

## 研究报告

# 一株具有促生作用的生防细菌 YN-2A 的分离、鉴定及全基因组测序分析

王琦, 陈秀玲\*, 王傲雪\*

东北农业大学 园艺园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

王琦, 陈秀玲, 王傲雪. 一株具有促生作用的生防细菌 YN-2A 的分离、鉴定及全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2986-3003.

WANG Qi, CHEN Xiuling, WANG Aoxue. A biocontrol bacterium YN-2A with growth-promoting effect: isolation, identification, and genome sequencing[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2986-3003.

**摘要:** 【背景】根际土壤中分布着丰富的微生物类群, 其中不少微生物具有拮抗病原菌的能力, 以此保护植株免受病害侵袭。【目的】分离并鉴定出一株具有促生作用的生防细菌, 从基因组学与生物信息学角度探究生防菌的抑菌机制。【方法】采用平板稀释涂布法筛选出具有拮抗黄瓜炭疽病作用的细菌。通过 16S rRNA 基因和基因组序列比对来确定生防细菌的生物学分类。以 500 倍生防菌稀释液( $5 \times 10^8$  CFU/mL)为材料, 测定其对番茄种子、幼苗的促生效果。通过平板对峙试验测定生防细菌的广谱抑菌性。利用三代(PacBio、Nanopore)结合二代测序技术解析菌株的基因组信息、基因功能注释等。【结果】从鹅掌柴根际土壤分离出一株生防细菌 YN-2A, 结合 16S rRNA 基因与核酸序列数据库(nucleotide sequence database, NT)比对结果, 鉴定出菌株 YN-2A 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。菌株 YN-2A 是一株好氧型的革兰氏阳性菌, 具有产生生物膜的能力。菌株 YN-2A 的 500 倍稀释液( $5 \times 10^8$  CFU/mL)能够有效促进番茄种子发芽率和幼苗的生长, 同时提高叶片的叶绿素荧光参数。在 72、96 和 120 h 的发芽率分别比 CK 组提高 1.45 倍、1.42 倍和 1.09 倍; 在幼苗形态指标上, 株高提升 5.90 cm。光化学猝灭指数(photochemical quenching, qP)在荧光参数中提升最为显著, 处理后番茄叶片 qP 指数同 CK 组相比提高 1.27 倍。平板对峙试验中菌株 YN-2A 能够拮抗多种真菌病原。全基因组测序结果表明, 菌株 YN-2A 全基因组长度为 4 046 066 bp, G+C 含量为 46%, 包含 4 090 个编码基因。将全基因组测序数据提交至 NCBI 获得 GenBank 登录号为 CP139086。基本功能注释中大部分基因注释到氨基酸与碳水化合物代谢途径。另外, 在病原与宿主互作(pathogen host interactions, PHI)数据库中毒力降低(reduced virulence)分类涉及基因数量高达 905 个, 并有 69 个基因注释到病原菌失去致病力(loss of pathogenicity)分类。初步推断生防细菌 YN-2A 因其含有大量抗病、降低毒力的基因来发挥抑菌作用。【结论】分离并鉴定出一株贝莱斯芽

资助项目: 国家自然科学基金面上项目(32072588); 黑龙江省自然科学基金(LH2020C011); 泰山产业领军人才工程项目

This work was supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (32072588), the Natural Science Foundation of Heilongjiang Province (LH2020C011), and the Taishan Industry Leading Talent Project.

\*Corresponding authors. E-mail: CHEN Xiuling, chenx@neau.edu.cn; WANG Aoxue, axwang@neau.edu.cn

Received: 2023-10-22; Accepted: 2023-11-25; Published online: 2024-01-04

孢杆菌(*B. velezensis*) YN-2A, 该菌株对番茄的种子和幼苗具有良好的促生效果, 同时该菌株具备广谱抑菌性。通过测序技术, 获得了菌株 YN-2A 的全基因组信息, 为深入挖掘菌株 YN-2A 的抑菌机制提供参考信息。

关键词: 生防细菌; 拮抗作用; 全基因组测序; 基因功能注释

## A biocontrol bacterium YN-2A with growth-promoting effect: isolation, identification, and genome sequencing

WANG Qi, CHEN Xiuling\*, WANG Aoxue\*

College of Horticulture and Landscape Architecture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

**Abstract: [Background]** There are numerous microorganisms in the rhizosphere soil, many of which can antagonize pathogens and thus protect plants from diseases. **[Objective]** To isolate and identify a biocontrol bacterial strain capable of promoting plant growth and explore the antifungal mechanism from genomics and bioinformatics. **[Methods]** The dilution-plate coating method was employed to isolate a bacterial strain with antagonistic effects against *Colletotrichum orbiculare*. The strain was identified based on 16S rRNA gene sequencing and genome sequence alignment. The effects of the strain suspension ( $5 \times 10^8$  CFU/mL) on tomato seeds and seedlings were determined. The antifungal spectrum of the strain was determined by the plate confrontation test. Furthermore, the third-generation (PacBio, Nanopore) sequencing was combined with the second-generation sequencing to analyze the genomic information and gene function annotation of the strain. **[Results]** A strain of biocontrol bacteria isolated from the rhizosphere soil of *Schefflera heptaphylla* was named YN-2A. Based on the alignment results of 16S rRNA gene and nucleotide sequence database (NT), the strain YN-2A was identified as *Bacillus velezensis*. Strain YN-2A was an aerobic Gram-positive bacterial strain with the ability to produce biofilms. Strain YN-2A suspension ( $5 \times 10^8$  CFU/mL) promoted tomato seed germination and seedling growth and increased the leaf chlorophyll fluorescence parameters. Specifically, the suspension increased the germination rate at the time points of 72, 96 and 120 h by 1.45 times, 1.42 times and 1.09 times, respectively, and it increased the plant height of tomato seedlings by 5.90 cm. Among the fluorescence parameters, photochemical quenching (qP) exhibited the most significant increase of 1.27 times in the strain treatment group compared with the control group. The results of the plate confrontation test showed that strain YN-2A can antagonize a variety of fungal pathogens. The results of whole genome sequencing showed that the whole genome length of strain YN-2A was 4 046 066 bp, with the G+C content of 46% and 4 090 coding genes. The whole genome sequencing data was submitted to NCBI to obtain the GenBank accession number CP139086. Most genes were annotated to the amino acid and carbohydrate metabolic pathways. Particularly, 905 genes were annotated to reduced virulence in the pathogen host interactions (PHI) database, and 69 genes were annotated to the loss of pathogenicity database. It is thus hypothesized that the

antifungal effect of YN-2A is attributed to the disease-resistant and virulence-reducing genes. **[Conclusion]** A biocontrol strain *B. velezensis* YN-2A was isolated and identified. The strain promoted tomato seed germination and seedling growth and demonstrated a broad antifungal spectrum. The whole genome information of strain YN-2A was obtained by sequencing, which provided reference information for deciphering the antifungal mechanism of strain YN-2A.

**Keywords:** biocontrol bacteria; antagonistic effect; whole genome sequencing; gene function annotation

生防细菌主要分布于植物根际周围的土壤中,是根际土壤微生物群落结构必不可少的一部分。生防细菌具有繁殖速度快、发酵液制备简便、防治效果稳定等优点,因此是制作生物菌剂的主要来源<sup>[1]</sup>。生防细菌以芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)居多,芽孢杆菌在土壤、空气和水中均有分布,它能够抑制多种病原菌的繁殖<sup>[2-3]</sup>。芽孢杆菌在繁殖过程中能向胞外分泌各种酶和细菌素,以抑制病原菌孢子繁殖和萌发,同时破坏细胞膜和细胞壁来达到抑菌效果<sup>[4-5]</sup>。夏明聪等<sup>[6]</sup>研究表明贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) YB-145 是一株具有防治小麦纹枯病的生防菌株,同时具备促生长的作用。研究发现,巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) BM1、贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) RC218 能够明显减轻小麦赤霉病的发生<sup>[7-8]</sup>。促生作用也是生防菌的一大特点,张秀玥等<sup>[9]</sup>将枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) gb-1 和常规化肥进行对比,结果表明枯草芽孢杆菌 gb-1 能增加辣椒株高和果重,同时降低 6%辣椒青枯病病害发生率。IAA 具有促进细胞生长、增加细胞体积和调节植物根系生长变化等功能。施用具有产生 IAA 的生防细菌在豌豆上,发现植株、茎、叶和鲜重等都有大幅度提高<sup>[10]</sup>。生物防治优势在于对土壤、水体等无污染,而且在采后果实中不残留有毒物质<sup>[11]</sup>。一些菌种还能够在植物体的根部形成生物膜来抵御病原菌的侵袭<sup>[12]</sup>。

本研究以筛选出具有良好促生效果的生防

菌株为目的,通过结合二代、三代测序技术,鉴定菌株的身份信息。同时测定菌株对番茄的促生效果响应。为深入了解菌株的作用机理,采用 COG、KEGG 和 GO 数据库进行基因基本功能注释,碳水化合物相关酶数据库(carbohydrate-active enzymes database, CAZy)和病原与宿主互作数据库(pathogen host interactions database, PHI-base)进行特殊功能分析,以期全方位解析菌株的作用机制,为生防微生物的发展贡献新资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

土壤样品采集自云南西双版纳傣族自治州勐腊县根际土壤,选取长势健壮无病害植株的根际周围<sup>[13]</sup>,除去表面土,采集 5-10 cm 深处土样。采样用多点取样法采集土壤;土壤样品保存于自封袋中,并进行编号。

病原菌:灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)、轮枝镰刀菌(*Fusarium verticillioide*)、木贼镰刀菌(*Fusarium equiseti*)和葵花菌核病菌 [*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary]保存于东北农业大学园艺生物技术课题组。

### 1.2 主要试剂和仪器

酵母粉、胰蛋白胨和氯化钠等,哈尔滨赛百奥科技有限公司;细菌基因组提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司。立式压力蒸汽灭菌

锅,上海申安医疗器械厂;电子显微镜,麦克奥迪实业集团有限公司。万深根系扫描系统,杭州万深检测科技有限公司;FluorCam 叶绿素荧光成像系统,易科泰生态技术公司;损失修复试剂盒,PacBio 公司;Qubit 3.0 荧光计,ThermoFisher;Agilent 2100 生物分析仪,安捷伦。

### 1.3 培养基

细菌培养基:LB 培养基(g/L)参考文献[14]配制。

真菌培养基:PDA 培养基(g/L)参考文献[15]配制。

### 1.4 生防菌的分离、筛选

菌株的分离采用平板稀释涂布法,首先称取 2 g 碾碎的土壤样品,倒入无菌锥形瓶中,加入 18 mL 无菌水,振荡 30 min 后静置至分层;然后吸取上清液 1 mL,加入 9 mL 无菌水,此时试管内浓度为  $10^{-1}$ ,依次梯度稀释至  $10^{-4}$ ;取试管中浓度为  $10^{-4}$  的溶液 0.1 mL 在平板中均匀涂布,重复 3-5 次。将上述涂布好的平板 28 °C 倒置培养 48 h。待长出菌落后随机选取不同形态的菌落纯化培养。

菌株的筛选:初步筛选以黄瓜炭疽病菌(*C. orbiculare*)为病原菌,采用平板对峙法筛选出具有拮抗作用的细菌,从中选择拮抗效果最好的生防细菌,按 1% 的接种量接种到无菌液体 LB 培养基,28 °C、200 r/min 培养 48 h,即可得到菌悬液( $1 \times 10^9$  CFU/mL)。在灭菌过后的平板左侧放入无菌牛津杯,并在杯中加入 80-100  $\mu$ L 菌悬液;右侧接种黄瓜炭疽病原菌菌饼(直径 6 mm),5 d 后测量抑菌带宽度,从中筛选出抑菌效果最好的菌株 YN-2A 进行后续研究,试验重复 3 次。

### 1.5 生防菌的鉴定

菌株 YN-2A 在 LB 固体培养基上划线培养用以观察形态。从划线培养基中挑取菌落,接种于 LB 液体培养基中,28 °C、200 r/min 培养 48 h,

以备革兰氏染色观察,具体方法参照王笠等<sup>[16]</sup>。

接触酶、好氧或厌氧性、葡萄糖氧化发酵(O/F)和甲基红测定的方法参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[17]</sup>。生物膜测定方法如下:接种 YN-2A 到 LB 液体培养基中,28 °C、200 r/min 培养 1 d。吸取 4 mL 菌悬液注入无菌试管底部,28 °C 静置 2 d。将菌悬液倒出后,用无菌水多次清洗试管内壁,加入 1% 的结晶紫染液 5 mL,静置 15 min,去结晶紫,无菌水清洗 3 次,若此时试管壁有蓝紫色环痕形成,表明可以产生生物膜。

菌株 DNA 提取按照细菌基因组提取试剂盒方法操作,以菌株 YN-2A 基因组 DNA 为模板,使用鉴定细菌的通用引物 27F (5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTAC CTTGTTACGACTT-3')进行 16S rRNA 基因扩增。PCR 反应体系:Super Mix 15  $\mu$ L, Primer F (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, Primer R (10  $\mu$ mol/L) 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L。PCR 反应条件:96 °C 5 min; 96 °C 6 min, 62 °C 20 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 10 min; 16 °C 保存。

将菌株 YN-2A 的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI 的 GenBank 数据库中并进行 BLAST 比对,并与已报道的序列进行同源性比对。将 YN-2A 菌株样品送武汉菲沙基因信息有限公司进行全基因组测序。采用 pb\_assembly\_hifi\_microbial (from SMART Link v11.0.0) 软件进行细菌基因组组装,使用 Pilon v1.24 软件<sup>[18]</sup>基于 pair reads 进行二代数据组装矫正得到最终的组装结果。将每条序列通过 BLAST+ 软件<sup>[19]</sup>的 BLASTn 程序比对到 NT 数据库,比对参数是“-task megablast-outfmt 5-e value 1e-5-max\_target\_seqs 3”,其余为默认参数。结合 NT 数据库比对结果和 16S rRNA 基因测序结果来鉴定菌株身份信息。

## 1.6 分泌 IAA 能力的检测

在 LB 液体培养基中加入 1% L-色氨酸,再将菌株 YN-2A 接种于 LB 液体培养基中,28 °C、200 r/min 培养 48 h,4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取 2 mL 上清液加入 4 mL Salkowski 检测液和两滴正磷酸,将混合液于 28 °C 水浴 2 h,若混合液变为橘红色或红色则表明生防细菌可以分泌 IAA<sup>[20-21]</sup>。试验重复 3 次。

## 1.7 番茄种子发芽率的测定

首先制备生防菌稀释液,具体方法为取  $1 \times 10^9$  CFU/mL 的菌悬液 1 mL 加入无菌锥形瓶中,再加入 499 mL 无菌水,混合均匀,即为 500 倍稀释液( $5 \times 10^8$  CFU/mL)。

将番茄种子用温水浸泡、消毒后,CK 组中加入 10 mL 无菌水;菌株 YN-2A 组中加入 500 倍稀释液 10 mL,各浸泡 30 粒种子,3 h 后用无菌水冲洗种子,再将种子装入种子袋。分别记录 48、72、96、120 和 144 h 番茄种子发芽率。

## 1.8 番茄幼苗促生作用的测定

将番茄种子进行消毒,使用 55 °C 左右温水浸泡种子 3 h 后播入穴盘中,待幼苗长至两叶一心(约 15 d)时移入营养钵中;在 30 d 时,采取灌根的方法将每个营养钵中加入 10 mL YN-2A 稀释液,CK 组加入等量无菌水。20 d 后,测量植株形态指标,在不伤害根系的情况下清洗根系,使用根系扫描系统测定根系指标。

灌根处理后 20 d 的幼苗进行 30 min 黑暗处理,用 FluorCam 叶绿素成像系统测定叶片的叶绿素荧光参数。测定参数包括:非光化学猝灭(nonphotochemical quenching, NPQ)指数、光化学猝灭(photochemical quenching, qP)指数、初始荧光(fluorescence origin, Fo)参数。

## 1.9 生防菌的广谱抑菌性测定

将灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*)、黄瓜炭疽病菌(*C.*

*orbiculare*)、轮枝镰刀菌(*F. verticillioide*)、木贼镰刀菌(*F. equiseti*)、葵花菌核病菌[*S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary]制作成 6 mm 菌饼,用无菌接种针将菌饼置于灭菌晾干的 PDA 培养基中心偏右位置,将无菌牛津杯置于中心偏左位置,吸取菌悬液 80–100  $\mu$ L 注入牛津杯中,对照组则在牛津杯中加入等量无菌水。密封培养皿后,28 °C 恒温箱培养 7 d,测量抑菌距离。

## 1.10 基因组测序

为保证测序数据的准确性,首先对样品进行质量检测,质检结果达到要求后进行建库,构建主要流程为:gTube 将基因组 DNA 打断至 10 kb;使用核酸外切酶 VII 消化,去除 3 端的单链末端;采用损失修复试剂盒修复 DNA 链上的单链断裂或碱基缺失、氧化等;末端修复将 DNA 修复为平末端;连接带 barcode 的 SMRT 哑铃型接头;进行核酸外切酶消化,去除两端未连接上 SMRT 哑铃型接头的片段;使用 0.45 $\times$ 的 PB 磁珠进行二次筛选纯化,获得测序文库。使用 Qubit 3.0 荧光计进行准确定量、Agilent 2100 生物分析仪对文库大小进行检测,当文库大小符合预期后进行上机测序。

## 1.11 基因功能注释

关于基本功能注释,将预测到的基因蛋白序列分别比对到 COG、KEGG 和 GO 数据库。COG:使用 diamond v2.0.9.147 软件的 BLASTp 命令将预测基因的蛋白序列比对到 COG2020 库,*E* 值  $1e-5$ ,挑选得分最高的 hit 作为最终注释结果。KEGG:使用 diamond v2.0.9.147 软件的 BLASTp 命令将预测基因的蛋白序列比对到 KOBAS-v3.0 的全库中,再使用 KOBAS-v3.0 软件解析比对结果,将基因 ID 对应到 KO,最后利用 KEGG BRITE 库中的层级关系表做层级注释。GO:GO term 的注释是通过 ID Mapping (20210616)利用 Swiss-Prot 注释结果映射而来,然后利用 go-basic.obo (v2021-09-01)进行层级注释。

关于特殊功能注释, CAZy 数据库注释使用 dbCAN2 的 dbCAN-HMMdb-V10, 注释软件 HMMER-v3.3.2, 参数  $E$  值  $\leq 1e-15$ , coverage  $\geq 0.35$  (参考 dbCAN2); PHI 数据库注释使用 diamond v2.0.9.147 软件的 BLASTp 命令将预测基因的蛋白序列比对到 PHI 库,  $E$  值  $1e-5$ , 挑选得分最高的 hit 作为最终注释结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌株的筛选

从鹅掌柴根际土壤样品中共筛选出 7 株对黄瓜炭疽病菌有拮抗作用的生防细菌, 其中菌株 YN-2A 抑菌距离为  $(0.55 \pm 0.07)$  cm, 抑菌效果好于其他菌株(表 1)。

### 2.2 菌株 YN-2A 的鉴定

#### 2.2.1 菌株的形态学特征和生理生化特征

YN-2A 的菌落呈乳白色, 表面褶皱、干燥、不透明(图 1A), 革兰氏染色后菌体呈紫色, 大小相似的杆状, 为革兰氏阳性菌(图 1B)。在生理生化特性测定中, 如表 2 所示, 菌株 YN-2A 为好氧型细菌, 接触酶试验为阳性; 在葡萄糖氧化发酵试验上, 菌株 YN-2A 为产酸型的细菌, 甲基红试验为阴性, 具有产生生物膜的能力。

表 1 初步筛选的抑菌带宽度

Table 1 Preliminary screening of the width of bacteriostatic zone

菌株编号	黄瓜炭疽病菌抑菌带宽度
Strain No.	Inhibition zone of <i>Colletotrichum orbiculare</i> (cm)
YN-2A	0.55±0.07a
YN-2B	0.28±0.02bc
YN-3	0.11±0.01d
YN-4	0.19±0.03cd
YN-5	0.29±0.04bc
YN-6	0.49±0.10a
YN-8	0.35±0.06b

不同小写字母表示组间差异显著( $P < 0.05$ ). 下同

Different lowercase letters indicate that significant differences ( $P < 0.05$ ). The same below.

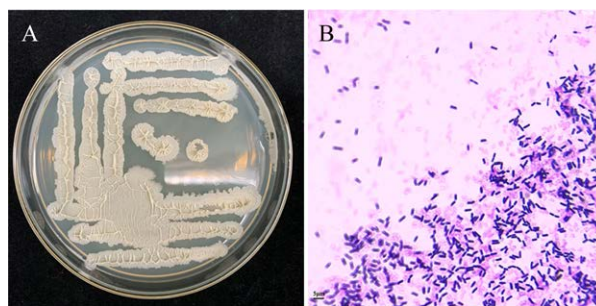


图 1 菌株 YN-2A 菌落形态(A)与革兰氏染色观察(B)

Figure 1 Observation of colony morphology (A) and Gram staining (B) of strain YN-2A.

表 2 生理生化鉴定

Table 2 Physiological and biochemical identification

项目 Item	结果 Result
革兰氏染色	+
Gram staining	
接触酶试验	+
Catalase test	
好氧或厌氧	好氧
Aerobic or anaerobic	Aerobic
葡萄糖氧化发酵	产酸型
Glucose oxidative fermentation (O/F)	Acidogenic type
甲基红	-
Methyl red	
生物膜	+
Biofilm	

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

#### 2.2.2 分子生物学鉴定

以菌株 YN-2A 基因组 DNA 为模板, 通过通用引物扩增得到约 1 400 bp 的 PCR 产物。将菌株 YN-2A 的 16S rRNA 基因序列提交到 NCBI 的 GenBank 数据库和已报道的序列进行同源性比对。与菌株 YN-2A 相似性最高的前 3 条分别为 *Bacillus subtilis* strain Y17B (MT571500.1)、*B. velezensis* strain ROA048 (MT525304.1) 和 *B. velezensis* strain B268 (CP053764.1) (表 3)。

为进一步鉴定菌株 YN-2A 的物种分类信息, 将组装后基因组每条序列通过 ncbi-blast-2.11.0+ 软件的 BLASTn 程序比对到 NT 数据库, 结果表

明得分最高的是 CP046918.1。参考 16S rRNA 基因比对结果, 最终将菌株 YN-2A 确定为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) (表 4)。

表 3 YN-2A 的 16S rRNA 基因序列比对结果

Table 3 Results of 16S rRNA gene sequence alignment of YN-2A

Purification steps	<i>Bacillus subtilis</i> strain Y17B 16S rRNA gene, partial sequence	<i>Bacillus velezensis</i> strain ROA048 16S rRNA gene, partial sequence	<i>Bacillus velezensis</i> strain B268 chromosome, complete genome
Max score	2 519	2 519	2 519
Total score	2 519	2 519	22 635
Query cover (%)	100	100	100
E-value	0	0	0
Percent identity (%)	100	100	100
Accession number	MT571500.1	MT525304.1	CP053764.1

表 4 菌株 YN-2A 基因组与 NT 数据库比对结果

Table 4 Comparison between strain YN-2A genome and NT database

Item	CP046918.1	CP071970.1	CP065137.1
Length	4 035 062	4 160 003	4 096 172
Identity	803 225/805 182 (99.76)	734 402/734 815 (99.94)	667 380/668 367 (99.85)
Score	1 475 850	1 354 650	1 228 750
E-value	0	0	0
Description	<i>Bacillus velezensis</i> strain BA-26 chromosome, complete genome	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain XJ5 chromosome, complete genome	<i>Bacillus</i> sp. A1 (2020) chromosome, complete genome

### 2.3 菌株分泌 IAA 的能力

加入 Salkowski 检测液后, 菌株 YN-2A 检测溶液变为橘红色, 说明生防细菌 YN-2A 具有分泌少量 IAA 的能力(图 2)。

### 2.4 菌株对番茄种子发芽率的影响

分别在 48、72、96、120 和 144 h 测定番茄种子发芽率(图 3)。结果表明在 48 h 以后, 菌株 YN-2A 的稀释液对番茄种子发芽率均有不同程度的提高(图 3B–3E)。其中在 72–120 h, 菌株 YN-2A 处理组与对照组(CK)相比差异显著(图 3B–3D)。随时间增加, 在 144 h, 对照组(CK)和处理组(YN-2A)发芽率趋于平稳, 组间差异不显著(图 3E)。

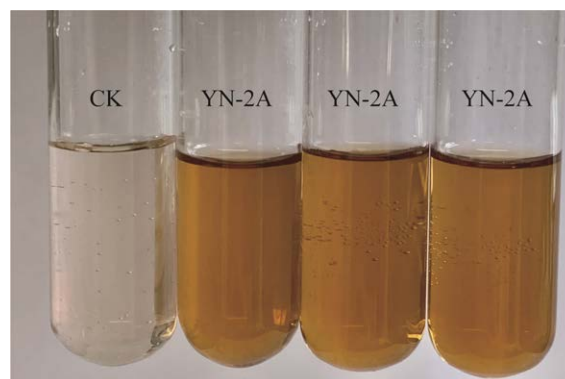


图 2 菌株 YN-2A 的 IAA 分泌能力检测

Figure 2 Detection of IAA secretion ability of strain YN-2A.



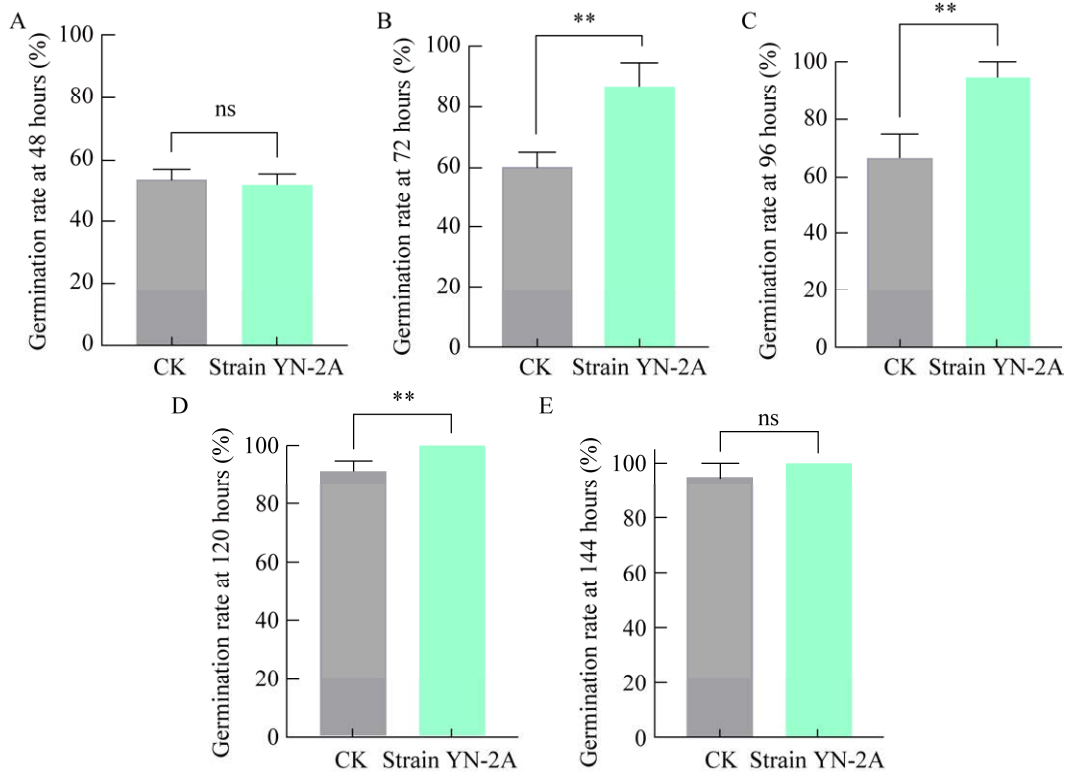


图3 菌株 YN-2A 的稀释液对番茄种子发芽率的影响 A: 在 48 h 测定的番茄种子发芽率. B: 在 72 h 测定的番茄种子发芽率. C: 在 96 h 测定的番茄种子发芽率. D: 在 120 h 测定的番茄种子发芽率. E: 在 144 h 测定的番茄种子发芽率. \*\*:  $P < 0.01$ . ns: 两组对比无显著性差异

Figure 3 Effect of strain YN-2A diluent on the germination percentage of tomato seeds. A: The germination percentage of tomato seeds was measured after 48 hours. B: The germination percentage of tomato seeds was measured after 72 hours. C: The germination percentage of tomato seeds was measured after 96 hours. D: The germination percentage of tomato seeds was measured after 120 hours. E: The germination percentage of tomato seeds was measured after 144 hours. \*\*:  $P < 0.01$ . ns: There was no significant difference between the two groups.

## 2.5 菌株对番茄幼苗形态指标的影响

菌株 YN-2A 稀释液处理番茄幼苗的株高、茎粗、鲜重和干重都优于对照组(CK)。菌株 YN-2A 稀释液处理后植株株高( $29.57 \pm 2.09$ ) cm, 茎粗( $0.46 \pm 0.01$ ) mm, 鲜重( $5.90 \pm 0.20$ ) g, 干重( $1.30 \pm 0.19$ ) g。通过数据分析发现通过灌根的方式施用菌株 YN-2A 稀释液对番茄幼苗具有良好的促生作用(表 5)。

## 2.6 菌株对番茄根系指标的影响

菌株 YN-2A 稀释液处理的番茄植株根系长度、根系表面积、根尖数和根系节点数均显著

表 5 番茄幼苗形态指标

Table 5 Morphological indexes of tomato seedlings

Index	CK	Strain YN-2A
株高	$23.67 \pm 1.62$	$29.57 \pm 2.09^*$
Plant height (cm)		
茎粗	$0.39 \pm 0.01$	$0.46 \pm 0.01^{**}$
Stem diameter (mm)		
鲜重	$3.52 \pm 0.92$	$5.90 \pm 0.20^*$
Fresh weight (g)		
干重	$0.48 \pm 0.11$	$1.30 \pm 0.19^{**}$
Dry weight (g)		

\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .



高于 CK (图 4A–4D)。生防细菌的加入可以提高根系生长量、增强根系吸收土壤中养分的能力, 进一步提高植株抗逆性。根系长度、根系表面积、根系节点数和根尖数是反映根系状态的重要指标。

### 2.7 菌株 YN-2A 对番茄叶片叶绿素荧光参数的影响

NPQ 指数反映植株可通过调节叶片以热耗散量来维持光合活性和稳定性, 数值越高说明植株抗逆性越强。菌株 YN-2A 稀释液处理后番茄叶片的 NPQ 指数为 0.56, 显著高于 CK 组。由此可见, 菌株 YN-2A 稀释液能够提高番茄叶片的光保护力(图 5A)。

根据 qP 结果表明, 菌株 YN-2A 稀释液处理后番茄叶片的 qP 指数是 0.80, 与 CK 组相比差异性显著。以上数据表明, 使用菌株 YN-2A 稀释液处理植株后, 能够帮助番茄叶片光电子传递活性增强(图 5B)。

F<sub>o</sub> 指数是 PSII 反应中心处于完全开放状态的荧光产量, 与叶绿素浓度相关联。植株经暗适应后, 取大小一致的叶片使用 FluorCam 系统检测 F<sub>o</sub> 指数。分析发现菌株 YN-2A 稀释液处理后叶片颜色明显趋近红色部分更多。菌株 YN-2A 稀释液处理的叶片与 CK 相比, F<sub>o</sub> 指数有大幅度提高(图 5C)。

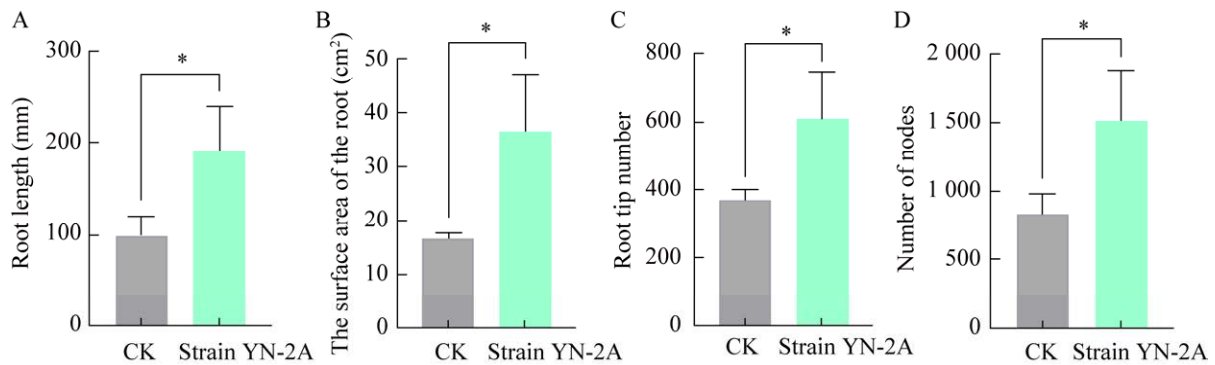


图 4 菌株 YN-2A 的稀释液对根系指标的影响 A: 根长. B: 根系表面积. C: 根尖数. D: 根系节点数  
Figure 4 Effect of strain YN-2A diluent on root index. A: Root length. B: The surface area of the root. C: Root tip number. D: Number of nodes. \*:  $P < 0.05$ .

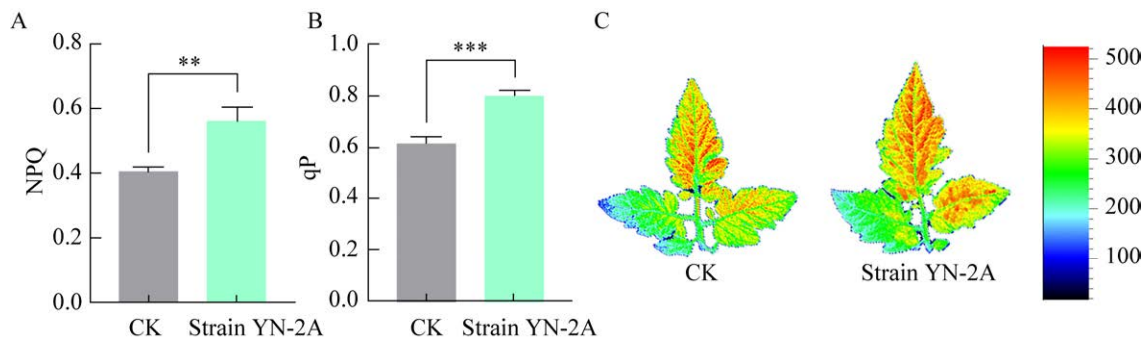


图 5 菌株 YN-2A 的稀释液对叶片上荧光参数的影响 A: NPQ 指数. B: qP 指数. C: F<sub>o</sub> 指数在叶片上的变化

Figure 5 Effect of strain YN-2A diluent on fluorescence parameters on leaves. A: Index of NPQ. B: Index of qP. C: The change of F<sub>o</sub> index on leaves.

## 2.8 菌株的广谱抑菌能力

将菌株 YN-2A 与灰葡萄孢菌(*B. cinerea*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、黄瓜炭疽病菌(*C. orbiculare*)、葵花菌核病菌[*S. sclerotiorum* (Lib.) de Bary]、轮枝镰刀菌(*F. verticillioides*)和木贼镰刀菌(*F. equiseti*)进行平板对峙, 测量抑菌带距离。菌株 YN-2A 的抑菌梯度为灰葡萄孢菌>木贼镰刀菌>轮枝镰刀菌>黄瓜炭疽病菌>黄瓜枯萎病菌、葵花菌核病菌(图 6, 表 6)。针对不同类型病原真菌菌株 YN-2A 的抑菌范围为 0.49–0.77 cm。以上表明, 菌株 YN-2A 对 6 种病原菌有着不同程度的抑菌效果, 因而具备广谱抑菌能力。

## 2.9 菌株全基因组测序结果

全基因组测序结果表明, 菌株 YN-2A 全基因组长度为 4 046 066 bp, G+C 含量为 46%, 其中 A、T、G 和 C 的含量分别是 1 083 174 bp (26.77%)、1 085 754 bp (26.83%)、939 033 bp (23.21%)和

938 105 bp (23.19%)。共涉及 4 090 个编码基因, 长度为 3 613 401 bp。tRNA 与 rRNA 分析结果表明, YN-2A 含有 87 个 tRNA、27 个 rRNA (图 7)。将 YN-2A 全基因组测序数据提交至 NCBI 网站, 获得 GenBank 登录号为 CP139086。

与 CRISPR 相关基因(CRISPR-associated genes, Cas gene)构成 CRISPR-Ca 系统。YN-2A 基因组中预测到 8 个 CRISPR (表 7)。前噬菌体的存在有助于细菌获得抗生素抗性, 使用 PhiSpy v.4.2.19 来预测前噬菌体的存在, 菌株 YN-2A 基因组中预测到 2 个前噬菌体(prophage)。前噬菌体 1 (prophage 1)起始位置位于 12 247 977 bp, 终止位置 1 274 629 bp, 左附着位点序列 GTGACGGAAACGG, 右附着位点序列 GTGACGGAAACG; 前噬菌体 2 (prophage 2)起始位置位于 2 042 422 bp, 终止位置 2 082 463 bp, 左附着位点序列 GGCTTTGCCGTT, 右附着位点序列 AACGGCAAAGCC (图 8)。

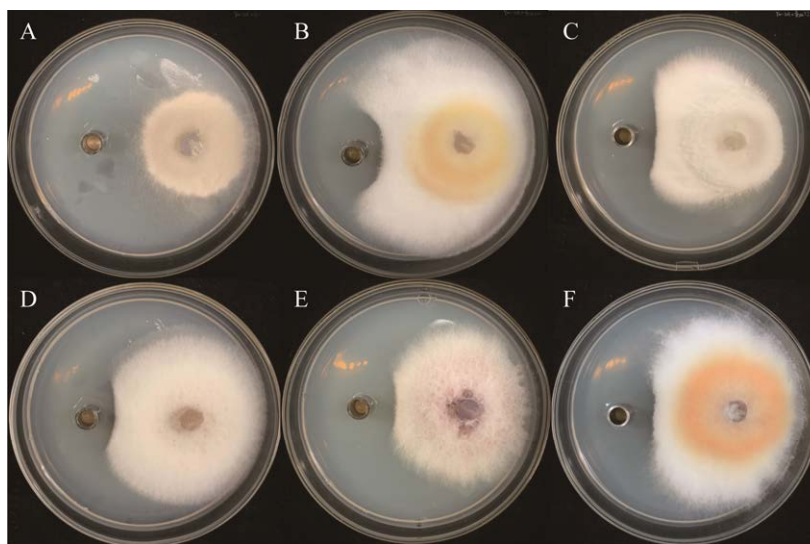


图 6 菌株 YN-2A 的广谱抑菌性 A: 灰葡萄孢菌. B: 黄瓜枯萎病菌. C: 黄瓜炭疽病菌. D: 葵花菌核病菌. E: 轮枝镰刀菌. F: 木贼镰刀菌

Figure 6 Broad-spectrum bacterial inhibition of strain YN-2A. A: *Botrytis cinerea*. B: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. C: *Colletotrichum orbiculare*. D: *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. E: *Fusarium verticillium*. F: *Fusarium equiseti*.

表 6 菌株 YN-2A 广谱抑菌带距离

Table 6 Broad-spectrum bacteriostatic band distance of strain YN-2A

病原菌名称 The name of the pathogen	抑菌带宽度 Inhibition zone (cm)
<i>Botrytis cinerea</i>	0.77±0.06a
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	0.49±0.04c
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	0.59±0.07bc
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) de Bary	0.49±0.03c
<i>Fusarium verticillium</i>	0.70±0.12ab
<i>Fusarium equiseti</i>	0.71±0.09ab

## 2.10 菌株基因组功能注释

为进一步分析 YN-2A 的基因组信息, 将菌株 YN-2A 的序列信息比对到 NR、COG、GO、Swiss-Prot 和 KEGG 数据库, 5 个数据库共注释到基因数量为 2 142 个, 其中 NR 数据库特有基因 4 019 个、COG 数据库 3 146 个、GO 数据库 3 073 个、Swiss-Prot 数据库 3 524 个和 KEGG 数据库 2 233 个(图 9A)。

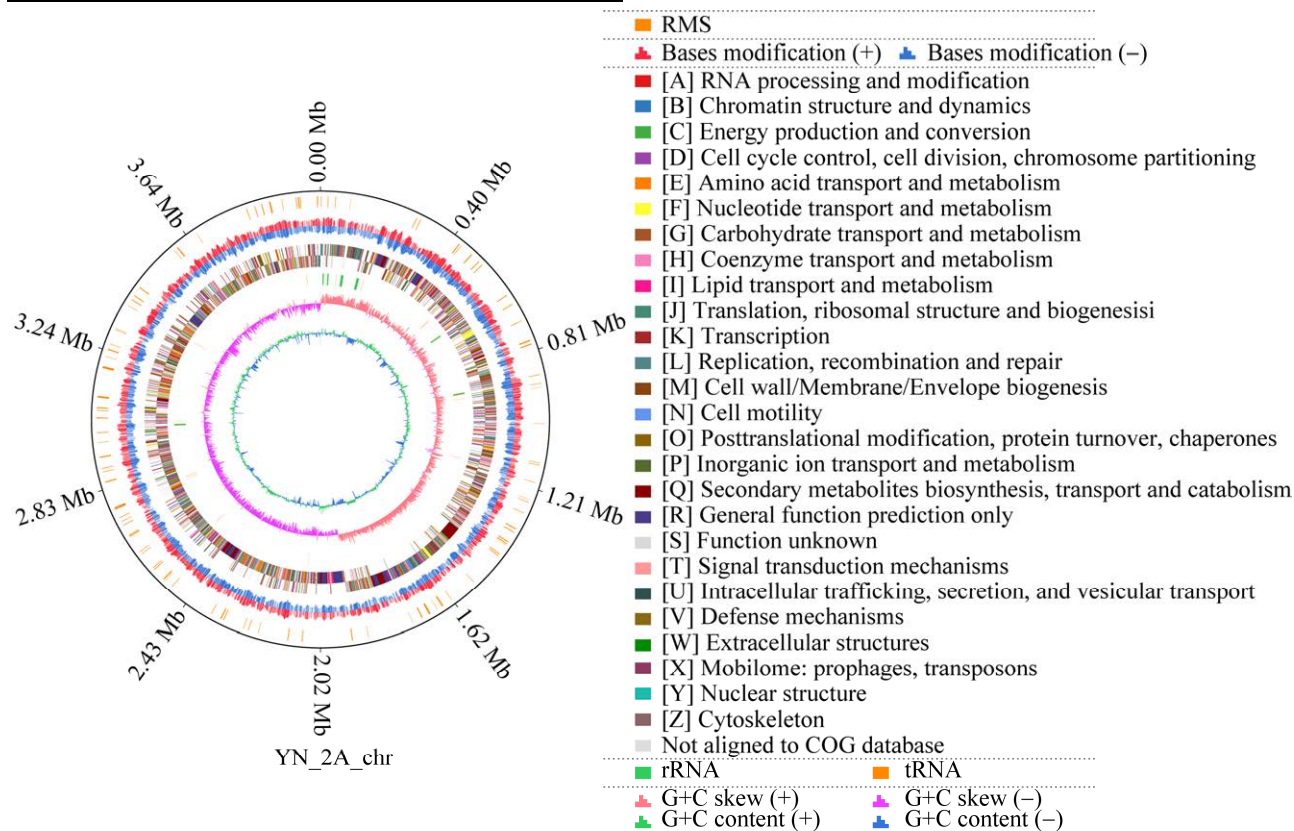


图 7 菌株 YN-2A 基因组圈图

Figure 7 The genome circle of strain YN-2A.

表 7 CRISPR 预测结果

Table 7 CRISPR prediction results

CRISPR ID	Chromosome	Copies	Repeat length (bp)	Spacer length (bp)	Position
CRISPR1	YN_2A_chr	5	35	25	502 045–502 319
CRISPR2	YN_2A_chr	9	42	48	769 843–770 604
CRISPR3	YN_2A_chr	20	27	48	774 644–776 110
CRISPR4	YN_2A_chr	12	38	43	1 262 366–1 263 294
CRISPR5	YN_2A_chr	2	41	67	1 307 591–1 307 739
CRISPR6	YN_2A_chr	5	28	56	2 738 375–2 738 741
CRISPR7	YN_2A_chr	3	24	54	2 907 178–2 907 357
CRISPR8	YN_2A_chr	4	24	51	3 578 347–3 578 595

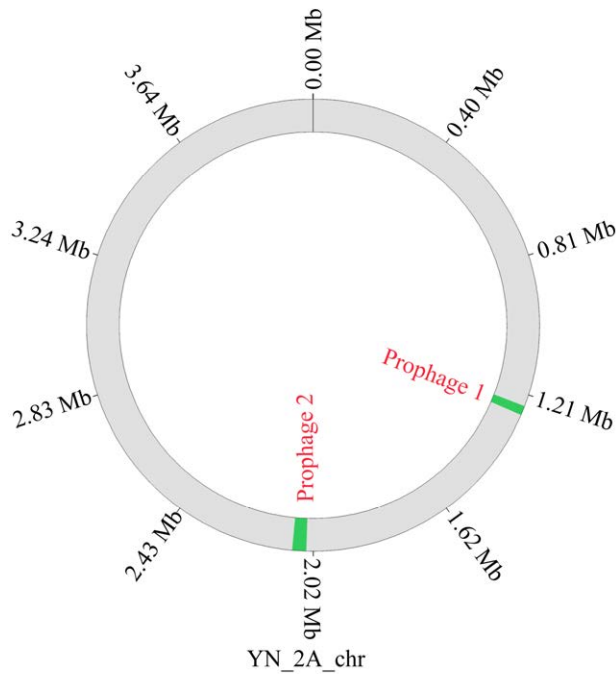
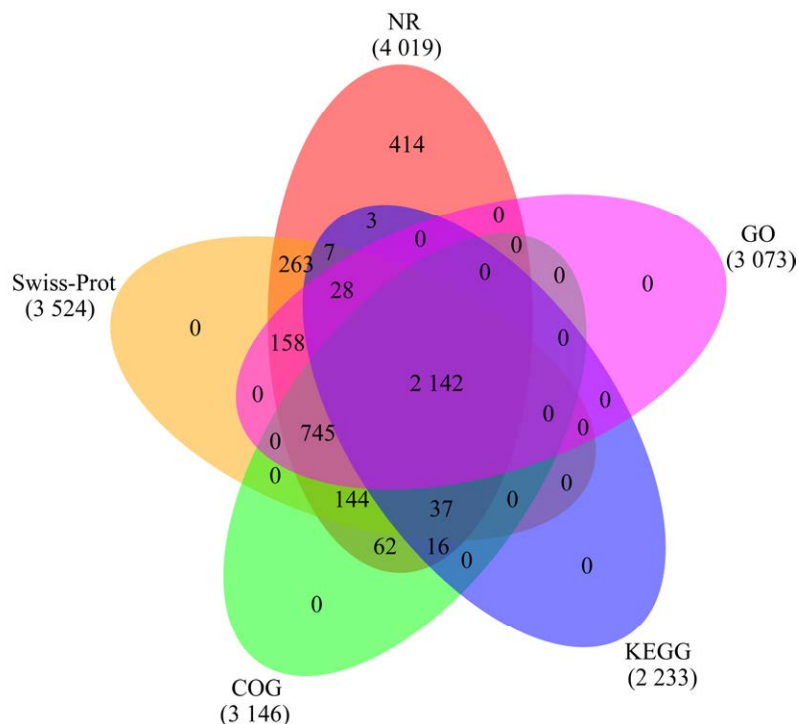


图 8 前噬菌体分布位置  
Figure 8 Distribution location of prophage.

COG 数据库分析发现，主要包含氨基酸转运及代谢(amino acid transport and metabolism)、翻译(transcription)、主要功能预测(general

A

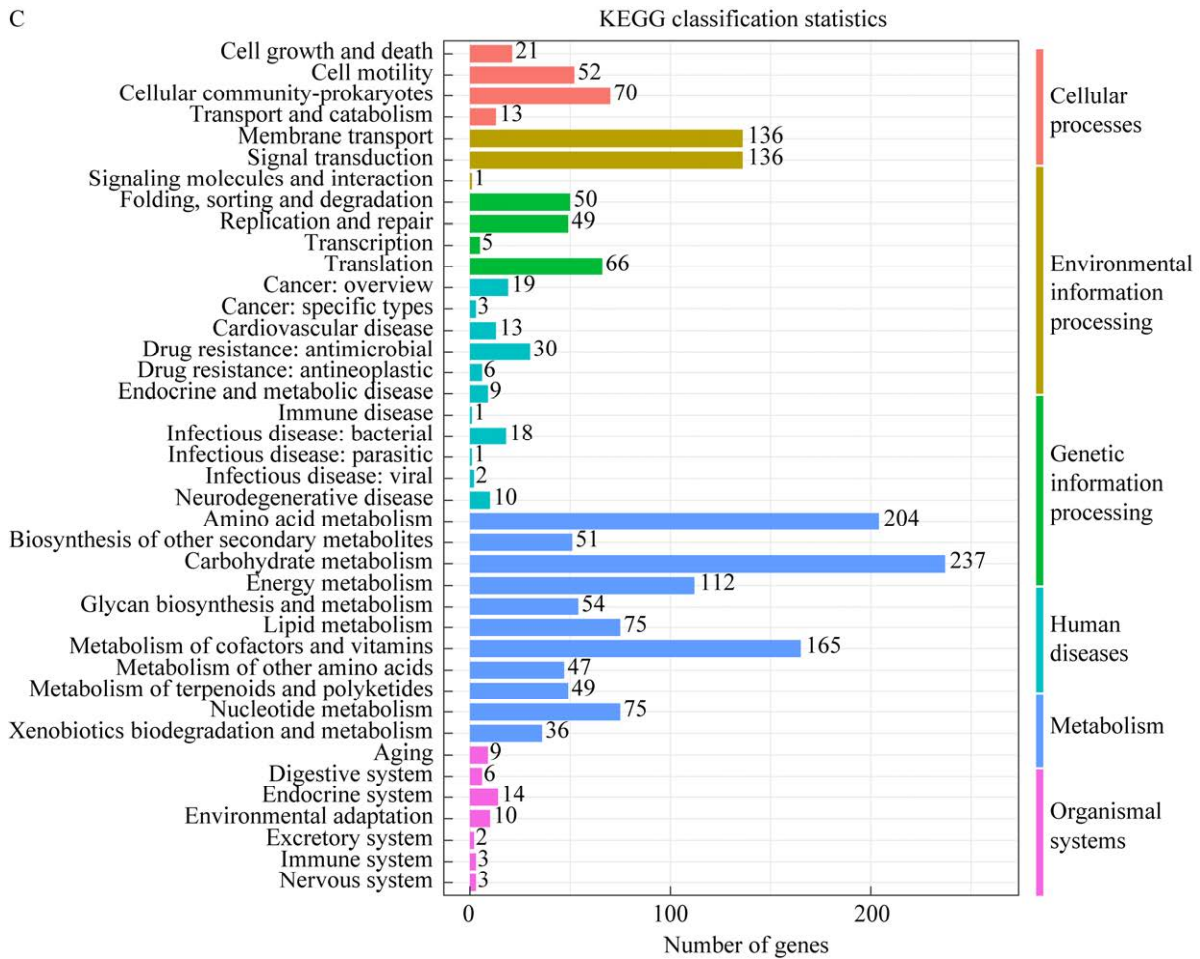
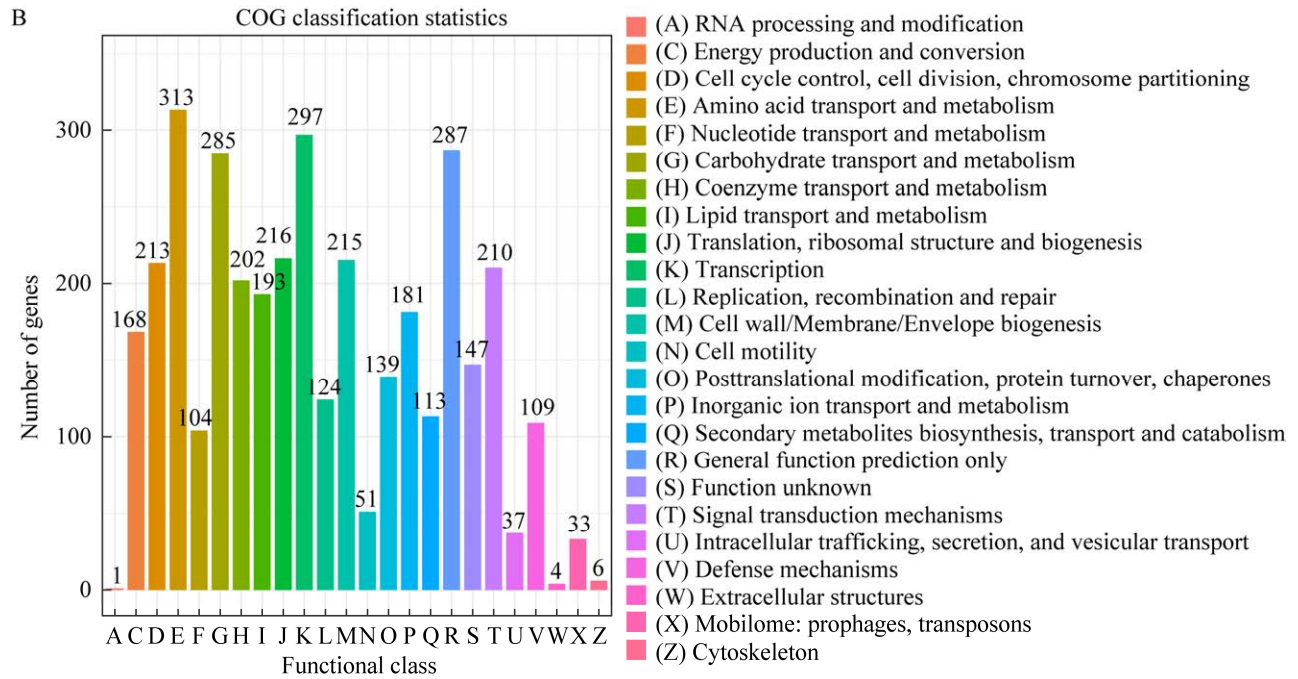


function prediction only)和碳水化合物转运代谢(carbohydrate transport and metabolism)这 4 个分类，其中氨基酸转运及代谢包含 313 个基因、翻译包含基因数量为 297 个，主要功能预测和碳水化合物转运代谢基因数量分别为 287 个和 285 个(图 9B)。

KEGG 分析的结果表明，在一级分类中，代谢(metabolism)中的数量最多，共注释到 1 105 个基因，其中碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)涉及到 237 个基因，是所有二级分类中最多的。其次氨基酸代谢(amino acid metabolism)也涉及较多的基因，有 204 个。同时 165 个基因被注释到辅因子和维生素的代谢(metabolism of cofactors and vitamins)中，初步推断这 3 类代谢途径在菌株 YN-2A 发挥抗菌功能中发挥重要作用(图 9C)。

GO 数据库侧重于描述编码基因参与的生物过程、分子功能及编码基因所在的细胞环境，GO 数据库包含三大分类：生物过程、分子功能和细胞组分。在一级分类结果中可知注释到生物





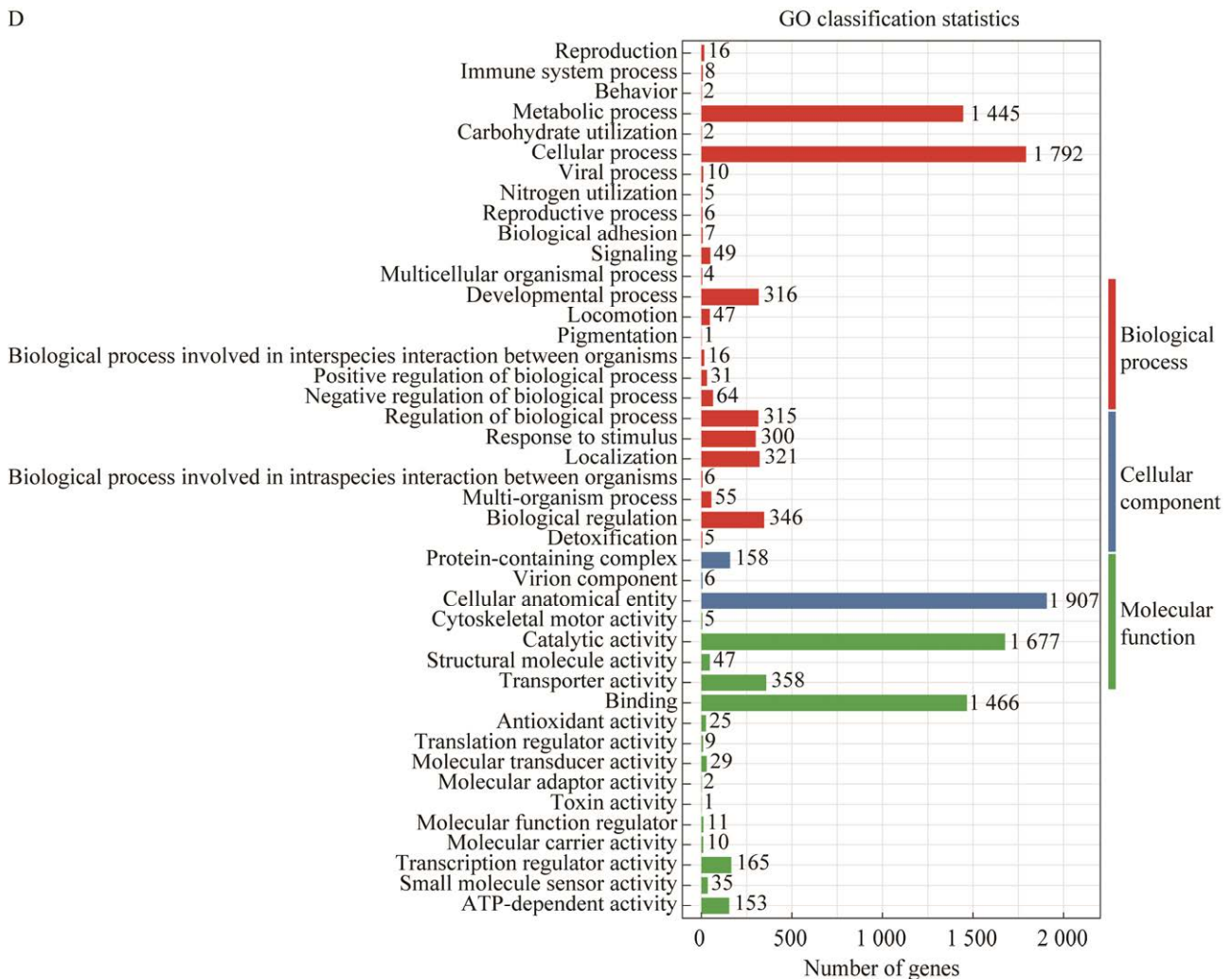


图 9 细菌基因组基本功能数据库注释结果图 A: 基础数据库共有和特有注释分析统计图. B: COG 数据库注释结果. C: KEGG 数据库注释结果. D: GO 数据库注释结果

Figure 9 Annotation result map of the basic function database of the bacterial genome. A: Statistical charts of common and unique annotation analysis in the basic database. B: COG database comment results. C: KEGG database comment results. D: GO database comment results.

过程的基因数量最多, 其次是分子功能。在生物过程中, 代谢过程(metabolic process)、细胞过程(cellular process)注释到的基因数量明显多于其他分类。细胞组分中的细胞解剖完整性(cellular anatomical entity)中注释 1 907 个基因, 是所有二级分类中基因数量最多的。分子功能中, 有 1 677 个和 1 466 个基因分别注释到催化活性(catalytic activity)及结合(binding)。GO 数据库的分析结果对后续基因组功能挖掘有着重要

的意义(图 9D)。

## 2.11 碳水化合物相关酶数据库(CAZy)和病原与宿主互作数据库(PHI)注释

在 CAZy 数据库中共注释到 89 个基因, 糖苷水解酶(glycoside hydrolases)注释到的基因数量最多, 为 40 个, 显著高于其他分类。其次是糖基转移酶(glycosyl transferases)和糖类酯解酶(carbohydrate esterases), 分别涉及 18 个和 17 个基因(图 10)。进一步分析表明菌株 YN-2A 基因

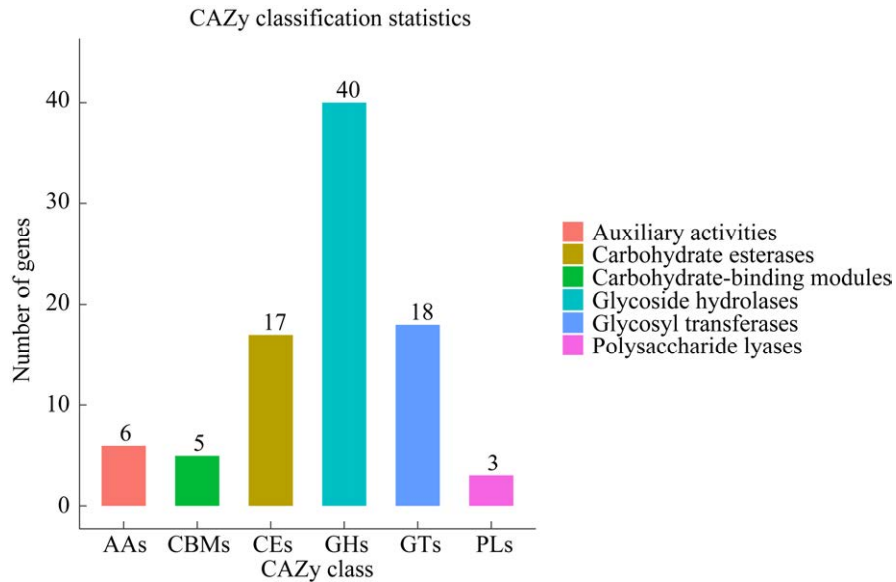


图 10 CAZy 注释分类统计图

Figure 10 CAZy annotated classification statistical chart.

组信息涉及细胞壁降解酶类(GH4、GH1 和 GH53)。初步推测菌株 YN-2A 通过破坏病原细胞壁的完整性,从而抑制病原菌的繁殖。

PHI 数据库是目前医疗、农业真菌和卵菌候选靶向位点的重要在线资源。通过 PHI 数据注

释结果分析,有 905 个基因被注释到毒力降低(reduced virulence),是所有分类中基因数量最多的(图 11)。同时在对病原菌致病性没有影响的(unaffected pathogenicity)分类中注释到 430 个基因,使病原菌失去致病力(loss of pathogenicity)

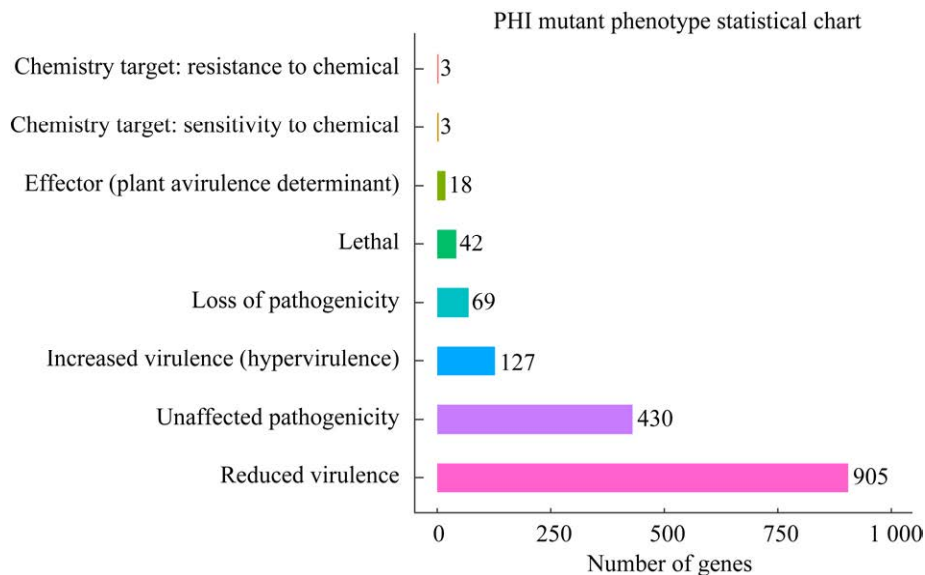


图 11 PHI 突变表型统计图

Figure 11 Phenotypic statistics of PHI mutation.



的分类注释到 69 个基因(图 11)。菌株 YN-2A 还具有致病效应基因 18 个。存在大量的毒力降低(reduced virulence)基因可能是菌株 YN-2A 能够抑制病原菌生长的主因素。

### 3 讨论

生物防治技术已逐渐成为化学防治技术的替代者。目前用作生物防治的微生物主要包括:生防真菌、细菌和放线菌等,其中以生防细菌和生防真菌居多。越来越多的生防菌被分离、鉴定。詹发强等<sup>[22]</sup>分离出的解淀粉芽孢杆菌 S-13,灌根于番茄根部,菌株在土壤中形成一个稳定的拮抗细菌群落,使植株对番茄枯萎病病原菌产生拮抗作用。赵士振<sup>[23]</sup>通过制备 S-56 孢子悬浮液喷施番茄植株,防治效果达 87.9%。本研究中番茄种子经过 500 倍( $5 \times 10^8$  CFU/mL)生防菌稀释液处理后,在 72、96 和 120 h 测定的发芽率,与 CK 组相比分别提高 1.45、1.42 和 1.09 倍,而且菌株 YN-2A 稀释液处理番茄种子后,发芽率要优于 FC21 稀释 1 000 倍液处理后种子发芽率<sup>[24]</sup>。光合作用是植物光合器官在光的驱动下将水和二氧化碳合成碳水化合物的过程<sup>[25]</sup>。菌株 YN-2A 稀释液通过提高番茄叶片光能转化率提高了植株光合作用能力,也提高了 NPQ、qP 和 Fo 指数,这对维持光合活性稳定性和增强植株抗逆性具有重要意义。

微生物基因组学测序技术的存在对研究人员探究微生物的抗病基因提供了可靠的信息来源。为进一步解析 YN-2A 的抑菌特性,本研究采用三代(PacBio+Nanopore)结合二代测序技术来测定菌株 YN-2A 的基因组信息。通过生物信息学分析了解到,菌株 YN-2A 全基因组长度为 4 046 066 bp, G+C 含量为 46%,共涉及 4 090 个编码基因,有 87 个 tRNA 和 27 个 rRNA。在 COG 和 KEGG 数据库中大量基因被注释到氨基酸和碳水化合

物分类,这与李小杰等<sup>[26]</sup>对菌株 Ba-0321 的研究结果一致。已有大量的菌株通过基因组学与生物信息学相结合的方式阐述基因功能和信息。二代 Illumina NovaSeq 与三代 PacBio Sequel 相结合对菌株 JJYY 进行全基因组测序表明 JJYY 序列长度为 3 929 792 bp,有 3 895 个编码基因<sup>[27]</sup>。

CAZy 数据库注释是碳水化合物相关酶的专业数据库,包括能催化碳水化合物、降解、修饰及生物合成的相关酶系家族<sup>[28]</sup>。在 CAZy 数据库中发现菌株 YN-2A 大部分基因注释到糖苷水解酶(glycoside hydrolases)中。已有研究表明,糖苷水解酶活性能够降低黏附生物膜的生物量,产生低分子量的 Pel 胞外多糖分泌形式,能够降低铜绿假单胞菌在秀丽隐杆线虫和果蝇中的毒力<sup>[29]</sup>。

PHI 数据的存储经过专业整理这些信息已证明会影响病原体与宿主相互作用的表型结果。在本研究中,有 905 个基因被注释到毒力降低分类中,而毒力降低也被认为是减弱病原菌致病力的重要突变表型。因此,初步推测菌株 YN-2A 能够在平板对峙中限制多种病原菌的生长与存在大量毒力降低相关基因密不可分。与此同时,注释到 69 个对病原菌失去致病力(loss of pathogenicity)的基因,从 PHI 分析结果推测菌株 YN-2A 发挥生防作用是因其含有大量抗病基因,这为后续抗病基因的挖掘提供了重要基础。

近年来,大量使用化学制剂控制真菌病害,导致土壤团聚体结构下降,微生物群落遭到破坏。此外,果实上的残留物难以清理,严重影响消费者的健康<sup>[30]</sup>。随着可持续发展农业的不断推进,我国已对农药残留问题进行严格把控。在植物保护过程中,许多地区都发现植物耐药性的发生,导致病害防治效果减弱,因此开展生物防治技术尤为紧迫。

## 4 结论

本研究从鹅掌柴根际土壤中分离并鉴定出一株贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*), 将其命名为 YN-2A, 该菌株对番茄的种子和幼苗具有良好的促生效果, 同时该菌株具备广谱抑菌性。从基因组学分析中发现该菌株含有大量毒力降低的相关基因, 为后续深入挖掘菌株 YN-2A 的抑菌机制提供了可靠信息。

## REFERENCES

- [1] ELSLAHI RH, OSMAN AG, SHERIF AM, ELHUSSEIN AA. Comparative study of the fungicide Benomyl toxicity on some plant growth promoting bacteria and some fungi in pure cultures[J]. *Interdisciplinary Toxicology*, 2014, 7(1): 12-16.
- [2] MAJUMDAR K, RAZDAN M, AGGARWAL N, MURALI K, BHATTACHARYA R, DUREJA P. Isolation and characterization of a potential biocontrol agent *Bacillus* KM5 from rhizosphere soil of a rice plant[J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2011, 44(12): 1196-1212.
- [3] CHEN F, WANG M, ZHENG Y, LUO J M, YANG X R, WANG X L. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Bacillus subtilis* B579[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(4): 675-684.
- [4] 程敏, 徐秋芳. 解淀粉芽孢杆菌植物亚种 CGMCC 11640 对山核桃干腐病菌的抑制机制[J]. *浙江农林大学学报*, 2017, 34(2): 326-331.  
CHENG M, XU QF. Inhibitory mechanism of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* CGMCC 11640 against *Botryosphaeria dothidea*, the pathogen of canker disease of *Carya cathayensis*[J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2017, 34(2): 326-331 (in Chinese).
- [5] 刘磊, 梁昌聪, 曾迪, 杨腊英, 郭立佳, 丁兆建, 黄俊生. 芽孢杆菌次生代谢产物及其在土传病害防控中的应用研究进展[J]. *热带作物学报*, 2017, 38(4): 775-782.  
LIU L, LIANG CC, ZENG D, YANG LY, GUO LJ, DING ZJ, HUANG JS. Research progress on secondary metabolites of *Bacillus* spp. and their applications in biocontrol of soil-borne diseases[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2017, 38(4): 775-782 (in Chinese).
- [6] 夏明聪, 邓晓旭, 齐红志, 谢夏, 徐文, 张洁, 孙润红, 潘娅梅, 武超, 杨丽荣. 贝莱斯芽孢杆菌 YB-145 对小麦纹枯病的防治效果及促生作用[J]. *河南农业科学*, 2021, 50(10): 76-83.  
XIA MC, DENG XX, QI HZ, XIE X, XU W, ZHANG J, SUN RH, PAN YM, WU C, YANG LR. Biological control of sharp eyespot and growth promotion in wheat by *Bacillus velezensis* YB-145[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2021, 50(10): 76-83 (in Chinese).
- [7] PAN D, MIONETTO A, TISCORNIA S, BETTUCCI L. Endophytic bacteria from wheat grain as biocontrol agents of *Fusarium graminearum* and deoxynivalenol production in wheat[J]. *Mycotoxin Research*, 2015, 31(3): 137-143.
- [8] PALAZZINI J, REYNOSO A, YERKOVICH N, ZACHETTI V, RAMÍREZ M, CHULZE S. Combination of *Bacillus velezensis* RC218 and chitosan to control *Fusarium* head blight on bread and durum wheat under greenhouse and field conditions[J]. *Toxins*, 2022, 14(7): 499.
- [9] 张秀玥, 许磊, 杜鹃, 张启东, 郑世乾. 枯草芽孢杆菌 gb-1 菌剂在辣椒化肥减施栽培上的应用研究[J]. *耕作与栽培*, 2021, 41(5): 58-60, 65.  
ZHANG XY, XU L, DU J, ZHANG QD, ZHENG SQ. Application of *Bacillus subtilis* gb-1 in pepper cultivation with reduced fertilizer application[J]. *Tillage and Cultivation*, 2021, 41(5): 58-60, 65 (in Chinese).
- [10] 张伟, 王加顺, 郭文涛, 梁福平, 周晓伦. 豌豆根际土壤中细菌的鉴定及其对黄豆幼苗促生作用研究[J]. *农业与技术*, 2021, 41(5): 16-19.  
ZHANG W, WANG JS, GUO WT, LIANG FP, ZHOU XL. Identification of bacteria in pea rhizosphere soil and its effect on soybean seedling growth[J]. *Agriculture & Technology*, 2021, 41(5): 16-19 (in Chinese).
- [11] NIU B, WANG WX, YUAN ZB, SEDEROFF RR, SEDEROFF H, CHIANG VL, BORRIS R. Microbial interactions within multiple-strain biological control agents impact soil-borne plant disease[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 585404.
- [12] ALETI G, LEHNER S, BACHER M, COMPANT S, NIKOLIC B, PLESKO M, SCHUHMACHER R, SESSITSCH A, BRADER G. Surfactin variants mediate species-specific biofilm formation and root colonization in *Bacillus*[J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(8): 2634-2645.
- [13] CHEN XL, HUANG HF, ZHANG SM, ZHANG Y, JIANG JB, QIU YW, LIU JY, WANG AX. *Bacillus velezensis* WZ-37, a new broad-spectrum biocontrol strain, promotes the growth of tomato seedlings[J]. *Agriculture*, 2021, 11(7): 581.
- [14] NIU X, ZHANG Y, WANG M, LIU W, LU F, LI Y.

- Effects of different integration sites on the expression of exogenous alkaline protease in *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2022, 38(4): 253-260.
- [15] AFSHARMANESH H, AHMADZADEH M, JAVAN-NIKKHAH M, BEHBOUDI K. Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilis* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation[J]. *Crop Protection*, 2014, 60: 83-92.
- [16] 王笠, 沈建华. 混合涂片革兰氏染色法鉴别细菌[J]. *科技创新导报*, 2018, 15(24): 79-79, 81.  
WANG L, SHEN JH. Identification of bacteria by mixed smear Gram staining method[J]. *Science and Technology Innovation Herald*, 2018, 15(24): 79-79, 81 (in Chinese).
- [17] 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, 349-398.  
DONG XZ, CAI MY. *Manual for Systematic Identification of Common Bacteria*[M]. Beijing: Science Press, 2001, 349-398 (in Chinese).
- [18] WALKER BJ, ABEEL T, SHEA T, PRIEST M, ABOUELLIEL A, SAKTHIKUMAR S, CUOMO CA, ZENG QD, WORTMAN J, YOUNG SK, EARL AM. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112963.
- [19] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, MA N, PAPADOPOULOS J, BEALER K, MADDEN TL. BLAST+: architecture and applications[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(1): 1-9.
- [20] 聂倩文. 番茄灰霉病生防细菌的筛选及其作用机制的研究[D]. 荆州: 长江大学硕士学位论文, 2020.  
NIE QW. Screening and studying the mechanism of endophyte against tomato gray mold from *Fraxinus hupehensis* root[D]. Jingzhou: Master's thesis of Yangtze University, 2020 (in Chinese).
- [21] JANGIR M, PATHAK R, SHARMA S, SHARMA S. Biocontrol mechanisms of *Bacillus* sp., isolated from tomato rhizosphere, against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*[J]. *Biological Control*, 2018, 123: 60-70.
- [22] 詹发强, 侯敏, 杨蓉, 龙宣杞. 一株番茄枯萎病生防菌的鉴定、定殖与盆栽防效研究[J]. *新疆农业科学*, 2013, 50(7): 1277-1287.  
ZHAN FQ, HOU M, YANG R, LONG XQ. Identification, colonization and control effect of an antagonistic bacterium against *Fusarium wilt* tomato[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2013, 50(7): 1277-1287 (in Chinese).
- [23] 赵士振. 粉红粘帚霉防治果蔬灰霉病的研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2015.  
ZHAO SZ. Bio-control efficacy of *Clonostachys rosea* against gray mould of fruits and vegetables[D]. Wuhan: Master's thesis of Huazhong Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [24] CHEN X, WANG X, MA J, TIAN Y, LI Z. Control effect of biocontrol strain FC21 on *Botrytis cinerea* and its growth-promoting effect[J]. *Northern Horticulture*, 2022, 507(12): 29-33.
- [25] TAGAWA K, TSUJIMOTO HY, ARNON DI. Role of chloroplast ferredoxin in the energy conversion process of photosynthesis[J]. *PNAS*, 1963, 49(4): 567-572.
- [26] 李小杰, 邱睿, 刘畅, 姚晨斌, 白静科, 陈玉国, 李淑君. 基于全基因组测序的贝莱斯芽胞杆菌 Ba-0321 抑菌机制分析及相关功能验证[J]. *中国生物防治学报*, 2023, 39(4): 885-894.  
LI XJ, QIU R, LIU C, YAO CX, BAI JK, CHEN YG, LI SJ. Antifungal mechanism analysis and verification of *Bacillus velezensis* Ba-0321 based on whole genome sequencing[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2023, 39(4): 885-894 (in Chinese).
- [27] 王麒, 许婧霞, 张亚妮, 孙婧, 张升潮, 王腊, 冯作山, 易菊平, 杨亚珍, 胡洪涛. 贝莱斯芽胞杆菌 (*B. velezensis*) JJYY 防控土传病害效果评价及其全基因组测序分析和抗菌成分鉴定[J]. *微生物学通报*, 2024, 51(1): 155-171.  
WANG Q, XU JX, ZHANG YN, SUN J, ZHANG SC, WANG L, FENG ZS, YI JP, YANG YZ, HU HT. *Bacillus velezensis* JJYY against soil-borne diseases: biocontrol effect, whole genome sequencing, and antimicrobial components[J]. *Microbiology China*, 2024, 51(1): 155-171 (in Chinese).
- [28] CANTAREL BL, COUTINHO PM, RANCUREL C, BERNARD T, LOMBARD V, HENRISSAT B. The carbohydrate-active enzymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(suppl\_1): D233-D238.
- [29] WANG KL, ZHENG XF, SU YY, LU YC, YANG QY, SHI Y, LANHUANG BE, ZHANG XY, ZHAO LN, GODANA EA, DHANASEKARAN S, LEGRAND NGOLONG NGEA G, ZHANG HY. A glycoside hydrolase superfamily gene plays a major role in *Penicillium expansum* growth and pathogenicity in apples[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2023, 198: 112228.
- [30] BAIOME BA, YE XF, YUAN ZY, GAAFAR YZA, MELAK S, CAO H. Identification of volatile organic compounds produced by *Xenorhabdus indica* strain AB and investigation of their antifungal activities[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2022, 88(13): e0015522.