

研究报告

一株抑制烟草疫霉的耐受盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*)的分离、鉴定及全基因组测序分析

张雨薇¹, 唐培培², 刘子琦², 李翔², 吴俊林², 苗森², 路鹏², 贾玮¹,
郝浩浩^{*2}, 党炳俊^{*1}

1 河南农业大学 烟草学院, 河南 郑州 450046

2 河南省烟草公司驻马店市公司, 河南 驻马店 463000

张雨薇, 唐培培, 刘子琦, 李翔, 吴俊林, 苗森, 路鹏, 贾玮, 郝浩浩, 党炳俊. 一株抑制烟草疫霉的耐受盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*)的分离、鉴定及全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1760-1774.

ZHANG Yuwei, TANG Peipei, LIU Ziqi, LI Xiang, WU Junlin, MIAO Sen, LU Peng, JIA Wei, HAO Haohao, DANG Bingjun. Isolation, identification, and whole genome sequencing of a *Bacillus halotolerans* strain inhibiting *Phytophthora nicotianae*[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1760-1774.

摘要:【背景】烟草黑胫病是由烟草疫霉侵染所引起的土传类病害,在我国烟草种植区内发病率高且病情严重,造成的产量损失巨大。【目的】筛选对烟草黑胫病菌有拮抗作用的生防菌株,为烟草黑胫病的生物防治提供菌种资源。【方法】采用稀释涂布平板法、平板对峙法筛选出对烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)具有拮抗作用的菌株,借助 DNBSEQ 平台和 PacBio 平台对拮抗菌株进行全基因组测序,通过 antiSMASH 在线软件对拮抗菌株的次级代谢产物基因簇进行预测。【结果】筛选分离出一株可以抑制烟草疫霉生长的耐受盐芽孢杆菌(*Bacillus halotolerans*) BY-S2。菌株 BY-S2 具有溶磷、产铁载体的能力,还对重金属铜具有一定的耐受能力。全基因组测序结果表明,菌株 BY-S2 基因组长度为 4 058 008 bp,只有一条环形染色体,平均 G+C 含量为 43.78%。antiSMASH 共预测到次级代谢产物基因簇 10 个,其中 5 个与 bacillaene、fengycin、bacillibactin、subtilosin A、bacilysin 化合物合成相关基因簇完全一致。【结论】耐受盐芽孢杆菌 BY-S2 对烟草疫霉具有拮抗作用,具有溶磷和产生铁载体的能力,具有 5 种已知的抑菌代谢物合成基因簇。

关键词: 耐受盐芽孢杆菌; 烟草黑胫病; 促生作用; 全基因组测序

资助项目: 河南省烟草公司驻马店市公司科技项目(2022411700270010); 河南农业大学青年英才项目(30500568)

This work was supported by the Science and Technology Project of Henan Tobacco Company in Zhumadian City (2022411700270010) and the Young Talents Foundation of Henan Agricultural University (30500568).

*Corresponding authors. E-mail: HAO Haohao, haohh108@126.com; DANG Bingjun, dangbingjun@henau.edu.cn

Received: 2024-07-22; Accepted: 2024-09-25; Published online: 2024-10-31

Isolation, identification, and whole genome sequencing of a *Bacillus halotolerans* strain inhibiting *Phytophthora nicotianae*

ZHANG Yuwei¹, TANG Peipei², LIU Ziqi², LI Xiang², WU Junlin², MIAO Sen², LU Peng², JIA Wei¹, HAO Haohao^{*2}, DANG Bingjun^{*1}

¹ College of Tobacco Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China

² Zhumadian Tobacco Company of Henan Province, Zhumadian 463000, Henan, China

Abstract: [Background] Tobacco black shank is a soil-borne diseases caused by *Phytophthora nicotianae*. This disease exhibits a high incidence and severity in tobacco cultivation regions across China, leading to substantial yield losses. [Objective] To screen the strains with antagonistic activity against *Phytophthora nicotianae* and provide strain resources for the biocontrol of tobacco black shank. [Methods] The dilution-plate spreading method and the plate confrontation method were employed to screen the strains with antagonistic effects on *Phytophthora nicotianae*. Whole genome sequencing of the antagonistic strain was performed on the DNBSEQ and PacBio platforms, and antiSMASH online was used for the prediction of synthetic gene clusters of secondary metabolites. [Results] *Bacillus halotolerans* BY-S2, a strain capable of inhibiting the growth of *P. nicotianae*, was isolated. Strain BY-S2 exhibited phosphorus-solubilizing ability, siderophore-producing ability, and tolerance to copper. Whole genome sequencing revealed that the genome of strain BY-S2 was a circular chromosome with a length of 4 058 008 bp and the G+C content of 43.78%. A total of 10 synthetic gene clusters of secondary metabolites were predicted by antiSMASH, including 5 completely consistent with known gene clusters for the synthesis of bacillaene, fengycin, bacillibactin, subtilosin A, and bacilysin. [Conclusion] *B. halotolerans* BY-S2 exhibits antagonistic activity against *P. nicotianae*, has the ability to solubilize phosphate and produce siderophores, and carries 5 known gene clusters of secondary metabolites.

Keywords: *Bacillus halotolerans*; tobacco black shank; growth-promoting effect; whole genome sequencing

烟草(*Nicotiana tabacum* L.)是双子叶植物纲管花目茄科烟草属作物,喜温暖、向阳的环境,是一种重要的叶用经济作物。烟草黑胫病又叫烟草黑根、黑杆疯等,是由烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)侵染所引起的土传性真菌类病害。烟田发病严重时甚至会造成烟叶绝收,可对烟草生产造成毁灭性的危害^[1]。因此,控制烟草疫霉引起的烟草黑胫病具有重要意义。

培育抗病品种和施用化学杀菌剂是防治烟草黑胫病的2种有效措施。然而,培育抗病品

种不仅耗时费力,而且品种抗病性不稳定,容易丧失。长期施用化学药剂也会导致烟株产生稳定遗传的抗药性,会影响化学杀菌剂的防治效果。生物防治是指利用有益微生物防治病害或虫害的方法,具有绿色安全无残留的特点,符合烟叶绿色发展的要求,因此成为防治烟草黑胫病的最佳途径^[2]。

已有多项研究证明不同种类的生防菌对于防治烟草黑胫病具有较好的生防效果,这些微生物类群主要为芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[3-4]、假单胞

菌属(*Pseudomonas*)^[5-6]、木霉属(*Trichoderma*)^[7-8]和链霉菌属(*Streptomyces*)^[9]。在烟草黑胫病生物防治菌株的研究中,研究者多从筛选菌株着手,筛选环境主要集中在烟草根际健康土壤,筛选出来的菌株功能也较为单一。对于筛选出的具有生物防治潜力的菌株,在田间应用实践时,研究者们通常采用单一菌株进行防治。随着研究的深入,越来越多的研究者开始将研究视野扩展至更广泛的生态环境,目前,已有研究者从美洲大蠊肠管^[10]和西太平洋深海沉积物^[3]中筛选出具有防治烟草黑胫病潜力的菌株。研究者们也开始关注生防菌株的促生功能,包括溶磷、解钾、固氮、产氨、分泌吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)等能力,并研究这些菌株对烟草生长性状如株高、茎粗、最大叶长、总鲜重、总干重、根系生长等的影响。在田间应用时,研究者们也尝试采用生防菌株与杀菌剂等其他试剂复配的策略,以期增强防治效果。例如,将抗性诱导剂与木霉菌结合使用^[11]、壳寡糖与解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)共同使用^[12]、甲霜灵与玫瑰黄链霉菌(*Streptomyces roseoflavus*)联合使用^[13],以及生物炭负载枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)^[14]等方法,均能显著提升对烟草黑胫病的防治效果。同时,在烟草黑胫病生物防治菌株的研究中,对于烟草黑胫病生防菌株分子机制的深入研究相对较少,对菌株功能基因的挖掘尚不充分,目前仅对少量烟草黑胫病生防菌株进行了全基因组测序,如菌株枯草芽孢杆菌 MC4-2^[10]和蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*) Z4^[3]。

鉴于此,本研究旨在筛选对烟草疫霉具有良好抑制作用的菌株,研究其促生特性以及对重金属铜的耐受能力;同时对菌株进行全基因组测序,根据测序结果对菌株的次级代谢产物合成基因簇进行深入挖掘,以期对烟草黑胫病

的防治提供优良的生防资源,并为生防菌剂的开发与应用奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 样品

烟草根际土壤样品采集于河南省驻马店市泌阳县小程庄。取样过程:用便携式土铲去除土壤表层杂质,挖出烟草根系,运用抖根法收集根际土壤,然后将收集到的土壤充分混匀。采集到的根际土壤样品放置于无菌无酶离心管中,用干冰封装并运回。

供试病原真菌为烟草疫霉(*P. nicotianae*)^[15],由河南农业大学烟草学院品质生态实验室保藏。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 29213^T 购自青岛海博生物技术有限公司,将冻干菌株复苏以进行后续试验。

1.2 主要试剂和仪器

胰蛋白胨,北京奥博星生物技术有限责任公司;酵母提取物, Oxoid 公司;琼脂粉,北京索莱宝科技有限公司;磷酸三钙,天津市登峰化学试剂厂;植酸钙,上海易恩化学技术有限公司;氯化钠和七水硫酸镁等试剂,国药集团化学试剂有限公司。

电热式压力蒸汽灭菌器,浙江新丰医疗器械有限公司;精密恒温培养箱,上海一恒科学仪器有限公司;高速离心机, Eppendorf 公司;卧式全温振荡器,金坛市杰瑞尔电器有限公司;紫外可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司。

1.3 培养基

燕麦粉琼脂培养基(g/L):燕麦粉 60.0,琼脂 12.5, pH 7.2±0.2。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)参考文献[16]配制;营养琼脂培养基(nutrient agar, NA)参考文献[17]配制;LB 液体培养基参考文献[18]配制。

本研究用于检测菌株溶磷能力的培养基包括两类, NBRIP 培养基用于检测菌株溶无机磷能力, 植酸钙固体培养基用于检测菌株溶有机磷的能力。NBRIP 培养基参照 Mehta 等^[19]的方法进行改良后配制, 调整 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 含量为 2.0 g, 加入琼脂 15.0 g。植酸钙固体培养基除替换 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 为植酸钙, 其余成分与 NBRIP 培养基相同。

CAS 检测培养基用于检测菌株是否产生铁载体, 参照赵翔等^[20]的方法进行改良后配制, 调整十六烷基三甲基溴化铵、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 、 K_2HPO_4 和 NaCl 的用量至参考文献用量的一半, 琼脂用量为 9.0 g/L。

1.4 烟草黑胥病拮抗菌株的分离与纯化

采用稀释涂布平板法进行烟草根际土壤细菌的分离。取 10 g 烟草根际土壤样品, 置于灭菌后的盛有 90 mL 无菌水的锥形瓶(内含 5 个无菌玻璃珠)中。于 160 r/min、30 °C 振荡 30 min 制成土壤悬浮液, 即成 10^{-1} 稀释液。将其静置 5 min, 随后取 100 μL 的上清液对其进行稀释, 分别得到 10^{-2} – 10^{-7} 稀释度的稀释液。吸取 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} 稀释度的稀释液均匀涂布于 NA 培养基上, 于 30 °C 恒温培养箱中倒置培养 3 d, 培养完成后挑取平板上的单菌落进行划线纯化。

用燕麦粉琼脂培养基活化烟草疫霉, PDA 培养基活化分离出的菌株。

以烟草疫霉为靶标, 采用平板对峙法筛选对烟草疫霉具有拮抗作用的菌株。用 1 mL 无菌枪头(直径约 7.5 mm)对活化的烟草疫霉打菌饼, 将其接种于 PDA 培养基的中心, 并在其相等距离(2.5 cm)十字交叉线的四端接种纯化后的细菌, 同时单独接种病原菌烟草疫霉为对照, 试验设置 3 次重复, 30 °C 条件下培养至对照组疫霉长满平板, 分别测量对照直径和抑制直径,

按照公式(1)计算抑制率:

$$\text{抑制率} = (\text{对照直径} - \text{抑制直径}) / \text{对照直径} \times 100\% \quad (1)$$

1.5 拮抗菌株的促生功能测定

1.5.1 菌株溶磷能力的检测

用 NBRIP 培养基和植酸钙固体培养基检测拮抗菌株是否具有溶磷功能。将拮抗菌株以打菌饼的方式分别接种于 NBRIP 培养基和植酸钙固体培养基中, 30 °C 培养箱中倒置培养 7 d, 观察菌落周围有无透明圈的产生。测量其透明圈直径(D)和菌落直径(d), 通过二者比值(D/d)大小判断拮抗菌株的溶磷能力。

1.5.2 菌株分泌铁载体能力的检测

采用 CAS 检测培养基对菌株是否能产生铁载体进行检测。将拮抗菌株接种在 CAS 检测培养基上, 培养 3 d 后观察菌落周围是否有橘黄色晕圈的产生, 并测定菌落直径与晕圈的直径。

1.6 拮抗菌株的抗重金属铜胁迫能力检测

将拮抗菌株接种于 LB 液体培养基于 30 °C、160 r/min 条件下培养过夜, 取菌液在 4 °C、4 000 r/min 条件下离心 10 min 后弃去上清液, 用无菌水洗涤沉淀 2 次, 最后用 LB 液体培养基调整细菌菌悬液浓度为 0.5 麦氏浓度, 再使用 LB 液体培养基稀释细菌菌悬液 100 倍。

用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 试剂配制浓度梯度为 120、160、200、240、280、320 mg/L 的重金属铜浓度。在 96 孔细胞板每孔中分别加入重金属铜浓度为 120、160、20、240、280、320 mg/L 的铜盐溶液 150 μL , 最后一孔加入 300 μL LB 培养液, 设置为对照组, 然后除对照组外, 每孔加入 150 μL 稀释菌液, 30 °C 培养 24 h, 以抑制细菌生长的最低浓度作为细菌的最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)。以金黄

色葡萄球菌 ATCC 29213^T 为阳性对照菌株。

1.7 拮抗菌株的分子生物学鉴定及全基因组测序

1.7.1 拮抗菌株的分子生物学鉴定

在拮抗菌株的基因组注释文件中找到其 16S rRNA 基因序列, 然后从基因组序列中将其提取出来, 与 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) 数据库进行比对, 根据序列比对结果, 获得与其同源性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 采用 MEGA 11.0 软件的 MUSCLE 程序进行序列比对, 根据比对结果, 采用 neighbor-joining 方法构建菌株的系统发育树, 参数 bootstrap 值设为 1 000。

根据 16S rRNA 基因比对结果, 选取与拮抗菌株 16S rRNA 基因序列相似度较高且在公共数据库中有完整基因组序列的 8 株菌, 采用 orthologous ANI tool (OAT) 软件对拮抗菌株与选取的 8 株菌进行平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 分析^[21]。

1.7.2 拮抗菌株的全基因组测序

将拮抗菌株接种于 LB 液体培养基中 30 ℃、160 r/min 培养过夜, 然后于 4 ℃、12 000 r/min 离心 2 min 收集菌体, 收集的菌体送到深圳华大基因公司进行 DNA 的提取及基因组测序。采用二代 DNBSEQ 平台和三代 PacBio 平台相结合的方式对拮抗菌株的全基因组测序。

1.7.3 基因组组装

对原始测序数据进行过滤得到 clean data。利用 Canu v1.5、Falcon v0.3.0 等软件对获取的高质量 CCS subreads 序列进行自纠正, 得到高可信的 corrected reads。将 corrected reads 采用 Canu 进行组装, 选择出最优组装结果。通过 GATK 3.4-0-g7e26428 软件利用二代小片段数据对组装进行单碱基纠正, 得到高可信的组装

序列, 最后, 对组装结果进行序列成环判断、基因组序列及质粒序列区分。

1.7.4 基因预测与功能注释

基因预测及基因功能的注释采用 NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)^[22], 包括预测蛋白质编码基因及其他功能基因组单元, 如非编码 RNA、tRNAs 等。

将拮抗菌株的基因编码蛋白序列与 BacMet 数据库进行比对, 以鉴定重金属铜耐受基因^[23]。

以文献报道的溶磷相关功能基因^[24-25]为基础, 对 PGAP 注释结果进行检索, 以挖掘拮抗菌株所含有的溶磷相关功能基因。

利用 antiSMASH 在线数据库预测拮抗菌株的次级代谢产物合成基因簇^[26]。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选结果

通过对驻马店地区的烟草根际土壤样本进行微生物分离, 经过平板对峙法筛选获得 1 株拮抗菌株。平板对峙结果如图 1 所示, 拮抗菌株对烟草疫霉的抑制率为 (69.00±0.97)%。

2.2 拮抗菌株的促生功能

2.2.1 菌株的溶磷能力分析

如图 2、图 3 所示, 拮抗菌株具有一定的溶解无机磷和植酸钙的能力。在 NBRIP 培养基上, 溶磷圈直径(D)为 (17.23±1.01) mm、菌落直径(d)为 (13.52±0.88) mm, 溶磷圈直径(D)和菌落直径(d)大小的比值为 (1.28±0.15)。在植酸钙固体培养基上, 溶磷圈直径(D)为 (28.09±0.94) mm、菌落直径(d)为 (17.02±2.52) mm, 溶磷圈直径(D)和菌落直径(d)大小的比值为 (1.65±0.06), 以上数据说明拮抗菌株具有一定的溶解无机磷和有机磷的能力。

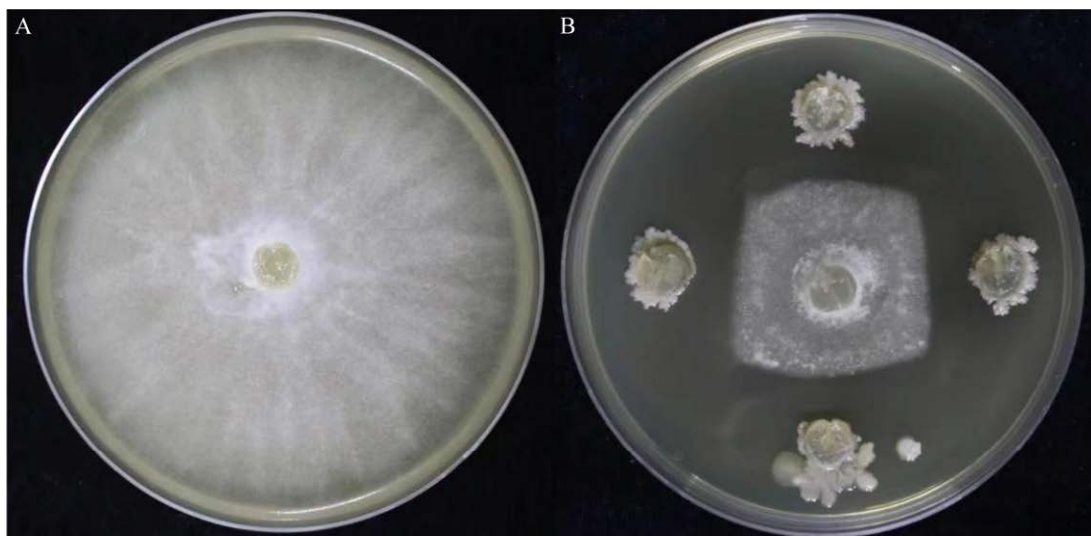


图 1 拮抗菌株与烟草疫霉的平板对峙结果 A: 对照组烟草疫霉的菌落形态; B: 拮抗菌株对烟草疫霉的抑制效果图。

Figure 1 Inhibitory effect of antagonistic strain against *P. nicotianae* evaluated by plate confrontation experiment. A: The control group shows the normal colony morphology of *P. nicotianae*. B: The treatment group shows the inhibitory effect of antagonistic strain against *P. nicotianae*.

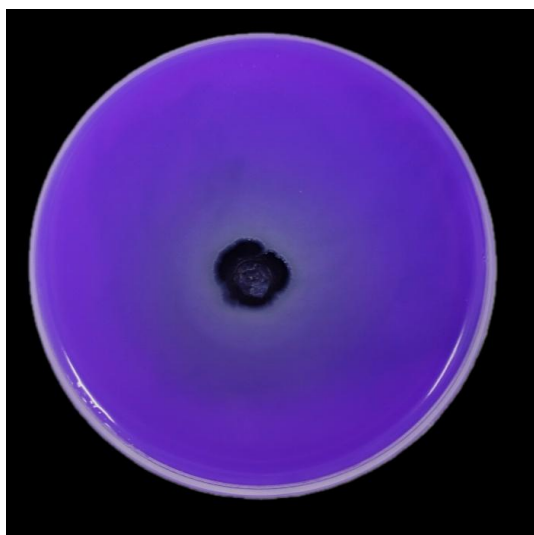


图 2 拮抗菌株溶无机磷能力测试结果 拮抗菌株在培养基上产生透明圈表示其具有溶解无机磷的能力。

Figure 2 Detection of solubilization of inorganic phosphate by antagonistic strain. The clear zone on NBRIP agar plate indicates that antagonistic strain has the ability to solubilize inorganic phosphate.

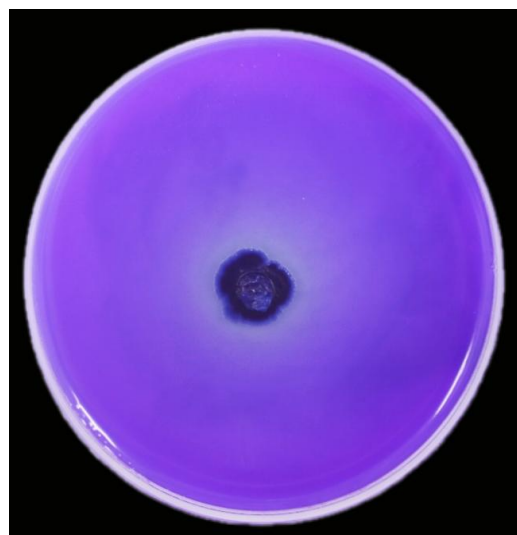


图 3 拮抗菌株溶有机磷能力测试结果 拮抗菌株在培养基上产生透明圈表示其具有溶解有机磷的能力。

Figure 3 Detection of solubilization of organic phosphate by antagonistic strain. The clear zone on medium indicates that antagonistic strain has the ability to solubilize organic phosphate.

2.2.2 菌株分泌铁载体的能力分析

由于铁载体竞争 CAS 检测培养基中的 EDTA 螯合的铁离子,使培养基颜色由蓝色变为橘黄色,因此菌落周围橘黄色晕圈的产生可代表铁载体的产生。如图 4 所示,拮抗菌株具有产生铁载体的能力,在 CAS 检测培养基上菌落直径为 (9.63 ± 0.19) mm,产生的橘黄色晕圈直径为 (22.18 ± 0.83) mm。

2.3 菌株的抗铜离子胁迫能力

对拮抗菌株的抗铜离子胁迫能力进行检测,结果表明,拮抗菌株具有一定的铜耐受能力, MIC 为 140 mg/L。对照菌株金黄色葡萄球菌 ATCC 29213^T的 MIC 为 160 mg/L。

2.4 拮抗菌株的鉴定结果

2.4.1 拮抗菌株的分子生物学鉴定结果

将菌株 16S rRNA 基因序列上传至 EzBioCloud 数据库进行序列比对,比对结果选择“valid names only”选项,过滤掉非模式菌株。比对结

果显示,拮抗菌株与模式菌株 *B. halotolerans* ATCC 25096^T的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号: LPVF01000003)的相似性最高,为 100%。同时,拮抗菌株与其他 10 株菌株的 16S rRNA 基因序列相似度也较高,均在 99%以上,为 99.59%–99.93%。根据 16S rRNA 基因序列比对结果,采用 MEGA 11.0 软件以邻接法构建拮抗菌株的系统发育树。结果显示,拮抗菌株与 *B. halotolerans* ATCC 25096^T聚为一簇,亲缘关系最近,该结果与 16S rRNA 基因序列比对结果一致(图 5)。

2.4.2 平均核苷酸一致性分析

选取与拮抗菌株的 16S rRNA 基因序列相似度较高且在公共数据库中有完整基因组序列的 8 株菌,采用 OAT 软件对拮抗菌株与选取的 8 株菌进行 ANI 值计算分析,这 8 株菌及其 NCBI 登录号分别为 *B. halotolerans* ATCC 25096^T (GCF_001517105.1)、莫哈韦芽孢杆菌(*B. mojavensis*) RO-H-1^T (GCF_014499005.1)、特基拉芽孢杆菌(*B. tequilensis*) KCTC 13622^T (GCF_000507145.1)、卡布氏芽孢杆菌(*B. cabrialesii*) TE3^T (GCF_004124315.2)、贫瘠水芽孢杆菌(*B. inaquosorum*) KCTC 13429^T (GCF_003148415.1)、斯皮宰曾氏芽孢杆菌(*B. spizizenii*) NRRL B-23049^T (GCF_000227465.1)、*B. subtilis* NCIB 3610^T (GCF_002055965.1)和中村氏芽孢杆菌(*B. nakamurai*) NRRL B-41091^T (GCF_001584325.1)。ANI 值计算结果显示,拮抗菌株与 *B. halotolerans* ATCC 25096^T的 ANI 值最高,为 99.05%,高于细菌种水平鉴定的判定阈值 95%–96%,说明拮抗菌株与 *B. halotolerans* 为同一个种(图 6)。结合 16S rRNA 基因比对结果,基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析及 ANI 分析,可以将拮抗菌株鉴定为 *B. halotolerans*,命名为 *B. halotolerans* BY-S2。

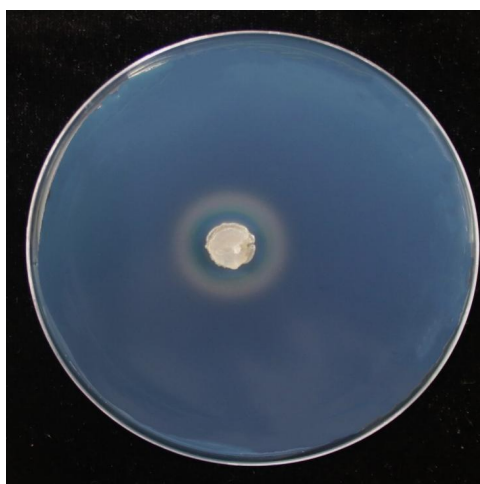


图 4 拮抗菌株 BY-S2 产生铁载体测试结果
拮抗菌株在培养基上产生橘黄色晕圈表明其具有产生铁载体的能力。

Figure 4 Detection of siderophore production by antagonistic strain. The orange halo zone on CAS agar plate indicates that antagonistic strain has the ability to produce siderophores.

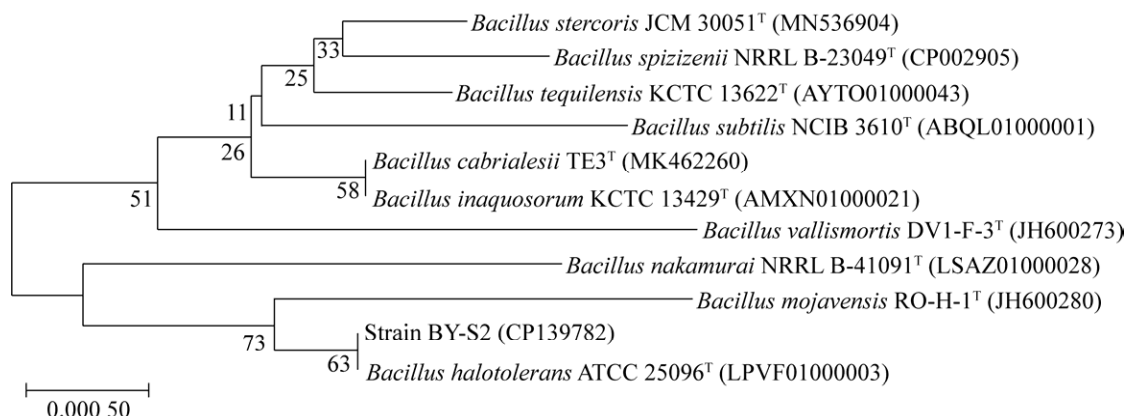


图 5 基于 16S rRNA 基因序列构建的拮抗菌株的系统发育树 “T”代表模式菌株；菌株后面括号中的序号为 GenBank 登录号；分支处的数字为 bootstrap 值；标尺代表每个位点碱基的替换频率。

Figure 5 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequences of antagonistic strain and closely related antagonistic strains of the genus *Bacillus*. “T” stands for type strain, the GenBank accession numbers are given in parentheses after the strain name, the numbers at the branch nodes are the bootstrap values, and the ruler represents the frequency of base substitution at each site.

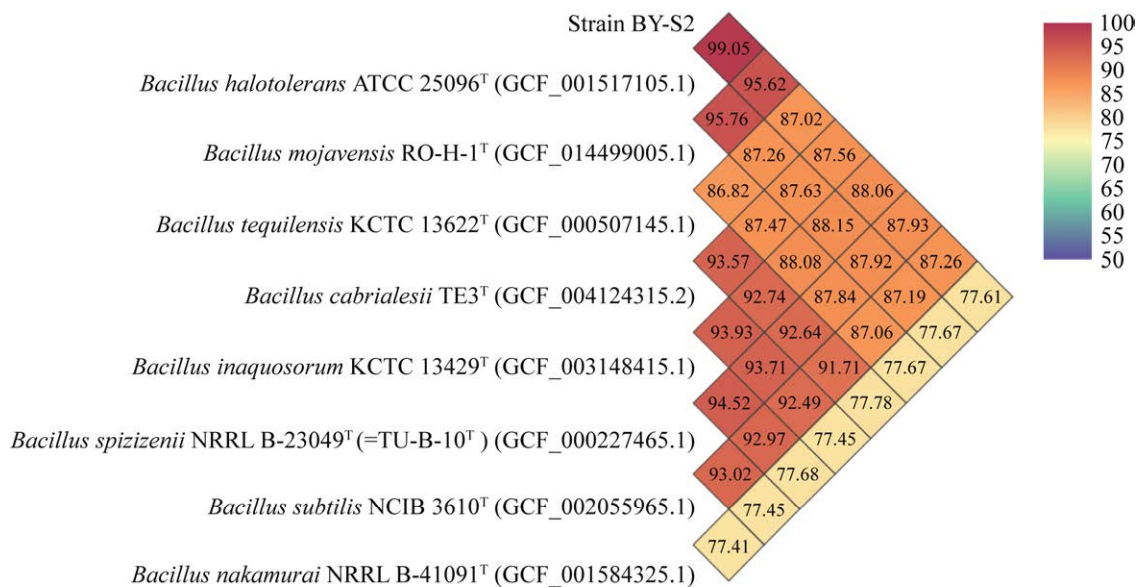


图 6 拮抗菌株与相似度较高的 8 株菌之间的平均核苷酸一致性值(%)

Figure 6 The average nucleotide identity (ANI) values between antagonistic strain and other eight similar strains (%).

2.5 全基因组测序结果

全基因组测序结果表明，菌株 BY-S2 全基因组长度为 4 058 008 bp，仅包含一条环形染色体，整个基因组的平均 G+C 含量为 43.78%，

根据基因组数据绘制了基因组圈图(图 7)。将获得的菌株 BY-S2 的基因组序列上传至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)，获得登录号为 CP139782。

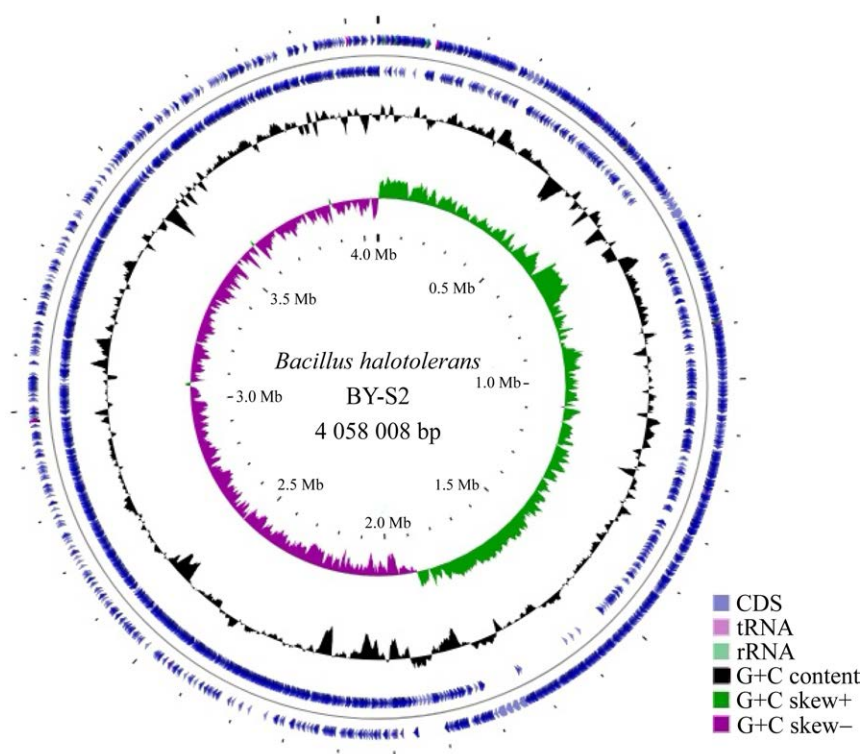


图7 菌株 BY-S2 基因组圈图 从最内环到最外环:第1环为刻度,第2环为 G+C skew,第3环为 G+C 含量,第4环和第5环为编码序列、tRNA 和 rRNA 在基因组中的位置。

Figure 7 Circular genome map of strain BY-S2. From the innermost ring to the outermost ring: The first ring is the sequence ruler, the second ring is G+C skew, the third ring is G+C content, the fourth ring and the fifth ring are the positions of coding sequence, tRNA and rRNA in the genome.

PGAP 注释结果表明,菌株 BY-S2 的全基因组含有 4 100 个基因,其中,3 870 个为编码蛋白的编码序列(coding sequence, CDS),6 个为 5S rRNA 基因,6 个为 16S rRNA 基因,6 个为 23S rRNA 基因,71 个为 tRNA 基因,5 个非编码 RNA (non-coding RNA, ncRNA),136 个假基因。

采用 antiSMASH 在线软件(<http://antismash.secondarymetabolites.org/>)对菌株 BY-S2 基因组的次级代谢产物合成基因簇进行预测分析,发现菌株 BY-S2 基因组中共含有 10 个次级代谢产物合成基因簇,结果如表 1 所示。菌株 BY-S2 编码的次级代谢产物有脂肽类的表面活性素(surfactin)、丰原素(fengycin)、laterocidine、二肽化合物的溶杆菌素(bacilysin)、铁载体类的儿茶酚

型铁载体(bacillibactin)、聚酮类的 aurantinin B/aurantinin C/aurantinin D、芽孢杆菌烯(bacillaene)、塞克肽类(sactipeptide)的芽孢杆菌素(subtilosin A),以及萜烯(terpene)类的 2 种未知化合物。其中,基因簇 1 与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) FZB42 的表面活性素(surfactin)基因簇有 91% 的相似性,基因簇 4 与 *B. velezensis* FZB42 的芽孢杆菌烯(bacillaene)基因簇有 100% 的相似性,基因簇 5 与 *B. velezensis* FZB42 的丰原素(fengycin)基因簇有 100% 的相似性,基因簇 8 与 *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 的铁载体(bacillibactin)基因簇有 100% 的相似性,基因簇 9 与 *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 的芽孢杆菌素(subtilosin A)基因簇有 100% 的相似性,基因簇 10

表 1 BY-S2 基因组中预测的次级代谢产物基因簇及其编码的抑菌物质

Table 1 The predicted gene clusters in the genome of strain BY-S2 and the antifungal compounds encoded by these gene clusters									
编号 Cluster ID	起始位点 Start site	结束位点 Stop site	类型 Cluster type	MiBiG 索引号 MiBiG accession	基因簇 Gene cluster	产物 Product	来源 Resource	相似度 Similarity (%)	
Cluster 1	275 750	337 908	NRPS	BGC0000433		Surfactin	<i>B. velezensis</i> FZB42	91	
Cluster 2	604 548	717 089	PKS-like, T1PKS, transAT-PKS, T3PKS	BGC0001520		Aurantinin B/ Aurantinin C/ Aurantinin D	—	28	
Cluster 3	1 103 293	1 123 719	Terpene	—	—	—	—	—	
Cluster 4	1 712 320	1 818 661	TransAT-PKS, PKS-like, T3PKS, NRPS	BGC0001089		Bacillaene	<i>B. velezensis</i> FZB42	100	
Cluster 5	1 894 342	1 968 024	NRPS, betalactone	BGC0001095		Fengycin	<i>B. velezensis</i> FZB42	100	
Cluster 6	2 083 914	2 105 845	Terpene	—	—	—	—	—	
Cluster 7	2 180 182	2 221 279	T3PKS	BGC0002432		Laterocidine	—	5	
Cluster 8	3 070 929	3 122 745	NRP-metallophore, NRPS	BGC0000309		Bacillibactin	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168	100	
Cluster 9	3 663 748	3 685 360	Sactipeptide	BGC0000602		Subtilosin A	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> ATCC 6633	100	
Cluster 10	3 687 263	3 728 681	Other	BGC0001184		Bacilysin	<i>B. velezensis</i> FZB42	100	

—: 没有信息。
—: No information.

与 *B. velezensis* FZB42 的溶杆菌素(bacilysin)基因簇有 100%的相似性, 基因簇 2 和基因簇 7 与已报道化合物编码基因簇相似性较低, 此外, 萜烯类的 2 种次生代谢产物与 MiBiG 数据库比对没有同源性, 可能为该菌株所特有的产物, 值得进一步研究。

2.6 菌株 BY-S2 耐受重金属铜、溶磷和产铁载体的相关功能基因的鉴定

为了探究菌株 BY-S2 耐重金属铜的分子机制, 我们将菌株 BY-S2 的基因编码蛋白序列与 BacMet 数据库进行比对, 以鉴定菌株 BY-S2 所携带的重金属铜耐受基因。比对结果显示, 菌株 BY-S2 携带铜耐受相关基因 *copZ*、*csuR*、*copA*、*yfmP*、*yfmO*、*ycnK* 和 *ycnJ*。同时, 我们也探究了菌株 BY-S2 溶磷和产铁载体的分子机制。通过对 PGAP 注释结果进行检索, 我们发现菌株 BY-S2 携带多个有机酸合成相关的功能基因, 包括乙酸(*ackA*)、丙酮酸(*pyk*、*pyc*)、丁酸(*buk*)、莽草酸(*aroK*)、乳酸(*ldh*)、柠檬酸(*citA*、*citZ*), 这些有机酸通过提升土壤酸度, 促进难溶性磷酸盐向植物可利用的游离态磷酸盐转化, 从而实现无机磷的有效利用。菌株 BY-S2 还包含一个溶有机磷的基因 *phyC*, 编码植酸酶, 具有溶解植酸钙的能力, 可以提高植酸磷的利用率。利用 antiSMASH 在线数据库预测菌株 BY-S2 的次级代谢产物合成基因簇, 通过分析这些次级代谢产物合成基因簇, 我们发现菌株 BY-S2 中含有完整的编码铁载体合成的 DHB 合成基因簇(*dhbACEBF*)。菌株 BY-S2 含有的耐受重金属铜、溶磷和产铁载体的相关功能基因结果见表 2。

3 讨论

烟草黑胥病是烟草农业生产上危害严重的真菌土传病害, 可以采用施加化学杀菌剂、培育

抗病品种、改变耕作方式等措施加以控制。目前, 生物防治由于其符合环保的要求日益受到关注, 也符合绿色优质烟叶生产的要求。芽孢杆菌为棒状的革兰氏阳性细菌, 广泛地分布在自然界中, 于极端环境中可以形成孢子抵抗不良环境, 并可以产生抗菌物质对植物病原菌起到拮抗作用, 被广泛地用于防治烟草黑胥病。耐受盐芽孢杆菌(*B. halotolerans*)是芽孢杆菌属的一个种, 研究表明耐受盐芽孢杆菌对多种植物病原菌有抑制作用, 具有一定的生防潜力, 同时研究还发现耐受盐芽孢杆菌有促进植物生长发育的作用^[27-28]。刘雪停等^[29]研究发现耐受盐芽孢杆菌对黄斑病菌、灰霉病菌等不同病原菌有稳定的拮抗活性。许世洋等^[30]筛选出耐受盐芽孢杆菌 XP236, 可有效防治辣椒镰孢根腐病。Jiménez-Gómez 等^[31]发现耐受盐芽孢杆菌 SCCPVE07 可以促进茼蒿的生长发育并提高其营养成分的含量, 并且在盐胁迫条件下有利于酚类化合物的合成。本研究中筛选出的耐受盐芽孢杆菌 BY-S2, 对烟草疫霉有较好的抑制活性, 并且目前未见关于耐受盐芽孢杆菌防治烟草黑胥病的研究, 为烟草黑胥病的积极防控提供新的生防资源。此外, 该菌株具有一定的抗重金属铜离子的胁迫能力, 可以在重金属铜胁迫条件下防治烟草黑胥病, 在微生物制剂的应用中前景广阔。

铁载体又叫嗜铁素, 是微生物在缺铁条件下产生的一种低分子量的有机化合物, 可以与环境中的铁离子螯合随即运输到植物体内。微生物产生的铁载体在缺铁环境下可以促进植物对铁元素的吸收, 另外, 也可以与病原菌直接进行铁的竞争, 从而抑制病原菌的生长^[32]。磷是植物生长的必需元素, 土壤中虽含有大量磷元素, 但只有少部分可被植物直接吸收利用, 农业上以施用磷肥为主要措施补充植物生长所需的磷^[33]。磷肥的长期过量施用导致了土壤结

表 2 菌株 BY-S2 中重金属铜耐受基因、溶磷基因和产铁载体基因

Table 2 Key genes associated with copper resistance, phosphate solubilization, and the production of siderophore in strain BY-S2

基因座标签 Locus tag	基因 Gene	位置 Position	产物 Product	NCBI 登录号 NCBI accession number	功能 Function
RSQ21_16410	<i>copA</i>	3 250 869–3 253 280	Copper-exporting P-type ATPase CopA	O32220	耐受重金属铜
RSQ21_16415	<i>copZ</i>	3 253 364–3 253 573	Copper chaperone CopZ	O32221	Tolerance to
RSQ21_16420	<i>csaR</i>	3 253 649–3 253 951	Copper-sensing transcriptional repressor CsaR	O32222	heavy metal copper
RSQ21_03525	<i>yfmP</i>	763 774–764 196	HTH-type transcriptional regulator YfmP	O06474	
RSQ21_03530	<i>yfmO</i>	764 262–765 452	Multidrug efflux protein YfmO	O06473	
RSQ21_01750	<i>ycnJ</i>	363 050–364 675	Copper transport protein YcnJ	C0SP95	
RSQ21_01755	<i>ycnK</i>	364 710–365 282	HTH-type transcriptional repressor YcnK	P94433	
RSQ21_01250	<i>ldh</i>	243 817–244 782	L-lactate dehydrogenase	NP_388187.2	溶无机磷
RSQ21_01305	<i>aroK</i>	255 092–255 652	Shikimate kinase	NP_388197.2	Solubilization of
RSQ21_04640	<i>citA</i>	970 875–971 975	Citrate synthase CitA	NP_388825.2	inorganic
RSQ21_07495	<i>pyc</i>	1 497 210–1 500 656	Pyruvate carboxylase	NP_389369.1	phosphate
RSQ21_11865	<i>buk</i>	2 383 831–2 384 916	Butyrate kinase	WP_003246025.1	
RSQ21_14155	<i>citZ</i>	2 810 367–2 811 485	Citrate synthase	NP_390792.1	
RSQ21_14175	<i>pyk</i>	2 814 002–2 815 759	Pyruvate kinase	NP_390796.1	
RSQ21_14265	<i>ackA</i>	2 833 148–2 834 335	Acetate kinase	NP_390825.1	
RSQ21_10460	<i>phyC</i>	2 144 191–2 145 339	Phytase	WP_007407926.1	溶有机磷
					Solubilization of
					organic phosphate
RSQ21_15610	<i>dhbF</i>	3 090 929–3 098 068	Amino acid adenylation domain-containing protein	CAB15186.3	产铁载体
					Siderophore
RSQ21_15615	<i>dhbB</i>	3 098 087–3 099 022	Isochorismatase	CAB15187.1	production
RSQ21_15620	<i>dhbE</i>	3 099 048–3 100 667	(2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate synthase	CAB15188.1	
RSQ21_15625	<i>dhbC</i>	3 100 696–3 101 892	Isochorismate synthase Dhbc	CAB15189.2	
RSQ21_15630	<i>dhbA</i>	3 101 918–3 102 703	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase	CAB15190.2	

构板结、环境污染等问题。具有解磷性能的细菌可以溶解土壤中的难溶性磷并将其转化为可被植物吸收利用的磷形态，从而提高土壤磷的利用效率^[34]。此外，溶磷菌可以促进植物生长发育，还可以改善土壤结构^[35]。铜是植物正常生命活动所必需的微量元素之一，参与多种生理代谢过程。但是过量的铜会对植株产生毒害，抑制植株的光合作用、打破激素平衡，影响植株的生长发育^[36]。研究发现 4 mg/L 的铜浓度就会对烟草植株产生毒害作用，抑制其生长发育^[37]。菌株 BY-S2 可以产生铁载体，具有溶磷能力，

同时具有良好的重金属铜耐受能力，施用菌株 BY-S2 可以于铜污染环境中提高植株养分的利用率、促进烟草植株的生长发育，增强烟草植株对铜的耐受能力，具有农业生产的应用潜力。

全基因组序列的获得对菌株后续进行基因生物学功能分析提供了便利，为了进一步探究菌株 BY-S2 的抑菌机制，本研究采用 DNBSEQ 平台和 PacBio 平台相结合的方式对菌株 BY-S2 的全基因组测序。测序结果表明，菌株 BY-S2 由一条全基因组长度为 4 058 008 bp 的染色体组成，平均 G+C 含量为 43.78%，有

71 个 tRNA、18 个 rRNA、5 个 ncRNA。本文运用 antiSMASH 分析方法从菌株 BY-S2 基因组中鉴定出 10 个次生代谢产物合成相关基因簇, 有 5 种与已知的基因簇完全相似, 分别为脂肽类的丰原素(fengycin)、二肽化合物的溶杆菌素(bacilysin)、铁载体类的儿茶酚型铁载体(bacillibactin)、聚酮类的芽孢杆菌烯(bacillaene)和塞克肽类的芽孢杆菌素(subtilosin A)。芽孢杆菌烯(bacillaene)是芽孢杆菌属产生的一类重要的聚酮类物质, 具有较强的抗真菌活性, 可以增强菌株的生物防治效果^[38]。丰原素(fengycin)由具有 7 个氨基酸的环状七肽和具有两亲性特性的疏水性脂肪酸尾部组成, 可以破坏真菌细胞膜导致细胞死亡, 从而具有有效的抗真菌活性^[39]。铁载体(bacillibactin)属于儿茶酚型嗜铁素, 可以与植物病原菌竞争环境中的铁, 导致病原菌缺铁从而抑制病原菌的生长^[40]。芽孢杆菌素(subtilosin A)是一种疏水性细菌素, 可以与细胞膜的脂质双分子层结合, 导致其膜的渗透性增加^[41]。溶杆菌素(bacilysin)是最简单的肽类抗生素, 可被转运到宿主细胞内, 细胞内的肽酶将其水解成抗荚膜菌素(anticapsin), 抗荚膜菌素(anticapsin)可以导致细菌和真菌细胞壁形成所必需的 6-磷酸葡萄糖胺的合成受阻, 导致细胞内含物外流, 从而达到抗菌作用^[42]。这些抑菌代谢物的合成对耐受盐芽孢杆菌 BY-S2 发挥拮抗作用具有重要的意义。相较于已报道的完成全基因组测序的烟草黑胫病生物防治菌株枯草芽孢杆菌 MC4-2^[10]与蜡样芽孢杆菌 Z4^[3], 通过 antiSMASH 分析发现, 菌株 BY-S2 携带有编码 2 种独特次级代谢产物 aurantin B/aurantinin C/aurantinin D 以及 laterocidine 的基因簇。未来研究可进一步深入, 例如对这 2 种独特次级代谢产物进行分离和鉴定, 同时评估这些次级代谢产物对烟草疫霉的抑制效果, 以

揭示其在生物防治中的应用潜力。

4 结论

本研究从烟草根际土壤中筛选出一株耐受盐芽孢杆菌 BY-S2, 该菌株对烟草疫霉具有良好的拮抗作用, 可以产生铁载体, 具有溶解无机磷和有机磷的能力, 同时对重金属铜有耐受能力, 是防治烟草黑胫病值得开发利用的生防资源。在后续研究中需进一步明确菌株 BY-S2 产生的次级代谢产物以及评价其对烟草疫霉的抑制效果。同时也可以探究菌株 BY-S2 与新型材料复配对烟草黑胫病的防治效果。

REFERENCES

- [1] 汪代斌, 杜根平, 曾昭兴, 郭保银, 张帅, 丁伟. 烟草黑胫病综合防控技术[J]. 植物医生, 2013(3): 44-45. WANG DB, DU GP, ZENG ZX, GUO BY, ZHANG S, DING W. Comprehensive control technology of tobacco black shank disease[J]. Plant Doctor, 2013(3): 44-45 (in Chinese).
- [2] 易龙, 邱妙文, 陈永明, 邓海滨. 烟草黑胫病的生物防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2017, 33(25): 146-151. YI L, QIU MW, CHEN YM, DENG HB. Advances in biological control of tobacco black shank[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2017, 33(25): 146-151 (in Chinese).
- [3] JI SH, TIAN Y, LI JJ, XU GX, ZHANG YA, CHEN SY, CHEN YQ, TANG XX. Complete genome sequence of *Bacillus cereus* Z4, a biocontrol agent against tobacco black shank, isolated from the Western Pacific Ocean[J]. Marine Genomics, 2023, 72: 101071.
- [4] 李苗苗, 张家韬, 崔传斌, 孙光军, 王东坤, 崔志燕, 高强, 冯超, 王凤龙, 陈德鑫, 王晓强. 三株芽孢杆菌的生防特性研究[J]. 中国烟草科学, 2020, 41(4): 80-89. LI MM, ZHANG JT, CUI CB, SUN GJ, WANG DK, CUI ZY, GAO Q, FENG C, WANG FL, CHEN DX, WANG XQ. Study on biocontrol characteristics of three *Bacillus* strains[J]. Chinese Tobacco Science, 2020, 41(4): 80-89 (in Chinese).
- [5] 贾孟媛, 王越洋, 唐培培, 周权, 吴俊林, 王小东, 孙会忠. 烟草黑胫病生防菌的筛选鉴定及其防效[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(3): 329-334. JIA MY, WANG YY, TANG PP, ZHOU Q, WU JL, WANG XD, SUN HZ. Screening and identification of biocontrol bacteria for tobacco black shank disease and evaluation of the control effect[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2023, 49(3): 329-334 (in Chinese).
- [6] 杨艺炜, 黎妍妍, 张安盛, 周建云, 李斌, 王静, 陈德鑫. 烟草黑胫病拮抗菌 XF10 的筛选与鉴定[J]. 烟

- 草科技, 2018, 51(4): 20-27.
YANG YW, LI YY, ZHANG AS, ZHOU JY, LI B, WANG J, CHEN DX. Screening and identification of an antagonistic bacterium XF10 against tobacco black shank[J]. Tobacco Science & Technology, 2018, 51(4): 20-27 (in Chinese).
- [7] 宋玉娟, 韩雪莲, 张安盛, 王玉军, 高克祥, 梁元存. 棘孢木霉 T-6 对烟草促生及对黑胫病和根黑腐病的抗病作用[J]. 中国烟草科学, 2020, 41(1): 50-55.
SONG YJ, HAN XL, ZHANG AS, WANG YJ, GAO KX, LIANG YC. Effects of *Trichoderma asperellum* T-6 on growth promotion, control of black shank and black root rot in tobacco[J]. Chinese Tobacco Science, 2020, 41(1): 50-55 (in Chinese).
- [8] 王学坚, 刘子仪, 张体坤, 刘剑金, 李再明, 王庙昌, 莫明和, 张滨. 钩状木霉(*Trichoderma hamatum* YMF1.00247)促进烟草生长及其诱导抗性研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2020, 42(6): 1230-1236.
WANG XJ, LIU ZY, ZHANG TK, LIU JJ, LI ZM, WANG MC, MO MH, ZHANG B. A study on the growth-promoting and resistance induction of *Trichoderma hamatum* YMF 1.00247 on tobacco[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2020, 42(6): 1230-1236 (in Chinese).
- [9] 王亚月, 贾方方, 李俊营, 许跃奇, 阎海涛, 何晓冰, 刘冬梅, 常栋. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选鉴定与防病促生作用研究[J]. 中国烟草科学, 2022, 43(6): 60-67, 75.
WANG YY, JIA FF, LI JY, XU YQ, YAN HT, HE XB, LIU DM, CHANG D. Screening, identification of a bacterial strain against tobacco black shank and its growth-promoting effects[J]. Chinese Tobacco Science, 2022, 43(6): 60-67, 75 (in Chinese).
- [10] SHI CL, ZENG SQ, GAO X, HUSSAIN M, HE MC, NIU XR, WEI CC, YANG R, LAN MX, XIE YH, WANG ZJ, WU GX, TANG P. Complete genome sequence analysis of *Bacillus subtilis* MC4-2 strain that against tobacco black shank disease[J]. International Journal of Genomics, 2024, 2024: 8846747.
- [11] XIA XR, WANG QZ, GUO K, YUAN GQ, DENG T, ZHAO ZY, GUO QC, WU K, CHEN B, PAN YH. Combined application of resistance inducer and *Trichoderma* control two tobacco soil-borne diseases by regulating the field soil microbial composition[J]. Journal of Phytopathology, 2024, 172(3): e13333.
- [12] ZENG XN, ZHANG X, PENG B, XIE BY, YUAN Y, YAO H, YOU XW, WEI JY, LI YQ. Chitooligosaccharide enhanced the efficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* CAS02 for the control of tobacco black shank[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1296916.
- [13] 韩瑞华, 江凯, 康业斌. 玫瑰黄链霉菌联合杀菌剂对烟草疫霉的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(3): 710-716.
HAN RH, JIANG K, KANG YB. Control effect of *Streptomyces roseoflavus* and fungicides on *Phytophthora nicotianae*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2024, 40(3): 710-716 (in Chinese).
- [14] JIA HJ, LV XL, SOHAIL MA, LI M, HUANG B, WANG J. Control efficiency of biochar loaded with *Bacillus subtilis* Tpb55 against tobacco black shank[J]. Processes, 2022, 10(12): 2663.
- [15] MA XH, XU JY, ZHAO XH, QU LL, GAO Y, HUANG WX, HAN D, DANG BJ, XU ZC, JIA W. Selenium improves the control efficacy of *Phytophthora nicotianae* by damaging the cell membrane system and promoting plant energy metabolism[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(9): 5073-5087.
- [16] 张穗, 郭永霞, 唐文华, 牛灿芳. 井冈霉素 A 对水稻纹枯病菌的毒力和作用机理研究[J]. 农药学报, 2001, 3(4): 31-37.
ZHANG S, GUO YX, TANG WH, NIU CF. Studies on the Toxicity and Mechanism of Jinggangmycin A on *Rhizoctonia solani* AG-1 IA [in vitro (on PDA) and in vivo (in rice plant)] [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2001, 3(4): 31-37 (in Chinese).
- [17] 陈倩, 刘善江, 白杨, 李亚星, 郜春花, 张强, 李建华. 山西矿区复垦土壤中解磷细菌的筛选及鉴定[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(6): 1505-1516.
CHEN Q, LIU SJ, BAI Y, LI YX, GAO CH, ZHANG Q, LI JH. Screening and identification of phosphate-solubilizing bacteria from reclaimed soil in Shanxi mining area[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2014, 20(6): 1505-1516 (in Chinese).
- [18] 杜雷, 王素萍, 陈钢, 洪娟, 黄翔, 张利红, 叶莉霞, 练志诚, 张贵友. 一株高效解磷细菌的筛选、鉴定及其溶磷能力的研究[J]. 中国土壤与肥料, 2017(3): 136-141.
DU L, WANG SP, CHEN G, HONG J, HUANG X, ZHANG LH, YE LX, LIAN ZC, ZHANG GY. Isolation and identification of efficient phosphate-solubilizing bacterial strain and its phosphate-solubilizing capacity[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2017(3): 136-141 (in Chinese).
- [19] MEHTA S, NAUTIYAL CS. An efficient method for qualitative screening of phosphate-solubilizing bacteria[J]. Current Microbiology, 2001, 43(1): 51-56.
- [20] 赵翔, 谢志雄, 陈绍兴, 沈萍. 适合高产铁载体细菌筛选、检测体系的改进与探析[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 95-98.
ZHAO X, XIE ZX, CHEN SX, SHEN P. Improvement and analysis in over- siderophores production bacteria filtrating and detecting[J]. Microbiology China, 2006, 33(6): 95-98 (in Chinese).
- [21] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(Pt 2): 346-351.
- [22] LI WJ, O'NEILL KR, HAFT DH, DiCUCCIO M, CHETVERNIN V, BADRETDIN A, COULOURIS G, CHITSAZ F, DERBYSHIRE MK, SCOTT DURKIN A, GONZALES NR, GWADZ M, LANCZYCKI CJ, SONG JS, THANKI N, WANG JY, YAMASHITA RA, YANG MZ, ZHENG CJ, MARCHLER-BAUER A, THIBAUD-NISSEN F. RefSeq: expanding the Prokaryotic Genome Annotation Pipeline reach with protein family model curation[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(D1): D1020-D1028.
- [23] PAL C, BENGTTSSON-PALME J, RENSING C, KRISTIANSSON E, JOAKIM LARSSON DG. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database[J]. Nucleic Acids Research, 2014, 42(Database issue): D737-D743.
- [24] 王向向, 陈静宇, 孟利强, 张烨, 李萌, 曹旭. 溶磷微生物功能基因的研究进展[J]. 生物过程, 2022,

- 12(3): 170-175.
WANG XX, CHEN JY, MENG LQ, ZHANG Y, LI M, CAO X. Advances in functional genes of phosphorus-solubilizing microorganisms[J]. Bioprocess, 2022, 12(3): 170-175 (in Chinese).
- [25] 赵健淞, 付若晗, 王跃麟, 赵鑫, 张越, 杨艳歌, 孙冬梅. 不动杆菌 PSB-K 解磷促生能力及全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2025, 52(1): 199-218.
ZHAO JS, FU RH, WANG YL, ZHAO X, ZHANG Y, YANG YG, SUN DM. Phosphate-solubilizing and plant growth-promoting effects and whole genome sequencing of *Acinetobacter baumannii* PSB-K[J]. Microbiology China, 2025, 52(1): 199-218 (in Chinese).
- [26] BLIN K, SHAW S, KLOOSTERMAN AM, CHARLOP-POWERS Z, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities[J]. Nucleic Acids Research, 2021, 49(W1): W29-W35.
- [27] WANG F, XIAO J, ZHANG YZ, LI RY, LIU L, DENG J. Biocontrol ability and action mechanism of *Bacillus halotolerans* against *Botrytis cinerea* causing grey mould in postharvest strawberry fruit[J]. Postharvest Biology and Technology, 2021, 174: 111456.
- [28] 陈兰, 谢永丽, 杨雪, 高英, 武玲玲, 王添, 许梦茹. 干旱沙地白刺根际 *Bacillus halotolerans* DGL6 对‘青麦 7 号’的促生及防病效果[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3899-3911.
CHEN L, XIE YL, YANG X, GAO Y, WU LL, WANG T, XU MR. *Bacillus halotolerans* DGL6 from the rhizosphere of *Nitraria tangutorum* in arid sandy land promotes growth and controls diseases of *Triticum aestivum* ‘Qingmai 7’[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3899-3911 (in Chinese).
- [29] 刘雪停, 夏彦飞, 李身, 雷荣月, 徐建强, 林晓民. 杨山牡丹生防内生细菌的分离及鉴定[J]. 江西农业学报, 2022, 34(2): 62-68.
LIU XT, XIA YF, LI S, LEI RY, XU JQ, LIN XM. Isolation and identification of endophytic bacteria from *Paeonia ostii*[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2022, 34(2): 62-68 (in Chinese).
- [30] 许世洋, 范雨轩, 汪学苗, 张怡忻, 柴继宽, 李建军, 李敏权, 漆永红, 李雪萍. 辣椒镰孢根腐病促生细菌的筛选及其效应[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2735-2750.
XU SY, FAN YX, WANG XM, ZHANG YX, CHAI JK, LI JJ, LI MQ, QI YH, LI XP. The *Fusarium* root rot-controlling effect and growth-promoting effect of the bacteria in the rhizosphere of *Capsicum annuum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2735-2750 (in Chinese).
- [31] JIMÉNEZ-GÓMEZ A, GARCÍA-ESTÉVEZ I, GARCÍA-FRAILE P, TERESA ESCRIBANO-BAILÓN M, RIVAS R. Increase in phenolic compounds of *Coriandrum sativum* L. after the application of a *Bacillus halotolerans* biofertilizer[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(6): 2742-2749.
- [32] 林彬, 赵妍妍, 玛依拉·吐尔地别克, 恩特马克·布拉提白. 薰衣草根际产铁载体细菌的促生作用[J]. 新疆师范大学学报(自然科学版), 2024, 43(3): 90-96.
LIN B, ZHAO YY, MAYILA T, ENTEMAKE B. Growth promotion of iron-producing carrier bacteria in lavender rhizosphere[J]. Journal of Xinjiang Normal University (Natural Sciences Edition), 2024, 43(3): 90-96 (in Chinese).
- [33] EOTIENO N, EOTIENO N, LALLY DR, EKIWANUKA S, ELIOYD A, ERYAN D, JGEERMAINE K, DOWLING DN. Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 745.
- [34] 王雪邴, 张芮瑞, 周少奇, 邱树毅. 不良环境解磷微生物研究进展[J]. 河南农业科学, 2020, 49(7): 8-17.
WANG XL, ZHANG RR, ZHOU SQ, QIU SY. Research progress of phosphate-solubilizing microorganisms in bad environments[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2020, 49(7): 8-17 (in Chinese).
- [35] 马莹, 程莹莹, 石孝均, 陈新平, 骆永明. 溶磷菌在磷素循环和生态农业中的作用与其生物肥料应用[J]. 微生物学报, 2023, 63(12): 4502-4521.
MA Y, CHENG YY, SHI XJ, CHEN XP, LUO YM. Phosphate-solubilizing bacteria: roles in phosphorus cycling and ecological agriculture and application as potential biofertilizers[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(12): 4502-4521 (in Chinese).
- [36] 李佳, 杜瑞英, 王旭, 陈光. 植物铜胁迫响应的生理与分子机制研究进展[J]. 中国农学通报, 2023, 39(11): 18-28.
LI J, DU RY, WANG X, CHEN G. Physiological and molecular mechanism of plants response to copper stress: a review[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2023, 39(11): 18-28 (in Chinese).
- [37] 徐根娣, 葛淑芳, 章艺, 吴玉环, 梅笑漫, 刘鹏. 外源水杨酸对 Cu 胁迫下水培烟草生长及营养元素吸收利用的影响[J]. 作物学报, 2015, 41(6): 956-962.
XU GD, GE SF, ZHANG Y, WU YH, MEI XM, LIU P. Effect of salicylic acid on growth and nutrient uptake in hydroponic tobacco under Cu stress[J]. Acta Agronomica Sinica, 2015, 41(6): 956-962 (in Chinese).
- [38] CHEN K, TIAN ZH, LUO Y, CHENG YJ, LONG CA. Antagonistic activity and the mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* DH-4 against *Citrus* green mold[J]. Phytopathology, 2018, 108(11): 1253-1262.
- [39] SAIYAM D, DUBEY A, MALLA MA, KUMAR A. Lipopeptides from *Bacillus*: unveiling biotechnological prospects-sources, properties, and diverse applications[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2024, 55(1): 281-295.
- [40] 刘卹洲, 沈佳慧, 乔俊卿, 左杨, 刘永锋. 芽孢杆菌嗜铁素研究进展[J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 266-276.
LIU YZ, SHEN JH, QIAO JQ, ZUO Y, LIU YF. Research progress of siderophore produced by *Bacillus* spp.[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2023, 39(1): 266-276 (in Chinese).
- [41] THENNARASU S, LEE DK, POON A, KAWULKA KE, VEDERAS JC, RAMAMOORTHY A. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2005, 137(1/2): 38-51.
- [42] 吴黎明, 李曦, 伍辉军, 高学文. 芽孢杆菌抗菌二肽溶杆菌素的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(5): 778-783.
WU LM, LI X, WU HJ, GAO XW. Research advances on bacilysin from *Bacillus*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(5): 778-783 (in Chinese).