021 软件进行作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 链霉菌 ZH-356 在植物中的定殖能力分析

将链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 接种于 ISP2 培养基上进行插片培养, 并使用荧光显微镜观测其是否发出绿色荧光。结果显示, 链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 在荧光显微镜下可清晰观察到菌丝体上产生的绿色荧光, 而对照组链霉菌 ZH-356 则无此现象, 这证实了质粒 pIJ8660Ep 已成功导入链霉菌 ZH-356 中 [数据已上传国家微生物科学数据中心 (<https://nmhc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0001773>), 登录号为 NMDCX0001773]。通过平板对峙法对链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 和 ZH-356 进行抑菌活性比较实验。结果显示与链霉菌 ZH-356 相比, 链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 对小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、苹果树腐烂病菌 (*Valsa mali*)、小麦根腐病菌 (*Bipolaris sorokinianum*)、番茄早疫病菌 (*Alternaria solani*) 和玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*) 等植物病原真菌的拮抗活性并无明显差异, 表明携带 GFP 荧光标记质粒 pIJ8660Ep 并未影响链霉菌 ZH-356 的拮抗活性, 因此可用于分析链霉菌 ZH-356 在植物体内的定殖情况。

取用处理后的番茄根系和茎, 制作临时装片, 并使用荧光显微镜观测链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 的定殖情况。结果如图 1 所示, 经菌株 ZH-356/pIJ8660Ep 处理 21 d 后, 番茄根切片在荧光显微镜下可观察到明显的绿色荧光

(图 1A、1B), 番茄茎切片中也可观察到少量绿色荧光(图 1G、1H), 而菌株 ZH-356 和 H<sub>2</sub>O 处理对照组的番茄根切片和茎切片中均未见明显的绿色荧光(图 1C-1F、1I-1L)。同样地, 经菌株 ZH-356/pIJ8660Ep 处理 21 d 后的小麦根切片和茎切片在荧光显微镜下也均能观察到明显的绿色荧光(图 2A、2B、2G、2H), 而菌株 ZH-356 和 H<sub>2</sub>O 处理对照组的小麦根切片和茎切片中均未见明显的绿色荧光(图 2C-2F、2I-2L)。上述结果表明链霉菌 ZH-356/pIJ8660Ep 能在番茄和小麦的植株体内稳定定殖, 且该菌株 ZH-356/pIJ8660Ep 在番茄中更倾向于在根部定殖。

## 2.2 链霉菌 ZH-356 菌剂对植物真菌病害的生物防治效果测定

### 2.2.1 链霉菌 ZH-356 种子包衣剂盆栽防效实验

在种植土壤中拌入番茄早疫病菌发酵液, 播种处理过的 3 组番茄种子(链霉菌 ZH-356 种子包衣剂处理; 基质包衣剂处理; 无处理对照组)。21 d 后每个处理组番茄苗长势如图 3A 所示, 链霉菌 ZH-356 种子包衣剂处理的番茄苗长势明显优于基质处理组和无处理组。具体而言, 在未接种番茄早疫病菌的情况下(图 3B), 各处理组的种子发芽率无明显差异, 说明链霉菌 ZH-356 种子包衣剂对番茄种子的萌发无负面影

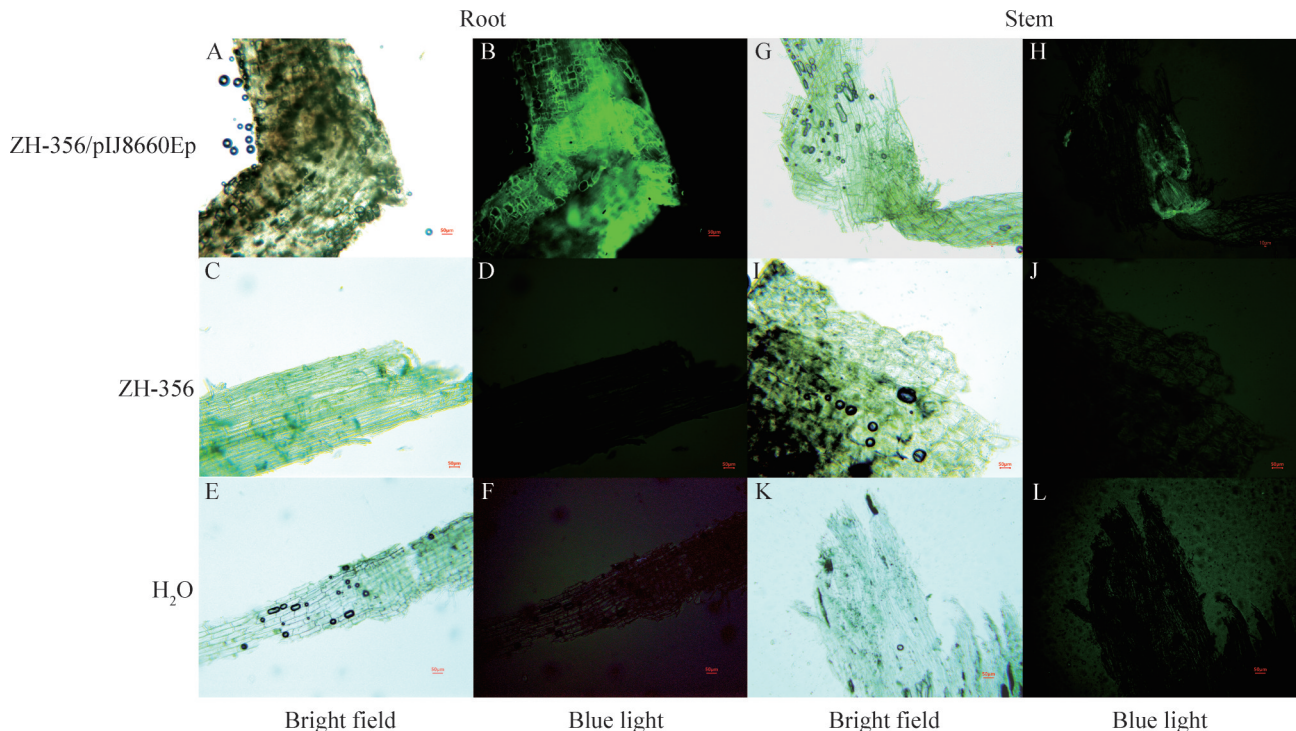


图1 链霉菌ZH-356/pIJ8660Ep在番茄植株体内的定殖

Figure 1 Colonization of *Streptomyces* sp. ZH-356/pIJ8660Ep in tomato. *Streptomyces* sp. ZH-356/pIJ8660Ep, ZH-356 and water-treated tomato seedling root slices were observed for fluorescence under white light (A, C, and E) and blue light (B, D, and F) using a fluorescence microscope. *Streptomyces* sp. ZH-356/pIJ8660Ep, ZH-356 and water-treated tomato seedling stem sections were observed for fluorescence under white light (G, I, and K) and blue light (H, J, and L) using a fluorescence microscope. Bar=50  $\mu$ m.

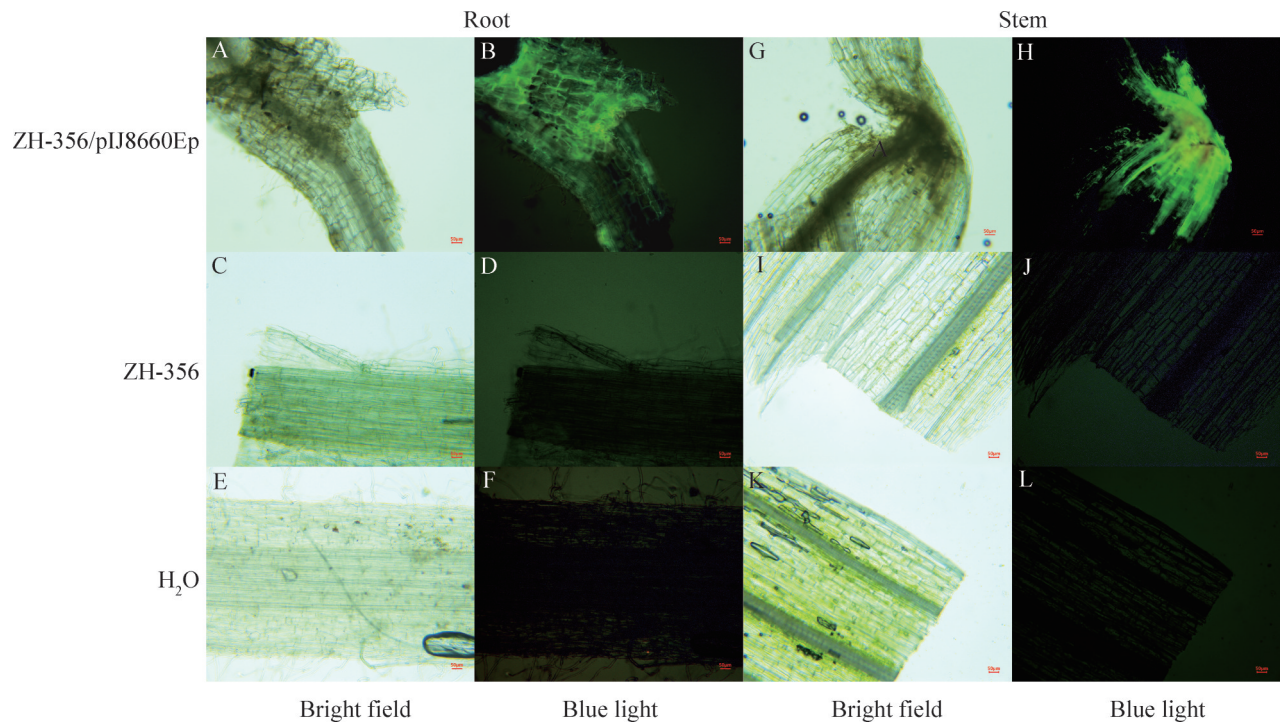


图2 链霉菌ZH-356/pIJ8660Ep在小麦植株体内的定殖

Figure 2 Colonization of *Streptomyces* sp. ZH-356/pIJ8660Ep in wheat. *Streptomyces* sp. ZH-356/pIJ8660Ep, ZH-356 and water-treated wheat seedling root slices were observed for fluorescence under white light (A, C, and E) and blue light (B, D, and F) using a fluorescence microscope. *Streptomyces* sp. ZH-356/pIJ8660Ep, ZH-356 and water-treated wheat seedling stem slices were observed for fluorescence under white light (G, I, and K) and blue light (H, J, and L) using a fluorescence microscope. Bar=50  $\mu$ m.

响；而在接种番茄早疫病菌后(图 3C)，虽然所有处理组的种子发芽率仍无明显差异，但链霉菌 ZH-356 种子包衣剂处理组的番茄苗在株高(图 3D)、根长(图 3E)、鲜重(图 3F)和干重(图 3G)方面均显著高于基质处理组和无处理组。综上所述，表明链霉菌 ZH-356 种子包衣剂能够有效保护番茄苗免受番茄早疫病菌的侵染。

### 2.2.2 链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂盆栽防效实验

可湿性粉剂盆栽防效实验共设置 8 个处理组，各组处理见 1.5.3。番茄早疫病菌孢子液和链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂喷洒间隔时间为 3 d，根据其先后顺序不同，分为链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂对番茄早疫病的预防处理(a1、b1 和

CK1)和治疗处理(a2、b2 和 CK1)。结果如图 4 所示，ZH-356 可湿性粉剂处理组相较于基质和番茄早疫病处理组，番茄苗叶片的病斑显著减少(图 4A)，用链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂进行预防处理的番茄苗病情指数也显著低于基质处理组和不喷施可湿性粉剂的对照组(图 4B)。先接种番茄早疫病菌再施用可湿性粉剂进行治疗处理，发现喷施链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂进行治疗后相较于喷施可湿性粉剂基质和不喷施可湿性粉剂的对照组，番茄苗叶片的病斑显著减少(图 4A)，用链霉菌 ZH-356 可湿性粉剂进行治疗处理的番茄苗病情指数也显著低于基质处理组和不喷施可湿性粉剂的对照组(图 4B)。相较于 a3、b3 和 CK2 组，其他接种番茄早疫病菌的处

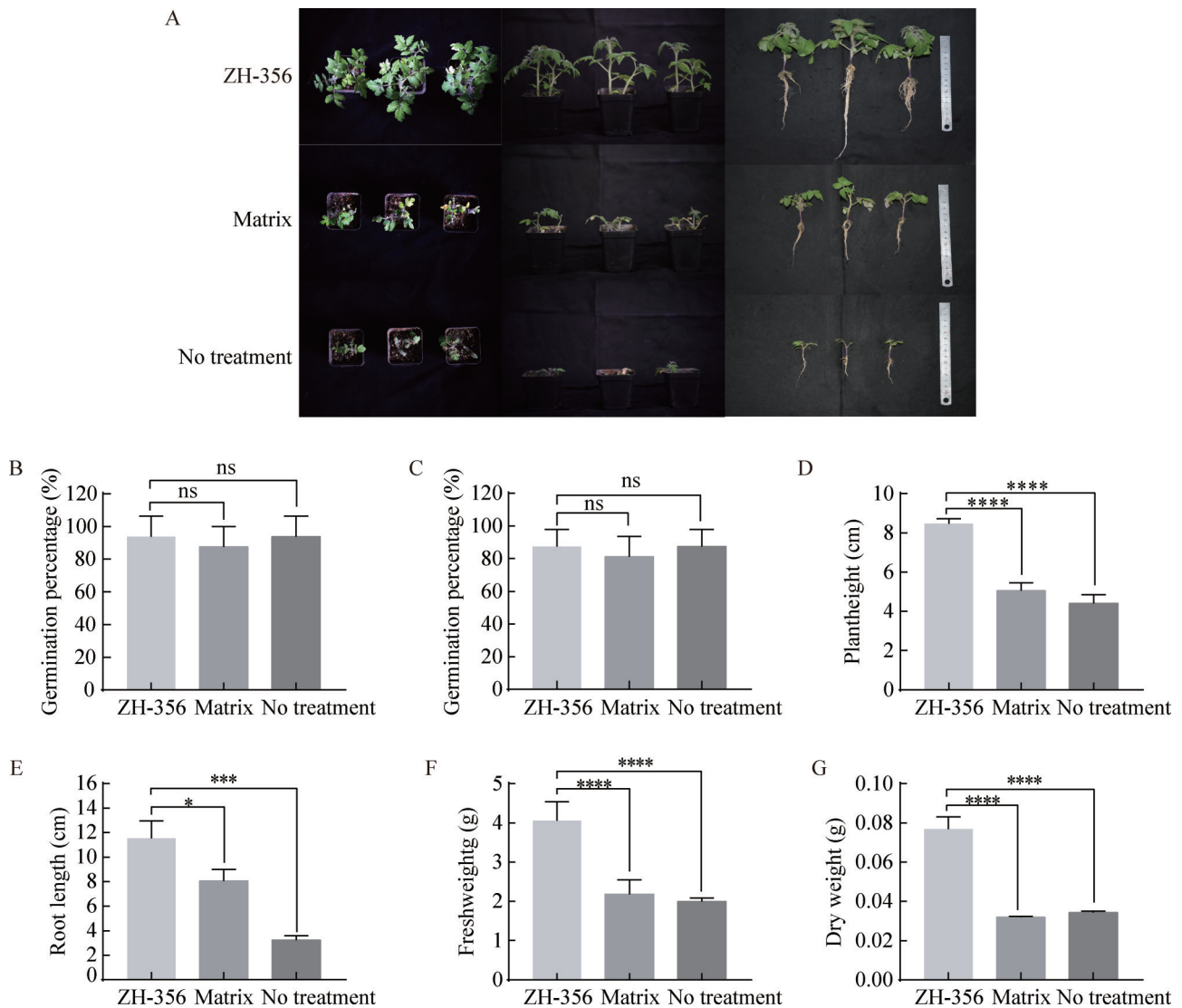


图3 链霉菌ZH-356种子包衣剂对番茄早疫病的防治作用

Figure 3 Effect of *Streptomyces* sp. ZH-356 seed coating agent on controlling tomato early blight. A: Tomato seeds treated with three different methods (*Streptomyces* sp. ZH-356 seed coating agent, matrix coating agent, and untreated control) were sown in soil mixed with a fermentation solution of *Alternaria solani*. After 21 d, the growth of the tomato seedlings in each treatment group was observed and photographed; B: Germination rates of tomato seeds in *Streptomyces* sp. ZH-356 seed coating treatment group, substrate treatment group and untreated group were determined without infection with *Alternaria solani*; C: Germination rates of tomato seeds in *Streptomyces* sp. ZH-356 seed coating treatment group, substrate treatment group and untreated group were determined after treatment with *Alternaria solani*. Plant height (D), root length (E), fresh weight (F) and dry weight (G) of tomato seedlings in *Streptomyces* sp. ZH-356 seed coating treatment group, substrate treatment group and untreated group were obtained after 21 d of treatment with *Alternaria solani*. All the data are representative of a minimum of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ , \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: No significant difference.

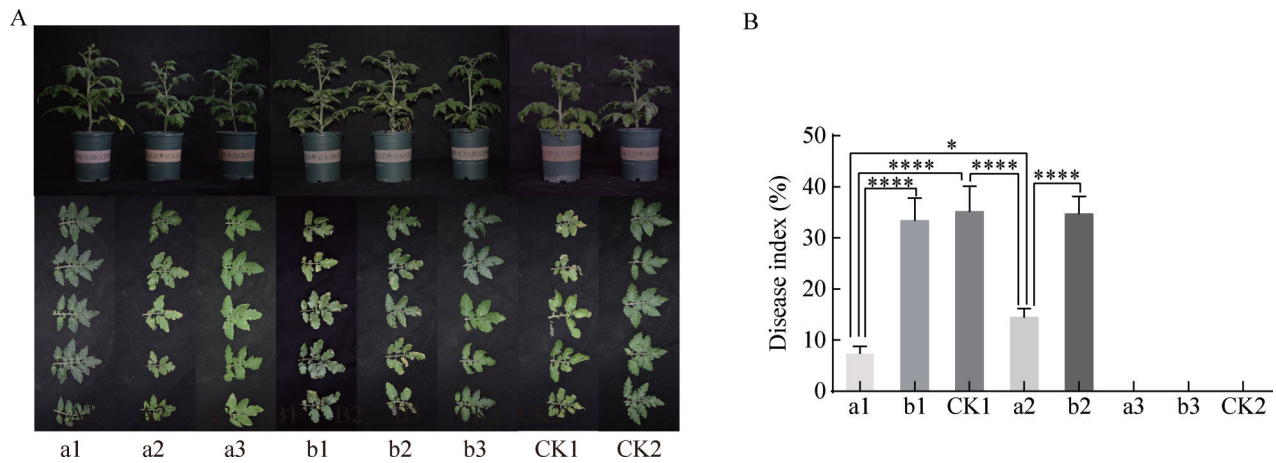


图4 链霉菌ZH-356可湿性粉剂对番茄早疫病的防治作用

Figure 4 Control effect of *Streptomyces* sp. ZH-356 wettable powder on tomato early blight. Leaf spot symptoms (A) and disease index (B) of tomato seedlings treated with apply wettable powder first and then inoculate *Alternaria solani* (a1), inoculate *Alternaria solani* first and then apply wettable powder (a2), apply wettable powder (a3), apply wettable powder matrix first and then inoculate *Alternaria solani* (b1), inoculation of *Alternaria solani* followed by application of wettable powder matrix (b2), apply wettable powder matrix (b3), inoculation of *Alternaria solani* (CK1) and untreated control (CK2). All the data are representative of a minimum of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

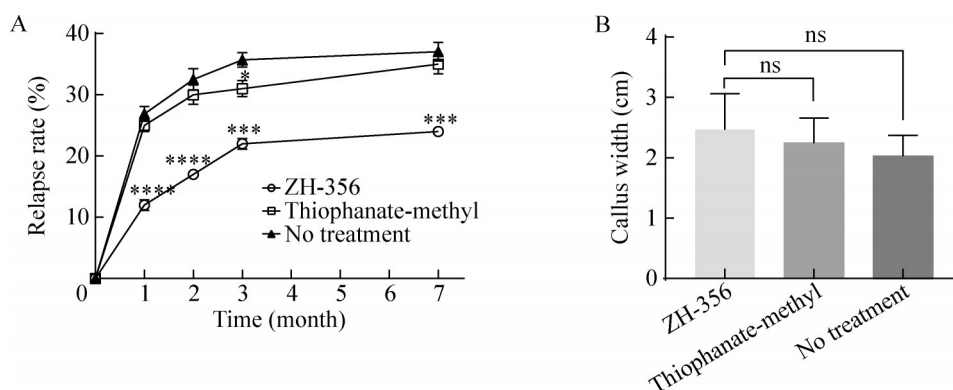
理组均显示出病害病症，说明该病害病症是由接种的番茄早疫病菌引起的(图 4)。综上所述，表明由链霉菌 ZH-356 制成的可湿性粉剂对番茄早疫病有良好的预防与治疗作用。另外，由于 a1 预防处理组的病情指数明显低于 a2 治疗处理组的病情指数，表明由链霉菌 ZH-356 制成的可湿性粉剂对番茄早疫病预防作用比治疗作用效果更好。

### 2.2.3 链霉菌 ZH-356 液体菌剂田间防效实验

2022–2023 年，连续 2 年在陕西省延安市安塞区高桥镇南沟村的山地苹果园中开展链霉菌 ZH-356 液体菌剂的田间试验。2022 年，对苹果树刮除发病处树皮后，分别涂抹链霉菌 ZH-356 胶水菌剂、甲基硫菌灵糊剂或不作处理，发现施用链霉菌 ZH-356 胶水菌剂后的苹果树腐烂病复发率显著低于施用甲基硫菌灵糊剂和无处理组(图 5A)。然而在处理 7 个月后，3 个处理组所

形成的愈伤组织宽度无明显差异(图 5B)。综上所述，由链霉菌 ZH-356 制成的胶水菌剂对苹果树腐烂病的防治效果明显优于甲基硫菌灵糊剂。

2023 年，设置苹果树在刮除发病处的树皮后分别涂抹骨胶菌剂、甲基硫菌灵糊剂和无处理，以及在不刮除发病处树皮的情况下分别涂抹骨胶菌剂、甲基硫菌灵糊剂和无处理等 6 种不同处理。结果如图 6 所示，刮除发病处树皮再涂抹链霉菌 ZH-356 骨胶菌剂后的苹果树腐烂病复发率显著低于涂抹甲基硫菌灵糊剂和无处理组(图 6A)。相比之下，不刮除发病处的树皮分别直接涂抹链霉菌 ZH-356 骨胶菌剂、甲基硫菌灵糊剂和无处理，结果不同处理之间的苹果树腐烂病复发率无显著差异，且它们都迅速复发，处理 3 个月后复发率均达到 100%(图 6B)，但是与甲基硫菌灵糊剂处理组类似，涂抹链霉



**图5** 链霉菌ZH-356胶水菌剂对苹果树腐烂病的田间防效作用

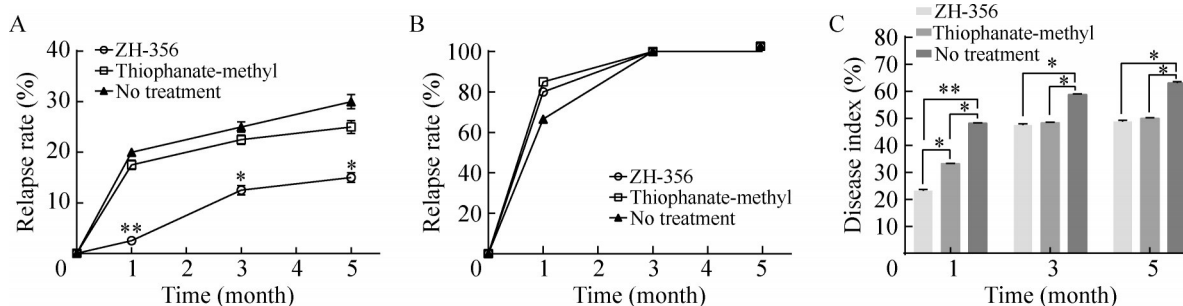
Figure 5 Field control effect of *Streptomyces* sp. ZH-356 glue inoculant against apple valsa canker. A: Recurrence rate of apple valsa canker at different time after treatment with ZH-356 biological agent; B: Width of callus at apple valsa canker spot after 7 months of treatment with ZH-356 biological agent. Treatment of thiophanate-methyl and no treatment were used as controls. All the data are representative of a minimum of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations. \*\*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ ; ns: No significant difference.

菌 ZH-356 骨胶菌剂的病情指数显著低于无处理组(图 6C), 说明在不刮除发病处树皮的情况下, 尽管链霉菌 ZH-356 骨胶菌剂不能有效遏制苹果树腐烂病的复发, 但能降低其病情指数。综上所述, 无论是否刮除发病处树皮, 链霉菌

ZH-356 制成的液体菌剂对苹果树腐烂病均具有一定的防治效果, 但刮除发病处树皮后的防治效果更好。

### 2.3 链霉菌 ZH-356 基因组测序及分析

链霉菌 ZH-356 的基因组经过测序和组装,



**图6** 链霉菌ZH-356骨胶菌剂对苹果树腐烂病的田间防效作用

Figure 6 Field control effect of *Streptomyces* sp. ZH-356 bone glue agent against apple valsa canker. A: Recurrence rate of apple valsa canker at different time after treatment with ZH-356 biological agent after scraping off the bark at the disease area; B: Recurrence rate of apple valsa canker at different time after treatment with ZH-356 biological agent after without scraping the bark at the disease area; C: Disease index of apple valsa canker at different time after treatment with ZH-356 biological agent after the bark of the disease area was not scraped. Treatment of thiophanate-methyl and no treatment were used as controls. All the data are representative of a minimum of three independent experiments. Error bars represent the standard deviations. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

得到一条总长度为 9 435 898 bp 的线性染色体结构 contig。该 contig 的 G+C 含量为 70.82%，N50 长度平均为 9 303 bp。预测到 8 432 个编码基因，总长度为 8 217 771 bp，平均长度为 975 bp，这些编码基因占全基因组的 87.09%。此外，该基因组包含 69 个 tRNA 基因、18 个 rRNA 基因、2 026 个小卫星序列和 68 个微卫星序列。同时，还含有 81 个重复序列和 2 402 个串联重复序列，长度范围在 1–828 bp，总长度为 120 175 bp，占基因组全长 1.273 6%。链霉菌 ZH-356 的基因组测序数据已提交至国家微生物科学数据中心(<https://nmdec.cn>)，基因组序列编号：NMDC60203801。

## 2.4 链霉菌 ZH-356 基因通用功能注释

### 2.4.1 物种注释

NR 数据库(non-redundant protein database)是一个可做物种分类用的非冗余的蛋白质数据库。使用 Diamond 软件将链霉菌 ZH-356 所有蛋白的氨基酸序列在 NR 数据库中进行比对，并根据比对结果进行基因注释，根据注释到的物种情况，统计注释到的物种及基因数目，结果显示链霉菌 ZH-356 与杜米托尔山链霉菌(*Streptomyces*

*durmitorensis*) 的匹配度最高(登录号为 NMDCX0001773)。使用 TYGS 在线工具对基因组进行比对及相似性分析，并构建系统发育树，基于 GBDP (genome blast distance phylogeny)法得到链霉菌 ZH-356 与不同物种间的 DNA-DNA 杂交值(DNA-DNA hybridization, dDDH)，结果如图 7 所示，链霉菌 ZH-356 与杜米托尔山链霉菌的亲缘关系最近。统计注释到的物种结果(登录号为 NMDCX0001773)，从基因组层面分析，链霉菌 ZH-356 不属于任何已测序的种(当满足 dDDH>70 时，才可认定比对的 2 个菌株是同一物种)。综上所述，链霉菌 ZH-356 是一个之前未被测序的链霉菌新种。

### 2.4.2 次级代谢产物合成基因簇预测与分析

利用 antiSMASH 程序(version 4.0.2)对链霉菌 ZH-356 基因组进行次级代谢产物合成基因簇的预测，共鉴定出 32 个次级代谢产物合成基因簇。其中，以编码萜类(terpene)、聚酮类(PKS)和非核糖体多肽类(NRPS)的合成基因簇为主要类型，共计 17 个，占基因组的 53.13%。其余 15 个基因簇主要参与核糖体合成和翻译后修饰、羊毛硫肽类化合物、氧化还原辅因子、吡啶、

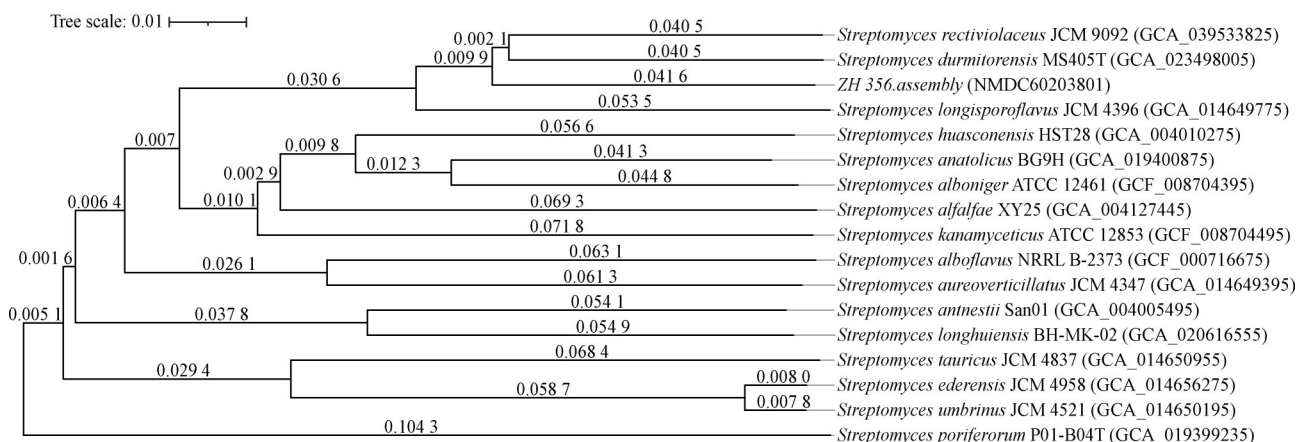


图7 链霉菌ZH-356系统发育树

Figure 7 Species evolutionary tree of *Streptomyces* sp. ZH-356. Numbers in parentheses are GenBank or National Microbiology Data Center accession numbers; Values above the branches are species diversity.

依克多因、丁内酯、黑色素、铁载体、套索肽等物质的生物合成(登录号为 NMDCX0001773)。本课题组前期研究发现链霉菌 ZH-356 在高氏一号液体培养基和 M1 液体培养基中均能产生黑色素<sup>[35]</sup>, 这与基因组信息相吻合, 提示该黑色素的生物合成基因簇可能为 ZH\_356\_GM005052–ZH\_356\_GM005063。

## 2.5 链霉菌 ZH-356 转录组测序分析

### 2.5.1 RNA 提取质量及测序质量分析

按照 1.5.1 制备实验组(A)和对照组(con)(图 8), 每组各有 3 个独立样本, 共 6 个样品进行质量检测, 并使用 fastp 软件进行样品质量控制, 2 组样品的 raw Q30 和 clean Q30 所占百分比均在超过 93%, 表明样品数据可以用于后续的实验数据分析。

### 2.5.2 样本间 KEGG 功能富集分析

采用上海美吉生物医药科技有限公司自主研发的流程, 对不同基因集(gene-set)中的基因进行 KEGG PATHWAY 富集分析, 以  $P < 0.05$  为阈值, 筛选基因集中显著富集的 KEGG 通路。与对照组相比, 实验组差异基因富集数量较多的通路包括双组分系统(two-component system)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)、泛酸和 CoA

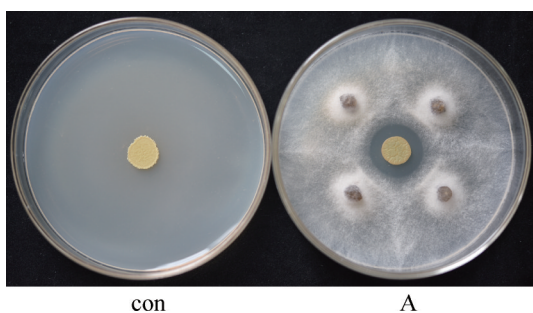


图8 不同处理样品图

Figure 8 Sample diagrams with different treatments. con: *Streptomyces* sp. ZH-356 no treatment served as control; A: *Streptomyces* sp. ZH-356 was antagonized with *Valsa mali*.

生物合成(pantothenate and CoA biosynthesis)以及脂肪酸生物合成(fatty acid biosynthesis)途径; 其中上调基因主要富集在双组分系统、嘌呤代谢(purine metabolism)、丙酮酸代谢、磷酸戊糖途径(pentose phosphate pathway)和三羧酸循环(TCA cycle)中; 实验组中其他次级代谢物生物合成途径的上调基因在硫代葡萄糖苷生物合成(glucosinolate biosynthesis)途径和各种抗生素的生物合成(biosynthesis of various antibiotics)中的富集程度较高(登录号为 NMDCX0001773)。说明与苹果树腐烂病菌对峙期间, 链霉菌 ZH-356 能够激活双组分系统感应机制, 并合成各种抗生素等活性物质作出反击。

### 2.5.3 链霉菌 ZH-356 样本间次级代谢产物合成基因簇表达差异分析

为了鉴定链霉菌 ZH-356 中的参与其抗植物病原真菌的次级代谢物生物合成基因簇, 通过转录组分析比较了实验组(A)和对照组(con)中次级代谢物生物合成基因簇的表达变化情况。与对照组(con)相比, 上调表达基因数目不超过 2 个的次级代谢物生物合成基因簇在本研究中被认定为未被激活的基因簇(登录号为 NMDCX0001773)。排除这些基因簇后, 只有 3 个基因簇在实验组(A)中的表达显著上调, 分别为编码合成 terpene、T3PKS 和 NRPS/T1PKS 的基因簇。其中编码合成 terpene 的基因簇 ZH\_356\_GM006641–ZH\_356\_GM006664 中, ZH\_356\_GM006650、ZH\_356\_GM006651、ZH\_356\_GM006654、ZH\_356\_GM006655、ZH\_356\_GM006656、ZH\_356\_GM006657 和 ZH\_356\_GM006663 等 7 个基因的表达均显著上调。同源比对发现, 该基因簇与杜米托尔山链霉菌(*Streptomyces durmitorensis*) MS405 菌株中的 M4V62\_07560–M4V62\_07630 基因簇同源, 该基因簇负责细菌藿多醇(bacteriohopanepolyols, BHPs)的生物合成。细菌

藁多醇是一种五环三萜类化合物, 主要存在于原核生物中, 具有促进细胞膜通透性和稳定性的作用<sup>[41]</sup>。然而, 目前尚未见文献报道该次级代谢物具有抗植物病原真菌的活性。编码合成 T3PKS 的基因簇 ZH\_356\_GM007118 - ZH\_356\_GM007159 中, ZH\_356\_GM007118、ZH\_356\_GM007119、ZH\_356\_GM007132 和 ZH\_356\_GM007150 等 4 个基因的表达均显著上调。同源比对发现, 这 4 个上调的基因分别与杜米托尔山链霉菌(*Streptomyces durmitorensis*) MS405 菌株中的 M4V62\_03890、M4V62\_04755、M4V62\_04815 和 M4V62\_04820 等基因同源, 分别编码天冬酰胺合成酶、假定的膜蛋白、TetR/AcrR 家族转录调节因子和 ABC 转运蛋白透性酶。然而, 这些基因的功能尚不清楚, 且均不属于次级代谢产物的核心生物合成基因。NRPS/T1PKS 基因簇 ZH\_356\_GM000343-ZH\_356\_GM000422 中, ZH\_356\_GM000344、ZH\_356\_GM000355、ZH\_356\_GM000409、ZH\_356\_GM000410、ZH\_356\_GM000411、ZH\_356\_GM000413、ZH\_356\_GM000414 和 ZH\_356\_GM000422 等 8 个基因的表达显著上调。同源比对发现, 该基因簇与杜米托尔山链霉菌(*Streptomyces durmitorensis*) MS405 菌株中的 M4V62\_39310-M4V62\_40270 基因簇同源。尽管该基因簇的功能尚未明确, 但上调表达的基因中包含了编码 I 型聚酮合酶的核心生物合成基因 ZH\_356\_GM000409。因此, 推测 NRPS/T1PKS 基因簇 ZH\_356\_GM000343-ZH\_356\_GM000422 可能是链霉菌 ZH-356 中参与抗植物病原真菌的活性物质的生物合成基因簇, 而 ZH\_356\_GM000409 可能是该活性物质的核心生物合成基因。

### 3 讨论与结论

本研究通过 GFP 荧光标记的植物定殖分析,

发现链霉菌 ZH-356 能够在番茄苗和小麦苗中稳定定殖。基于 ZH-356 制备的种子包衣剂在不影响番茄种子发芽率的前提下, 可有效保护番茄苗免受番茄早疫病菌的侵染。ZH-356 可湿性粉剂对番茄早疫病具有良好的预防和治疗效果, 且预防效果优于治疗效果。ZH-356 液体菌剂, 无论是否刮除发病处树皮, 均对苹果树腐烂病具有一定的防治效果, 但刮除病斑树皮后的防治效果更好, 且优于甲基硫菌灵糊剂。这些结果表明, 链霉菌 ZH-356 具有良好的环境适应性和卓越的生物防治潜力。为进一步探究 ZH-356 的生防作用机制, 本研究结合基因组学和转录组学分析, 发现该生防菌不属于任何已测序的链霉菌种类; 预测其含有 32 个以 PKS 和 NRPS 为主的次级代谢产物合成基因簇; 通过转录组学分析, 推测 NRPS/T1PKS 基因簇 ZH\_356\_GM000343-ZH\_356\_GM000422 可能是链霉菌 ZH-356 中参与抗植物病原真菌的活性物质的生物合成基因簇, 其中 ZH\_356\_GM000409 可能是该活性物质的核心生物合成基因。这些发现为链霉菌 ZH-356 的产业化应用和拮抗植物病原真菌的机制研究奠定了基础。

在植物与微生物互作的研究中, 链霉菌作为一种重要的植物内生菌, 因其多功能性而备受关注。生防链霉菌在植物体内定殖后可通过竞争、拮抗等多种方式抑制病原菌。例如, 刘琴等<sup>[42]</sup>发现娄彻氏链霉菌 SR-1102 定殖于番茄根系后, 通过竞争生存环境及拮抗真菌作用改变根系微生物群落, 抑制土壤中真菌的增殖, 从而防治番茄枯萎病。相比之下, 由于田间环境复杂, 许多生防链霉菌因无法有效定殖而失去应用价值<sup>[43]</sup>。王素芳等<sup>[44]</sup>研究发现, 田间土壤温湿度过高会抑制生防链霉菌 S506 的定殖能力, 从而降低其生防效果。同样地, 生防链霉菌在植物中的长期有效定殖是其能否稳定、持

久发挥生防效果的重要指标<sup>[45]</sup>。虽然本研究的链霉菌 ZH-356 能够在植物体内定殖并防治植物真菌病害,但其定殖过程是否影响植物根际和内生微生物群落的组成,以及田间复杂环境对其定殖效果的影响,均有待进一步深入研究。此外,部分生防链霉菌在帮助植物发挥抗病作用的同时还表现出对植物的促生作用。例如,赵娟等<sup>[46]</sup>研究发现 3 株具有广谱拮抗特性的链霉菌可促进甜瓜种子的胚根、胚轴生长,提高种子活力,并增强甜瓜幼苗的酚氧化酶活性。刘玉涛等<sup>[47]</sup>研究发现娄彻氏链霉菌 D74 种子包衣剂可加快小麦幼穗分化,促进小麦各时期的鲜重和干重增加,提高硝酸还原酶活性和光合速率。本研究中,链霉菌 ZH-356 种子包衣剂处理后的番茄幼苗长势明显优于基质处理和无处理组,表明其可能对植物具有促生作用,但由于本研究缺乏未侵染病原菌的对照实验,因此无法确定该作用。因此,链霉菌 ZH-356 对植物的潜在促生作用有待于后续进一步研究确认。

对于苹果树腐烂病的防治,链霉菌 ZH-356 菌剂在田间已展现出一定效果。为确保其疗效,刮除病斑上的树皮成为一项关键且不可或缺的步骤。然而,刮除病斑再抹药的施药方式人工成本较高,难以实现降本增效的目标。因此,后续还需对 ZH-356 菌剂配方进行改良,旨在在不刮除病斑的情况下也能有效防治苹果树腐烂病。例如,可以探索内吸型制剂的应用,通过提高与植物靶标部位接触机会从而提高药剂的利用率,在与植物接触过程中利用渗透作用进入植物体内并随水分循环达到植物各部分发挥防治作用<sup>[48]</sup>。一些植物所需的营养物质(如甘氨酸、葡萄糖和吡啶乙酸等)可以增强药剂的导向性,是目前提升农药内吸性的手段之一<sup>[48-50]</sup>。通过添加这些营养物质能否提升 ZH-356 菌剂的内吸性仍需深入研究。另外,采取树干内部给药的

方式,如将菌剂通过注射器或喷雾器直接注入树木的主干、枝干或树干内的注射法给药,在树干上打孔,通过输液装置将菌剂注入树体内的输液法给药等也是 ZH-356 菌剂防治苹果树腐烂病需要刮树皮这一问题的解决办法之一。

本研究对链霉菌 ZH-356 的基因组进行分析,结果显示其拥有 32 个以 PKS 和 NRPS 为主的次级代谢产物合成基因簇,PKS 和 NRPS 负责合成链霉菌的 2 类主要次级代谢产物,具有广泛的生物活性<sup>[51]</sup>。PKS 化合物在抗菌、抗肿瘤、免疫抑制以及酶抑制等领域展现出强大活性,例如红霉素和四环素等聚酮类抗生素已广泛应用于临床和农业防治<sup>[52]</sup>,而 NRPS 则通过其独特的合成途径形成复杂的分子结构,在抗菌活性和抗真菌活性中展现显著优势<sup>[53]</sup>。此外,antiSMASH 软件预测 ZH-356 还存在合成羊毛硫肽类化合物、铁载体、套索肽和黑色素等的基因簇。羊毛硫肽类化合物具有抗菌、抗肿瘤和抗病毒等活性<sup>[54]</sup>,如 I 型羊毛硫肽类化合物 actagardine 可与合成细胞壁的前体 lipid II 结合,阻断细胞壁合成,从而对革兰氏阳性细菌产生抗菌作用<sup>[55]</sup>; III 型羊毛硫肽类化合物 avermipeptin B 对革兰氏阴性细菌表现出强抑制活性<sup>[56]</sup>。铁载体对微生物的铁摄取至关重要,生防菌通过铁载体竞争环境中的铁元素供给自身营养,同时,也可与病原菌竞争铁元素从而达到防治病原菌的作用<sup>[57]</sup>。套索肽作为多肽类天然产物,部分套索肽已显示出对病原菌的广谱抗菌性<sup>[58]</sup>,例如链霉菌 NRRL F5369 产生的 I 类套索肽 arcumycin 具有抑制革兰氏阳性细菌的生物活性<sup>[59]</sup>。这些结果暗示链霉菌 ZH-356 除了能拮抗植物病原真菌外,可能还具有抗菌的功能。黑色素具有防止蛋白质降解、光子屏蔽和化学保护等作用,特别是对紫外线和辐射具有强抵抗性,从而可增强生防菌在高紫外线

环境下的生存能力<sup>[35]</sup>。无论是前期的发酵实验<sup>[35]</sup>, 还是本研究的基因组分析结果都证实链霉菌 ZH-356 能产生黑色素。因此, 它是一株兼具生防和产黑色素特性的生防菌, 暗示基于该菌制备的生防菌剂在大田使用时将具有强的环境适应性。

将生防菌开发成微生物制剂并应用于田间环境, 以发挥对农业中植物病害的防治作用, 是开发生防菌的最终目的。例如, Kemira 公司、赫尔辛基大学和芬兰农业研究中心合作研发的商品化生物杀真菌剂 MYCOSTOP<sup>®</sup>, 是由从苔藓中分离出的灰绿链霉菌的孢子和菌丝制成的一种生物杀菌剂, 对由土壤传播的植物病原真菌, 特别是镰孢菌属具有良好的抑制作用, 其活菌剂可用于防治许多蔬菜和观赏性植物的病害<sup>[60]</sup>。我国农科院研发的“5406”菌肥, 是由细黄链霉菌制成, 不仅能抑制多种植物病原真菌的生长, 还具有解钾、解磷、保苗和增产的作用, 并且能够分泌对植物有促生作用的激素<sup>[61]</sup>。然而目前由链霉菌制成的生防活菌剂的商业化应用依然较少。一方面, 链霉菌生长周期慢、发酵时间长、培养条件要求严格, 且培养成本较其他细菌和真菌更高<sup>[29]</sup>; 另一方面, 链霉菌在应用中对生存环境要求高, 适应外界条件能力弱, 作为外来菌株难以迅速定殖在植物体内<sup>[30-31]</sup>。本研究表明链霉菌 ZH-356 可以长期有效地定殖在植物体内, 其培养条件要求不高, 发酵周期短, 培养成本低, 并且分泌的抑菌活性物质在不同温度和酸碱度环境中具有高度稳定性<sup>[35]</sup>。同时, 它还能分泌黑色素以应对外界环境中的紫外线。在盆栽环境和田间环境中, 链霉菌 ZH-356 对植物真菌性病害已显示出显著的防治效果。因此, 链霉菌 ZH-356 在植物病害防治方面具有广阔的商业化应用前景。

综上所述, 链霉菌 ZH-356 具有很强的植物

病害生防作用。深入解析其作用机制将为可持续农业的发展提供重要理论依据。进一步研究链霉菌 ZH-356 次级代谢产物的合成机制及其环境适应性, 有望揭示其拮抗活性背后的深层次调控网络。这不仅有助于理解链霉菌在生态系统中的复杂行为, 还能指导其生防制剂的优化开发。同时, 在此基础上未来可通过基因编辑技术或合成生物学手段重构链霉菌 ZH-356 的次级代谢途径, 以提高其目标代谢产物的产量、活性或环境适应性。另外, 将链霉菌 ZH-356 与其他不同的生防菌株及其代谢产物组合使用, 或在不同农业环境中合理施用, 也不失为一种综合防治植物病害的新策略。

## 作者贡献声明

刘安东: 参与实验实施、数据采集与分析、论文撰写与修改; 宁婉清: 参与实验实施、数据分析、论文修改与完善; 朱旭飞: 参与实验实施, 协助论文修改; 张博琳: 参与实验实施; 屈小娜: 参与实验实施; 张晋龙: 指导实验实施, 评审实验过程与数据, 提供修改意见; 徐成楠: 指导实验实施, 评审实验过程与数据; 李广伟: 指导实验实施, 提供修改意见; 张向前: 对实验结果进行评审, 提供修改意见; 王延峰: 参与数据讨论与解读; 成娟丽: 负责实验规划与指导, 参与论文撰写、修改及定稿, 提供语言润色; 林金水: 负责研究构思、方案设计与实验规划, 指导研究方向与数据解读, 审核论文撰写与定稿。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明, 在本研究的设计、数据收集、数据分析、论文撰写及发表过程中, 不存在任何经济、个人或学术利益冲突。

## 参考文献

- [1] BARKA EA, VATSA P, SANCHEZ L, GAVEAU-VAILLANT N, JACQUARD C, KLENK HP, CLÉMENT C, OUHDOUCH Y, van WEZEL GP. Taxonomy, physiology, and natural products of actinobacteria[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2016, 80(1): 1-43.
- [2] 薛正莲, 王珊, 孙俊峰, 王芳, 周健. 链霉菌形态分化与次级代谢产物合成的研究进展[J]. *微生物学报*, 2021, 61(12): 3870-3886.  
XUE ZL, WANG S, SUN JF, WANG F, ZHOU J. Research progress on morphological differentiation and secondary metabolite biosynthesis of *Streptomyces*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(12): 3870-3886 (in Chinese).
- [3] ZHANG LIN, KAILI C, GAN Y, BINGHAI D, MEI X. Research progress on secondary metabolites of *Streptomyces albireticuli* and *Streptomyces albofauvus*[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2021, 46(2): 89-96.
- [4] QUINN GA, BANAT AM, ABDELHAMEED AM, BANAT IM. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery[J]. *Journal of Medical Microbiology*, 2020, 69(8): 1040-1048.
- [5] 何亚文, MAZHARI AS, 崔莹, 姚润贤, JODI LWF, HAN LL, 郝祥蕊, 张红艳. 高产杀粉蝶菌素的链霉菌鉴定及其拮抗水稻白叶枯菌活性研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(4): 1447-1459.  
HE YW, MAZHARI AS, CUI Y, YAO RX, JODI LWF, HAN LL, HAO XR, ZHANG HY. A piericidin-producing *Streptomyces* strain: identification and antagonistic activity on *Xanthomonas oryzae*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(4): 1447-1459 (in Chinese).
- [6] 董雷, 韩嘉瑞, 李帅, 岳凌霄, 李文均. 链霉菌最新研究进展[J]. *微生物学报*, 2023, 63(5): 1815-1832.  
DONG L, HAN JR, LI S, YUE LX, LI WJ. The latest research progress of streptomycetes[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(5): 1815-1832 (in Chinese).
- [7] EID J, FEHR A, GRAY J, LUONG K, LYLE J, OTTO G, PELUSO P, RANK D, BAYBAYAN P, BETTMAN B, BIBILLO A, BJORNSON K, CHAUDHURI B, CHRISTIANS F, CICERO R, CLARK S, DALAL R, DEWINTER A, DIXON J, FOUQUET M, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules[J]. *Science*, 2009, 323(5910): 133-138.
- [8] IKEDA H, ISHIKAWA J, HANAMOTO A, SHINOSE M, KIKUCHI H, SHIBA T, SAKAKI Y, HATTORI M, ÔMURA S. Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*[J]. *Nature Biotechnology*, 2003, 21(5): 526-531.
- [9] BENTLEY SD, CHATER KF, CERDEÑO-TÁRRAGA AM, CHALLIS GL, THOMSON NR, JAMES KD, HARRIS DE, QUAIL MA, KIESER H, HARPER D, BATEMAN A, BROWN S, CHANDRA G, CHEN CW, COLLINS M, CRONIN A, FRASER A, GOBLE A, HIDALGO J, HORNSBY T, et al. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* a3(2)[J]. *Nature*, 2002, 417(6885): 141-147.
- [10] KINASHI H, SHIMAJI M, SAKAI A. Giant linear plasmids in *Streptomyces* which code for antibiotic biosynthesis genes[J]. *Nature*, 1987, 328(6129): 454-456.
- [11] ELLIOT M, DAMJI F, PASSANTINO R, CHATER K, LESKIW B. The *bldd* gene of *Streptomyces coelicolor* a3(2): a regulatory gene involved in morphogenesis and antibiotic production[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(6): 1549-1555.
- [13] CHALLIS GL, HOPWOOD DA. Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(2): 14555-14561.
- [14] JIANQIANG H, SHI J, MOLLE V, SOHLBERG B, WEAVER D, BIBB M, KAROONUTHAISIRI N, LIH CJ, KAO C, BUTTNER M, COHEN S. Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 58: 1276-1287.
- [15] MEDEMA MH, de ROND T, MOORE BS. Mining genomes to illuminate the specialized chemistry of life[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2021, 22(9): 553-571.
- [16] 殷瑜, 戈梅, 陈代杰. 新方法新技术与新型抗生素发现[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(10): 1874-1884.  
YIN Y, GE M, CHEN DJ. New methods, new technologies and discovery of novel antibiotics[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(10): 1874-1884 (in Chinese).
- [17] RATH G, NIVEDITA S, BEHERA SS, BEHERA HT, GOUDA SK, RAINA V, ACHARY KG, BEHERA SK, RAY L. L-asparaginase producing novel *Streptomyces* sp. Hb2ag: optimization of process parameters and whole genome sequence analysis[J]. *3 Biotech*, 2023, 13(6): 201.
- [18] PRAKASHAM RS, RAO CS, RAO RS, LAKSHMI GS, SARMA PN. L-asparaginase production by isolated *Staphylococcus* sp.-6A: design of experiment considering interaction effect for process parameter optimization[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(5): 1382-1391.
- [19] WORLD HEALTH ORGANIZATION. World health organization model list of essential medicines: 21st list 2019[EB/OL]. [2024-11-02]. <https://iris.who.int/handle/10665/325771.js>.
- [20] BHARDWAJ A, AGRAWAL P. A review fungal endophytes: as a store house of bioactive compound[J]. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2014, 3: 228-237.
- [21] AGGARWAL N, THIND SK, SHARMA S. Role of secondary metabolites of actinomycetes in crop protection[M]//*Plant Growth Promoting Actinobacteria*. Singapore: Springer Singapore; 2016: 99-121.
- [22] SAVARY S, FICKE A, AUBERTOT JN, HOLLIER C. Crop losses due to diseases and their implications for global food production losses and food security[J]. *Food Security*, 2012, 4(4): 519-537.
- [23] BHARATHI R, VIVEKANANTHAN R, HARISH S, RAMANATHAN A, SAMIYAPPAN R. Rhizobacteria-based bio-formulations for the management of fruit rot infection in chillies[J]. *Crop Protection*, 2004, 23(9): 835-843.
- [24] QUWAIE AL, DIANA A. The role of *Streptomyces* species in controlling plant diseases: a comprehensive review[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2024, 53(1): 1-14.
- [25] 许晓雯, 陈宸, 陈夕军. 生防放线菌活性代谢产物研究

- 进展[J]. 生物灾害科学, 2023, 46(1): 86-93.  
XU XW, CHEN C, CHEN XJ. Advance in the secondary metabolites of biocontrol actinomycetes[J]. Biological Disaster Science, 2023, 46(1): 86-93 (in Chinese).
- [26] 宋桂芳, 张世文, 庄红娟, 周鹏飞, 陈弘扬, 宋强, 方兵. 农用地大环内酯类抗生素与杀菌剂残留污染评价[J]. 环境化学, 2022, 41(7): 2309-2319.  
SONG GF, ZHANG SW, ZHUANG HJ, ZHOU PF, CHEN HY, SONG Q, FANG B. Pollution assessment of macrolide antibiotics and fungicides residues in agricultural land[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41(7): 2309-2319 (in Chinese).
- [27] 骆焱平, 王兰英. 一种金黄垂直链霉菌 hn6 可湿性粉剂及其制备方法: CN201510715757.3[P]. 2016-03-16.  
LUO YP, WANG LY. Streptomyces aureus hn6 wettable powder and preparation method thereof: CN201510715757.3[P]. 2016-03-16.
- [28] GOMES EDB, DIAS LRL, MIRANDA RDCMD. Actinomycetes bioactive compounds: biological control of fungi and phytopathogenic insect[J]. African Journal of Biotechnology, 2018, 17(17): 552-559.
- [29] 薛应钰, 李兴昱, 李发康, 苟攀宁, 李龙, 徐秉良. 苹果树腐烂病生防真菌 Z-12A 的鉴定及其生防效果[J]. 微生物学通报, 2021, 48(1): 57-69.  
XUE YY, LI XY, LI FK, GOU PN, LI L, XU BL. Identification of Z-12A fungus for biocontrol of apple tree canker[J]. Microbiology China, 2021, 48(1): 57-69 (in Chinese).
- [30] 赵永龙, 赵盼, 曹晶晶, 汪志琴, 刘璐, 仲乃琴. 疮痍链霉菌拮抗菌定向筛选及其功能评价[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2624-2641.  
ZHAO YL, ZHAO P, CAO JJ, WANG ZQ, LIU L, ZHONG NQ. Targeted screening and functional evaluation of the bacterial antagonists to *Streptomyces scabies*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2624-2641 (in Chinese).
- [31] 吕昂, 吴明德, 张静, 杨龙, 李国庆. 链霉菌 3-10 发酵液及提取物的稳定性研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 250-257.  
LYU A, WU MD, ZHANG J, YANG L, LI GQ. Stability of cultural filtrate and crude extract produced by *Streptomyces* sp. 3-10[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 250-257 (in Chinese).
- [32] 陈杰, 朱渭兵, 郭天文, 谭雪莲, 王东胜, 马云艳, 薛泉宏. 放线菌定殖及其对马铃薯根区土壤微生物的影响[J]. 西北农业学报, 2015, 24(10): 150-158.  
CHEN J, ZHU WB, GUO TW, TAN XL, WANG DS, MA YY, XUE QH. Colonization of actinomycetes and their effect on microorganisms in rhizosphere soil of potato[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2015, 24(10): 150-158 (in Chinese).
- [33] 杨秀荣, 田涛, 孙淑琴, 刘亦学. GFP 标记生防细菌 B579 及其定殖能力检测[J]. 植物病理学报, 2013, 43(1): 82-87.  
YANG XR, TIAN T, SUN SQ, LIU YX. GFP-expressing *Bacillus subtilis* B579 strain and its colonization detection[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2013, 43(1): 82-87 (in Chinese).
- [34] YUAN S, WANG L, WU K, SHI J, WANG M, YANG X, SHEN Q, SHEN B. Evaluation of *Bacillus*-fortified organic fertilizer for controlling tobacco bacterial wilt in greenhouse and field experiments[J]. Applied Soil Ecology, 2014, 75: 86-94.
- [35] 张恒, 成娟丽, 朱旭飞, 张嵩林, 闫靓文, 林金水. 拮抗植物病原真菌链霉菌菌株 ZH-356 的鉴定及其生防评价[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3421-3436.  
ZHANG H, CHENG JL, ZHU XF, ZHANG SL, YAN LW, LIN JS. Identification and biocontrol evaluation of *Streptomyces* sp. strain ZH-356 antagonistic to plant pathogenic fungi[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3421-3436 (in Chinese).
- [36] 刘晓瑜, 马玉超. 生防链霉菌 SSD49 的绿色荧光蛋白标记及其在毛白杨组培苗中的定殖[J]. 生物技术通报, 2016, 32(9): 197-202.  
LIU XY, MA YC. Green fluorescent protein marker of biocontrol *Streptomyces* SSD49 and its colonization on the *Populus tomentosa* somaclone[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(9): 197-202 (in Chinese).
- [37] 霍普伍德. 链霉菌遗传操作实验手册[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988: 165-170.  
HOPWOOD DA. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: a Laboratory Manual[M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1988: 165-170 (in Chinese).
- [38] 周林, 程萍, 喻国辉, 黎永坚, 杨紫红. 枯草芽孢杆菌 TR21 在香蕉体内及根际的定殖动态[J]. 中国农学通报, 2010, 26(19): 392-396.  
ZHOU L, CHENG P, YU GH, LI YJ, YANG ZH. Colonization of *Bacillus subtilis* strain TR21 in banana plant and rhizosphere[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(19): 392-396 (in Chinese).
- [39] 王易. 新型生物种衣剂的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学硕士学位论文, 2014.  
WANG Y. Study of new seed coating agent[D]. Changsha: Master's Thesis of Hunan Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [40] 朱海霞, 马永强. 内生菌 HL-1 可湿性粉剂研制及其除草活性评价[J]. 草地学报, 2019, 27(5): 1301-1308.  
ZHU HX, MA YQ. Development of the wettable powder of fungal endophyte HL-1 and evaluation of its herbicidal activity[J]. Acta Agrestia Sinica, 2019, 27(5): 1301-1308 (in Chinese).
- [41] ZHANG HR, CHEN YY, LI YQ, SONG YX, MA JY, JU JH. Secondary metabolites and biosynthetic gene clusters analysis of deep-sea hydrothermal vent-derived *Streptomyces* sp. SXSIO ZS0520[J]. Marine Drugs, 2022, 20(6): 393.
- [42] 刘琴, 徐健, 祁建杭, 刘怀阿, 李传明, 韩光杰, 徐彬, 陆玉荣, 孙俊. 娄氏链霉菌 SR-1102 对番茄枯萎病的防效 I 及根际微生物的影响[J]. 江苏农业学报, 2020, 36(5): 1133-1138.  
LIU Q, XU J, QI JH, LIU HE, LI CM, HAN GJ, XU B, LU YR, SUN J. Control effect of *Streptomyces rochei* SR-1102 on *Fusarium* wilt of tomato and the impact on rhizosphere microorganisms[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2020, 36(5): 1133-1138 (in Chinese).
- [43] 戴蓬博, 蓝星杰, 张伟卫, 甘良, 王阳, 宗兆锋. 生防菌株 SC11 的鉴定, 定殖及对棉花枯萎病防治效果研究[J]. 植物病理学报, 2016, 46(2): 273-279.  
DAI PB, LAN XJ, ZHANG WW, GAN L, WANG Y, ZONG ZF. Identification, colonization and disease suppressive effect of strain SC11 against cotton *Fusarium* wilt[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2016, 46(2): 273-279 (in Chinese).

- [44] 王素芳, 王占武, 李洪涛, 张翠绵. 土壤因子对链霉菌 S506 定殖和促生功能的影响[J]. 中国生态农业学报, 2009, 17(2): 335-338.  
WANG SF, WANG ZW, LI HT, ZHANG CM. Effect of soil on colonization and growth promotion-function of *Streptomyces* sp. S506[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2009, 17(2): 335-338 (in Chinese).
- [45] 殷幼平, 袁训娥, 李强, 王中康. 生防菌枯草芽孢杆菌 CQBS03 的绿色荧光蛋白基因标记及其在柑橘叶片上的定殖[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3555-3563.  
YIN YP, YUAN XE, LI Q, WANG ZK. Construction of green fluorescent protein gene tagged biocontrol bacteria *Bacillus subtilis* CQBS03 and its colonization on the *Citrus* leaves[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2010, 43(17): 3555-3563 (in Chinese).
- [46] 赵娟, 杜军志, 薛泉宏, 段春梅, 王玲娜, 申光辉, 陈秦, 薛磊. 3 株放线菌对甜瓜幼苗的促生与抗性诱导作用[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(2): 109-116.  
ZHAO J, DU JZ, XUE QH, DUAN CM, WANG LN, SHEN GH, CHEN Q, XUE L. The growth-promoting effect and resistance induction of 3 antagonistic *actinomycetes* on *Cucumis melo* L. [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2010, 38(2): 109-116 (in Chinese).
- [47] 刘玉涛, 杨斌, 张凯, 马军妮, 温宏伟, 来航线, 薛泉宏. 链霉菌剂种子包衣对小麦幼穗分化及生物学特性的影响[J]. 麦类作物学报, 2020, 40(8): 990-1001.  
LIU YT, YANG B, ZHANG K, MA JN, WEN HW, LAI HX, XUE QH. Effect of seed coating with *Streptomyces* on panicle differentiation and biological characteristics of wheat[J]. Journal of Triticeae Crops, 2020, 40(8): 990-1001 (in Chinese).
- [48] 范添乐, 宋玥颐, 陈小军, 方天平, 沈殿晶, 徐王瑾, 王欣宇. 农药内吸性的研究现状与改善策略[J]. 农药学学报, 2020, 22(4): 579-585.  
FAN TL, SONG YY, CHEN XJ, FANG TP, SHEN DJ, XU WJ, WANG XY. Recent advances and improvement strategies for pesticide uptake ability[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2020, 22(4): 579-585 (in Chinese).
- [49] XIE Y, ZHAO JL, WANG CW, YU AX, LIU N, CHEN L, LIN F, XU HH. Glycinergic-fipronil uptake is mediated by an amino acid carrier system and induces the expression of amino acid transporter genes in *Ricinus communis* seedlings[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(19): 3810-3818.
- [50] 李俊凯, 徐汉虹, 江定心, 赵勇, 刘新清. 吡啶乙酸引导下三唑醇在大豆植株中的传导与积累研究初报[J]. 农药学学报, 2005, 7(3): 259-263.  
LI JK, XU HH, JIANG DX, ZHAO Y, LIU XQ. The preliminary study of transportation and accumulation of triadimenol in soybean seedlings induced by indoleacetic acid[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2005, 7(3): 259-263 (in Chinese).
- [51] LACEY HJ, RUTLEDGE PJ. Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species[J]. Molecules, 2022, 27(3): 887.
- [52] WANG J, ZHANG R, CHEN X, SUN X, YAN Y, SHEN X, YUAN Q. Biosynthesis of aromatic polyketides in microorganisms using type II polyketide synthases[J]. Microbial Cell Factories, 2020, 19(1): 1-11.
- [53] VILA FARRES X, CHU J, INOYAMA D, TERNEI MA, LEMETRE C, COHEN LJ, CHO W, REDDY BVB, ZEBROSKI HA, FREUNDLICH JS. Antimicrobials inspired by nonribosomal peptide synthetase gene clusters[J]. Journal of the American Chemical Society, 2017, 139(4): 1404-1407.
- [54] 杨赞, 梁艺璇, 张军, 何增国. 放线菌来源的羊毛硫肽研究进展[J]. 微生物学报, 2022, 62(9): 3289-3305.  
YANG Z, LIANG YX, ZHANG J, HE ZG. Research progress of lanthipeptides from actinomycetota[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(9): 3289-3305 (in Chinese).
- [55] CASTIGLIONE F, LAZZARINI A, CARRANO L, CORTI E, CICILIATO I, GASTALDO L, CANDIANI P, LOSI D, MARINELLI F, SELVA E. Determining the structure and mode of action of microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens[J]. Chemistry and Biology, 2008, 15(1): 22-31.
- [56] KOPONEN O, TOLONEN M, QIAO M, WAHLSTRÖM G, HELIN J, SARIS PEJ. *Nisc* is required for the dehydration and *nisc* for the lantionine formation in the post-translational modification of nisin[J]. Microbiology, 2002, 148(11): 3561-3568.
- [57] 张博阳, 朱天辉, 韩珊, 王莹, 李姝江, 譙天敏. 桑氏链霉菌 KJ40 全基因组测序及分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 805-818.  
ZHANG BY, ZHU TH, HAN S, WANG Y, LI SJ, QIAO TM. Whole-genome sequencing and analysis of *Streptomyces sampsonii* KJ40[J]. Microbiology China, 2018, 45(4): 805-818 (in Chinese).
- [58] HEGEMANN JD, ZIMMERMANN M, XIE X, MARAHIEL MA. Lasso peptides: an intriguing class of bacterial natural products[J]. Accounts of chemical research, 2015, 48(7): 1909-1919.
- [59] STARIHA LM, McCAFFERTY DG. Discovery of the class I antimicrobial lasso peptide arcumycin[J]. ChemBioChem, 2021, 22(16): 2632-2640.
- [60] WHITE JG, LINFIELD CA, LAHDENPERA ML, UOTI J. Mycostop-a novel biofungicide based on *Streptomyces griseoviridis*[J]. Developments in Agricultural & Managed Forest Ecology, 1991, 23: 258-263.
- [61] 李智. 5406 抗生菌肥特性及使用方法[J]. 生物加工过程, 2003, 1(2): 50-52.  
LI Z. Character and using methods of antagonistic fertilizer[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2003, 1(2): 50-52 (in Chinese).