

一株贝莱斯芽孢杆菌鉴定、全基因组学分析及其抗病促生特性

王春玲, 黄钰婷, 刘星, 徐良雄, 王艳君, 肖海霞, 朱柏诗, 毛露甜*

惠州学院 生命科学学院, 广东 惠州

王春玲, 黄钰婷, 刘星, 徐良雄, 王艳君, 肖海霞, 朱柏诗, 毛露甜. 一株贝莱斯芽孢杆菌鉴定、全基因组学分析及其抗病促生特性[J]. 微生物学报, 2025, 65(2): 745-757.

WANG Chunling, HUANG Yuting, LIU Xing, XU Liangxiong, WANG Yanjun, XIAO Haixia, ZHU Boshi, MAO Lutian. Identification, genomic analysis, and disease-resistant and plant growth-promoting characterization of a *Bacillus velezensis*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(2): 745-757.

摘要: 植物病原菌侵染引起的作物病害给全球农业带来了巨大危害, 而生物防治因其有效性和环境友好性等特点, 已成为防控植物病害的研究热点。【目的】从实验室保藏的菌种库中筛选拮抗植物病原菌的目标菌株, 对其进行鉴定、全基因组学分析, 并评价其抗病促生效果。【方法】采用平板对峙法筛选拮抗菌; 利用形态学观察、16S rRNA 基因测序、基因组系统发育分析、基因组平均核苷酸相似性(average nucleotide identity, ANI)和数字 DNA 杂交(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)值比较分析, 以及生理生化特征等方法进行菌种分类学鉴定; 对目标菌株进行全基因组序列分析, 挖掘功能基因; 通过测定溶磷、产铁载体、产蛋白酶和产纤维素酶活力来评价目标菌株的促生特性; 采用二分隔培养皿检测目标菌株产生的挥发性气体对植物病原真菌抑制情况; 通过盆栽试验探究目标菌株对番茄的促生防病效果。【结果】获得 1 株对茄科罗尔斯通氏菌(简称青枯菌)及 3 种植物病原真菌具有明显抑菌活性的菌株 MB1019, 经鉴定其为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。生理生化特征显示, 菌株 MB1019 的耐受温度为 15–50 °C, 最大耐受 NaCl 浓度为 10.0%, 耐受 pH 值为 5.0–9.0。全基因组分析显示, 菌株 MB1019 基因组大小为 3.8 Mb, G+C 含量为 46.4%, antiSMASH 预测显示, 菌株 MB1019 基因组含有 17 个次级代谢产物基因簇。dbCAN2 预测显示, 菌株 MB1019 含有 52 种、共 108 个 CAZy 家族基因, 其中糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)家族种类和数量最多。菌株 MB1019 产生的挥发性气体能够显著抑

资助项目: 惠州市优秀青年科技人才项目(2023EQ050042); 惠州学院博士科研启动项目(2022JB087); 广东省教育厅重点领域专项(2023ZDZX2061, 2024ZX096); 广东省大学生创新训练项目(S202310577075, S202310577070)

This work was supported by the Huizhou Outstanding Youth Science and Technology Talent Project (2023EQ050042), the Initial Funding for Doctoral Research of Huizhou University (2022JB087), the Department of Education of Guangdong Province Project (2023ZDZX2061, 2024ZX096), and the Innovative Training Program for College Students of Guangdong Province (S202310577075, S202310577070).

*Corresponding author. E-mail: mlt@hzu.edu.cn

Received: 2024-09-03; Accepted: 2024-11-08; Published online: 2024-12-18

制植物病原真菌的生长。盆栽试验结果显示, 菌株 MB1019 对番茄具有明显促生防病效果。【结论】贝莱斯芽孢杆菌 MB1019 具有拮抗青枯菌和植物病原真菌的能力, 展现出耐高温、耐盐碱以及促生功能, 其基因组中含有大量抑菌基因, 并能产生挥发性气体有效抑制病原真菌的生长, MB1019 菌液对番茄具有促生防病效果。综上所述, 菌株 MB1019 作为微生物肥料和农药研发的优良菌种资源, 展现出良好的开发和应用潜力。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 植物病原菌; 全基因组学分析; 抗病促生特性

Identification, genomic analysis, and disease-resistant and plant growth-promoting characterization of a *Bacillus velezensis*

WANG Chunling, HUANG Yuting, LIU Xing, XU Liangxiong, WANG Yanjun, XIAO Haixia, ZHU Boshi, MAO Lutian*

College of Life Sciences, Huizhou University, Huizhou, Guangdong, China

Abstract: Crop diseases caused by phytopathogens result in great harm to global agriculture. Biocontrol has garnered increasing attention in plant disease prevention and control because of its effectiveness and environmental friendliness. **[Objective]** To identify, analyze the genome, and evaluate the disease-resistant and plant growth-promoting effects of the strains with antagonistic activities that were screened from the culture collection. **[Methods]** Antagonistic strains were screened by plate confrontation method. and identified by morphological observation, phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene and genome, comparative analysis of average nucleotide identity (ANI) and digital DNA-DNA hybridization (dDDH) values, and physiological and biochemical tests. The whole genome sequence of the target strain was analyzed for the mining of functional genes. The plant growth-promoting effect of the target strain was characterized in terms of the phosphorus-solubilizing, siderophore-producing, and proteinase- and cellulose-producing properties. The inhibition of volatile gas produced by the target strain on phytopathogenic fungi was examined in petri dishes with a septum. The effects of the target strain on tomato growth and diseases were studied by pot experiments. **[Results]** Strain MB1019 with obvious inhibitory effects on *Ralstonia solanacearum* and three phytopathogenic fungal strains was screened out and identified as *Bacillus velezensis*. The physiological and biochemical tests showed that strain MB1019 tolerated the temperature of 15–50 °C, 10.0% NaCl, and pH 5.0–9.0. The genome of strain MB1019 was 3.8 Mb in length, with the G+C content of 46.4%. The prediction on antiSMASH suggested that the MB1019 genome had 17 synthetic gene clusters for secondary metabolites. The prediction on dbCAN2 suggested that MB1019 carried 108 genes belonging to 52 types of the CAZy family, among which glycoside hydrolases (GHs) were the richest and most abundant. The volatile gas produced by MB1019 significantly inhibited the growth of phytopathogenic fungi. The results of pot experiments showed that MB1019 promoted the growth and inhibited the diseases of tomato seedlings. **[Conclusion]** *B. velezensis* MB1019 capable of

antagonizing *R. solanacearum* and phytopathogenic fungi has tolerance to high temperatures and saline-alkali and demonstrates plant growth-promoting effects. Its genome contains a large number of functional genes, and the volatile gas produced by this strain can inhibit the growth of pathogenic fungi. The fermentation broth of MB1019 has the effects of promoting the growth and preventing the diseases of tomato seedlings. In summary, *B. velezensis* MB1019 can be used as an elite strain in the research and development of microbial fertilizers and pesticides, demonstrating promising development and application prospects.

Keywords: *Bacillus velezensis*; phytopathogen; genomic analysis; disease-resistant and plant growth-promoting properties

植物病原细菌及病原真菌引起的番茄青枯病^[1]、香蕉枯萎病^[2]、油茶炭疽病^[3]等植物病害,给全球作物造成了巨大危害。由于缺乏有效的抗性育种手段,应用化学杀菌剂成为控制植物病原菌的主要方法。然而,部分植物病害缺乏对应的商业化学品,且长期使用化学杀菌剂后,农田病原菌产生了耐药性,几种亚致死浓度的化学杀菌剂的使用会引发真菌毒素的生物合成^[4]。生物防治因其有效性及环境友好性等成为防治植物病虫害研究的热点。由于田间环境复杂多变,生防菌难以在土壤中稳定定殖,且缺乏有效的生防效应因子,生物防治面临很大挑战^[5]。

植物根际促生细菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)是生长在植物根际的有益细菌,它们不仅能够促进植物的生长发育,还能增强植物的抗病和抗逆性,主要包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等^[6]。芽孢杆菌广泛存在于自然界,具有繁殖快、代谢快、定殖能力强等特点,其能够产生芽孢以抵抗不良环境,因此成为当前生物农药研究的热点和产业化开发的主要来源。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)是芽孢杆菌中最重要的代表性生防菌,被广泛应用于农业生产中^[7-8]。贝莱斯芽孢杆菌通过产生多种次级代谢产物,如苯甲醛(benzaldehyde)、表面活性素(surfactin)和杆

菌霉素 D (bacillomycin D)等抑制病原体和害虫;通过改善宿主植物微生物群落结构,促进宿主对营养的吸收;激发宿主防御机制,诱导产生系统抗性^[9-10]。Tahir 等^[11]从贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)模式菌株 FZB42 中鉴定出了抑制茄科罗尔斯通氏菌(简称青枯菌, *Ralstonia solanacearum*)的挥发性代谢产物,包括苯甲醛、1,2-苯并异噻唑-3-酮 [1,2-benzisothiazol-3(2H)-one]和 1,3-丁二烯(1,3-butadiene);此外, *B. velezensis* FZB42 产生的表面活性素对多种病原微生物具有抑菌活性^[11]。Im 等^[12]研究发现, *B. velezensis* DR-08 的丁醇提取物含有 difficidin 和 oxydifficidin,对青枯菌有抗菌活性。

本研究从实验室保藏的菌种资源库中筛选拮抗青枯菌和 3 种植物病原真菌的生防菌株,随后对其进行菌种鉴定、全基因组学分析、促生功能检测、产挥发性气体的抑菌活性检测以及番茄促生防病效果评价。本研究旨在为微生物肥料和农药的研发提供优质的菌种资源,并为深入挖掘菌种的抑菌机理奠定理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株和培养基

所用菌株 MB1019、青枯菌 RSH、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*) TSF05、柑橘白地霉病菌

(*Citrus trichoderma*) TSF19 和烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) TSF44 均来自实验室保藏菌种。所用番茄种子为‘长合新金丰 1 号’。

营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基、营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基、R2A 琼脂培养基、麦康凯琼脂(MacConkey agar, MCA)培养基、胰蛋白胨大豆琼脂(trypsin soy agar, TSA)培养基、1/2MS 培养基均购自青岛海博生物技术有限公司。

解无机磷培养基(g/L): $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5.0, 葡萄糖 10.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5, NaCl 0.3, KCl 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, MnSO_4 0.03, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, 酵母浸粉 0.5, 琼脂 17.0, pH 7.2。

羧甲基纤维素钠琼脂培养基(g/L): 羧甲基纤维素钠 10.0, 酵母粉 1.0, 琼脂 17.0, pH 7.2。

上述培养基均于 121 °C 灭菌 20 min 后备用。

CAS 培养基(g/L): 葡萄糖 2.0, 干酪素 3.0, CaCl_2 0.1, MgSO_4 4.9, 琼脂 17.0, 121 °C 灭菌 20 min。CAS 染液(g/L): 刃天青 0.3, FeCl_3 0.1, 十六烷基三甲基溴化铵 1.5, 115 °C 灭菌 20 min。待冷却至 60 °C 时后, 向 CAS 培养基中缓慢加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液和体积分数为 5% 的 CAS 染液各 5 mL, 即为 CAS 检测培养基。

脱脂牛奶培养基(g/L): 脱脂奶粉 20.0 于锥形瓶中; 琼脂 30.0 于另一锥形瓶中, 分开灭菌, 115 °C 灭菌 20 min。待冷却至 60 °C 左右时, 将两锥形瓶混合后倒平板。

1.2 番茄青枯病拮抗菌株筛选及其拮抗植物病原真菌

取 100 μL 青枯菌菌悬液均匀涂布到 NA 平板上, 待吹干后, 用无菌牙签点接筛选的菌株到平板上, 30 °C 培养 2–3 d 后观察是否有抑菌圈形成。此外, 用直径 5 mm 的打孔器, 取培养 5 d 的番茄灰霉病 TSF05、柑橘白地霉病 TSF19 和烟曲霉 TSF44 的菌饼, 接种于 6 cm 的 NA 培

养基中央, 在距离中心 1 cm 处间隔 90° 设置 4 个点, 将筛选到具有拮抗青枯菌的菌株接种于 4 个点位置处, 以单独接种病原真菌作为对照, 每个处理重复 3 次, 30 °C 培养 3–4 d, 观察菌株对 3 种病原真菌的抑菌活性。

1.3 菌株 MB1019 鉴定

挑取 MB1019 菌体置于装有 50 μL 无菌水的离心管中, 100 °C 加热 10 min 后吹打混匀, 作为 PCR 扩增的模板。利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(20 μL): $2 \times rTaq$ Mix 10 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , DNA 模板 0.5 μL , ddH₂O 8.5 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。将扩增产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。将获得的 16S rRNA 基因序列上传到 EzBioCloud 数据库(<https://www.ezbiocloud.net/identify>)进行序列比对, 利用 MEGA 7.0 软件 Kimura 双参数模型(Kimura 2-parameter model) 1 000 次自展值构建 16S rRNA 基因的最大似然法(maximum likelihood method) 系统发育树。将获得的 16S rRNA 基因序列上传到 NCBI 数据库(www.ncbi.nlm.nih.gov), 获得 GenBank 登录号为 PQ268866。

将菌株 MB1019 采用四分法划线于 NA 平板上, 30 °C 培养 24 h 后进行拍照, 观察菌体形态特征; 此外, 采用扫描电子显微镜观察菌株个体形态特征。

还原酶活性: 取少量菌体溶于 3% 的 H_2O_2 溶液中, 观察有气泡产生则为阳性, 无气泡则为阴性。氧化酶活性: 使用氧化酶试剂(广东环凯微生物科技有限公司)进行检测。将菌株接种

到 NA 培养基上, 分别置于 10、15、30、35、40、45、50、55 °C 培养箱进行培养, 检测菌株在不同温度下的生长情况。将菌株接种到 NaCl 体积分数为 0–11.0% 的液体培养基中, 每个梯度间隔 1.0%, 30 °C、180 r/min 培养 2–3 d, 检测菌株在不同 NaCl 浓度下的生长情况。将菌株接种至 pH 值为 4.0–12.0 的 NA 液体培养基中, 每个梯度间隔 1.0, 30 °C、180 r/min 培养 2–3 d, 检测菌株在不同 pH 值下的生长情况。将菌株接种至 NA、R2A、MCA 和 TSA 这 4 种培养基上, 检测菌株在不同培养基上的生长情况。使用大肠埃希氏菌干制生化鉴定试剂盒(北京陆桥技术有限责任公司)进行 IMViC 生化系统鉴定(I: 吲哚; M: 甲基红; V: VP 试验; C: 柠檬酸盐)。

1.4 菌株 MB1019 促生特性

将 MB1019 分别点接在无机磷培养基、CAS 检测培养基及脱脂牛奶培养基上, 30 °C 培养 2–3 d 后, 观察是否有透明圈或培养基颜色变化, 进行溶解无机磷、产铁载体和产蛋白酶活性测定。将 MB1019 点接于纤维素培养基上, 用 1 mg/mL 的刚果红对平板染色 15 min, 之后用 1 mol/L NaCl 固定 15 min, 最后用清水轻轻冲洗掉多余的刚果红染料, 并观察是否产生透明圈。溶无机磷能力的定量测定参考刘晔等^[13]的方法。产铁载体能力的测定参照王平等^[14]的方法。蛋白酶活力测定参照国家标准 GB/T 23527.1—202 X 福林酚法^[15]。纤维素酶活力测定参照宋朝霞等^[16]的方法。

1.5 菌株 MB1019 全基因组测序及分析

挑取 MB1019 单菌落转接至 NA 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 2 d, 8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 于–80 °C 冰箱冻存后, 送至上海美吉生物医药科技有限公司进行全基因组测序。将测得的草图基因组序列使用 SPAdes

v3.11.1 软件组装成 contigs 和 scaffolds, 并将基因组序列上传到 NCBI 数据库, 获得 GenBank 登录号为 JBHEPW000000000。

使用在线网站 RAST () 进行 MB1019 全基因组注释, 基因组平均核苷酸相似性(average nucleotide identity, ANI)通过 EzBioCloud 平台上的在线工具 ANI calculator (<https://www.ezbiocloud.net/tools/ani>) 进行计算。基因组数字 DNA 杂交值(digital DNA-DNA hybridization, dDDH)通过 DSMZ 公司开发的在线工具 Genome-to-Genome Calculator GGDC (<http://ggdc.dsmz.de/home.php>) 进行计算。使用 UBCG 软件构建 MB1019 全基因组系统发育树。使用 antiSMASH v6.1.1 在线网站预测 MB1019 的次级代谢产物基因簇, 使用在线网站 dbCAN2 (E 值 $>1e-15$, coverage >0.35) 进行 CAZymes 基因注释。

1.6 菌株 MB1019 产生挥发性气体抑制病原真菌

将 NA 培养基倒入二分隔培养皿中, 冷却后培养皿一侧分别接种番茄灰霉病 TSF05 和柑橘白地霉病 TSF19, 另一侧接种 MB1019。以仅一侧接种病原真菌的培养皿作为对照, 实验设置 3 个重复, 在 30 °C 培养箱培养 4 d 后, 观察真菌的生长情况, 测量真菌的菌落直径。

1.7 番茄盆栽试验

将‘新金丰 1 号’番茄种子用 2.0% 次氯酸钠清洗 8 min 后, 用无菌水清洗 5–6 次, 然后将种子置于铺有浸湿灭菌滤纸的培养皿上进行催芽。将发芽的种子移栽到装有灭菌基质土的育苗盘中, 在 28–30 °C、60%–80% 湿度下育苗 20 d 左右, 将番茄苗移栽到直径 11.8 cm 的花盆中, 每盆移栽 1 株。将菌株 MB1019 和 *R. solanacearum* RSH 按 1% 的接种量分别接种于 NB 培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 2–3 d, 调

节菌液 OD_{600} 均为 1×10^8 CFU/mL。番茄苗移栽 2–3 d 后开始处理, CK 组: 每盆加入灭菌 NB 液体培养基 10 mL 作为对照; MB1019 组: 加入 MB1019 发酵液(每盆 10 mL, 浓度为 10^8 CFU/mL); RSH 组: 加入 *R. solanacearum* RSH 发酵液(每盆 10 mL, 浓度为 10^8 CFU/mL); MB1019+RSH 组: 加入 MB1019 和 RSH 发酵液各 5 mL (浓度均为 10^8 CFU/mL)。间隔 10 d 处理一次, 连续处理 2 次, 每组处理 4 株苗。番茄苗生长至 30 d 后, 统计株高、根长、鲜重、干重、鲜重/干重指标。

1.8 数据处理

所有测量数据使用 SPSS 软件进行方差分析和最小显著性差异法(least significant difference, LSD)多重比较($P < 0.05$), 采用 Excel 软件进行作图。

2 结果与分析

2.1 番茄青枯病拮抗菌株筛选及其拮抗的植物病原真菌的效能分选

从实验室保藏的菌种库中筛选到 1 株对青枯菌 RSH 具有明显拮抗活性的菌株 MB1019 (图 1A), 采用模式图(图 1B)的方法检测 MB1019 对 3 种病原真菌的抑菌活性, 结果显示, 与对照相比(图 1C、1E、1G), MB1019 对番茄灰霉病菌 TSF05 (图 1D)、柑橘白地霉病菌 TSF19 (图 1F) 和烟曲霉 TSF44 (图 1H) 具有明显的抑菌活性。

2.2 菌株 MB1019 的鉴定

2.2.1 形态学观察

如图 2A 所示, MB1019 在 NA 培养基上呈乳白色, 不透明, 分泌大量胞外黏液, 边缘整齐。扫描电镜结果显示, MB1019 呈短杆状, 大小为 $(1.7-2.3) \mu\text{m} \times (0.6-0.7) \mu\text{m}$ (图 2B)。

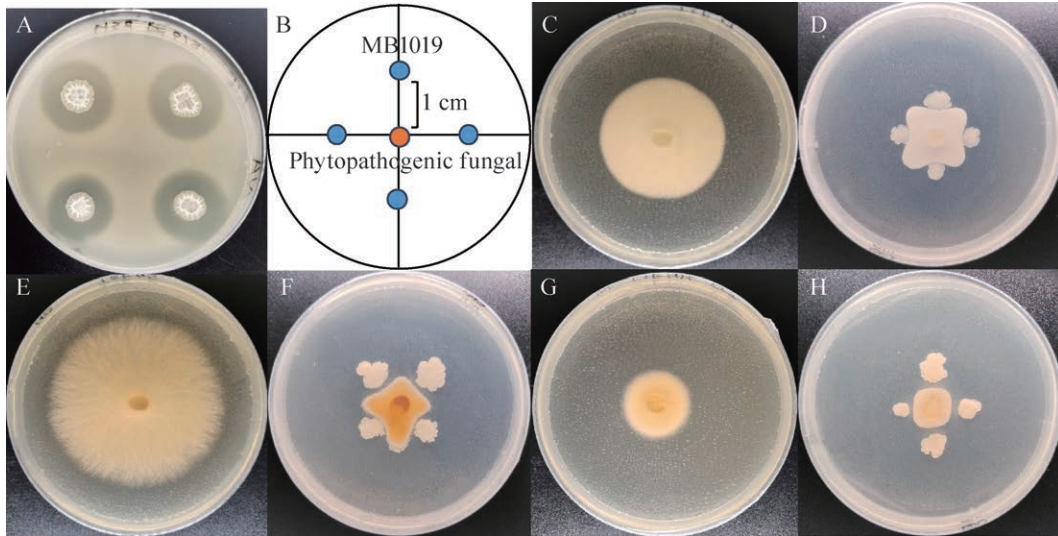


图1 菌株MB1019拮抗青枯菌及3种植物病原真菌

Figure 1 Antagonistic activities of strain MB1019 against *Ralstonia solanacearum* and three phytopathogenic fungi. A: Antagonistic activity of MB1019 against *Ralstonia solanacearum* RSH. B: The schematic of confrontation dual culture for phytopathogenic fungi with MB1019. *Botrytis cinerea* TSF05 (C), *Citrus Trichoderma* TSF19 (E), *Aspergillus fumigatus* TSF44 (G) in control dual culture test. Antagonistic activities of MB1019 against *Botrytis cinerea* TSF05 (D), *Citrus Trichoderma* TSF19 (F) and *Aspergillus fumigatus* TSF44 (H) in dual culture test.

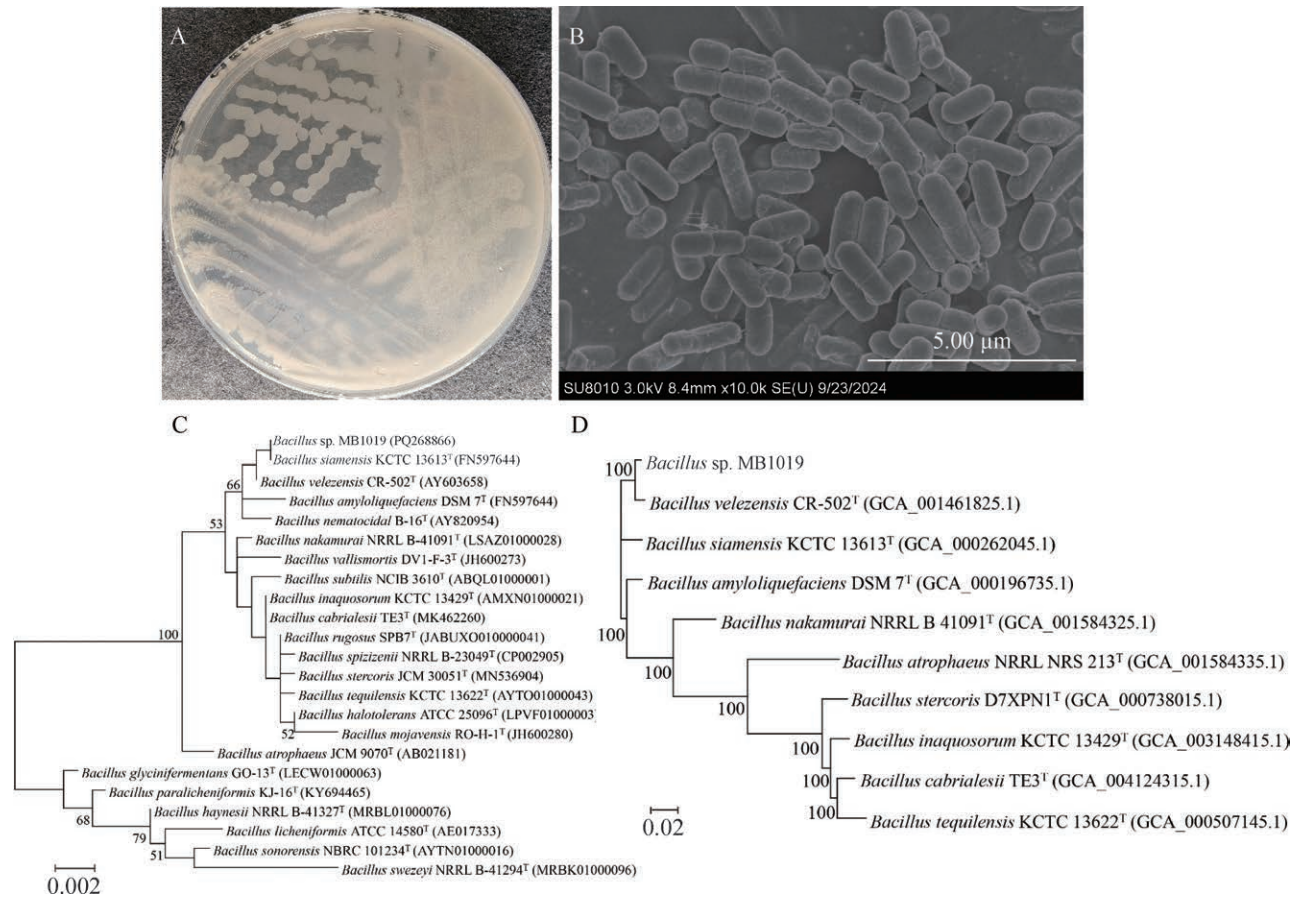


图2 MB1019的形态特征和系统发育分析

Figure 2 The morphological characteristics and phylogenetic analysis of MB1019. A: Colony morphology of MB1019. B: The individual morphology of MB1019. C: Maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bootstrap values (represented percentages of 1 000 replications) >50% are shown at nodes. Bar, 0.002 0 substitutions per nucleotide position. D: Phylogenetic tree based on 92 bacterial core genes of strain MB1019 and its reference species. GenBank accession numbers are given in parentheses. Bar, 0.02 substitutions per nucleotide position.

2.2.2 系统发育分析

MB1019 与暹罗芽孢杆菌 (*Bacillus siamensis*) KCTC 13613^T 和贝莱斯芽孢杆菌 CR-502^T 序列的相似性最大, 均为 99.9%。基于 16S rRNA 基因构建的最大似然法系统发育树显示, MB1019 与 *B. siamensis* KCTC 13613^T 聚在一个分支上(图 2C), 进一步全基因组系统发育树显示 MB1019 与 *B. velezensis* CR-502^T 聚在一个分支上(图 2D), 表明 MB1019 可能为一株贝

莱斯芽孢杆菌。

2.2.3 基因组 ANI 和 dDDH 比较分析

MB1019 与 *B. velezensis* CR-502^T 的 ANI 比值为 98.3%, dDDH 比值为 84.5%, 均大于区分物种界限值 95.0%–96.0% 和 70.0%, 而与其他菌株 ANI 比值在 77.0%–94.3% 之间, dDDH 比值在 20.4%–56.5% 之间(表 1), 表明 MB1019 是一株贝莱斯芽孢杆菌。

表1 MB1019与其相似菌株的ANI和dDDH比值

Table 1 The ANI and dDDH values of MB1019 and its related species

Strains	ANI	dDDH
<i>Bacillus velezensis</i> CR-502 ^T	98.3	84.5
<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613 ^T	94.3	56.5
<i>Bacillus nakamurai</i> NRRL B-41091 ^T	86.3	30.7
<i>Bacillus tequilensis</i> KCTC 13622 ^T	77.7	20.7
<i>Bacillus cabrialesii</i> TE3 ^T	77.2	20.5
<i>Bacillus inaquosorum</i> KCTC 13429 ^T	77.5	20.9
<i>Bacillus stercoris</i> D7XPNI ^T	77.0	20.4
<i>Bacillus atropheus</i> NRRL NRS 213 ^T	77.3	20.6
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DSM 7 ^T	93.1	55.1

2.2.4 生理生化特征分析

菌株 MB1019 的生理生化特征见表 2，其氧化酶和还原酶活性均为阴性，生长温度范围为 15–50 °C，最大耐受 NaCl 浓度为 10.0%，耐受 pH 值范围为 5.0–9.0。菌株 MB1019 在 NA、R2A、MCA 和 TSA 这 4 种培养基上均能生长。IMViC 生化系统鉴定结果显示，菌株 MB1019 的甲基红试验为阴性，吲哚试验为阳性，柠檬酸盐利用试验为阳性，VP 试验为阳性。

2.3 菌株 MB1019 全基因组学分析

菌株 MB1019 全基因组基本特征见表 3，基因组大小为 3.8 Mb，G+C 含量为 46.4%，草图基因组中含有 31 个 contigs，包含 3 984 个基因。

antiSMASH 在线数据库预测菌株 MB1019 基因组中含有 17 个次级代谢产物基因簇，其中有 4 个基因簇展示与 bacillibactin、bacilysin、bacillaene 和 macrolactin H 均有 100% 相似性，片段 6.2 编码一个 PKS-like 基因簇，与已知基因簇 butirosin A/butirosin B 相似性仅有 7% (表 4)，此外，4 个片段 6.1、7.2、10.1 及 11.1 编码的 terpene、T3PKS、terpene 和 lanthipeptide-class-ii 未检测出最相似基因簇(表 4)。

表2 菌株MB1019的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain MB1019

Characteristic	Results
Oxidase	–
Catalase	–
Temperature range (°C)	10–50
Maxium NaCl (% , W/V)	10.0
pH value	5.0–9.0
NA	+
R2A	+
MCA	+
TSA	+
Methyl red	–
Indole	+
Citric acid	+
VP	+

– : Negative; + : Positive.

表3 菌株MB1019全基因组基本特征

Table 3 The genome features of strain MB1019

Genomic features	Results
Accession number	JBHEPW000000000
Size (Mb)	3.8
Number of contigs	31
G+C content (%)	46.4
Number of genes	3 984
L50 (bp)	3
N50 (bp)	393 092
Number of RNAs	52

菌株 MB1019 基因组中共含有 52 种、共 108 个 CAZy 家族基因，其中糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GHs) 家族种类和数量最多，分别为 24 种和 42 个(图 3A)。图 3B 进一步展示了菌株 MB1019 基因组中含有的糖苷水解酶家族种类和数量，其中 GH13 和 GH43 含有的数量最多，分别为 6 个和 4 个。

2.4 菌株 MB1019 促生特性

菌株 MB1019 在溶无机磷、CAS 检测、脱

表4 使用antiSMASH在线网站预测菌株MB1019基因组中含有的次级代谢产物情况

Table 4 The secondary metabolites gene clusters in genome of strain MB1019 predicted by antiSMASH website

Region	Types	Most similar known clusters	Similarity (%)
1.1	NRP-metallophore, NRPS, RiPP-like	Bacillibactin	100
1.2	Other	Bacilysin	100
2.1	NRPS, betalactone, transAT-PKS	Fengycin	80
2.2	TransAT-PKS, NRPS, T3PKS	Bacillaene	100
2.3	TransAT-PKS	Macrolactin H	100
3.1	NRPS	Surfactin	82
4.1	TransAT-PKS	Difficidin	46
6.1	Terpene	–	–
6.2	PKS-like	Butirosin A/butirosin B	7
7.1	TransAT-PKS-like	Difficidin	53
7.2	T3PKS	–	–
10.1	Terpene	–	–
11.1	Lanthipeptide-class-ii	–	–
17.1	NRPS	Plipastatin	30
18.1	TransAT-PKS-like	Difficidin	26
21.1	NRPS	Fengycin	20
22.1	NRPS	Fengycin	13

– represents absence.

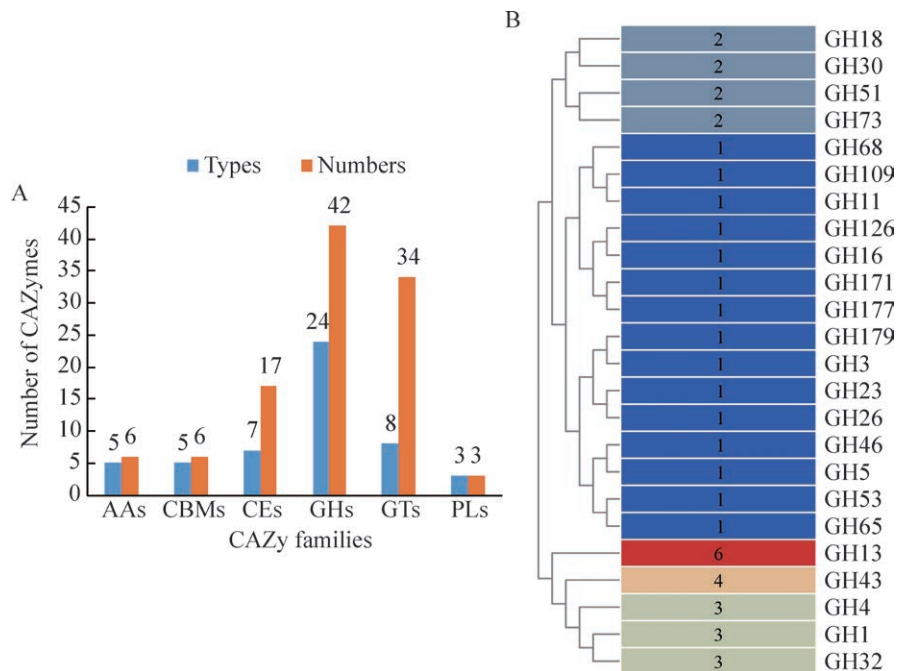


图3 菌株MB1019基因组中含有的CAZy家族及糖苷水解酶基因

Figure 3 The CAZy families and glucoside hydrolase genes in strain MB1019 genome. A: The types and numbers of CAZy families; B: The types and numbers of glucoside hydrolases.

脂牛奶及羧甲基纤维素钠培养基上均能形成明显的水解圈(图 4A-4D), 表明菌株 MB1019 具有溶无机磷、产铁载体、产蛋白酶和纤维素酶活性。

定量检测培养 3 d 的菌株 MB1019 发酵液中的溶无机磷、产铁载体、产蛋白酶和纤维素酶活力。结果显示, 菌株 MB1019 的溶解无机磷能力为(51.440±0.001) mg/L, 产铁载体能力为(55.70±0.19)%, 产蛋白酶活力为(22.008±2.171) U/mL, 产纤维素酶活力为(0.022 1±0.001 2) U/mL。

2.5 菌株 MB1019 产生挥发性气体抑制植物病原真菌

与单独培养 2 株植物病原真菌相比(图 5A、5C), 在二分隔培养皿中, 菌株 MB1019 的生长对番茄灰霉病菌 TSF05 和柑橘白地霉病菌 TSF19 具有显著的抑菌效果(图 5B、5D、5E), 表明菌株 MB1019 产生的挥发性气体能够有效抑制这 2 种植物病原真菌。

2.6 菌株 MB1019 对番茄促生防病作用

将生长 30 d 的 4 个处理组的番茄苗的株高、根长、鲜重、干重以及鲜重-干重值进行统计, 结果如图 6 所示, 与灭菌的 NB 液体培养基(CK)相比, 接种菌株 MB1019 发酵液后, 番茄的株高、根长、鲜重和干重分别提高了 32.4%、

31.2%、50.9% 和 37.0% (MB1019)。此外, 施加青枯菌 RSH 的番茄苗植株明显变矮, 部分植株出现枯萎症状(RSH)。然而, 与青枯菌 RSH 组相比, 当同时施加菌株 MB1019 和 RSH 后, 番茄苗植株恢复生长, 且株高、根长、鲜重和干重分别提高了 39.0%、58.6%、94.1% 和 74.1% (MB1019+RSH)。盆栽试验结果表明, 菌株 MB1019 对番茄具有明显的促生作用, 并且能够有效防治青枯病。

3 讨论与结论

近年来, 芽孢杆菌等 PGPR 在农业生产上被广泛应用, 以防治植物病害并促进作物生长^[17]。然而, 对于这些细菌促进生长及适应环境的分子机制仍有许多未知之处。本研究筛选到一株对植物病原细菌和真菌有明显抑菌作用的菌株 MB1019 (图 1), 经表型分析、系统发育分析、基因组 ANI 和 dDDH 比较分析以及生理生化特征等鉴定, 确认该菌株为贝莱斯芽孢杆菌(图 2、表 1、表 2), 并且发现菌株 MB1019 具有溶磷和产铁载体等促生特征(图 4A、4B), 表明 MB1019 是一株 PGPR。此外, 菌株 MB1019 展现出多种抗性特征, 包括耐高温(50 °C)、最高耐 NaCl 浓度为 10.0%、耐酸碱范围 pH 5.0-9.0 等(表 2)。

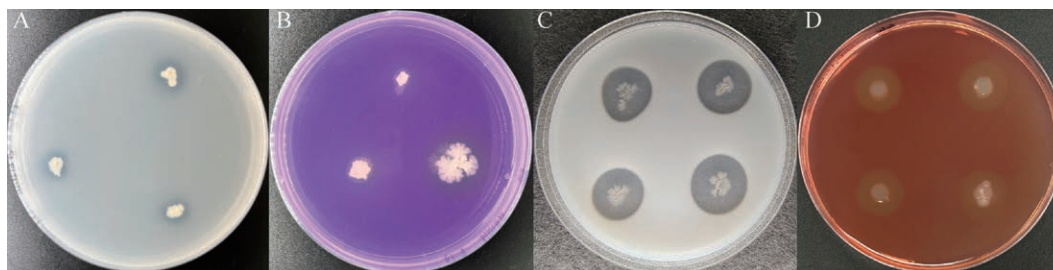


图4 菌株MB1019促生特性

Figure 4 Plant growth-promoting characteristics of strain MB1019. A: Qualitative detection the ability of MB1019 dissolving inorganic phosphorus; B: Siderophore qualitative detection of MB1019 with the CAS method; C-D: Qualitative detection the ability of MB1019 producing protease (C) and cellulose (D).

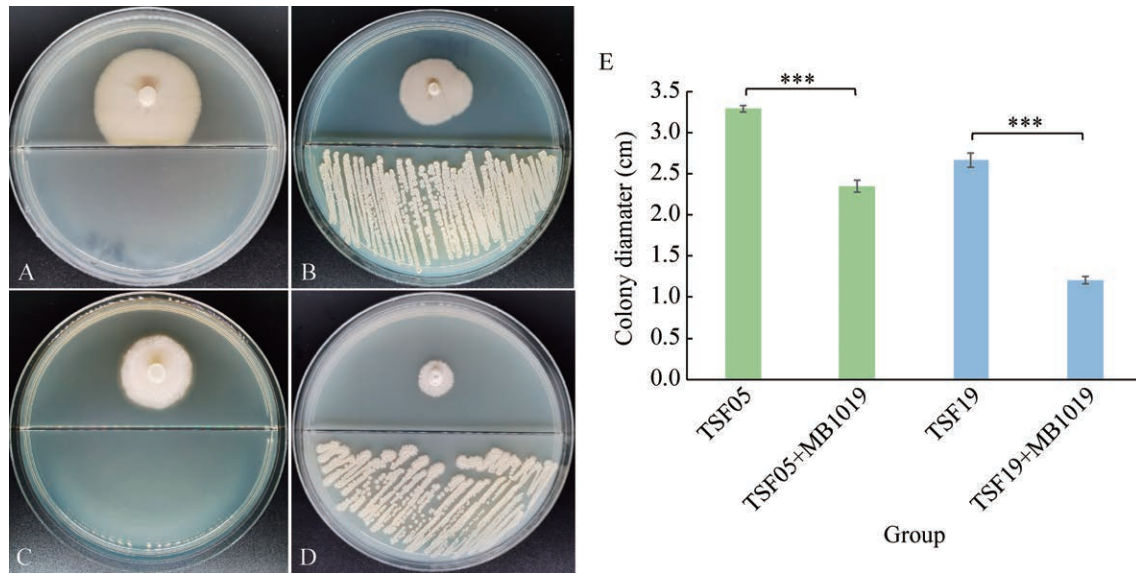


图5 菌株MB1019产生挥发性气体抑制病原真菌

Figure 5 Volatile gases produced by strain MB1019 inhibiting pathogenic fungi. A: *Botrytis cinerea* TSF05; B: TSF05+MB1019; C: *Citrus Trichoderma* TSF19; D: TSF19+MB1019; E: The colony diameter of pathogenic fungus in different groups. ***: $P < 0.001$.

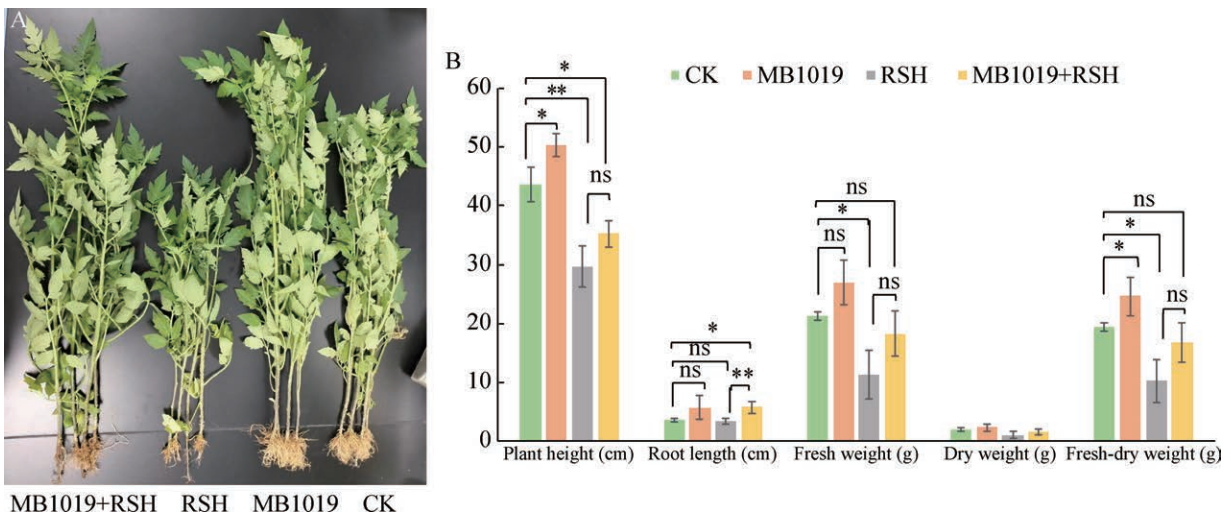


图6 菌株MB1019对番茄青枯病生防及对番茄促生效果

Figure 6 Biocontrol effects on tomato bacteria wilt and plant-growth-promoting effect of strain MB1019 in greenhouse. A: Phenotype of tomato plantlets in different inoculation treatment groups; B: Plant-growth-promoting effect of MB1019 on tomato height, root length, fresh weight, dry weight and fresh-dry weight in different inoculation treatment groups. CK: Inoculation with NB medium as control; MB1019: Inoculation only with the cultures of MB1019; RSH: Inoculation only with the cultures of *Ralstonia solanacearum* RSH; MB1019+RSH: Simultaneous inoculation with the cultures of MB1019 and the bacterial solution of *Ralstonia solanacearum* RSH. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ns: $P > 0.05$.

多株贝莱斯芽孢杆菌已被报道有拮抗病原菌功能, 包括 FZB42、GS-1、BA-26、BS1 等^[7,18]。它们可通过产生次级代谢产物抑制多种病原真菌和细菌。在本研究中, 菌株 MB1019 的基因组被预测含有 17 个次级代谢产物基因簇(表 4), 其中 difficidin、macrolactin H 和 bacilysin 主要抑制病原真菌, 而 bacillaene、fengycin 和 surfactin 则能有效抑制病原细菌, bacillibactin 能够抑制微生物的竞争对手^[19]。此外, 有 2 个基因簇编码 terpenes, 1 个基因簇编码 T3PKS 和 1 个基因簇编码 lanthipeptide(表 4)。Lanthipeptides 是核糖体合成和翻译后修饰肽, 具有抗菌、抗真菌及其他活性^[20]。Terpene 一般具有挥发性, 包括 α -pinene 和氧化 terpene, 是挥发性的抗菌化合物, 与本研究发现菌株 MB1019 产生挥发性气体以抑制病原真菌的结果相一致(图 5)^[21-22]。

我们也发现菌株 MB1019 具有产生蛋白酶和纤维素酶活力(图 4C、4D), 这些酶活性已被报道有助于拮抗病原菌及防治植物病害^[23]。PGPRs 能够通过分泌蛋白酶、纤维素酶、葡聚糖酶及几丁质酶来降解真菌细胞壁, 如几丁质、葡聚糖和蛋白质, 从而破坏细胞壁的完整性, 进而降低病原菌的致病力^[24]。我们推测菌株 MB1019 的抗真菌活性与其分泌的这些胞外水解酶的分解能力密切相关。

青枯菌侵染引起的番茄青枯病素有“植物癌症”之称, 是一种毁灭性的土传病害, 也是番茄主要病害之一^[25-26]。盆栽结果显示, 接种菌株 MB1019 发酵液对番茄青枯病有显著的抑菌效果, 并且对番茄有明显的促生作用(图 6)。综上所述, 贝莱斯芽孢杆菌 MB1019 展示了广谱高效地拮抗病原细菌和真菌的活性, 具有溶磷和产铁载体等促生特性, 能够产生具有抑菌活性的多种次级代谢产物, 以及蛋白酶和纤维素酶。

因此, MB1019 是一株有应用价值的安全有效的防治青枯病的生防细菌, 在环境友好的农业生态中值得深入探索它的生防应用。

作者贡献声明

王春玲: 研究构思和设计、论文撰写和修改; 黄钰婷: 数据收集和处理; 刘星: 数据收集和处理; 徐良雄: 论文修改; 王艳君: 论文修改; 肖海霞: 数据收集和处理; 朱柏诗: 数据收集和处理; 毛露甜: 研究设计、论文修改。

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] DEAN R, van KAN JAL, PRETORIUS ZA, HAMMOND-KOSACK KE, di PIETRO A, SPANU PD, RUDD JJ, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J, FOSTER GD. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 414-430.
- [2] PIETRO AD, MADRID MP, CARACUEL Z, DELGADO-JARANA J, RONCERO MI. *Fusarium oxysporum*: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4(5): 315-325.
- [3] CHEN XG, JIANG LY, BAO AH, LIU CL, LIU JN, ZHOU GY. Molecular characterization, pathogenicity and biological characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of *Camellia yuhsienensis* hu in China[J]. *Forests*, 2021, 12(12): 1712.
- [4] TANG GF, CHEN Y, XU JR, KISTLER HC, MA ZH. The fungal myosin I is essential for *Fusarium* toxosome formation[J]. *PLoS Pathogens*, 2018, 14(1): e1006827.
- [5] TIMMUSK S, BEHERS L, MUTHONI J, MURAYA A, ARONSSON AC. Perspectives and challenges of microbial application for crop improvement[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 49.
- [6] BENAÏSSA A. Rhizosphere: role of bacteria to manage plant diseases and sustainable agriculture: a review[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2024, 64(3): e2300361.
- [7] DUNLAP CA, KIM SJ, KWON SW, ROONEY AP. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

- Microbiology, 2016, 66(3): 1212-1217.
- [8] KHAN AR, MUSTAFA A, HYDER S, VALIPOUR M, RIZVI ZF, GONDAL AS, YOUSUF Z, IQBAL R, DARAZ U. *Bacillus* spp. as bioagents: uses and application for sustainable agriculture[J]. Biology, 2022, 11(12): 1763.
- [9] BAI XF, LI Q, ZHANG D, ZHAO Y, ZHAO DM, PAN Y, WANG JH, YANG ZH, ZHU JH. *Bacillus velezensis* strain HN-Q-8 induced resistance to *Alternaria solani* and stimulated growth of potato plant[J]. Biology, 2023, 12(6): 856.
- [10] CHOWDHURY SP, HARTMANN A, GAO XW, BORRIS R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: a review[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 780.
- [11] TAHIR HAS, GU Q, WU HJ, NIU YD, HUO R, GAO XW. *Bacillus* volatiles adversely affect the physiology and ultra-structure of *Ralstonia solanacearum* and induce systemic resistance in tobacco against bacterial wilt[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40481.
- [12] IM SM, YU NH, JOEN HW, KIM SO, PARK HW, PARK AR, KIM JC. Biological control of tomato bacterial wilt by oxydificidin and diffificidin-producing *Bacillus methylotrophicus* DR-08[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 163: 130-137.
- [13] 刘晔, 刘晓丹, 张林利, 吴越, 王国文, 汪强, 姜瑛. 花生根际多功能高效促生菌的筛选鉴定及其效应研究[J]. 生物技术通报, 2017, 33(10): 125-134.
LIU Y, LIU XD, ZHANG LL, WU Y, WANG GW, WANG Q, JIANG Y. Screening, identification of multifunctional peanut root-promoting rhizobacteria and its promoting effects on peanuts (*Arachis hypogaea* L.)[J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(10): 125-134 (in Chinese).
- [14] 王平, 董飏, 李阜棣, 胡正嘉. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326.
WANG P, DONG B, LI FD, HU ZJ. Detection and determination of the siderophores produced by wheat rhizobacteria[J]. Microbiology China, 1994, 21(6): 323-326 (in Chinese).
- [15] 于豪杰. 产蛋白酶乳酸菌的筛选及其应用于豆粕发酵初探[D]. 郑州: 郑州大学硕士学位论文, 2020.
YU HJ. Screening of protease-producing lactic bacteria and its application in soybean meal fermentation[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Zhengzhou University, 2020 (in Chinese).
- [16] 宋朝霞, 范玲, 李鹏, 周庆举. 一株纤维素酶高产细菌的筛选及鉴定[J]. 河南工程学院学报(自然科学版), 2018, 30(4): 76-81.
SONG ZX, FAN L, LI P, ZHOU QJ. Screening and identification of a cellulase-producing strain[J]. Journal of Henan University of Engineering (Natural Science Edition), 2018, 30(4): 76-81 (in Chinese).
- [17] SAXENA AK, KUMAR M, CHAKDAR H, ANUROOPA N, BAGYARAJ DJ. *Bacillus* species in soil as a natural resource for plant health and nutrition[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(6): 1583-1594.
- [18] FAN B, BLOM J, KLENK HP, BORRIS R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an operational group *B. amyloliquefaciens* within the *B. subtilis* species complex[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 22.
- [19] FAZLE RABBEE M, BAEK KH. Antimicrobial activities of lipopeptides and polyketides of *Bacillus velezensis* for agricultural applications[J]. Molecules, 2020, 25(21): 4973.
- [20] REPKA LM, CHEKAN JR, NAIR SK, van der DONK WA. Mechanistic understanding of lanthipeptide biosynthetic enzymes[J]. Chemical Reviews, 2017, 117(8): 5457-5520.
- [21] DELA CRUZ-LÓPEZ N, CRUZ-LÓPEZ L, HOLGUÍN-MELÉNDEZ F, GUILLÉN-NAVARRO GK, HUERTA-PALACIOS G. Volatile organic compounds produced by cacao endophytic bacteria and their inhibitory activity on *Moniliophthora roreri*[J]. Current Microbiology, 2022, 79(2): 35.
- [22] STAMENKOVIĆ JG, PETROVIĆ GM, ĐORĐEVIĆ AS. Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Achillea coarctata* Poir. essential oils[J]. Chemistry & Biodiversity, 2022, 19(10): e202200578.
- [23] XU S, XIE XW, ZHAO YR, SHI YX, CHAI AL, LI L, LI BJ. Whole-genome analysis of *Bacillus velezensis* ZF2, a biocontrol agent that protects *Cucumis sativus* against *Corynespora* leaf spot diseases[J]. 3 Biotech, 2020, 10(4): 186.
- [24] HUANG L, LI QC, HOU Y, LI GQ, YANG JY, LI DW, YE JR. *Bacillus velezensis* strain HYEB5-6 as a potential biocontrol agent against anthracnose on *Euonymus japonicus*[J]. Biocontrol Science and Technology, 2017, 27(5): 636-653.
- [25] 官超, 黎振兴, 麦培婷, 孙保娟, 李植良, 李涛. 番茄青枯病抗性相关根际微生物的研究进展[J]. 广东农业科学, 2021, 48(9): 51-61.
GONG C, LI ZX, MAI PT, SUN BJ, LI ZL, LI T. Research progress of rhizosphere microorganisms related to tomato bacterial wilt resistance[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2021, 48(9): 51-61 (in Chinese).
- [26] 姚文武, 张晓丽, 秦双林, 季鸣宇, 张福建. 番茄青枯病发生机制及主要防治技术研究进展[J]. 长江蔬菜, 2022(20): 30-34.
YAO WW, ZHANG XL, QIN SL, JI MY, ZHANG FJ. Research progress on pathogenic mechanism and main control techniques of tomato bacterial wilt[J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2022(20): 30-34 (in Chinese).