

研究报告

解脲沙雷氏菌鉴定及防控青枯病机理分析

张娟^{1,2}, 吴正伟¹, 马紫君², 汤亚飞², 何自福^{*2}, 余小漫^{*2}

1 广东海洋大学 滨海农业学院, 广东 湛江 524088

2 广东省农业科学院植物保护研究所 广东省植物保护新技术重点实验室, 广东 广州 510640

张娟, 吴正伟, 马紫君, 汤亚飞, 何自福, 余小漫. 解脲沙雷氏菌鉴定及防控青枯病机理分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2613-2629.

ZHANG Juan, WU Zhengwei, MA Zijun, TANG Yafei, HE Zifu, SHE Xiaoman. Identification and mechanism analysis of *Serratia ureilytica* capable of controlling bacterial wilt[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2613-2629.

摘要: 【背景】番茄青枯病是番茄生产上常发的毁灭性病害, 可造成番茄减产 10%–100%, 导致严重的经济损失。【目的】明确生防菌株 BB183 分类地位及对番茄青枯病的防治效果, 为番茄青枯病的防控提供生防微生物资源。【方法】利用形态学特征、生理生化特性、基因组序列比较等方法, 确定菌株 BB183 的分类地位; 采用抑菌圈法测定菌株 BB183 对不同序列变种青枯菌菌株的抑菌活性; 通过盆栽试验测定菌株 BB183 对番茄青枯病的防效及对番茄的促生能力效果; 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记菌株测定 BB183 在番茄根、茎、叶及根际的定殖能力; 采用三代 PacBio 和二代 Illumina 技术相结合测定菌株 BB183 基因组。【结果】菌株 BB183 被鉴定为解脲沙雷氏菌(*Serratia ureilytica*); 该菌株对分属 6 个序列变种的 8 株番茄青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)菌株均有抑菌活性, 抑菌圈直径 1.20–1.69 cm; 盆栽试验测定结果表明, 菌株 BB183 对番茄青枯病的防效为 51.67%, 与 20%噻森铜的防效相当, 对番茄植株表现出显著的促生效果, 并可稳定在番茄根际土壤中定殖。基因组分析结果表明, 菌株 BB183 只包含 1 个环状的染色体, 基因组大小为 5 159 039 bp, G+C 含量为 59.35%, 共编码 4 664 个基因; 含有 10 个不同的次生代谢产物编码基因簇, 其中包括 3 个抗生素类产物合成基因簇, 4 个铁载体相关产物合成基因簇, 1 个抗原相关产物合成基因簇和 2 种潜在的抑菌物质合成基因簇。【结论】筛选获得的生防菌株 BB183 为解脲沙雷氏菌, 对番茄青枯菌具有良好的防治效果, 对番茄也有较好的促生能力。

关键词: 解脲沙雷氏菌; 番茄青枯病; 基因组; 防治效果; 促生

资助项目: 科技创新战略专项资金(高水平农科院建设) (R2023PY-JG011)

This work was supported by the Special Fund for Scientific Innovation Strategy-construction of High-level Academy of Agriculture Science (R2023PY-JG011).

*Corresponding authors. E-mail: SHE Xiaoman, shexiaoman@gdppri.com; HE Zifu, hezf@gdppri.com

Received: 2024-09-15; Accepted: 2024-11-04; Published online: 2024-12-05

Identification and mechanism analysis of *Serratia ureilytica* capable of controlling bacterial wilt

ZHANG Juan^{1,2}, WU Zhengwei¹, MA Zijun², TANG Yafei², HE Zifu^{*2}, SHE Xiaoman^{*2}

1 College of Coastal Agricultural Sciences, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, Guangdong, China

2 Key Laboratory of High Technology for Plant Protection of Guangdong Province, Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong, China

Abstract: [Background] Tomato bacterial wilt is a devastating disease that occurs frequently in tomato production. It can reduce tomato yields by 10%–100% and lead to severe economic losses. **[Objective]** To clarify the taxonomic status of the biocontrol strain BB183 and its ability to control tomato bacterial wilt and to provide a biocontrol strain for the prevention and control of this disease. **[Methods]** Morphological, physiological, and biochemical characteristics and genome sequence information were used to determine the taxonomic status of strain BB183. The inhibitory activities of strain BB183 against different sequevars of *Ralstonia solanacearum* was determined via the inhibition zone method. The abilities of strain BB183 to control tomato bacterial wilt and promote tomato growth were determined via pot experiments. A green fluorescent protein (GFP) marker was used to measure the abilities of strain BB183 to colonize tomato roots, stems, leaves, and rhizosphere. Strain BB183 genome was sequenced via a combination of third-generation PacBio and second-generation Illumina technologies. **[Results]** Strain BB183 was identified as *Serratia ureilytica*. The strain demonstrated inhibitory activities against eight *R. solanacearum* strains belonging to six sequevars, with the inhibition zone diameter ranging from 1.20 cm to 1.69 cm. The results of pot experiments revealed that the control efficiency of strain BB183 on tomato bacterial wilt was 51.67%, which was comparable to that of 20% thiosen copper. Moreover, the strain significantly promoted the growth of tomato plants and stably colonized the rhizosphere of tomato plants. Strain BB183 contained only one circular chromosome, with a genome size of 5 159 039 bp and the G+C content of 59.35%, encoding a total of 4 664 genes. It carried 10 different gene clusters encoding secondary metabolites, including three for antibiotic synthesis, four for siderophore synthesis, one for antigen synthesis, and two for potential antimicrobial substances. **[Conclusion]** Strain BB183 obtained by screening was *S. ureilytica*, demonstrating strong effects of controlling tomato bacterial wilt and promoting tomato growth.

Keywords: *Serratia ureilytica*; tomato bacterial wilt; genome; control efficiency; growth-promoting

番茄是我国重要的蔬菜作物, 2021 年我国番茄播种面积为 111.3 万 hm²^[1]。由茄科雷尔氏菌复合种(*Ralstonia solanacearum* species complex) 侵染引起的青枯病是番茄生产上的毁灭性病害, 可造成番茄减产 10%–100%, 导致严重的经济

损失^[2]。目前, 生产上防治番茄青枯病的措施主要有种植抗病品种或嫁接苗、药剂防治、轮作等。但青枯菌种群复杂, 存在多个序列变种, 且序列变种致病性分化严重, 加之番茄抗性资源缺乏, 导致番茄青枯病仍常发、多发与阶段

性流行^[3]；而长期使用化学药剂极易导致病原菌抗药性增强，还具有潜在的化学污染与食品安全风险。生防微生物及其产品具有绿色、安全、病原菌不易产生抗药性等优点，也是绿色农业和健康作物发展的必然要求。

前人对作物青枯病的生物防治已有许多研究，并取得良好进展。已报道对番茄青枯病有防治效果的生防菌主要有芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)等微生物和无致病力茄科雷尔氏菌等^[4-7]。芽孢杆菌属主要包括解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)^[8]。该属的菌株在自然环境中普遍存在、繁殖能力强、易存活、耐热、耐旱、可分泌一些抗菌代谢物质诱导植株产生抗病性，被认为是理想的生防菌^[9]。此外，有研究报道橙黄色黏球菌(*Myxococcus xanthus*)、洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)的一些菌种对番茄青枯病有较好的防效^[10-12]。

沙雷氏菌(*Serratia*)属于肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*) γ -变形菌，广泛存在于自然界中^[13]。解脲沙雷氏菌(*Serratia ureilytica*)是黏质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的近缘种^[14]，有研究报道该菌能够利用尿素，具有防治有害昆虫、修复土壤环境、杀菌、抗疟的作用^[15]。Amorim 等^[16]研究表明，沙雷氏菌对番茄植株具有显著的促生能力。Trejo-López 等^[17]从健康的芒果上分离到 3 株沙雷氏菌，它们能够产生几丁质酶、葡聚糖酶、纤维素酶和灵菌红素，对由暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)引起的芒果炭疽病有一定的防治效果。王靖等^[18]研究表明，黏质沙雷氏菌 LIEH 92 发酵液对向日葵菌核病的室内盆栽防效达 73.35%，菌株 LIEH 92 处理可提高向日葵植株的过氧化物酶(peroxidase, POD)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)和多酚氧化

酶(polyphenol oxidase, PPO)等防御酶活性，从而诱导向向日葵对菌核病的抗性。薛庆云^[11]筛选获得的沙雷氏菌(*Serratia* sp.) XY21 能定殖于番茄根际，对番茄青枯病的田间防效达到 70.16%。

课题组前期从番茄根际土壤中筛选出一株对番茄青枯菌有较好抑制效果的细菌^[19]，本研究对其进行分类地位鉴定，测定其对不同序列变种青枯菌的抑菌效果及对番茄青枯病的防治效果，以期为开发利用该菌株提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样品

生防菌 BB183、番茄青枯菌(*Ralstonia solanacearum*) RS180 (序列变种 13)、SSf-4 (序列变种 14)、RS397 (序列变种 17)、GMI1000 (序列变种 18)、TS-2 (序列变种 18)、RS404 (序列变种 34)、RS550 (序列变种 34)和 RS129 (序列变种 44)等均由本试验室保存。番茄，品种为‘Alisa carig’，由北京农林科学院蔬菜研究所李常保研究员提供。pbav1k-T5-sf GFP 质粒，宁波明舟生物科技有限公司。

1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L)：蛋白胨 10.0，酵母提取物 5.0，氯化钠 10.0，pH 7.0–7.2；LB 液体培养基中加入 12.0 g/L 琼脂为 LB 固体培养基。

TZC 培养基(g/L)：蛋白胨 10.0，干酪素水解物 1.0，葡萄糖 5.0，琼脂 15.0，2,3,5-氯化三苯基四氮唑 5.0，pH 7.0–7.2。

铁载体检测铬天青(Chrome azurol S, CAS)培养基、产蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶和 β -1,3 葡聚糖酶检测培养基、吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)检测培养基、阿须贝氏培养基及解磷培养基的配制方法参考文献[20-24]。

1.3 主要试剂和仪器

2,3,5-氯化三苯基四氮唑，BBI 生命科学有限公司；革兰氏染色试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；ExTaq 酶和 2000 DNA marker，宝生物工程(大连)有限公司；GlodView 核酸染料，湖

南艾科瑞生物工程有限公司; EasyPure® Genomic DNA Kit, 北京全式金生物技术股份有限公司。

生化培养箱, 韶关市泰宏医疗器械有限公司; 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 分光光度计, 赛默飞世尔科技公司; 透射电镜, 株式会社日立制作所; 荧光显微镜 Nikon H550s, 尼康株式会社。

1.4 菌株 BB183 对青枯菌不同序列变种菌株的抑菌活性测定

菌株 BB183 悬浮液的制备: 挑取 LB 固体培养基上活化的菌株 BB183 单菌落接种于装有 5 mL LB 液体培养基的试管中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h。将培养获得的 BB183 种子液按照 1% 的接种量接种至含有 150 mL 的 LB 液体培养基的三角瓶中, 同样的培养条件继续培养 24 h。青枯菌菌株悬浮液的制备: 挑取在 TZC 培养基上活化的青枯菌单菌落, 在 TZC 斜面培养基上复壮, 30 °C 培养 24 h; 挑取白色菌落接种于装有 5 mL TZC 液体培养基的试管中, 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h。

采用平板抑菌圈法测定菌株 BB183 对分属 6 个序列变种的 8 株番茄青枯菌的抑菌活性。加热融化 TZC 固体培养基, 待其冷却后, 加入 500 μ L 的不同序列变种的青枯菌悬浮液, 混匀后倒入 90 mm 培养皿中制成含青枯菌的平板, 平板晾干后在平板上面放置直径为 8 mm 的灭菌滤纸片, 每片滤纸接种 5 μ L 菌株 BB183 的菌悬液, 每平板放置 3 片滤纸片, 30 °C 培养 48 h, 利用十字交叉法测量抑菌圈直径大小。

1.5 菌株 BB183 的分类鉴定

1.5.1 菌株 BB183 的形态观察

将菌株 BB183 在 LB 固体培养基上 30 °C 培养 24 h 后, 观察菌落的形态, 并用革兰氏染色试剂盒进行染色。利用透射电镜观察细菌的形态, 并测量其大小, 委托广东省微生物分析检测中心完成。

1.5.2 菌株 BB183 的生理生化测定

参考《常见细菌系统鉴定手册》^[25]对菌株

BB183 进行生理生化鉴定。每一试验均设置 3 个重复。

1.5.3 菌株 BB183 的分子生物学鉴定

采用 EasyPure® Genomic DNA Kit 提取菌株 BB183 的基因组 DNA, 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCMTGGC TCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGA CTT-3') 对其 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μ L): DNA 模板 (112 ng/ μ L) 1 μ L, 27F (10 μ mol/L) 2 μ L, 1492R (10 μ mol/L) 2 μ L, 2 $\times$ Taq Mix 25 μ L, ddH₂O 20 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序, 序列提交 NCBI 进行 BLAST 比对。下载相似性较高的序列利用 MEGA 11 ClustalW 进行比对, 采用邻接法构建系统发育树。

1.6 菌株 BB183 的促生能力分析

1.6.1 菌株 BB183 产 IAA 能力的测定

每个试管中加入 5 mL 的 IAA 检测培养基, 再加入 100 μ L BB183 菌液 ($OD_{600}=1$), 以加入 100 μ L 无菌水作为空白对照, 30 °C、180 r/min 振荡培养 2 d 后 5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 200 μ L 和 IAA 比色液 200 μ L 至 1.5 mL 离心管中, 轻弹混匀, 以 200 μ L 无菌水作为对照。室温下放置 20 min, 观察颜色变化情况, 如离心管中的液体变红, 则表明有 IAA 产生。

1.6.2 菌株 BB183 产嗜铁素能力的测定

采用单点法将菌株 BB183 接种至 CAS 检测培养基平板, 30 °C 培养 3 d, 观察菌落周围有无黄色的晕圈, 如果有则表明该菌能够产生嗜铁素。

1.6.3 菌株 BB183 固氮解磷能力的测定

采用划线法将菌株 BB183 接种到阿须贝氏固氮培养基, 30 °C 培养 2 d, 观察周围是否有透明圈的产生, 如有透明圈表示菌株具有固氮能力。采用 3 点法将菌株 BB183 接种到解磷培

培养基,观察周围是否有透明圈的产生,有透明圈表示菌株有解磷能力。

1.6.4 菌株 BB183 产酶能力的测定

参考胡荣等^[21]、刘婉^[22]、陈云云等^[23]、王超等^[24]的方法,分别测定菌株 BB183 是否有产生淀粉酶、纤维素酶、 β -1,3 葡聚糖酶和蛋白酶的能力。

1.6.5 菌株 BB183 对番茄植株促生能力的测定

将番茄播种于灭菌土(营养土与田园土 1:1 混合)中,待番茄长至 2 叶 1 心时,选取生长一致的番茄苗进行促生能力测定,每株番茄苗淋根 50 mL 的 BB183 菌液(终浓度为 1×10^8 CFU/mL),以淋 50 mL 稀释的 LB 液体培养基为对照;每处理 15 株苗,3 次重复。各处理随机排列,15 d 后测量番茄的株高、根长、茎粗、鲜重和根重。

1.7 菌株 BB183 室内盆栽防效的测定

将番茄播种于灭菌土(营养土与田园土 1:1 混合)中,待番茄长到 4 叶 1 心时进行移栽。试验设置 4 个处理:(1) 菌株 RS550 阳性对照;(2) 菌株 BB183+菌株 RS550;(3) 20%噻森铜+菌株 RS550;(4) 清水对照。定植 1 周后,处理 1 和处理 4 每株番茄用自来水淋根;处理 2 每株番茄用 50 mL 菌株 BB183 菌液(BB183 培养液离心收集菌体后用自来水重悬制备菌悬液,终浓度为 1×10^8 CFU/mL)淋根;处理 3 每株番茄用 50 mL 20%噻森铜悬浮剂稀释 300 倍液淋根。5 d 后,处理 1、2 和 3 的番茄分别用 50 mL 的青枯菌 RS550 菌液(终浓度为 1×10^8 CFU/mL)淋根。每个处理 15 株番茄,3 次重复。各处理随机排列,培养温度为 25–30 °C,湿度为 60%–80%,7 d 后调查其病级数。番茄青枯病情分级标准:0 级:植株健康未出现萎焉现象;1 级:1%–25%叶片出现萎焉;2 级:26%–50%叶片出现萎焉;3 级:51%–75%叶片出现萎焉;4 级:76%–100%叶片萎焉^[26]。根据公式(1)计算番茄青枯病情指数,根据公式(2)计算菌株 BB183 的防治效果。

病情指数 = $\frac{\sum(\text{发病株数} \times \text{该病等级值})}{(\text{调查总株数} \times \text{最高等级值})} \times 100$ (1)

防效(%) = $\frac{(\text{对照病情指数} - \text{处理组病情指数})}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$ (2)

1.8 菌株 BB183 的全基因组测定

1.8.1 菌株 BB183 基因组测序

挑取在 LB 平板上活化的菌株 BB183 单菌落,接种到 5 mL LB 液体培养基中,30 °C、180 r/min 培养 24 h;按 1%接种量取 150 μ L 菌液接种到 150 mL LB 液体培养基中,30 °C、180 r/min 培养 24 h 后 5 000 r/min 离心 10 min 去上清收集菌体,–80 °C 保存。采用三代 PacBio 和二代 Illumina 技术相结合的方法测序,由广州基迪奥生物科技有限公司完成。

1.8.2 菌株 BB183 平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分析

从 NCBI 上下载沙雷氏菌属 10 个代表种基因组,采用 OAT 软件计算各菌株基因组间总核苷酸序列相似性。

1.8.3 菌株 BB183 次生代谢物产物预测分析

将菌株 BB183 的全基因组序列上传 antiSMASH 数据库网站进行在线分析,预测菌株 BB183 次生代谢产物合成的基因簇。

1.9 菌株 BB183 定殖能力的测定

1.9.1 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标记菌株的构建

参考大肠杆菌感受态的制作方法,制备菌株 BB183 感受态细胞^[27]。取 2 μ L pbav1k-T5-sf GFP 质粒加入 100 μ L 感受态细胞中,用手指轻弹混匀,放置冰上 30 min;将感受态转移到 0.1 cm 预冷的电击杯中,2 200 V 电击 2 次;加入 500 μ L LB 液体培养基,混匀菌液,30 °C 复苏 1 h;取 60 μ L 涂布在含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基上,30 °C 培养 16 h。挑取荧光显微镜下有荧光的单菌落进行培养,采用 EasyPure® Genomic DNA Kit 提取候选单菌落的基因组 DNA,并用 GFP 检测引物 T5F (5'-GTTC AAACTCAAGAAGGACC-3')和 T5R (5'-GTT

GTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGG-3') 进行 PCR 鉴定, 获得阳性菌株。PCR 反应体系(25 μ L): 模板(125 ng/ μ L) 1 μ L, 引物 T5F (10 μ mol/L) 1 μ L, 引物 T5R (10 μ mol/L) 1 μ L, 2 $\times$ Taq Mix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 1 min; 94 $^{\circ}$ C 35 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。同时利用细菌 16S rRNA 基因通用引物对阳性菌株进行鉴定, PCR 反应体系及反应程序同 1.5.3。

1.9.2 菌株 BB183^{GFP} 根际定殖能力的检测

将番茄播种于灭菌土(营养土与田园土 1:1 混合)中, 待番茄长至苗 4 叶 1 心进行生防菌定殖能力的检测。每株番茄苗灌根 50 mL 的 BB183 菌液(终浓度为 1×10^8 CFU/mL), 在淋根后 5、10、15、20、25、30 和 35 d 进行取样, 每个处理时间取 3 株。分别将每株的根际土按照 1:10 加入无菌水中混匀, 以 10 倍数逐步稀释, 分别取 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 的土壤悬浮液 100 μ L 涂布在含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 每个浓度涂 3 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 统计平板上有荧光的菌落数。称取根、茎、叶各 1 g, 依次用 75% 酒精消毒 1 min, 1% 次氯酸钠消毒 30 s, 用无菌水清洗 3 次, 用灭菌滤纸吸干样品上的

水, 然后放入加有 3 mL 无菌水的研钵中, 研磨呈匀浆状, 静置 30 min; 取 1 mL 研磨液稀释 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} , 取 100 μ L 稀释液和原液涂板, 每个稀释度涂 3 个平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 统计平板上有荧光的菌落数^[28], 计算出每克番茄根、茎、叶中生防菌的定殖量。

2 结果与分析

2.1 菌株 BB183 对青枯菌不同序列变种抑菌活性检测结果

平板抑菌圈法测定结果显示, 菌株 BB183 对分属 6 个序列变种的 8 株番茄青枯菌菌株均有较好的抑菌活性(图 1), 但对不同的序列变种菌株的抑菌活性存在差异, 抑菌圈平均直径为 1.20–1.69 cm (表 1)。

2.2 菌株 BB183 鉴定结果

菌株 BB183 在 LB 固体培养基上的菌落特点为圆形, 乳白色, 中央隆起, 边缘整齐光滑(图 2A), 革兰氏染色紫红色, 为革兰氏阴性菌(图 2B); 透射电镜观察结果显示, 菌体为短杆状, 两端钝圆(图 2C); 随机测量了 5 个菌体, 平均长为 1.15 μ m (0.88–1.58 μ m, SD=0.25), 平均宽为 0.75 μ m (0.71–0.83 μ m, SD=0.04)。

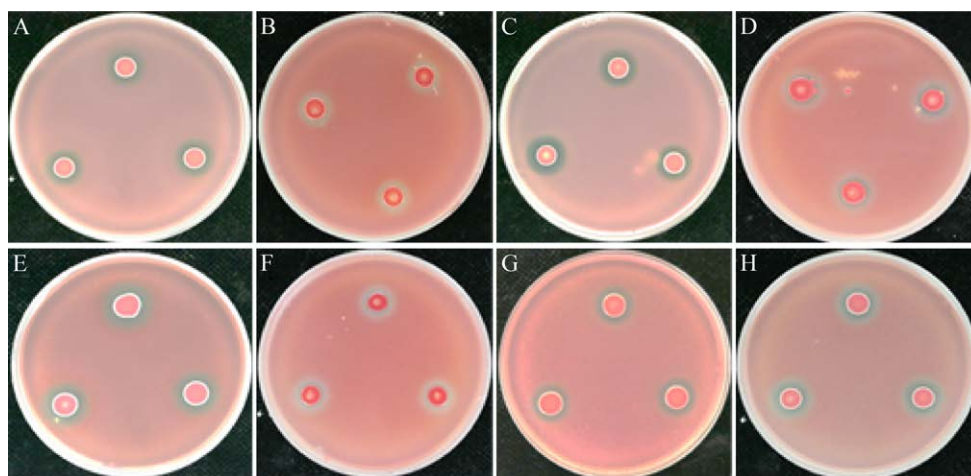


图 1 菌株 BB183 对不同序列变种番茄青枯菌的抑菌效果

Figure 1 The inhibitory effects of strain BB183 against different sequevars of *R. solanacearum* isolates. A: Strain RS180; B: Strain RS129; C: Strain RS397; D: Strain GMI1000; E: Strain TS-2; F: Strain RS404; G: Strain RS550; H: Strain SSF-4.

表 1 菌株 BB183 对不同序列变种青枯菌的抑菌圈直径

Table 1 Diameter of inhibition zone of strain BB183 against different sequevars of *R. solanacearum* isolates

青枯菌 <i>R. solanacearum</i>	序列变种 Sequevar	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (cm)
RS180	13	1.47±0.02
RS129	44	1.20±0.04
RS397	17	1.60±0.00
GMI1000	18	1.50±0.00
TS-2	18	1.69±0.03
RS404	34	1.10±0.06
RS550	34	1.53±0.03
SSf-4	14	1.55±0.03

抑菌圈直径数据为平均值±标准误, 每个处理 3 个生物学重复。

Data of inhibition zone diameter were mean±SE, three biological replicates per treatment.

生理生化测定结果显示, 菌株 BB183 具有运动性, 能够使明胶液化, 硝酸盐还原、V-P 试验、柠檬酸盐利用、过氧化氢酶、精氨酸水解、脲酶利用、鸟氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶试验为阳性; 甲基红试验、丙二酸盐利用、氧化酶、淀粉酶为阴性; 可利用阿拉伯糖、纤维二糖、蔗糖、鼠李糖、葡萄糖、乳糖、棉籽糖、甘露醇、卫矛醇和山梨醇。

采用 27F/1492R 引物扩增获得菌株 BB183

16S rRNA 基因近全长序列, 约 1 500 bp。序列相似性比较分析结果显示, 菌株 BB183 与 12 株沙雷氏菌的相似性在 96.78%–100%, 其中与解脲沙雷氏菌(*Serratia ureilytica*) HNU47 的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%。利用 MEGA 11 构建系统发育树, 菌株 BB183 与解脲沙雷氏菌 HNU47 (CP098030) 聚为一支, 置信度为 84% (图 3)。基于 16S rRNA 基因序列的菌株 BB183 系统发育分析结果, 结合菌体形态和生理生化结果, 将菌株 BB183 鉴定为解脲沙雷氏菌。

2.3 菌株 BB183 的促生能力分析

生物学特性测定结果显示, 菌株 BB183 在阿须贝氏固氮培养基、解磷培养基和产蛋白酶培养基培养 2 d 后, 菌落周围均产生透明圈, 说明菌株 BB183 具有固氮、解磷和产蛋白酶能力(图 4A–4C); 菌株 BB183 能使 IAA 检测培养基变红, 表明菌株具有产 IAA 能力(图 4D); 菌株 BB183 在 CAS 检测培养基平板培养 3 d 后, 接种点周围没有黄色的晕圈, 表明菌株 BB183 不能产生嗜铁素(图 4E); 菌株 BB183 在产淀粉酶、纤维素酶和 β -1,3 葡聚糖酶培养基培养 2 d 后, 菌落周围均不产生透明圈, 说明菌株 BB183 没有产淀粉酶、纤维素酶和 β -1,3 葡聚糖酶的能力(图 4F–4H)。

菌株 BB183 菌液处理番茄植株 15 d 后统计结果表明: 相较于对照组, 菌株 BB183 菌液对番茄植株的株高、根长、茎粗、鲜重和根重具有

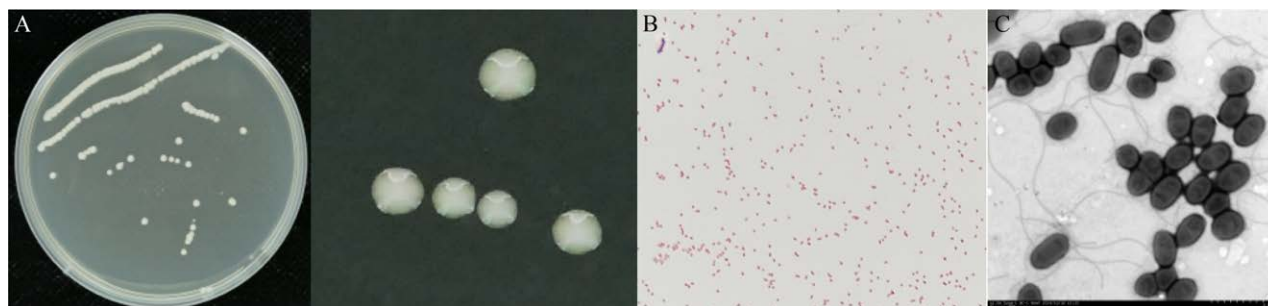


图 2 菌株 BB183 的形态特征 A: 培养基上的形态; B: 革兰氏染色; C: 透射电镜下的形态。

Figure 2 Morphological characteristics of strain BB183. A: Morphology on the culture medium; B: Gram staining; C: Morphology under transmission electron microscopy.

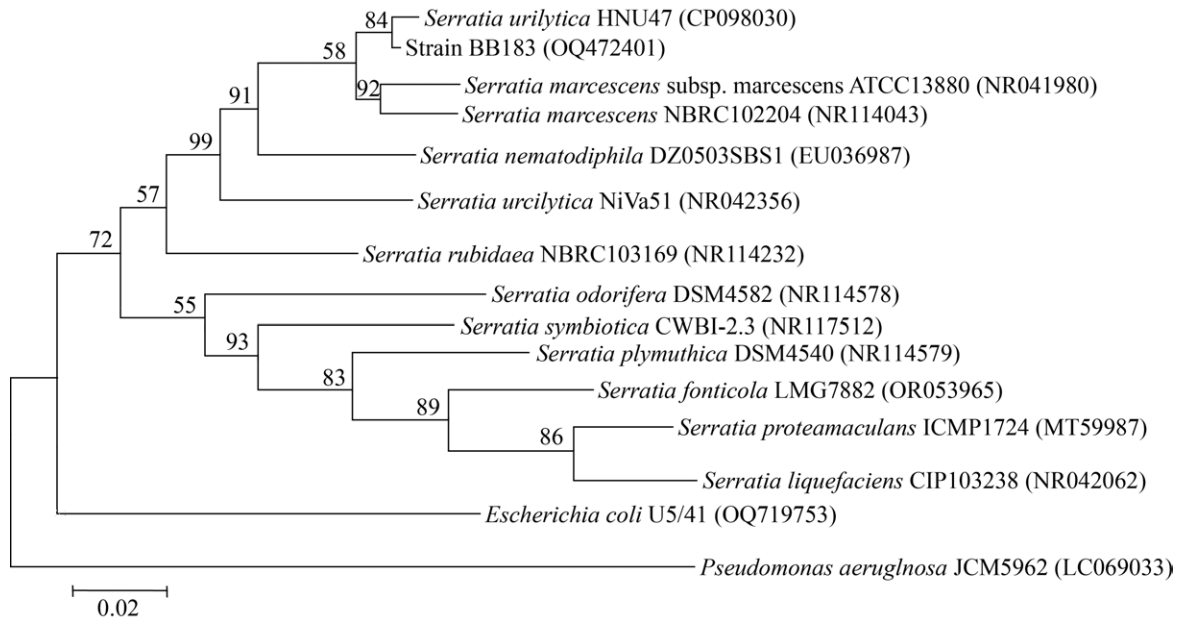


图3 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 BB183 的系统发育树 括号内编号为菌株的 GenBank 登录号；分支上的数字为 bootstrap 值，代表分类单位聚类的概率；标尺刻度为序列差异的分支长度。

Figure 3 Phylogenetic tree of strain BB183 based on 16S rRNA gene sequence. The GenBank accession number of the strain is indicated in parentheses; The numbers on the branch are the bootstrap values, representing the probability of the taxa being clustered together; Bar: Nucleotide divergence.

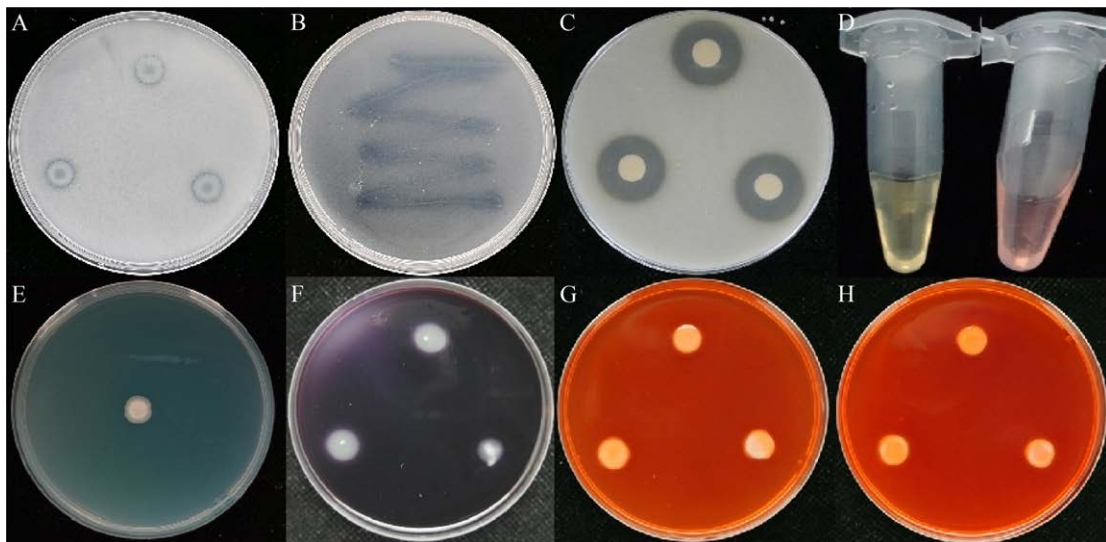


图4 菌株 BB183 生物学功能测定结果 A: 解磷培养基; B: 固氮培养基; C: 蛋白酶检测培养基; D: 吲哚乙酸检测培养基(左: CK; 右: 菌株 BB183); E: 铁载体产生; F: 淀粉酶检测培养基; G: 纤维素酶检测培养基; H: β -1,3 葡聚糖酶检测培养基。

Figure 4 Results of biological function assay of strain BB183. A: Phosphorus solubilization culture medium; B: Nitrogen fixation culture medium; C: Protease detection medium; D: Indoleacetic acid detection medium (left: CK; right: strain BB183); E: Siderophore production; F: Amylase detection medium; G: Cellulase detection medium; H: β -1,3 glucanase detection medium.

促生作用(图 5),株高、根长、茎粗、鲜重和根重分别增加 22.41%、17.89%、10.53%、50.44% 和 77.14%,与对照处理相比差异显著(表 2)。

2.4 菌株 BB183 对番茄青枯病的防治效果

室内盆栽试验结果(图 6)表明,淋施青枯菌 7 d 后,青枯菌菌液单独处理的番茄植株大部分发病,平均病株率达 88.89%,病情指数为 82.77;青枯菌菌液和 BB183 菌液处理的番茄植株平均病株率为 48.89%,病情指数为 40.00, BB183 菌液对番茄青枯病的防治效果为 51.67%;青枯菌菌液和 20%噻森铜 300 倍液处理的番茄植株青枯病平均病株率为 40.00%,病情指数为 36.77, 20%噻森铜对番茄青枯病的防治效果为 55.58% (表 3)。方差分析结果显示, BB183 菌液和 20%噻森铜对番茄青枯病的防效差异不显著(表 3)。

2.5 菌株 BB183 全基因组分析结果

2.5.1 菌株 BB183 基因组特征

菌株 BB183 基因组测序结果表明,菌株

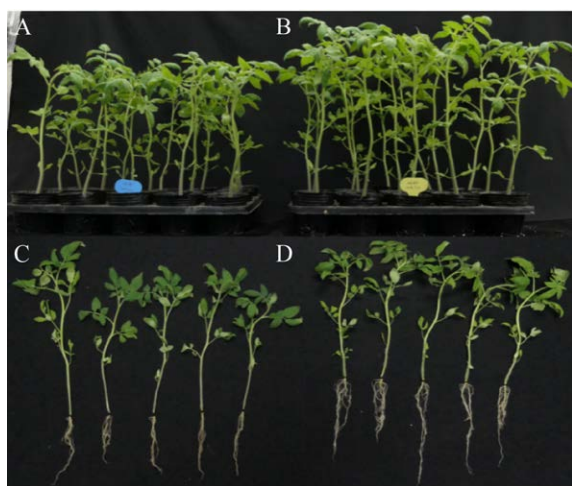


图 5 菌株 BB183 对番茄植株促生能力测定结果 A: 对照处理; B: 菌株 BB183 菌液处理; C: 对照处理; D: 菌株 BB183 菌液处理。

Figure 5 Growth promotion ability of strain BB183 on tomato plants. A: Mock; B: Treatment with BB183 liquid culture; C: Mock; D: Treatment with BB183 liquid culture.

表 2 菌株 BB183 对番茄植株的促生效果

Table 2 Growth promotion efficiency of strain BB183 on tomato plant

Item	Strain BB183	Control	Growth promoting efficiency (%)
株高 Plant height (cm)	30.15±0.46a	24.63±0.63b	22.41
根长 Root length (cm)	18.65±0.69a	15.82±0.75b	17.89
茎粗 Stem diameter (mm)	3.78±0.05a	3.42±0.08b	10.53
鲜重 Fresh weight (g)	6.83±0.23a	4.54±0.23b	50.44
根重 Root weight (g)	0.62±0.04a	0.35±0.04b	77.14

数据为平均值±标准误,同一指标不同小写字母表示在 $P<0.05$ 差异显著, $n=45$ 。

The data were mean±SE. Different lowercase letters of the same item indicate significant difference at $P<0.05$, $n=45$.

BB183 只包含 1 个环状的染色体,基因组全长为 5 159 039 bp, G+C 含量为 59.35%;共编码 4 664 个基因,注释至 21 条 COG 功能分类,分别为转录、核糖体结构和生物起源(translation, ribosomal structure and biogenesis) 188 个基因, RNA 加工和修饰(RNA processing and modification) 1 个基因,转录(transcription) 397 个基因,复制、重组和修复(replication, recombination and repair) 133 个基因,染色质结构和动力学(chromatin structure and dynamics) 2 个基因,细胞周期调控、细胞分裂、染色体分区(cell cycle control, cell division, chromosome partitioning) 34 个基因,防御机制(defense mechanisms) 62 个基因,信号转导机制(signal transduction mechanisms) 179 个基因,细胞壁/膜/内膜生物起源(cell wall/membrane/envelope biogenesis) 253 个基因,细胞运动(cell motility) 105 个基因,胞内运输、分泌和囊泡转运(intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport) 118 个基因,转

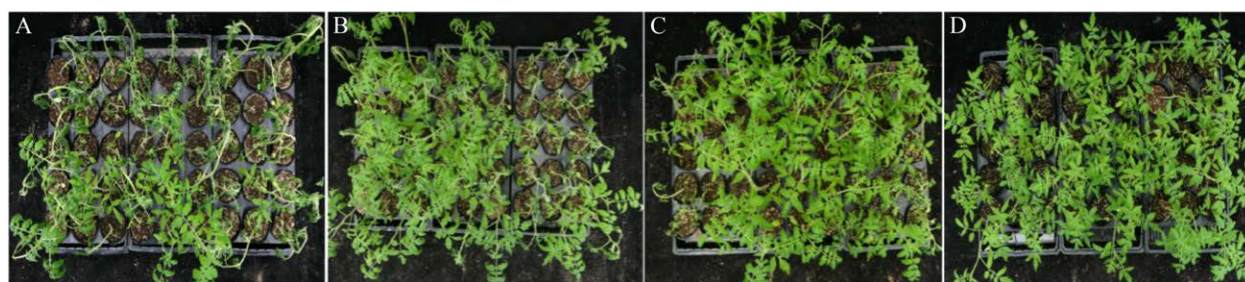


图 6 菌株 BB183 对番茄青枯病的防治效果 A: 菌株 RS550; B: 菌株 BB183+RS550; C: 20%噻森铜+菌株 RS550; D: 清水。

Figure 6 Control effect of BB183 on tomato bacterial wilt. A: Strain RS550; B: Strain BB183+RS550; C: 20% thiazene copper+strain RS550; D: Water.

表 3 菌株 BB183 对番茄青枯病的防治效果

Table 3 Control efficiency of strain BB183 on tomato bacterial wilt

Item	Control (RS550)	Strain BB183+RS550	20% thiazene copper+RS550
病株率 Disease incidence rate (%)	88.89	48.89	40.00
病情指数 Disease index	82.77±8.20a	40.00±14.16b	36.77±16.76b
平均防效 Average control efficiency (%)		51.67	55.58

病情指数数据为平均值±标准误差, 每个处理 3 个生物学重复。

Data of disease index were mean±SE, three biological replicates for each treatment.

录后修饰、蛋白质周转伴侣(posttranscriptional modification, protein turnover, chaperones) 167 个基因, 能量产生和转换(energy production and conversion) 250 个基因, 碳水化合物转运和代谢(carbohydrate transport and metabolism) 370 个基因, 氨基酸转运和代谢(amino acid transport and metabolism) 542 个基因, 核酸转运和代谢(nucleotide transport and metabolism) 100 个基因, 辅酶转运和代谢(coenzyme transport and metabolism) 178 个基因, 脂类转运和代谢(lipid transport and metabolism) 135 个基因, 无机离子转运和代谢(inorganic ion transport and metabolism) 346 个基因, 次级代谢产物合成途径、转运和分解(secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism) 131 个基因, 一般功能预测(general function prediction only) 603 个基因, 此外含有未知功能(function unknown) 370 个基因; 非编码基因有 128 个(其中含 90 个 tRNA, 22 个 rRNA 和 16 个 ncRNA) (GenBank 登录号为

CP142395) (图 7)。此外, 菌株 BB183 基因组中预测含有 1 个 CRISPR (1 671 299–1 671 686 bp)、1 个正链前噬菌体(204 311–246 766 bp)、2 个基因组岛(genomic islands, GIs) (205 015–257 128 bp 和 4 557 649–4 563 851 bp)、10 个次生代谢产物基因簇及 499 个含信号肽蛋白, 其中跨膜蛋白 95 个, 分泌蛋白 404 个。

ANI 分析结果表明, 菌株 BB183 与 *S. ureilytic* HNU47 和菌株 T6 的全基因组序列一致性分别为 99.23%和 97.64%, 而与其他 7 株沙雷氏菌属菌株的全基因组序列一致性为 84.76%–95.47% (图 8), 进一步支持菌株 BB183 为解脲沙雷氏菌。

2.5.2 菌株 BB183 次生代谢产物合成基因簇预测

使用 antiSMASH 对菌株 BB183 的基因组进行分析, 预测出 10 个不同的次生代谢产物编码基因簇(表 4), 包括 5 个非核糖体肽合成酶基因簇(non-ribosomal peptide synthetase cluster,

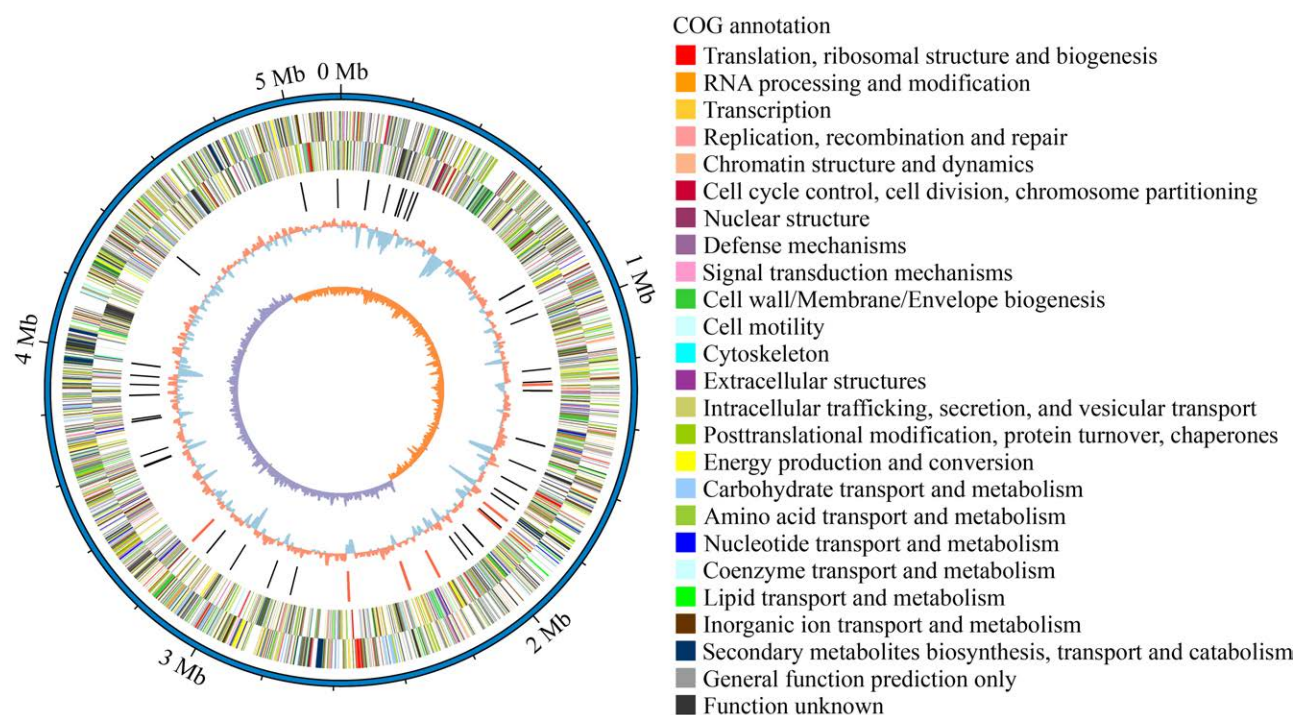


图7 菌株BB183基因组圈图 圈图由外向内分别表示基因组大小、正链和负链编码蛋白质编码区(不同颜色代表不同注释功能)、ncRNA, G+C含量(橙色向外表示G+C含量低于平均水平,蓝色向内表示G+C含量高于平均水平)、G+C分布(蓝色向外表示G含量高于C含量,橙色向内表示G含量低于C含量)。

Figure 7 Circle diagram of the strain BB183 genome. The circle plot represents genome size, positive and negative strand of coding DNA sequence (different colors represent different annotation functions), ncRNA, G+C content (orange outward indicates below average G+C content, blue inward indicates above-average G+C content), G+C distribution (blue outward indicates that G content is higher than C content, and orange inward indicates that G content is below C content).

NRPS), 与已知的编码抗生素次级代谢产物 kolossin、andrimid 和 5-dimethylallylindole-3-acetonitrile 的基因簇, 与铁载体相关次级代谢产物 trichrysobactin/cyclic trichrysobactin/chrysobactin/dichrysobactin, 与 viobactin 基因簇的相似性为 33%–100%; 编码的次级代谢产物 opine like metallophore 基因簇与具有金属螯合剂作用的 yersinopine 基因簇的相似性为 100%; 编码的含硫环状多肽类抗生素 thiopeptide 基因簇与编码 O-抗原基因簇的相似性为 14%; 编码的次级代谢产物 RRE-containing 基因簇与编码铁载体相关次级代谢产物 synechobactin 的基因簇相似性仅为 9%。此外, 菌株 BB183 基因组还含有编码 batalactone 和

hserlactone 这 2 种次级代谢产物的基因簇, 但与已发表的基因组没有同源性, 推测菌株 BB183 可能编码一类新的抑菌活性物质。

2.6 菌株 BB183^{GFP} 根际定殖能力测定结果

应用电击法将带有荧光蛋白基因的质粒成功转入菌株 BB183 中, 获得具有荧光标记的菌株 BB183^{GFP}。

定殖试验结果显示, 菌株 BB183^{GFP} 可稳定定殖于番茄根际部, 但不能在番茄植株根、茎、叶内定殖。接种处理 10 d 后, 菌株 BB183^{GFP} 在番茄根际的定殖量最高为 2×10^7 CFU/g, 之后定殖菌量逐渐下降; 25 d 后, 菌株 BB183^{GFP} 在番茄根际的定殖量趋于稳定(图 9)。

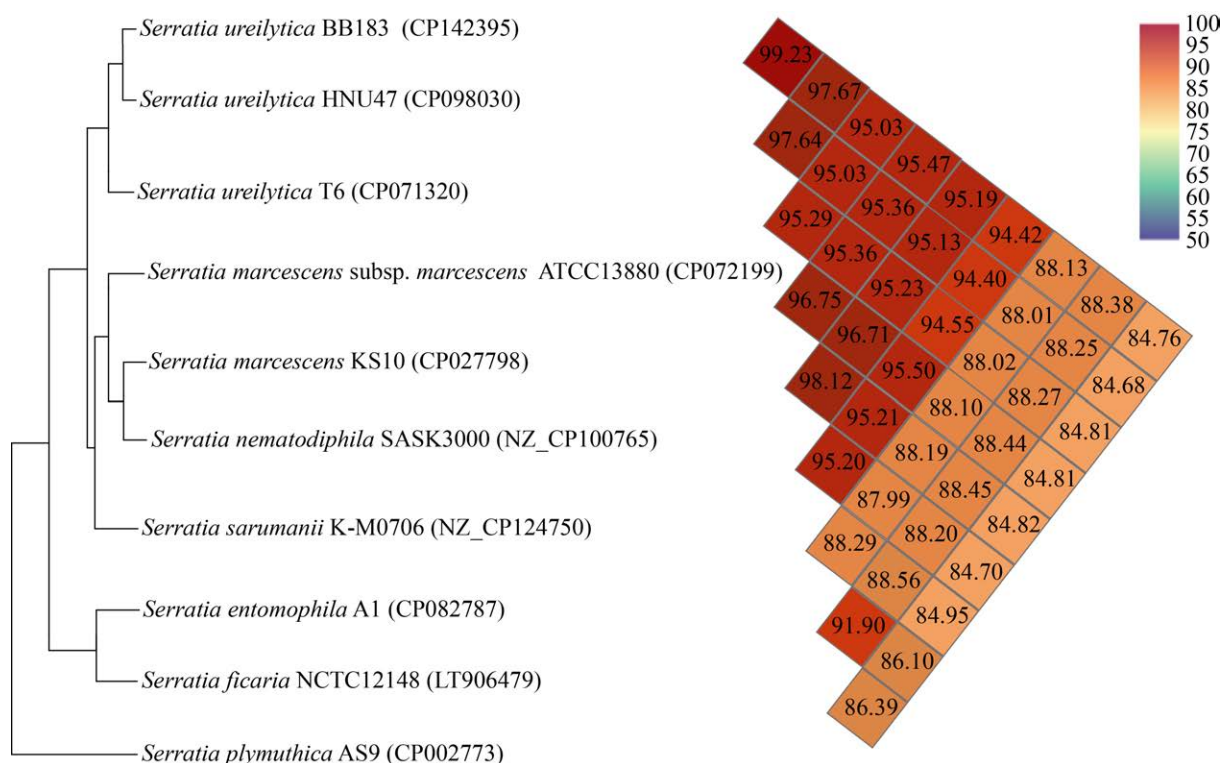


图8 基于菌株BB183和9株沙雷氏菌属菌株基因组平均核苷酸一致性的系统发育树 括号内编号为菌株的GenBank登录号；小方格内数据为两株菌株基因组平均核苷酸一致性；方格颜色越深表示基因组平均核苷酸一致性越高。

Figure 8 Phylogenetic tree base on pairwise average nucleotide identity (ANI) comparisons of whole genomes of strain BB183 and other nine strains. The GenBank accession number of the strain is indicated in parentheses; The data in each small square represents the pairwise average nucleotide identity of two strains; The darker small square represents the higher pairwise average nucleotide identity.

表4 菌株BB183次生代谢产物合成基因簇预测结果

Table 4 Predicted result of secondary metabolite synthesis gene clusters of strain BB183

簇编号 Cluster ID	簇类型 Cluster type	基因位置 Gene location	已知基因簇 Known cluster	相似度 Similarity (%)
Cluster 1	Thiopeptide	370 967–397 410	O-antigen	14
Cluster 2	Batalactone	1 386 946–1 412 614	/	/
Cluster 3	NRPS	1 784 042–1 848 122	Trichrysobactin/cyclic trichrysobactin/ chrysobactin/dichrysobactin	46
Cluster 4	Hserlactone	2 085 749–2 106 423	/	/
Cluster 5	NRPS	2 616 476–2 674 328	Kolossin	100
Cluster 6	NRPS-like	3 930 260–3 979 713	Andrimid	95
Cluster 7	NRPS	3 997 788–4 074 533	5-dimethylallylindole-3-acetonitrile	33
Cluster 8	NRPS	4 729 434–4 777 941	Viobactin	46
Cluster 9	RRE-containing	4 795 380–4 815 658	Synechobactin	9
Cluster 10	Opine like metallophore	5 078 426–5 100 523	Yersinopine	100

“/”表示无已知基因簇或无基因序列相似度。

“/” indicates no known gene cluster or similarity.

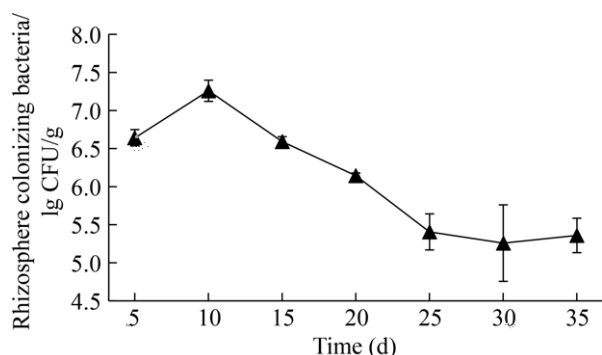


图9 菌株BB183^{GFP}在番茄根际定殖动态
Figure 9 Colonization dynamics of strain BB183^{GFP} in tomato rhizosphere soil.

3 讨论

在我国,青枯菌存在明显的遗传多样性和众多序列变种^[29-32],不同序列变种分布于不同生态区域^[32]。序列变种间致病性存在差异,即使是来源于相同寄主的不同序列变种青枯菌株对同一番茄品种的致病性也存在明显差异^[33],青枯菌致病力分化复杂导致番茄青枯病的防控难度大,长期大量使用化学药剂导致病原菌的抗药性增强并污染环境,亟待广泛筛选生防微生物,研发青枯病生防菌剂以满足番茄健康生产的需要。解脲沙雷氏菌(*S. ureilytica*)为2005年鉴定的新种,与黏质沙雷氏菌(*S. marcescens*)是近缘种,利用尿素作为唯一的氮源^[14],同时也具有生防菌功能。Arifiyanto等^[34]分离的解脲沙雷氏菌MBC1能抑制黑曲霉菌(*Aspergillus niger*)、假丝酵母菌(*Candida* sp.)和镰刀菌(*Fusarium* sp.)的生长。Cao等^[15]于2023年首次报道了解脲沙雷氏菌HNU47对青枯菌有拮抗效果,但未明确该菌株对番茄青枯病的防治效果。本研究通过形态学特征、生理生化特性、16S rDNA基因序列比较以及菌株全基因组分析,将对番茄青枯病有较好防治效果的菌株BB183鉴定为解脲沙雷氏菌。

生防菌田间防治效果不稳定,可能与田间应用时受到温度、湿度、土壤pH值等外界因素影响有关^[35]。本实验室前期研究结果表明,相同寄主、不同序列变种的青枯菌菌株对相同

抗性的番茄品种具有不同致病性,不同序列变种分布于不同生态区域^[31]。我们推测生防菌田间防治效果不稳定,可能与病原菌致病性不同相关。因此,本试验利用相同寄主、不同序列变种以及不同地理来源的6个序列变种的8株番茄青枯菌作为底菌,以及在广东省各个生态区均有分布的序列变种34的青枯菌菌株作为盆栽试验的接种菌株,旨在筛选出具有对作物青枯病菌有广谱拮抗且可应用到广东省多个生态区的生防菌株。

为解析菌株BB183的抑菌防病机理,本研究采用三代结合二代测序技术测定了菌株BB183的基因组序列,菌株BB183只包含1个环状的染色体,共编码4664个基因,注释至21条COG功能分类,通过编码的基因数目推测菌株BB183可能有较强的氨基酸、碳水化合物转运和代谢能力。应用antiSMASH分析,发现了菌株BB183含有已知抗生素kolossin、andrimid、5-dimethylallylindole-3-acetonitrile (5-DMAIAN)的基因簇,以及batalactone和hserlactone这2种潜在抗菌物质的基因簇。andrimid可抑制细菌脂肪酸的合成,为一类新的天然抗生素^[36]。Bode等^[37]研究发现,kolossin的立体异构体对罗德西亚锥虫具有较高活性。5-DMAIAN是放线菌属(*Actinomyces*)细菌都能产生的代谢产物,5-DMAIAN结构与6-prenyltryptophol非常类似^[38]。6-prenyltryptophol是一种细胞毒素,但未报道其有抑菌作用^[39]。6-prenyltryptophol对青枯菌是否有抑制作用还需进一步验证。batalactone和hserlactone基因簇可能编码新的抑菌物质,后续还需通过次级代谢产物提取纯化、结构解析和抑菌功能加以验证。在菌株BB183的次生代谢产物分析中还预测到3种铁载体相关次级代谢产物合成基因簇,但本研究中利用CAS检测培养基的培养物中未检测到菌株BB183铁载体的产生,可能是培养条件或培养基不适合铁载体的产生,或者是3种次级代谢产物合成基因簇编码的次级代谢产物具有其他功能,还需后

续进一步验证^[40]。

植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)发挥着不同的功能维持土壤中的生态平衡,它们一般通过产生植物激素提高植物对土壤矿物质的吸收利用、抑制病原菌生长从而达到促进植物生长的目的^[41],如产生吲哚乙酸供植物吸收利用^[42],通过固氮作用以及解磷解钾功能降解土壤中一些难溶性磷和钾等供植物吸收,从而促进植物的生长提高植株的抗逆性^[43]。Niu 等^[44]发现黏质沙雷氏菌对水稻种子的萌发、根部和地上部长度、新芽和根重有显著的促进作用,并且经过黏质沙雷氏菌处理过的水稻植株对稻飞虱的取食还有趋避作用。Bai 等^[45]从党参根际分离得到 1 株高效溶磷菌能够促进党参的生长。Wang 等^[46]发现普利茅斯沙雷氏菌(*Serratia plymuthica*)不但能够促进番茄植株的生长,还能够稳定定殖于植株根际增强活性氧的清除能力,诱导植株叶片中一些防御酶的表达,从而提高番茄植株对辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)的抗性。本研究发现解脲沙雷氏菌具有解磷和固氮能力,这可能是其对番茄植株的株高、鲜重和根重具有显著促生作用的原因。

定殖是生防菌发挥功能的关键步骤,定殖能力强弱关系到生防菌能否发挥生防能力^[47]。秦士娇等^[48]用黏质沙雷氏菌株 S160 处理黄瓜 35 d 后,在根和茎中的定殖量分别达到 3.87×10^3 CFU/g 和 7.20×10^3 CFU/g,对黄瓜枯萎病的防效达到 57.2%。Sun 等^[49]研究表明枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) R31 可在土壤和番茄植株中定殖,其定殖能力在维持微生物群落和调节植物免疫方面发挥重要作用。Zhao 等^[50]在栽培试验中发现,接种 10 d 后普利茅斯沙雷氏菌仍能够在番茄的根和茎内定殖,其定殖趋势表现为先上升后下降最后趋于稳定。Ferraz 等^[51]在探究拮抗菌在番茄植株根际和根际的种群动态时,发现黏质沙雷氏菌 UFV252 在土壤中的波动较大,认为可能是该菌株不产生内生孢子所致。本研究发现,

在栽培试验接种后 10 d,菌株 BB183 在番茄根际土壤定殖量达到最大值,随即其在番茄根际土壤定殖量逐渐下降,在接种后 25 d,菌株 BB183 在番茄根际土壤定殖量趋于稳定。在本研究中,菌株 BB183 只能定殖于番茄植株的根际土壤中,在番茄的根、茎和叶中均未分离到菌株 BB183,推测可能是由于该菌株是从植物根际土壤中分离获得,难以定殖于植株内部。

4 结论

菌株 BB183 经鉴定为解脲沙雷氏菌,对多种序列变种的青枯菌菌株具有良好的抑制作用,对番茄青枯病有较好的防效;具有解磷、固氮、产蛋白酶和吲哚乙酸能力,能够利用尿素,对番茄具有显著的促生效果,并可稳定在番茄根际土壤中定殖;测定了菌株 BB183 的基因组序列并预测其含有 10 个不同的次生代谢产物编码基因簇。本研究揭示了菌株 BB183 的防病促生机理,为防控番茄青枯病提供了良好的菌株资源。

作者贡献声明

张娟:完成本研究试验工作并撰写论文初稿;吴正伟:基因组数据分析;马紫君:培养本试验相关的植物材料;汤亚飞:指导张娟完成本研究;何自福:论文修改;余小漫:构思并设计本研究试验,文章校正。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无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。

REFERENCES

- [1] 余小漫,姚挺,黄真珍,何自福. 香葱伴生番茄对青枯病及根际微生态特征的影响[J]. 广东农业科学, 2024, 51(1): 10-20.
SHE XM, YAO T, HUANG ZZ, HE ZF. Effects of companion chives on bacterial wilt and the micro-ecological characteristics of tomato rhizosphere[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2024, 51(1): 10-20 (in Chinese).
- [2] 岳童. 番茄青枯病拮抗微生物的构建及生防机理研

- 究[D]. 兰州: 兰州理工大学, 2023.
- YUE T. Studies on the influence of different microbial inoculants on ensiling quality for sweet sorghum based on microbiome and metabolomics[D]. Lanzhou: Lanzhou University of Technology, 2023 (in Chinese).
- [3] WU SX, SU H, GAO FY, YAO HY, FAN XL, ZHAO XL, LI YY. An insight into the prevention and control methods for bacterial wilt disease in tomato plants[J]. *Agronomy*, 2023, 13(12): 3025.
- [4] TUHUMURY GNC, HASINU JV, KESAULYA H. Activity test of *Bacillus* spp. against bacterial wilt (*R. solanacearum*) on tomatoes by *in vitro*[J]. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2021, 883(1): 012027.
- [5] MOHAMMED AF, OLOYEDE AR, ODESEYE AO. Biological control of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum* using *Pseudomonas* species isolated from the rhizosphere of tomato plants[J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2020, 53(1/2): 1-16.
- [6] ZHUANG XX, GAO CT, PENG CH, WANG ZY, ZHAO JW, SHEN Y, LIU CX. Characterization of a novel endophytic actinomycete, *Streptomyces physcomitrii* sp. nov., and its biocontrol potential against *Ralstonia solanacearum* on tomato[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(12): 2025.
- [7] 郑雪芳, 王梓然, 朱育菁, 陈燕萍, 王阶平, 刘波. 不同致病力青枯雷尔氏菌诱导番茄防御相关信号途径基因的表达分析[J]. *福建农业学报*, 2022, 37(1): 79-83.
- ZHENG XF, WANG ZR, ZHU YJ, CHEN YP, WANG JP, LIU B. Expressions of defense signal pathway genes in tomato plant induced by *Ralstonia solanacearum* of different virulence[J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37(1): 79-83 (in Chinese).
- [8] SINGH D, DEVAPPA V, YADAV DK. Suppression of tomato bacterial wilt incited by *Ralstonia pseudo solanacearum* using polyketide antibiotic-producing *Bacillus* spp. isolated from rhizospheric soil[J]. *Agriculture*, 2022, 12(12): 2009.
- [9] SUI XN, HAN XB, CAO JM, LI YQ, YUAN Y, GOU JY, ZHENG YF, MENG C, ZHANG CS. Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* EM-1 associated with suppressive rhizosphere soil microbes against tobacco bacterial wilt[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 940156.
- [10] 徐欣. 黄色粘球菌对番茄青枯病的防治作用与机制研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2020.
- XU X. Biocontrol activities and mechanisms of *Myxococcus xanthus* against tomato bacterial wilt[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [11] 薛庆云. 植物细菌性青枯病病原菌筛选策略研究及生防机理初探[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- XUE QY. Studies on screening strategy of antagonists against *Ralstonia solanacearum* and biocontrol mechanism of antagonistic strain Xy21[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008 (in Chinese).
- [12] 许萌杏, 李凤芳, 袁高庆, 黎起秦, 吴小刚. 洋葱伯克霍尔德氏菌 JX-1 防治番茄青枯病机理的初步分析[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(2): 304-314.
- XU MX, LI FF, YUAN GQ, LI QQ, WU XG. Identification and characterization of *Burkholderia cepacia* JX-1 against the tomato bacterial wilt[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(2): 304-314 (in Chinese).
- [13] LEUNG KM, WYATT GR, LAI GK, LEUNG FC, GRIFFIN SJ. Complete genome sequence of *Serratia ureilytica* KML.E1, a copper-tolerant strain isolated from a disused tungsten mine[J]. *Microbiology Resource Announcements*, 2024, 13(7): e0037924.
- [14] BHADRA B, ROY P, CHAKRABORTY R. *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(5): 2155-2158.
- [15] CAO XL, YE YT, LI P. Genome sequence resource of *Serratia ureilytica* HNU47: a strain with biocontrol potential against bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum*[J]. *Plant Disease*, 2023, 107(3): 919-921.
- [16] AMORIM DJ, TSUJIMOTO TF, BALDO FB, LEITE LG, HAKAKAVA R, WILCKEN SRS, GABIA AA, AMORIM DJ. *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Serratia* control *Meloidogyne incognita* (Rhabditida: Meloidogynidae) and promote the growth of tomato plants[J]. *Rhizosphere*, 2024, 31: 100935.
- [17] TREJO-LÓPEZ JA, RANGEL-VARGAS E, GÓMEZ-ALDAPA CA, VILLAGÓMEZ-IBARRA JR, FALFÁN-CORTES RN, ACEVEDO-SANDOVAL OA, CASTRO-ROSAS J. Isolation and molecular identification of *Serratia* strains producing chitinases, glucanases, cellulases, and prodigiosin and determination of their antifungal effect against *Colletotrichum siamense* and *Alternaria alternata* *in vitro* and on mango fruit[J]. *International Journal of Plant Biology*, 2022, 13(3): 281-297.
- [18] 王靖, 苏志芳, 李亚珍, 王海伟, 郑喜清, 邸娜. 内生黏质沙雷氏菌 LIEH 92 对向日葵菌核病的防治效果及其防病机制研究[J]. *植物保护*, 2016, 42(1): 73-80.
- WANG J, SU ZF, LI YZ, WANG HW, ZHENG XQ, DI N. Control effect of antagonistic endophytic *Serratia marcescens* LIEH92 on sunflower *Sclerotinia* rot and its antifungal mechanism[J]. *Plant Protection*, 2016, 42(1): 73-80 (in Chinese).
- [19] 李萍. 番茄青枯病拮抗菌鉴定及其生防机理研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2023.
- LI P. Identification of antagonistic bacteria against tomato bacterial wilt and analyzing on biological control mechanism[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [20] 袁涛. 广西梧州药用野生稻内生菌新种鉴定及生物学功能研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- YUAN T. Study of endophytic bacteria isolated from *Oryza officinalis* in Wuzhou and characterization of *Rhizobium wuzhouense* sp. nov.[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [21] 胡荣, 方琳琳, 付朦, 黄玉珠, 刘凤先, 张佳丽, 赵喜华. 淀粉酶高产菌的筛选、鉴定、诱变及生产优化[J]. *江西师范大学学报(自然科学版)*, 2019, 43(5): 496-500.
- HU R, FANG LL, FU M, HUANG YZ, LIU FX, ZHANG JL, ZHAO XH. The screening, identification, mutagenesis and production optimization of a bacteria with a high-level production of amylase[J]. *Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2019, 43(5): 496-500 (in Chinese).

- [22] 刘婉. 产纤维素酶菌株 S-1 的筛选与诱变研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
LIU W. Screening and mutagenesis of cellulase-producing strain S-1[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2018 (in Chinese).
- [23] 陈云云, 李惠霞, 张海英, 徐生军, 刘永刚. 萎蔫芽胞杆菌 MQ19ST15 鉴定及对甘蓝枯萎病的盆栽防效[J]. 植物保护, 2021, 47(5): 64-71.
CHEN YY, LI HX, ZHANG HY, XU SJ, LIU YG. Identification of *Bacillus atrophaeus* MQ19ST15 and its control efficacy against *Fusarium* wilt on potted cabbage plants[J]. Plant Protection, 2021, 47(5): 64-71 (in Chinese).
- [24] 王超, 申成美, 郑丽, 薛庆云, 郭坚华. 烟草青枯病生防细菌的筛选与生防效果研究[J]. 植物保护, 2014, 40(2): 43-47, 69.
WANG C, SHEN CM, ZHENG L, XUE QY, GUO JH. Isolation and screening of antagonistic bacterial strains and their biocontrol efficiency against bacterial wilt[J]. Plant Protection, 2014, 40(2): 43-47, 69 (in Chinese).
- [25] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 353-386.
DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001: 353-386 (in Chinese).
- [26] WAMANI AO, MUTHOMI JW, MUTITU E, WACEKE WJ. Efficacy of microbial antagonists in the management of bacterial wilt of field-grown tomato[J]. Journal of Natural Pesticide Research, 2023, 6: 100051.
- [27] 滕丽雯. 大肠杆菌 BL21(DE3)感受态制备及转化影响因素的研究[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2021.
TENG LW. Study on the factors affecting the preparation and transformation of *E. coli* BL21(DE3) competent cells[D]. Jinan: Qilu University of Technology, 2021 (in Chinese).
- [28] GUO ZX, QIN YP, LV JL, WANG XJ, YE T, DONG XX, DU NS, ZHANG T, PIAO FZ, DONG H, SHEN SS. High red/far-red ratio promotes root colonization of *Serratia plymuthica* A21-4 in tomato by root exudates-stimulated chemotaxis and biofilm formation[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2024, 206: 108245.
- [29] 何自福, 虞皓, 罗方芳. 广东茄科青枯菌致病力分化及其 DNA 多态性分析[J]. 植物病理学报, 2003, 33(5): 415-420.
HE ZF, YU H, LUO FF. Differentiation of pathogenicity and RAPD analysis of *Ralstonia solanacearum* in Guangdong[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(5): 415-420 (in Chinese).
- [30] 徐进, 冯洁. 植物青枯菌遗传多样性及致病基因组学研究进展[J]. 中国农业科学, 2013, 46(14): 2902-2909.
XU J, FENG J. Advances in research of genetic diversity and pathogenome of *Ralstonia solanacearum* species complex[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(14): 2902-2909 (in Chinese).
- [31] SHE XM, HE ZF, LI HP. Genetic structure and phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* strains from diverse origins in Guangdong Province, China[J]. Journal of Phytopathology, 2018, 166(3): 177-186.
- [32] SHE XM, YU L, LAN GB, TANG YF, HE ZF. Identification and genetic characterization of *Ralstonia solanacearum* species complex isolates from *Cucurbita maxima* in China[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1794.
- [33] 余小漫. 广东青枯菌种群结构和 4 号生理小种 YC45 菌株的全基因组分析[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
SHE XM. Population structure of *Ralstonia solanacearum* isolated from Guangdong province and genomic analysis of Race4 strain YC45[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [34] ARIFIYANTO A, AFRIANI H, PUTRI MH, DAMAYANTI B, RIYANTO CLR. The biological prospective of red-pigmented bacteria cultured from contaminated agar media[J]. Biodiversitas Journal of Biological Diversity, 2021, 22(3): 1152-1159.
- [35] 贺字典, 高玉峰. 生防菌在植物病害防治中的研究进展[J]. 河北职业技术师范学院学报, 2003, 17(2): 56-59.
HE ZD, GAO YF. Research development of biological control germ in preventing and controlling plants disease and insects (summary)[J]. Journal of Hebei Vocation-Technical Teachers College, 2003, 17(2): 56-59 (in Chinese).
- [36] CHENG TF, GE TL, ZHAO LQ, HOU YY, XIA JY, ZHAO L. Improved production of andrimid in *Erwinia persicina* BST187 strain by fermentation optimization[J]. BMC Microbiology, 2023, 23(1): 268.
- [37] BODE HB, BRACHMANN AO, JADHAV KB, SEYFARTH L, DAUTH C, FUCHS SW, KAISER M, WATERFIELD NR, SACK H, HEINEMANN SH, ARNDT HD. Structure elucidation and activity of Kolossin A, the D-/L-pentadecapeptide product of a giant nonribosomal peptide synthetase[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2015, 54(35): 10352-10355.
- [38] OZAKI T, NISHIYAMA M, KUZUYAMA T. Novel tryptophan metabolism by a potential gene cluster that is widely distributed among actinomycetes[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2013, 288(14): 9946-9956.
- [39] SARMIENTO-VIZCAÍNO A, ESPADAS J, MARTÍN J, BRAÑA AF, REYES F, GARCÍA LA, BLANCO G. Atmospheric precipitations, hailstone and rainwater, as a novel source of *Streptomyces* producing bioactive natural products[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 773.
- [40] CHAABAN T, MOHSEN Y, EZZEDDINE Z, GHSSEIN G. Overview of *Yersinia pestis* metallophores: yersiniabactin and yersinopine[J]. Biology, 2023, 12(4): 598.
- [41] LUGTENBERG B, KAMILOVA F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 541-556.
- [42] SPAEPEN S, VANDERLEYDEN J, REMANS R. Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2007, 31(4): 425-448.
- [43] 伍国强, 于祖隆, 魏明. PGPR 调控植物响应逆境胁迫的作用机制[J]. 草业学报, 2024, 33(6): 203-218.
WU GQ, YU ZL, WEI M. The mechanism of PGPR regulating plant response to abiotic stress[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(6): 203-218 (in Chinese).
- [44] NIU HT, SUN Y, ZHANG ZC, ZHAO DX, WANG N,

- WANG LH, GUO HF. The endophytic bacterial entomopathogen *Serratia marcescens* promotes plant growth and improves resistance against *Nilaparvata lugens* in rice[J]. Microbiological Research, 2022, 256: 126956.
- [45] BAI FL, BAI BX, JIN TT, ZHANG GP, REN JH. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of *Serratia ureilytica* DW2[J]. Biocell, 2023, 47(3): 647-656.
- [46] WANG YY, PIAO FZ, DI YC, XU JX, WANG ZC, WANG T, LI PJ, HU CY, DU NS, ZHANG T, DONG XX, DONG H, SHEN SS, GUO ZX. *Serratia plymuthica* HK9-3 enhances tomato resistance against *Phytophthora capsici* by modulating antioxidant defense systems and rhizosphere micro-ecological condition[J]. Physiologia Plantarum, 2024, 176(3): e14323.
- [47] 焦蓉, 何鹏飞, 王戈, 吴毅歆, 王军伟, 唐萍, 杨焕文, 何月秋. 内生菌 YN201728 的定殖能力及其防治烟草白粉病的效果研究[J]. 核农学报, 2020, 34(4): 721-728.
- JIAO R, HE PF, WANG G, WU YX, WANG JW, TANG P, YANG HW, HE YQ. Colonization and control effect on tobacco powdery mildew of endophyte YN201728[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2020, 34(4): 721-728 (in Chinese).
- [48] 秦士娇, 李娟, 王远宏, 康芬芬, 刘可, 樊乐, 常若葵. 黄瓜 PGPR 菌株 S160 的鉴定及其对重金属铅的吸附研究[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(1): 129-134.
- QIN SJ, LI J, WANG YH, KANG FF, LIU K, FAN L, CHANG RK. Identification of PGPR strain S160 on cucumber and its adsorption for lead ions[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(1): 129-134 (in Chinese).
- [49] SUN YH, SU YT, MENG Z, ZHANG J, ZHENG L, MIAO S, QIN D, RUAN YL, WU YH, XIONG LN, YAN X, DONG ZY, CHENG P, SHAO MW, YU GH. Biocontrol of bacterial wilt disease in tomato using *Bacillus subtilis* strain R31[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1281381.
- [50] ZHAO JJ, WANG S, ZHU XF, WANG YY, LIU XY, DUAN YX, FAN HY, CHEN LJ. Isolation and characterization of nodules endophytic bacteria *Pseudomonas protegens* Sneb1997 and *Serratia plymuthica* Sneb2001 for the biological control of root-knot nematode[J]. Applied Soil Ecology, 2021, 164: 103924.
- [51] FERRAZ HGM, RESENDE RS, MOREIRA PC, SILVEIRA PR, MILAGRES EA, OLIVEIRA JR, RODRIGUES FÁ. Antagonistic rhizobacteria and jasmonic acid induce resistance against tomato bacterial spot[J]. Bragantia, 2015, 74(4): 417-427.