



一株具有防病促生功能的贝莱斯芽孢杆菌 SF327

方园^{1#}, 彭勇政^{1#}, 廖长贵², 陈路生¹, 周琦¹, 黄俭³, 阎依超¹, 王慕媛¹, 张祎坤¹, 邹丽芳^{1*}, 陈功友¹

- 1 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240
- 2 上海廊优农业科技有限公司, 上海 201516
- 3 上海市金山区蔬菜技术推广中心, 上海 201500

方园, 彭勇政, 廖长贵, 陈路生, 周琦, 黄俭, 阎依超, 王慕媛, 张祎坤, 邹丽芳, 陈功友. 一株具有防病促生功能的贝莱斯芽孢杆菌 SF327. 微生物学报, 2022, 62(10): 4071–4088.

Fang Yuan, Peng Yongzheng, Liao Changgui, Chen Lusheng, Zhou Qi, Huang Jian, Yan Yichao, Wang Muyuan, Zhang Yikun, Zou Lifang, Chen Gongyuo. *Bacillus velezensis* SF327, a potential biocontrol agent with the functions of preventing plant diseases and promoting plant growth. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(10): 4071–4088.

摘要: 【目的】筛选植物根际促生贝莱斯芽孢杆菌, 分析菌株的生防潜力和全基因组特征。

【方法】通过温室小青菜促生试验以及植物益生表型的分析, 明确具有促生功能的菌株 SF327。用滤纸片法测定菌株 SF327 对 5 种植物病原真菌以及 4 种植物病原细菌的拮抗活性。通过大田喷雾接种的方式评价菌株 SF327 对水稻白叶枯病的防治潜力。利用 antiSMASH 分析预测菌株 SF327 产生的二次代谢产物。通过比较基因组分析 SF327 与 2 株植物根际益生贝莱斯芽孢杆菌的代表性菌株 FZB42 和 SQR9 的亲缘关系、核心基因以及二次代谢产物合成基因簇。【结果】菌株 SF327 能够产生生长素吲哚-3-乙酸, 是一株有益的根围促生菌; 对稻瘟病菌、黄瓜枯萎病菌、辣椒疫霉菌、橡胶树胶孢炭疽菌、尖孢炭疽病菌都具有明显的拮抗作用; 也具有防治水稻白叶枯病的生防潜力。菌株 SF327 基因组全长 4.08 Mb, GC 含量为 46.49%, 共编码 4 033 个基因, 含有 13 个潜在的次生代谢产物编码基因簇, 不含有质粒。SF327 与 FZB42 和 SQR9 具有较近的亲缘关系, 有 87% 以上的核心基因相同, 但与 SQR9 的亲缘关系较近。【结论】*B. velezensis* SF327 是一株具有

基金项目: 上海市科技兴农项目(沪农科创字(2019)第 2-2 号)

Supported by the Shanghai Agriculture Applied Technology Development Program, China (G20190202)

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: zoulifang202018@sjtu.edu.cn

Received: 1 March 2022; Revised: 8 April 2022; Published online: 15 June 2022

宽广拮抗谱的多功能菌株，具有较好的生防应用潜力。

关键词：贝莱斯芽孢杆菌；植物根围促生菌；生物防治；全基因组分析

***Bacillus velezensis* SF327, a potential biocontrol agent with the functions of preventing plant diseases and promoting plant growth**

FANG Yuan^{1#}, PENG Yongzheng^{1#}, LIAO Changgui², CHEN Lusheng¹, ZHOU Qi¹, HUANG Jian³, YAN Yichao¹, WANG Muyuan¹, ZHANG Yikun¹, ZOU Lifang^{1*}, CHEN Gongyou¹

1 School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 Shanghai Langyou Agricultural Science & Technology Co., Ltd., Shanghai 201516, China

3 Jinshan District Vegetable Technology Promotion Center in Shanghai, Shanghai 201500, China

Abstract: [Objective] To screen plant rhizosphere growth-promoting *Bacillus velezensis* and analyze the biocontrol potential and genome characteristics of the target strain. [Methods] We screened out the growth-promoting strain SF327 through the experiment on pak choi (*Brassica campestris* sp. *chinensis* L.) and analysis of plant traits. The activity of strain SF327 against five plant pathogenic fungi and four phytopathogenic bacteria was tested with the filter paper method. Through spray inoculation in paddy fields, the activity of strain SF327 against rice bacterial blight was evaluated. We predicted the secondary metabolites of SF327 using antiSMASH. Moreover, we explored the genetic relationship between SF327 and the plant growth-promoting *B. velezensis* FZB42 and SQR9, and compared the core genes and secondary metabolite synthesis gene clusters. [Results] The plant growth-promoting SF327 produced auxin indole-3-acetic acid (IAA) and antagonized *Magnaporthe oryza*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *C. acutatum*. It had the potential for biocontrol of rice bacterial blight. The genome of SF327 was 4.08 Mb which was composed of a circular chromosome of 4 081 758 base pairs without plasmid and with G+C content of 46.49%, 4 033 protein-coding sequences, and 13 gene clusters for secondary metabolites. SF327 strain showed close genetic relationship with strain FZB42 and SQR9, particularly SQR9, and they shared 87% core genes. [Conclusion] *B. velezensis* SF327 is versatile with a broad antagonistic spectrum, which can be a promising biocontrol agent.

Keywords: *Bacillus velezensis*; plant growth-promoting rhizobacteria; biological control; whole-genome analysis

在农业生产上应用最多的生防细菌主要为芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)、假单胞杆菌 (*Pseudomonas* spp.)以及链霉菌(*Streptomyces* spp.)

等^[1-2]。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)作为一种新型的生防芽孢杆菌，最早于2005年由Ruiz-García等分离于西班牙南部马拉加(Malaga)

的维河(the Vélez river)含盐水样^[3]。在 2015 和 2016 年, Dunlap 等经过比较基因组的分析, 证明解淀粉芽孢杆菌植物亚种(*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*) 和甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*)为贝莱斯芽孢杆菌的同种异名菌^[4-5]。因此, 现在的贝莱斯芽孢杆菌分类单元为原贝莱斯芽孢杆菌群、解淀粉芽孢杆菌植物亚种群和甲基营养型芽孢杆菌群的整合分类群。

在同类的贝莱斯芽孢杆菌中, FZB42 作为革兰氏阳性根围促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)的模式菌株, 在防病、促生、诱导植物抗性机理等方面研究最为深入。关于该菌株防病促生的田间试验已应用于马铃薯^[6]、棉花^[7]、草莓^[8]、小麦^[9]、生菜^[10]和番茄^[11]等多种经济作物。据预测, FZB42 全基因组约 10% 的序列编码了至少 13 种有活性的次生代谢产物^[12], 在真菌、细菌、病毒和线虫病害的防治中起不同的作用。这些次生代谢产物主要包括 4 种环脂肽(surfactin、bacillomycin D、fengycin 和噬铁素 bacillibactin)、3 种聚酮类化合物(macrolactin、bacillaene 和 difficidin)、1 种二肽化合物 bacilysin、2 种细菌素(plantazolicin 和 amylocyclicin)以及挥发性物质(acetoin 和 2,3-butandiol)等^[12-15]。

环脂肽类对于贝莱斯芽孢杆菌抑制真菌类病原菌起主要作用, 例如 FZB42 产生的 surfactin、bacillomycin D 和 fengycin 能够防治由立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)引起的生菜根腐病^[16], 其中 bacillomycin D 也能有效抑制尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)和禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)^[17-19]。贝莱斯芽孢杆菌对植物病原细菌的抑制作用主要由酮类化合物和二肽 bacilysin 起作用。FZB42 产生的 difficidin 和 bacilysin 能够显著抑制水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas*

oryzae pv. *oryzae*, *Xoo*)和条斑病菌(*X. oryzae* pv. *oryzicola*, *Xoc*)^[20]。也有研究显示, bacillomycin D 和 fengycin 对于 FZB42 防治由雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的番茄青枯病起主要作用^[19]。FZB42 也能够抑杀植物病原线虫例如根结线虫和松材线虫等, 其产生细菌素 plantazolicin 对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)有抑杀作用, 但对松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)无抑制作用^[21-24]。近几年, 随着不同拮抗目标菌的采用, 新的贝莱斯芽孢杆菌株例如 J17-4^[25]、NKMV-3^[26]以及 HNA3^[27]等不断被分离和鉴定, 新的生防潜力不断被挖掘, 防病、促生的机理也不断被解析。

本研究前期工作获得了 7 株对 *Xoc* 具有较好拮抗活性的贝莱斯芽孢杆菌。为了明确这些菌株是否具有促生作用, 本研究通过温室促生试验和菌株 PGPR 的特征表型分析, 筛选到一株对小青菜具有显著促生作用的菌株 *B. velezensis* SF327。通过对该菌株拮抗谱分析、对水稻白叶枯病的生防潜力分析以及基因组、比较基因组的分析, 证明 SF327 对水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryza*)、橡胶树胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和尖孢炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)都具有较好的抑制作用, 含有 13 个次生代谢产物编码基因簇。这些研究表明 SF327 是一株具有防病促生功能的生防菌, 具有较好的生防应用潜力。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株和培养条件

本研究所用的菌株见表 1。芽孢杆菌和植物病原黄单胞菌置于 NA (牛肉浸膏 3 g/L, 多聚蛋白胨 5 g/L, 蔗糖 10 g/L, 酵母粉 1 g/L, 琼脂粉 15 g/L, pH 7.0-7.2)或 NB (NA 不含有琼脂粉)培养基中, 丁香假单胞菌、水稻穗枯病菌置

表 1 本研究所用的菌株
Table 1 Strains used in this study

Strains	Relevant characteristics	Sources
<i>Bacillus velezensis</i>		
SF327	Isolated from rhizosphere soil (No. 176) of fruit tree from Haikou city in Hainan province	This study
SF305	Isolated from cabbage rhizosphere soil (No. 163) from Hute Saihan district in Inner Mongolia autonomous region	This study
SF197	Isolated from water spinach rhizosphere soil (No. 50) from Sanming city in Fujian province	This study
SF284	Isolated from rice rhizosphere soil (No. 130) from Haidian district, Beijing	This study
SF307	Isolated from <i>Poria cocos</i> rhizosphere soil (No. 165) from Hohhot city in Inner Mongolia autonomous region	This study
SF309	Isolated from cucumber rhizosphere soil (No. 165) from Hohhot city in Inner Mongolia autonomous region	This study
SF336	Isolated from pepper rhizosphere soil (No. 176) from Haikou city in Hainan province	This study
2P24	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	[28]
RS105	<i>Xoc</i> wild type strain, Chinese race 2	This lab
PXO99 ^A	<i>Xoo</i> wild type strain, Philippine race 6	[29]
DC3000	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>	[30]
LS-2	<i>Acidovorax citrulli</i>	This lab
LMG2196	<i>Burkholderia glumae</i>	This lab
DH5 α	<i>Escherichia coli</i>	This lab
<i>Magnaporthe oryzae</i>	Causing rice blast	This lab
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	Causing cucumber fusarium wilt	This lab
<i>Phytophthora capsici</i>	Causing pepper phytophthora blight	This lab
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Causing anthracnose on rubber leaves	This lab
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Causing anthracnose on rubber leaves	This lab

于 LB (蛋白胨 10 g/L, 氯化钠 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, 琼脂粉 15 g/L, pH 7.0–7.2) 或者 LB broth (LB 不含有琼脂粉) 培养基中, 培养温度为 28 °C; 大肠杆菌置于 LB 培养基中, 培养温度为 37 °C。供试的植物病原真菌置于 PDA 培养基(土豆 200 g/L, 葡萄糖 20 g/L, 琼脂粉 15 g/L, pH 5.6±0.2 中, 培养温度为 28 °C。

1.2 贝莱斯芽孢杆菌的分离

本研究前期工作从全国 31 个省(或自治区) 收集了 248 份植物根际土样, 以水稻条斑病菌的模式菌株 *Xoc* RS105 作为指示菌, 筛选拮抗

菌株, 利用 16S rRNA 基因的通用引物 27F 和 1492R^[2], 以拮抗菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增和鉴定, 共获得 7 株贝莱斯芽孢杆菌: SF327、SF305、SF197 (已命名为 *B. velezensis* 504)^[2]、SF284、SF307、SF309 以及 SF336。SF327 从编号为 176 号的土样中筛选获得, 土样于 2018 年 11 月 8 日采集自海南省海口市海甸港湾花园果园地的土壤。

1.3 贝莱斯芽孢杆菌 PGPR 特性的分析

对上述分离到的 7 株贝莱斯芽孢杆菌进行植物益生功能的检测, 包括蛋白酶活性、纤维

素酶活性、几丁质酶活性、产嗜铁素能力、降解无机磷、降解钾以及促生长等 PGPR 的特性分析。

胞外蛋白酶活测定按照如下步骤进行。配制 3 种不同组分的培养基: A: 10% (W/V) 的脱脂奶粉 (20.0 g 脱脂奶粉溶于 200 mL 蒸馏水), B: 3% (W/V) 的琼脂溶液 (6.0 g 琼脂粉溶于 200 mL 蒸馏水)。将 A 单独在 110 °C 高压灭菌 15 min, A 和 B 充分混匀制成平板备用。平板中央放置牛津杯, 加入 50 μ L 的待测贝莱斯芽孢杆菌菌液 ($OD_{600}=2.0$), 将其置于 28 °C 的培养箱中培养 1–2 d。根据是否产生水解圈可以判断是否产生蛋白酶。

纤维素酶活的测定采用羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 培养基, 各组分包括: 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 20.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 2.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, NaCl 6.0 g, $CaCl_2$ 0.1 g, 琼脂粉 20.0 g, pH 7.0–7.5。用纯净水溶解, 最终定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min。在 CMC-Na 平板中央放置牛津杯, 加入 50 μ L 待测菌液 ($OD_{600}=2.0$), 静置于 45 °C 培养箱中培养 3 d。用 1 g/L 的刚果红染色 10 min, 再用 1 mol/L 的 NaCl 冲洗, 观察和测量透明圈的直径。

几丁质酶活的测定采用培养基各组分包括: 胶状几丁质 15.0 g, 酵母粉 3.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, $MgSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.3 g, KH_2PO_4 1.36 g, 琼脂粉 15.0 g, pH 7.0。用纯净水溶解, 最终定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min。其中胶状几丁质的配制如下: 将 5.0 g 细粉几丁质溶于 88 mL 浓盐酸中, 此几丁质成胶状, 在 4 °C 静置 24 h。然后用玻璃纤维过滤到 500 mL 去离子水中, 同时搅拌, 离心, 将其洗至中性, 最后加适量去离子水高压灭菌后保存。在平板中央放置牛津杯, 加入 50 μ L 待测菌液 ($OD_{600}=2.0$), 静置于 28 °C 培养箱中培养 2 d, 观察是否有水解圈的形成。

嗜铁素的测定采用 CAS (铬天青) 培养基。首先配制 CAS A 液: 1 mmol/L CAS, 4 mmol/L CTMAB (十六烷基三甲基溴化铵), 0.1 mmol/L $FeCl_3 \cdot 6H_2O$; 再配制 CAS B 液: 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.0; 再配制 CAS C 液: 蔗糖 2.0 g, 酸水解酪蛋白 3.0 g, 1 mmol/L $MgSO_4$ 20 mL, 1 mmol/L $CaCl_2$ 1 mL, 琼脂粉 18.0–20.0 g, pH 7.0。将 CAS A 液、B 液和 C 液于 115 °C、15 min 分别灭菌, 待温度降至 60 °C 左右时, 在 100 mL CAS C 检测平板中加入 CAS A 液 5 mL 和 CAS B 液 0.5 mL, 边加边缓慢摇晃均匀, 倒平板备用。在平板中央放置牛津杯, 加入 50 μ L 待测菌液 ($OD_{600}=2.0$), 静置于 28 °C 培养箱中培养 2 d, 观察是否有透明圈形成。

解磷培养基以磷酸钙作为唯一磷源, 各成分为: $Ca_2(PO_4)_3$ 3.0–5.0 g, 蔗糖 10.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 g, NaCl 0.2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, KCl 0.2 g, 酵母粉 0.5 g, $MnSO_4$ 0.000 4 g, $FeSO_4$ 0.000 2 g, 琼脂粉 15.0 g, pH 7.0。用纯净水溶解, 最终定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min。在培养基中央放置牛津杯, 加入 50 μ L 的待测菌液 ($OD_{600}=2.0$), 将其置于 28 °C 的培养箱培养 2–3 d。根据是否产生水解圈可以判断是否具有降解磷的能力。

解钾培养基的各成分为: 蔗糖 10.0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 g, $NaH_2PO_4 \cdot 12H_2O$ 2.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, NaCl 0.1 g, 酵母粉 0.5 g, $CaCO_3$ 1.0 g, 钾长石粉 20.0g。琼脂粉 15.0–20.0 g, pH 7.2。用纯净水溶解, 最终定容至 1 L, 121 °C 高压灭菌 20 min。培养基中央放置牛津杯, 加入 50 μ L 的待测菌液 ($OD_{600}=2.0$), 将其置于 28 °C 的培养箱培养 2–3 d。根据是否产生水解圈可以判断是否具有降解钾的能力。

改良后的 YM 培养基配方为: 甘露醇 5.0 g, K_2HPO_4 0.25 g, NaCl 0.05 g, 酵母膏 1.5 g, 色

氨酸 0.05 g, pH 7.0。用纯净水溶解, 最终定容至 1 L。将制备改良 YM 培养基注入试管中, 121 °C 高压灭菌 20 min。在无菌条件下把每一个试管中接种待测菌株, 置于 28 °C、135 r/min 条件下培养 96 h。离心取上清液, 与比色液混合, 在室温下培养 30 min, 有粉红色出现, 说明有 IAA 产生。在波长为 530 nm 处测量 OD 值, 根据 IAA 标准曲线(IAA 标准曲线的制作: 配置浓度梯度为 1、2、5、10、20、50、100 的 IAA 标品溶液, 测量 530 nm 处的 OD 值, 制作标准曲线; 根据标准曲线公式 $y=0.0184x-0.0032$) 计算产生的 IAA 含量。

1.4 小青菜促生效果测定

在 50 孔穴盘中播种进行小青菜育苗, 25 d 后取出备用。挑取待测菌株单菌落接种于 NB 培养基中, 于 28 °C、200 r/min 的摇床中培养过夜后, 将菌液浓度调至 $OD_{600}=1.0$, 将 $OD_{600}=1.0$ 的菌液稀释 5 倍备用。将取出的穴盘苗在稀释后的菌液中浸根 5 min 使根系充分被菌液浸润后移栽, 移栽后施加水肥, 30 d 后进行采摘和地上部分称重, 统计数据进行分析。

1.5 SF327 菌株生理生化特性的分析

将纯化的 SF327 菌株送至中国典型培养物保藏中心(中国, 武汉)进行保藏(保藏编号为 CCTCC M 2022130), 以及进行生理生化特性的测定。鉴定系统采用 GEN III MicroPlates™ (Biolog, Hayward, CA, USA), 包含了 49 种碳源和 20 个生化测定。

1.6 SF327 拮抗谱的测定

1.6.1 病原细菌拮抗谱的测定

将表 1 中提及的 2 株植物病原黄单胞菌株 (*Xoo* PXO99^A 和 *Xoc* RS105) 和 3 株生产上重要的西瓜果斑病菌(*Acidovorax citrulli*) LS-2、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) DC3000 和水稻穗枯病菌(*Burkholderia glumae*)

LMG2196 以及大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 的单菌落接种到对应培养基中(黄单胞菌及西瓜果斑病菌接种在 NB 培养基中, 其余菌株接种到液体 LB 培养基中), 于 28 °C、200 r/min 的摇床中培养过夜后, 将菌液浓度调至 $OD_{600}=2.0$ 。取 200 μ L 菌液加至平板中冷却至 55 °C 的培养基中充分混合, 自然冷却凝固。在平板中间位置放置牛津杯, 每个牛津杯内接 10 μ L 浓度为 $OD_{600}=2.0$ 的待测菌液。每个菌株的试验设置 3 个重复, 28 °C 恒温培养 24–48 h, 测量抑菌圈大小、分析数据、拍照整理图片。

1.6.2 病原真菌拮抗谱的测定

将表 1 中的 5 株植物病原真菌稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*)、橡胶树胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 以及橡胶树尖孢炭疽病菌 (*Colletotrichum acutatum*), 置于 PDA 培养基上培养, 待菌丝长满平板后, 用打孔器在平板边缘打取菌饼备用, 用灭菌后的牙签挑取一个菌饼, 菌丝朝下, 接种到新的 PDA 平板中央。将 SF327 单菌落接种在 NB 培养基中, 于 28 °C、200 r/min 的摇床中培养过夜, 将菌液浓度调至 $OD_{600}=2.0$ 。在上述接种病原真菌的新平板中, 菌饼的上下左右 4 边放置滤纸片(直径为 8 mm, 滤纸片距离菌饼中心约 20 mm), 在左右两个滤纸片上滴加 5 μ L SF327 菌液, 上下两个滤纸片上滴加 5 μ L NB 培养基作为对照, 置于 28 °C 培养箱中静置培养 5–7 d, 每个试验设置 3 个重复, 测定抑菌直径, 拍照整理图片。

1.7 SF327 防治水稻白叶枯病的大田试验

大田防治水稻白叶枯病的试验分为预防处理和治疗处理两个试验组进行。将 SF327 和 *Xoo* PXO99^A 的单菌落分别接种于 NB 培养基中, 于 28 °C、200 r/min 的摇床中培养过夜, 将菌液浓

度调至 $OD_{600}=0.6$ 备用。预防处理实验组 (SF327-Pre), 选择傍晚将 $OD_{600}=0.6$ 的 SF327 菌液均匀喷雾接种至水稻叶片上, 24 h 后用 $OD_{600}=0.6$ 的 *Xoo* PXO99^A 菌液进行喷雾处理; 治疗处理实验组 (SF327-Tre), 在傍晚将 $OD_{600}=0.6$ 的 *Xoo* PXO99^A 菌液均匀喷雾接种至水稻叶片上, 24 h 后用 $OD_{600}=0.6$ 的 SF327 菌液进行喷雾处理; 另设置对照组, 仅用 $OD_{600}=0.6$ 的 *Xoo* PXO99^A 菌液进行喷雾处理。喷雾接种 20 d 后观察水稻的发病情况, 统计病级数并进行数据分析。

1.8 SF327 的全基因组测序

将 SF327 的单菌落分别接种于 NB 培养基中, 于 200 r/min 转速的 28 °C 培养箱中过夜培养后, 以 1:100 的比例转接至新的 NB 培养基中培养至对数期 (OD_{600} 介于 0.8–1.0 之间), 在 4 °C 条件下 6 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 弃上清, 用 1×PBS 缓冲液冲洗沉淀, 相同的条件下离心, 弃上清, 该步骤重复 2–3 次, 直至上清透明, 移除全部上清, -80 °C 冻存, 送至上海派森诺生物科技有限公司对 SF327 进行全基因组测序。利用 PacBio Sequel 和 Illumina NovaSeq 测序平台, 采用二代和三代技术建库、测序; 将 Pacbio 获得的下机数据使用 HGAP 和 CANU 软件进行第三代单分子测序数据的拼装, 获得 contig 序列。后续用二代数据对三代结果进行纠错, 将二代的高质量数据使用 pilon 软件对三代 contig 结果进行矫正, 最终拼接得到完整序列。

1.9 菌株 SF327 与其他贝莱斯芽孢杆菌比较基因组的分析

在 NCBI 上下载贝莱斯芽孢杆菌 FZB42、SQR9 的基因及蛋白的序列信息与菌株 SF327 进行比较基因组分析。将 3 个菌株的基因序列分别上传 antiSMASH6.0 进行代谢基因簇分析。

运用 BPGA 软件对 3 个菌株的 CDS (sequence coding for aminoacids in protein) 区进行同源性分析, 并对三者的比较基因组的功能基因进行了 KEGG 注释。运用 mauve 软件对 3 个菌株进行共线性分析。

2 结果与分析

2.1 小青菜促生菌 SF327 的筛选和鉴定

本研究前期工作从全国 31 个省或者自治区收集了 248 份健康植物根际土样, 以 *Xoc* 的模式菌株 RS105 作为指示菌, 历时 3 年 (2018–2020 年), 共获得 223 株细菌类拮抗菌株。经过 16S rRNA 基因序列的鉴定以及 NCBI 中 BLAST 的同源性比对分析, 以同源性高于 99% 以上为种的划分标准, 共获得 7 株对 *Xoc* RS105 拮抗作用明显的贝莱斯芽孢杆菌 (图 1A)。以生防荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 2P24 为对照, 进行平板抑菌活性的分析, 发现这 7 株菌株对 *Xoc* RS105 的拮抗活性明显强于 2P24。进一步对这些菌株进行蛋白酶活性、产嗜铁素能力、降解无机磷、降解钾以及促生长等植物根围促生菌的特性分析。酶活试验显示, 这些菌株都具有胞外蛋白酶活性, 形成的酶活水解圈明显大于菌株 2P24 (图 1B), 其中 SF327 菌株产嗜铁素的能力最强 (图 1C), 但是这些菌株都不产生纤维素酶和几丁质酶, 也不具有解磷和解钾的能力 (资料未显示)。小青菜 (*Brassica campestris* sp. *chinensis* L.) 的促生试验显示, 菌株 SF327、SF305 (另文发表) 以及 SF197 (以下命名为 *B. velezensis* 504) (已另文发表)^[2] 能够稳定促进小青菜地上部分鲜重的增加 (图 1D), SF327 和 504 的施用能使小青菜产生较多的侧根 (图 1E)。SF327 能够产生吲哚-3-乙酸 (1H-indole-3-acetic acid, IAA) 类生长素 (图 1F), 定量分析结果显

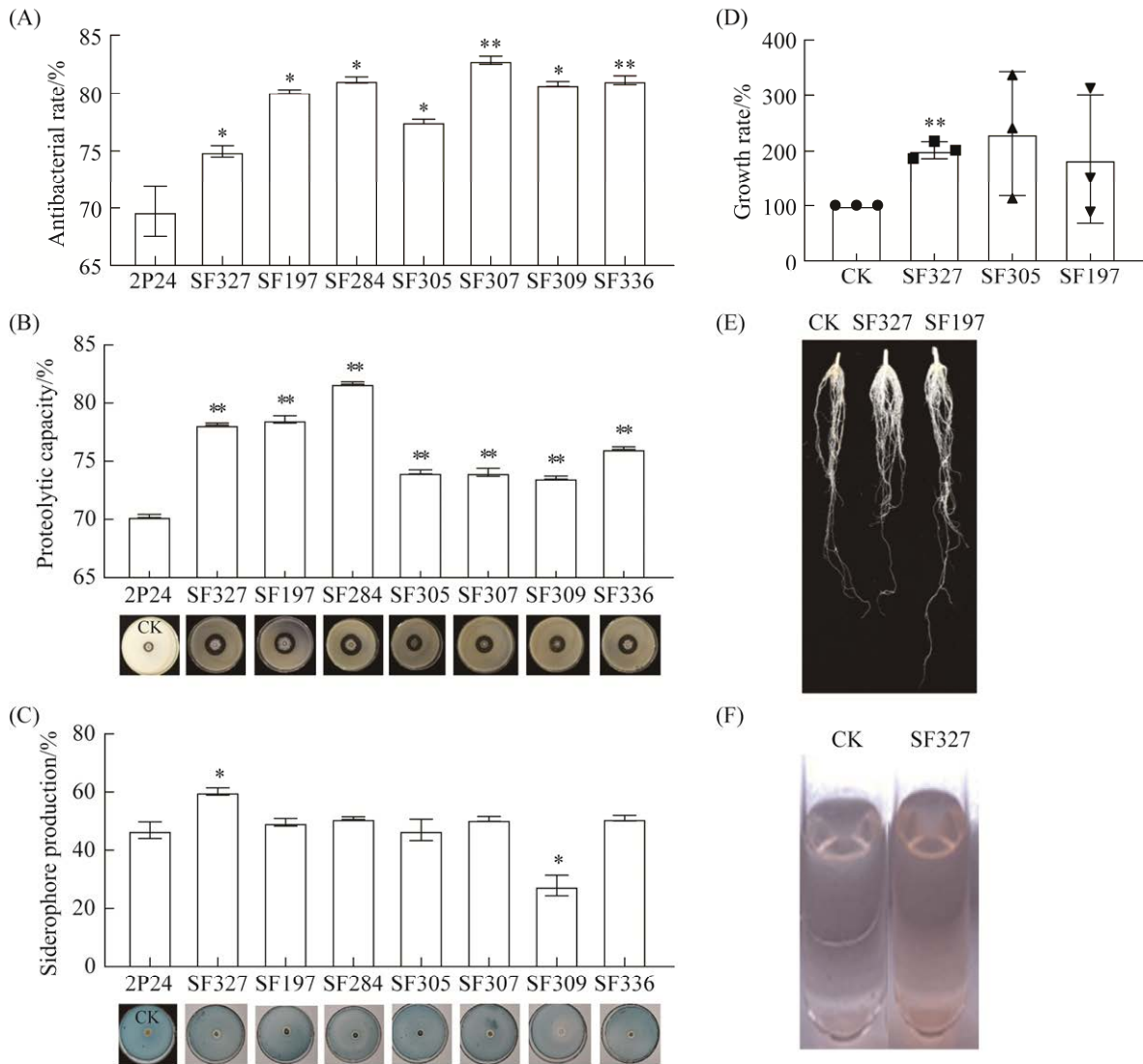


图 1 贝莱斯芽孢杆菌 SF327 的 PGPR 特征分析

Figure 1 The PGPR characteristics of *B. velezensis* SF327. A: the antagonistic spectrum of 7 isolates of *B. velezensis* (SF327, SF197, SF284, SF305, SF307, SF309, SF336) and *Pseudomonas fluorescens* 2P24 against *Xoc* RS105; B: the extracellular protease activity of 7 isolates of *B. velezensis* and *P. fluorescens* 2P24; C: the capability of producing siderophore of 7 isolates of *B. velezensis* and *P. fluorescens* 2P24; D: the growth-promoting rate of *B. velezensis* SF327, SF305 and SF197; E: the roots of pak choi (*Brassica campestris* sp. *chinensis* L.) treated by *B. velezensis* SF327 and SF197 through root-irrigation; F: the IAA production of *B. velezensis* SF327. Error bars indicate standard deviation, and the * indicates significant differences ($0.01 < P < 0.05$), the ** indicates highly significant differences ($P < 0.01$).

示 SF327 产生 IAA 的量约为 3.62 mg/L。这些结果表明, SF327 是一株有益的根围促生菌。

因解淀粉芽胞杆菌和贝莱斯芽孢杆菌的 16S rRNA 基因序列具有较高的同源性,为了确

保 SF327 菌株鉴定的准确性,进一步将菌株送至中国典型培养物保藏中心(武汉)进行分子生物学的鉴定和生理生化测定,16S rRNA 和持家基因 *gyrA* 同源性比对的分析确定 SF327 为贝莱

斯芽孢杆菌(结果未显示)。生理生化特征显示, SF327 能够利用甘油、葡萄糖、果糖、甘露糖、肌醇等 18 种碳源产酸(结果未显示), 与我们前期鉴定的 *B. velezensis* 504 的生理生化特征具有较高的相似性^[2]。

2.2 *B. velezensis* SF327 拮抗谱的分析

为了明确 SF327 的拮抗谱, 选取 4 株生产上重要的植物病原细菌和 1 株大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 进行平板抑菌活性分析。拮抗试验显示, SF327 仅对水稻白叶枯病菌 *Xoo* PXO99^A 具有拮抗作用, 抑菌率约为 75.92% (图 2A), 对西瓜果斑病菌(*A. citrulli*) LS-2、丁香假单胞菌(*P. syringae* pv. *tomato*) DC3000、水稻穗枯病菌(*B. glumae*) LMG2196 以及 *E. coli* DH5 α 都没有拮抗活性(资料未显示)。这表明 SF327 对水稻黄单胞菌(*Xoo* 和 *Xoc*)具有较特异的拮抗活性。

进一步选取 5 株植物病原真菌进行拮抗试验, 发现 SF327 对稻瘟病菌(*M. oryzae*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、辣椒疫霉菌(*P. capsici*)都具有明显的拮抗作用, 抑菌率分别为 60.91%、64.68%和 58.57%; 对橡

胶树胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)以及橡胶树尖孢炭疽病菌(*C. acutatum*)也具有拮抗作用, 对尖孢炭疽病菌的拮抗作用较为显著, 抑菌率为 67.42% (图 3)。这些结果表明, SF327 具有较广的拮抗谱, 对一些重要的植物病原真菌和细菌都具有较好的抑制作用。

2.3 *B. velezensis* SF327 防治水稻白叶枯病潜力的分析

已有的研究显示, 贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 对 *Xoo* 和 *Xoc* 具有较显著的拮抗作用^[20]。本研究前期工作关于贝莱斯芽孢杆菌 504 的研究也表明, 其含有能特异性抑制水稻黄单胞菌的活性化合物, 对水稻细菌病害的防治具有较好的生防应用价值^[2]。为了明确 SF327 是否具有防治水稻白叶枯病的潜力, 在大田感病水稻日本晴成株期时, 模拟 *Xoo* PXO99^A 的自然侵染过程, 采用喷雾接种的方法来评价其生防效果。以 SF327 比 *Xoo* PXO99^A 提前 1 d 喷雾为预防处理(SF327-Pre), 比 *Xoo* PXO99^A 滞后 1 d 喷雾为治疗处理(SF327-Tre)。接种 20 d 后, 观察叶片发病情况、统计病情指数和防治效果。结果显

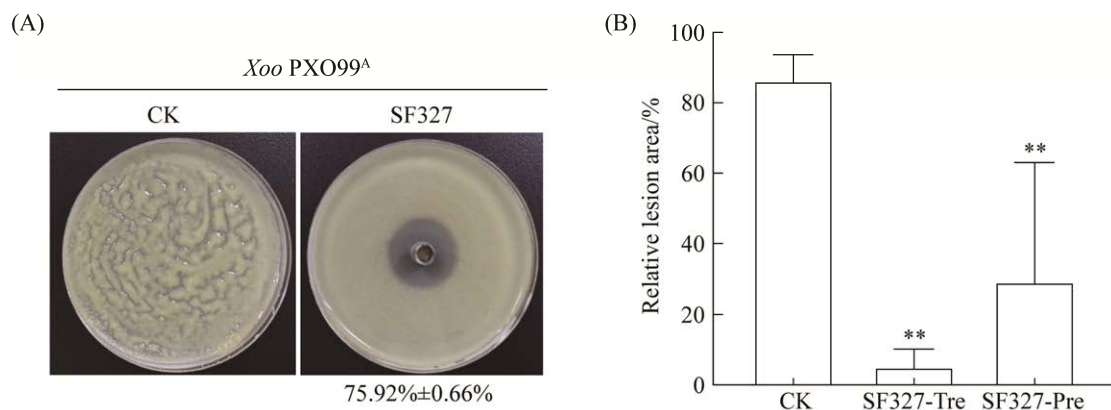


图 2 贝莱斯芽孢杆菌 SF327 防治水稻白叶枯病潜力分析

Figure 2 Analysis of the biocontrol potential of *B. velezensis* SF327 to control bacterial blight of rice. A: the antagonistic activity of *B. velezensis* SF327 against *Xoo* PXO99^A; B: effect of *B. velezensis* SF327 on control of bacterial blight of rice. Error bars indicate standard deviation, ** indicates highly significant differences ($P < 0.01$).

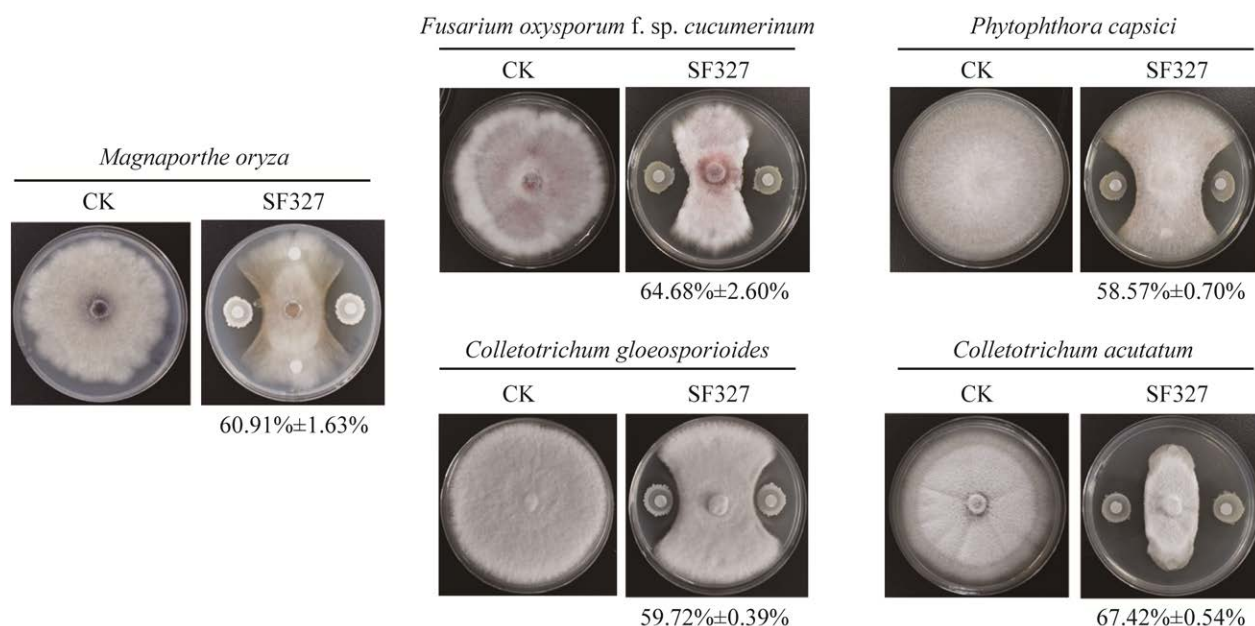


图 3 贝莱斯芽孢杆菌 SF327 对 5 种植物病原真菌的拮抗作用

Figure 3 The antagonistic activity of *B. velezensis* SF327 against five plant pathogenic fungi.

示：与仅喷雾 *Xoo* PXO99^A 的对照相比，经过预防处理和治疗处理的日本晴水稻叶片的叶枯状病斑长度明显变短；预防处理的病情指数为 40.00，防效约为 60%，治疗处理的病情指数为 12.73，防效约为 87.27%，治疗效果明显优于预防效果(图 2B)。这表明 SF327 是一株具有防治水稻白叶枯病潜力的生防菌。

2.4 *B. velezensis* SF327 的基因组特征

为了进一步明确 SF327 防病和促生的机制，本研究对其全基因组进行了测序，序列已上传 NCBI (GenBank: CP092383)。测序结果显示，SF327 不含有质粒，染色体的序列长度为 4 081 758 bp，GC 含量为 46.49% (图 4)。染色体含有 4 033 个开放阅读框(opening reading frame, ORF)，包含 9 个 5S rRNA 拷贝、9 个 16S rRNA 拷贝、9 个 23S rRNA 拷贝、86 个 tRNA 拷贝以及 82 个其他非编码 RNA 拷贝(表 2)。CAZy (carbohydrate-active enzymes database)酶活分析显示，SF327 染色体中含有 47 个糖苷水

解酶(glycoside hydrolases)的基因、38 个编码糖基转移酶(glycosyl transferases)的基因、29 个编码碳水化合物结合相关酶(carbohydrate esterases)的基因、19 个编码碳水化合物结合相关酶(carbohydrate-binding modules)的基因、7 个编码辅助活性酶(auxiliary activities)的基因(图 5A)。COG (clusters of orthologous groups of proteins)分析显示，SF327 有 84.30%的基因功能得到了注释，丰度最大的是参与转录的基因，有 272 个；其次是参与氨基酸转运和代谢的基因有 268 个；碳水化合物转运和代谢、细胞壁/膜/包膜生物发生、无机离子转运和代谢基因分别为 227、205 和 180 个；次级代谢物的生物合成、转运与代谢基因有 90 个，其中有 16 个基因参与了一磷酸腺苷(Amp)的合成酶和连接酶的生物合成；6 个基因参与了非核糖体多肽的合成(图 5B)。GO 数据库对比分析显示：SF327 含有几丁质酶(GO: 0004568)、纤维素酶(GO: 0008810)合成基因，可能具有水解病原真菌细胞

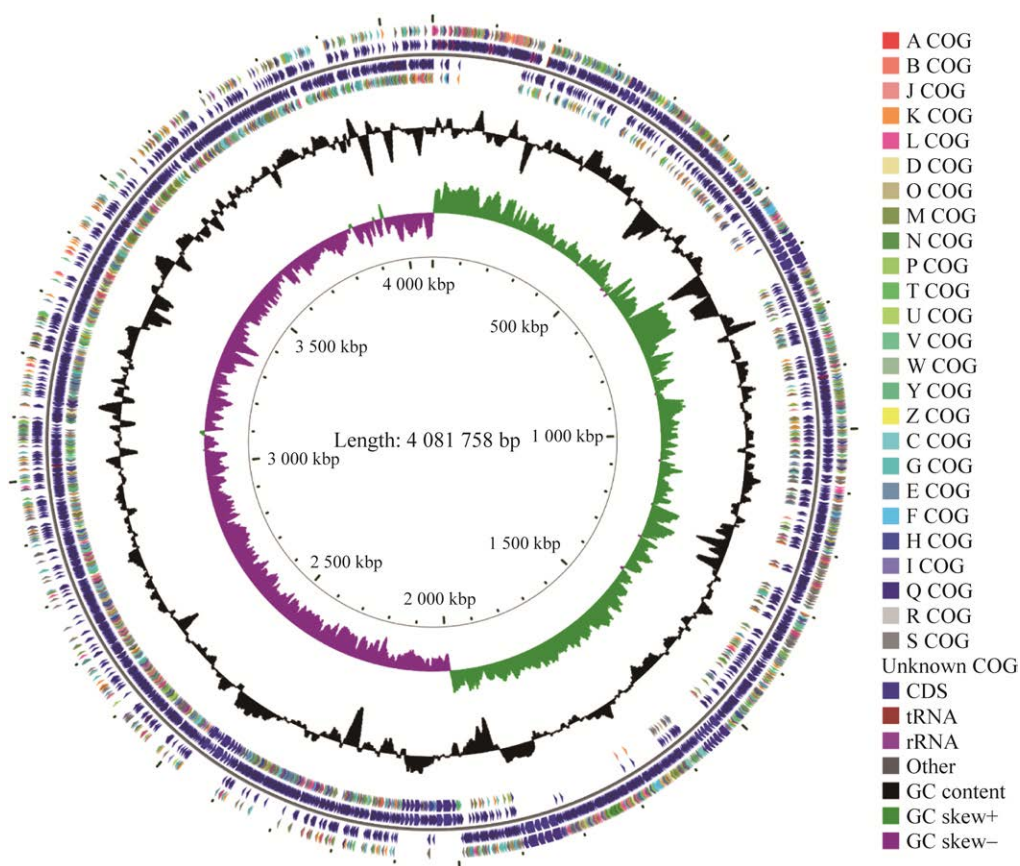


图 4 贝莱斯芽孢杆菌 SF327 的基因组圈图

Figure 4 Circular genome map of *B. velezensis* SF327. The outermost and second circles of all replicons indicate CDS on forward and reverse strands colored according to COG category. The third and fourth circles show G+C content and the G+C skew in green (+) and purple (-), respectively. The fifth circle shows the insertion sequences in red, putative prophage remnants in brown. The scale is shown in the innermost circle.

表 2 *B. velezensis* SF327 开放阅读框信息

Table 2 Statistics of open reading frame predictions of *B. velezensis* SF327

Property	Value
ORF number	4 033
ORF total length	3 632 124 bp
ORF density	0.988 genes per kb
Longest ORF length	17 706 bp
ORF average length	900.60 bp
Intergenic region length	449 634 bp
ORF/genome (coding percentage)	88.98%
Intergenic length/genome	11.02%
GC content in ORF region	47.30%
GC content in intergenic region	40.00%

壁的能力; 具有孢子形成、萌发(GO: 0043934、GO: 0030435)等与菌株抗逆性相关的基因; 此外 SF327 还含有嗜铁素生物合成(GO: 0019290)、磷代谢(GO: 0006793)和生长素(indole-3-acetic acid, IAA)合成相关的基因。这些分析暗示 SF327 具有抗逆、抗真菌、促进植物生长和诱导植物系统抗性等特性。

2.5 *B. velezensis* SF327 与其他 *B. velezensis* 菌株的比较基因组分析

为了明确 SF327 和另外 2 株模式贝莱斯芽孢杆菌 FZB42、SQR9 是否存在差异性, 我们

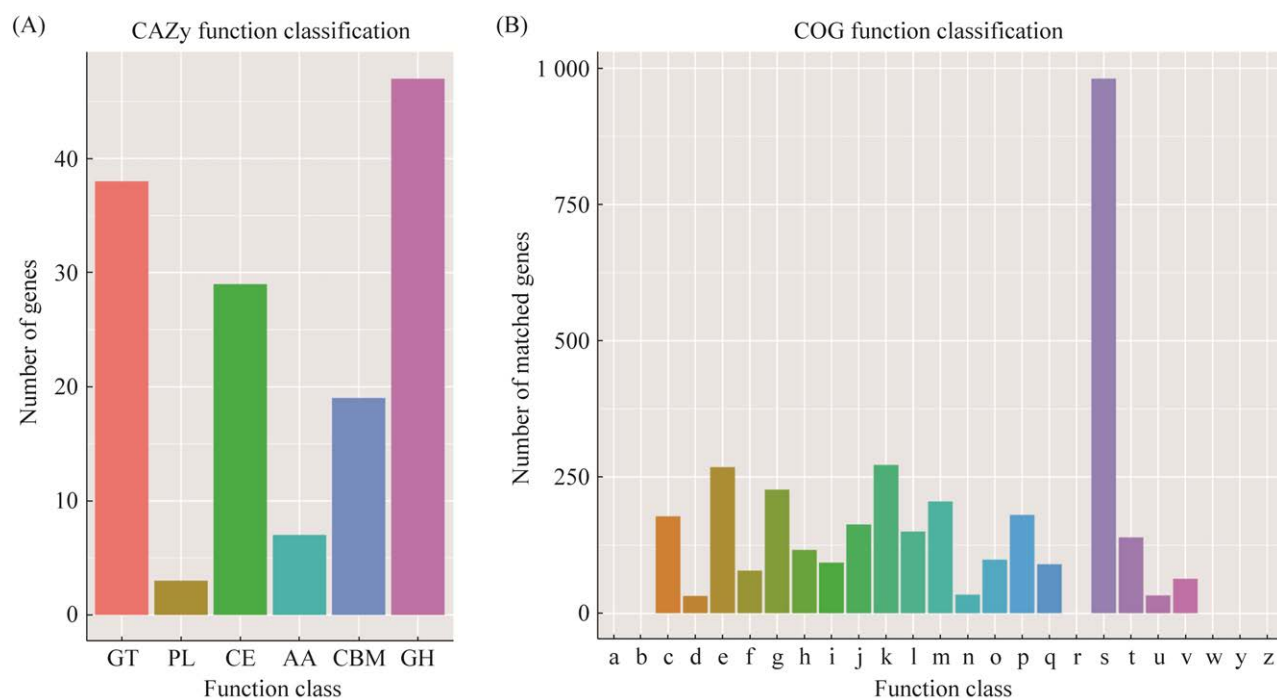


图 5 贝莱斯芽孢杆菌 SF327 的碳水化合物酶活(CAZy)和同源聚类基因簇(COG)分析

Figure 5 CAZy (Carbohydrate-Active enZymes Database) functional classification and COG (clusters of orthologous groups) functional classification of *B. velezensis* SF327. A: GT: glycosyl transferases, PL: polysaccharide lyases, CE: carbohydrate esterases, AA: auxiliary activities, CBM: carbohydrate-binding modules, GH: glucoside hydrolases. B: a: RNA processing and modification; b: chromatin structure and dynamics; c: energy production and conversion; d: cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; e: amino acid transport and metabolism; f: nucleotide transport and metabolism; g: carbohydrate transport and metabolism; h: coenzyme transport and metabolism; i: lipid transport and metabolism; j: translation, ribosomal structure and biogenesis, k: transcription; l: replication, recombination and repair; m: cell wall/membrane/envelope biogenesis, n: cell motility; o: posttranslational modification, protein turnover, chaperones; p: inorganic ion transport and metabolism; q: secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; r: general function prediction only; s: function unknown; t: signal transduction mechanisms; u: intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; v: defense mechanisms; w: extracellular structure; y: nuclear structure; z: cytoskeleton.

对这 3 个菌株进行了比较基因组分析。基因组的一般特征显示, SF327 的基因组大小介于 FZB42 与 SQR9 之间, 这 3 株菌具有相似的 GC 含量, SF327 含有最多的 CDS 序列(表 3)。共线性分析显示, SF327 与 FZB42、SQR9 的基因组间高度相似, 大部分基因均存在线性的直接对应关系, 但也存在翻转、易位等基因组重排现象(图 6A)。核心基因分析显示 3 个菌株共有

的核心基因数为 3 303, 占基因组总核心基因数的 87%以上, 其中 326 个基因是 SF327 菌株所特有(图 6B)。进一步的 KEGG (Kyoto encyclopedia of genes and genomes)注释结果显示, 部分基因功能预测与外排转运、核糖体、脂类转运代谢、膜蛋白、DNA 修饰、次生代谢产物等相关。其中, 涉及到细胞生长与死亡、细胞运动、抗性、环境适应、转录等的基因在三者之间是完全一

表 3 三株贝莱斯芽孢杆菌 SF327、FZB42 和 SQR9 的基因组特征

Table 3 General genomes features of *B. velezensis* SF327, FZB42 and SQR9

General features	<i>B. velezensis</i> SF327	<i>B. velezensis</i> FZB42	<i>B. velezensis</i> SQR9
Genome size/Mb	4.08	3.92	4.12
GC content/%	46.49%	46.50	46.10
rRNA genes	27	29	21
tRNA genes	86	88	72
Other RNA genes	82	4	5
Coding density/%	88.98	95.33	96.30
Protein coding sequences (CDS)	4 033	3 675	3 899

致的, 涉及到氨基酸代谢和糖代谢的同源性较高, 而涉及群体感应、维生素代谢、DNA 复制和修复的同源性则较低(图 6C)。

为了明确 SF327、FZB42 和 SQR9 在次生代谢产物基因簇上是否存在差异, 本研究对这 3 株菌进行了 antiSMASH 分析。结果显示, SF327 含有 13 个次生代谢产物基因簇, 其中包括环脂肽 surfactin、fengycin 和噬铁素 bacillibactin, 3 种聚酮类化合物 macrolactin、bacillaene 和 difficidin, 1 种二肽化合物 bacilysin。这些活性化合物的存在可能揭示了 SF327 能够拮抗水稻黄单胞菌(*Xoo* 和 *Xoc*)和辣椒疫霉菌的机理, 因为已有研究显示 FBZ42 对 *Xoo* 和 *Xoc* 的抑制作用由 difficidin 和 bacilysin 协同产生^[20], 对大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*)的抑制作用主要由 bacilysin 起作用^[31]。菌株 SF327、SQR9 和 FZB42 含有 11 个相同的次生代谢产物基因簇, 这些基因簇保守性较高, 彼此间均存在共线性关系(图 6D)。另外, SF327 含有 2 个特有的基因簇, 分别编码抗生素 myxovirescin 和 mersacidin。Myxovirescin 对革兰氏阴性细菌具有广谱的拮抗性, mersacidin 能够拮抗金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*) (图 6D)。这些结果表明, SF327 含有多种次生代谢产物基因簇, 具有防治真菌、卵菌和细菌病害的生防潜力。

3 讨论

本研究筛选到 1 株贝莱斯芽孢杆菌 SF327, 其能够产生低量的 IAA, 促进小青菜生长, 能特异性抑制植物病原黄单胞菌, 拮抗稻瘟病菌、黄瓜枯萎病菌、辣椒疫霉菌以及橡胶树胶孢炭疽菌、尖孢炭疽菌, 这为水稻、橡胶树、黄瓜以及辣椒病害的生物防治提供了新的微生物资源。基因组以及比较基因组的分析为菌株间次生代谢产物合成基因簇的分布特征以及菌株的变异提供了线索。

菌株 SF327 能产生蛋白酶、噬铁素, 但是不能解磷、解钾, 不具有纤维素酶和几丁质酶的活性。GO 数据库对比分析显示 SF327 含有几丁质酶和纤维素酶编码基因, 但是 SF327 却没有几丁质和纤维素酶活性。这表明一些植物促生菌的益生功能可能在某些表型上存在差异, 并不会具有所有 PGPR 相关的表型, 基因型和表型之间也有可能不对应。例如, 本研究分离的 7 株贝莱斯芽孢杆菌都产生嗜铁素, 且 SF327 产生嗜铁素的能力最强, 但是贝莱斯芽孢杆菌 BAC03 和 QST713 却不产生嗜铁素^[32]。一般低量的 IAA 有助于植物生长, SF327 产生的 IAA 浓度约为 3.62 mg/L, 这比一些根围促生的假单胞菌低了约 30 倍。例如, 摩拉维亚假单胞菌 FP1761 可产生约 92.2 mg/L 的 IAA, 能促进小麦苗的生长^[33]。贝莱斯芽孢杆菌 BAC03、QST713 和 FZB42 分别产生 21.3、15.2、19.5 μg/L 的 IAA^[32]。SF327 能够解钾、解无机磷和有机磷, 可以产氨、蛋白酶、嗜铁素。这些特异的差异可能造成促生菌的功能各异, 这与菌株分离时的地域、生境有一定的关系。最新的研究

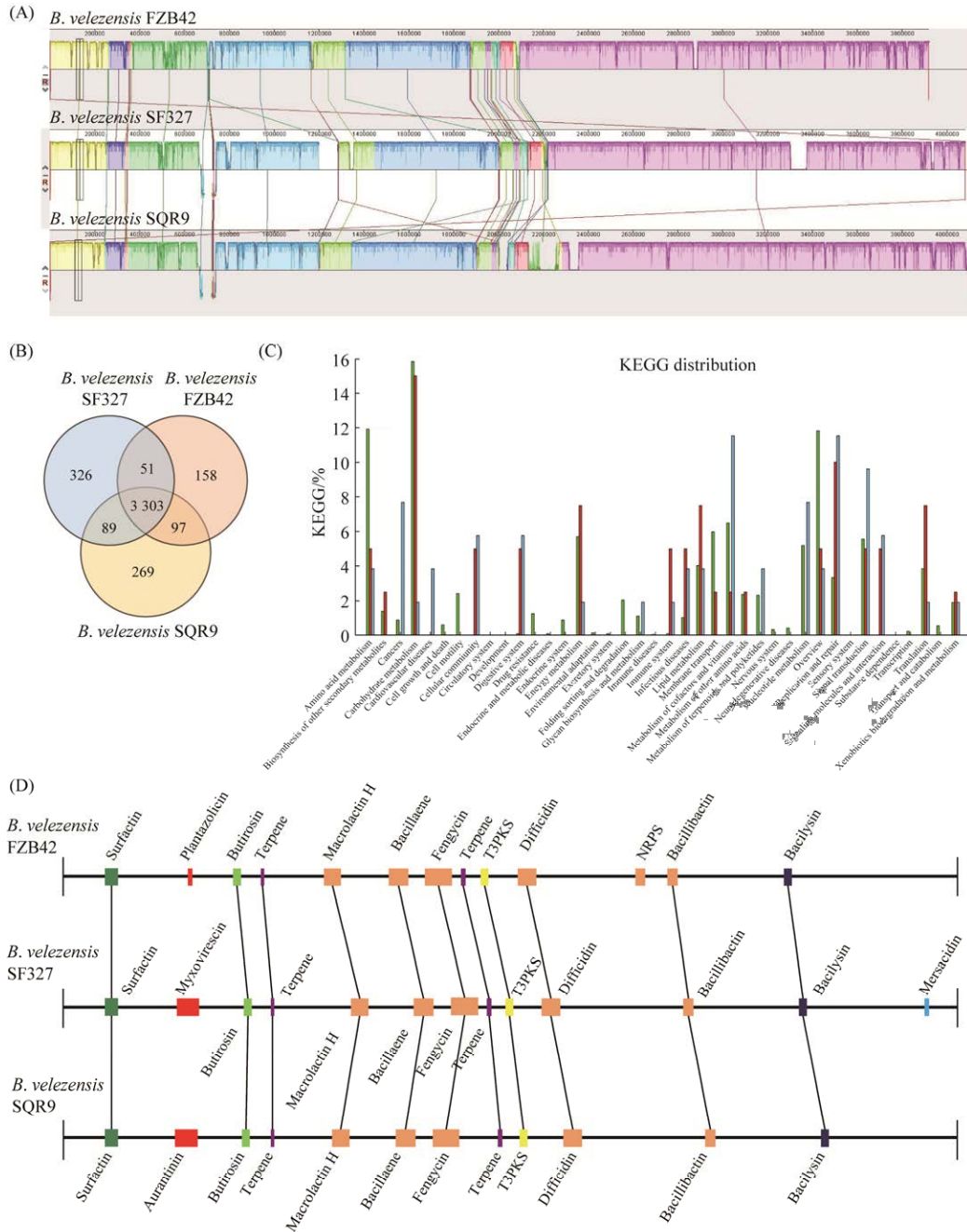


图 6 菌株 SF327、FZB42 和 SQR9 的比较基因组分析

Figure 6 Comparative genomic analysis among *B. velezensis* SF327, FZB42 and SQR9. A: genome-to-genome alignment among *B. velezensis* SF327, FZB42 and SQR9 using a progressive mauve software. Boxes with the same color indicate the syntenic regions. Boxes below the horizontal line indicate inverted regions. Rearrangements are shown by colored lines; B: Venn diagram showing the number of genes of orthologous CDSs shared and unique among three strains of *B. velezensis* SF327, FZB42 and SQR9; C: comparison of the KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) annotation of *B. velezensis* SF327, FZB42 and SQR9; D: comparison of the secondary metabolite biosynthesis gene clusters of *B. velezensis* SF327, FZB42 and SQR9. Colinear regions are connected by black lines.

显示, 莱斯芽孢杆菌 FZB42 产生低量的 IAA, 能够促进植物侧根的形成、诱导植物抗性和活性氧(reaction oxygen species, ROS)的迸发, 同时 ROS 的产生也诱导了 IAA 的产生, 随之, 其能抵消(或中和)植物的免疫反应和 ROS 毒性, 进而促进了 FZB42 在拟南芥根际的定殖^[34]。SF327 也能促进小青菜的侧根增多, 是否能激活免疫反应还有待于进一步分析。根围益生菌的接种也能够招募有益菌群的重组促进植物生长或者抑制土传病原菌。最新的研究也显示, 贝莱斯芽孢杆菌 SQR9 能够与黄瓜根围本身存在的益生假单胞菌(*P. stutzeri*)协同作用提高菌生物膜的形成以及促生作用^[35]。这暗示, 贝莱斯芽孢杆菌还有更多的生防潜力和促生机制有待于挖掘。

随着新的贝莱斯芽孢杆菌株不断被分离和鉴定, 许多研究显示, 贝莱斯芽孢杆菌具有宽广的拮抗谱。例如, 贝莱斯芽孢杆菌 AL7 能够防治由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb)引起的棉花的枯萎病, 这个生防功能主要由 fengycin 起作用^[36]。FZB42 和 SQR9 能够防治由尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)引起的黄瓜枯萎病, 主要由 bacillomycin D 起作用^[17,37]。SF327 对 *Xoo* 和 *Xoc* 具有显著的抑制作用, 能够有效防治由 *Xoo* 引起的水稻白叶枯病。这个结果与我们先前关于贝莱斯芽孢杆菌 504 的研究结果一致^[2]。我们的研究显示, 504 能够抑制多种植物病原黄单胞菌, 对于 *Xoo* 的抑制效果最显著^[2]。关于 FZB42 的研究显示, 其能够显著抑制 *Xoo* 和 *Xoc* 是因其产生 difficidin 和 bacilysin 协同起作用^[20]。我们关于 SF327 基因组次生代谢产物合成基因簇的 antiSMASH 分析也发现其含有完整的 difficidin 和 bacilysin 合成基因簇。这暗示 SF327 对 *Xoo* 和 *Xoc* 的拮抗活性化合物可能为 difficidin 和 bacilysin。SF327 能够抑制辣椒疫

霉菌(*Phytophthora capsici*), 这与近期关于 FZB42 能够抑制 6 种疫霉菌(也包括 *P. capsici*)的结果一致。FZB42 对大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)的抑制作用主要由 bacilysin 起作用^[31]。这些研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌对于不同种类的病原生物(真菌、细菌或线虫)的抑制(或抑杀)作用因其多样的次生代谢产物起作用, 但是某一类的活性物质例如 bacilysin 能同时抑制多类病原菌(植物病原黄单胞菌和卵菌)。冯江鹏等发现贝莱斯芽孢杆菌 JK3 能够抑制草莓胶孢炭疽菌^[38]。我们的研究发现 SF327 能够同时抑制橡胶树的胶孢炭疽菌和尖孢炭疽菌, 这扩展了贝莱斯芽孢杆菌的抑菌谱。

SF327 的菌株不含有质粒, 我们前期分离的贝莱斯芽孢杆菌 504 含有质粒^[2]。共线性分析显示 SF327 与 SQR9 菌株的亲缘关系较近一些, 全基因组的长度进行比较 FZB42 略短一些, 它仅 3.92 Mb, SF327 有 4.08 Mb, SQR9 有 4.12 Mb。这些差异可能与地域的不同有关, 因为 SF327 与 SQR9 分离于中国植物根围的土样^[35], FZB42 分离自西班牙维河含盐水样, 不同的生境可能造成某些适应性的改变, 虽然 SQR9 和 FZB42 都具有耐盐的特性^[35,39]。AntiSMASH 的分析显示 SF327 与 FZB42 一样, 含有 13 个二次代谢产物的基因簇, 但是 FZB42 有 2 次代谢产物基因簇不存在于 SF327 与 SQR9 中, 一个编码 plantazolicin, 另一个编码功能未知的非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetases, NRPS)。Plantazolicin 与秀丽隐杆线虫抑杀线虫有关, 对松材线虫并无抑制作用^[21]。FZB42 对松材线虫具有抑杀能力, 但是这个作用与 plantazolicin 无关, 这表明在 FZB42 中还有未鉴定的因素与杀植物病原线虫有关。SF327 是否具有抑杀线虫的能力, 还有待于进一步分析。SF327 含有编码抗生素 myxovirescin 的基因簇,

myxovirescin 一般在黄色粘球菌 (*Myxococcus xanthus*) 中产生, 对革兰氏阴性细菌具有广谱的拮抗活性, 推测可能是由聚酮合酶 (polyketide synthases, PKS) 和 NRPS 共同作用 (PKS/NRPS) 的途径产生^[40]。SF327 也含有一个基因簇编码 mersacidin, 属于羊毛硫抗生素 (lantibiotic) 的成员, 已显示能够拮抗金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 但是对革兰氏阴性细菌和真菌没有拮抗活性^[41–42]。Myxovirescin 合成基因簇的存在是否对于 SF327 抑制植物病原黄单胞菌和一些植物病原真菌具有贡献, 也有待于进一步分析。
致谢

感谢中国热带农业科学院橡胶研究所涂敏副研究员馈赠橡胶树胶孢炭疽菌、尖孢炭疽菌, 感谢中国农业大学窦道龙教授、张力群教授分别馈赠辣椒疫霉菌株和 2P24 菌株, 感谢扬州大学陈孝仁教授馈赠黄瓜枯萎病菌, 感谢上海交通大学农业与生物学院范江波副教授馈赠稻瘟病菌。

参考文献

- [1] 李生樟, 刘昭, 杨瑞环, 陈颖, 钟佑宁, 陈路生, 屈伊凝, 陈功友, 邹丽芳. 一株拮抗水稻条斑病菌的蜡样芽孢杆菌的分离和鉴定. *江苏农业科学*, 2020, 48(7): 127–136.
Li SZ, Liu Z, Yang RH, Chen Y, Zhong YN, Chen LS, Qu YN, Chen GY, Zou LF. Isolation and identification of a *Bacillus cereus* strain against plant pathogenic *Xanthomonas oryzae*. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2020, 48(7): 127–136. (in Chinese)
- [2] 李生樟, 陈颖, 杨瑞环, 张翠萍, 刘昭, 李逸朗, 陈涛, 陈功友, 邹丽芳. 一株拮抗黄单胞菌的贝莱斯芽孢杆菌的分离和鉴定. *微生物学报*, 2019, 59(10): 1969–1983.
Li SZ, Chen Y, Yang RH, Zhang CP, Liu Z, Li YL, Chen T, Chen GY, Zou LF. Isolation and identification of a *Bacillus velezensis* strain against plant pathogenic *Xanthomonas* spp.. *Acta Microbiologica Sinica*, 2019, 59(10): 1969–1983. (in Chinese)
- [3] Ruiz-Garcia C, Bejar V, Martinez-Checa F, Llamas I, Quesada E. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(Pt 1): 191–195.
- [4] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(3): 1212–1217.
- [5] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2015, 65(7): 2104–2109.
- [6] Schmiedeknecht G, Bochow H, Junge H. Use of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent. II. Biological control of potato diseases. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1998, 105(4): 376–386.
- [7] Yao AV, Bochow H, Karimov S, Boturov U, Sanginbov S, Sharipov AK. Effect of FZB 24 *Bacillus subtilis* as biofertilizer on cotton yields in field tests. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2006, 39(4): 323–328.
- [8] Sylla J, Alsanius BW, Krüger E, Reineke A, Strohmeier S, Wohanka W. Leaf microbiota of strawberries as affected by biological control agents. *Phytopathology*, 2013, 103(10): 1001–1011.
- [9] Talboys PJ, Owen DW, Healey JR, Withers PJA, Jones DL. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biology*, 2014, 14: 51.
- [10] Chowdhury SP, Dietel K, Randler M, Schmid M, Junge H, Borriss R, Hartmann A, Grosch R. Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on lettuce growth and health under pathogen pressure and its impact on the rhizosphere bacterial community. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68818.
- [11] Al-Ali A, Deravel J, Krier F, Béchet M, Ongena M, Jacques P. Biofilm formation is determinant in tomato rhizosphere colonization by *Bacillus velezensis* FZB42. *Environmental Science and Pollution Research*, 2018, 25(30): 29910–29920.
- [12] Fan B, Wang C, Song XF, Ding XL, Wu LM, Wu HJ, Gao XW, Borriss R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the Gram-positive model strain for plant growth

- promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2491.
- [13] Rabbee MF, Ali MS, Choi J, Hwang BS, Jeong SC, Baek KH. *Bacillus velezensis*: a valuable member of bioactive molecules within plant microbiomes. *Molecules*, 2019, 24(6): 1046.
- [14] Chowdhury SP, Hartmann A, Gao XW, Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42—a review. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 780.
- [15] Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süssmuth R, Piel J, Borriss R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 2009, 140(1/2): 27–37.
- [16] Chowdhury SP, Uhl J, Grosch R, Alqueres S, Pittroff S, Dietel K, Schmitt–Kopplin P, Borriss R, Hartmann A. Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(9): 984–995.
- [17] Gu Q, Yang Y, Yuan QM, Shi GM, Wu LM, Lou ZY, Huo R, Wu HJ, Borriss R, Gao XW. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant–pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2017, 83(19): e01075-17.
- [18] Koumoutsis A, Chen XH, Henne A, Liesegang H, Hitzeroth G, Franke P, Vater J, Borriss R. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(4): 1084–1096.
- [19] Cao Y, Pi HL, Chandransu P, Li YT, Wang YQ, Zhou H, Xiong HQ, Helmann JD, Cai YF. Antagonism of two plant-growth promoting *Bacillus velezensis* isolates against *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum*. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 4360.
- [20] Wu LM, Wu HJ, Chen L, Yu XF, Borriss R, Gao XW. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12975.
- [21] 张文博, 李昱龙, 周蕾, 沈东霞, 朱丽华, 樊奔. 植物根际益生菌代表菌株贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 对松材线虫的抑杀性. *微生物学报*, 2021, 61(5): 1287–1298.
- Zhang WB, Li YL, Zhou L, Shen DX, Zhu LH, Fan B. Inhibition of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(5): 1287–1298. (in Chinese)
- [22] Liu ZZ, Budiharjo A, Wang PF, Shi H, Fang J, Borriss R, Zhang KQ, Huang XW. The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23): 10081–10090.
- [23] Scholz R, Molohon KJ, Nachtigall J, Vater J, Markley AL, Süssmuth RD, Mitchell DA, Borriss R. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(1): 215–224.
- [24] Kalyon B, Helaly SE, Scholz R, Nachtigall J, Vater J, Borriss R, Süssmuth RD. Plantazolicin A and B: structure elucidation of ribosomally synthesized thiazole/oxazole peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Organic Letters*, 2011, 13(12): 2996–2999.
- [25] Shi Z, Hong W, Wang Q. Complete genome resource of *Bacillus velezensis* J17-4, an endophyte isolated from stem tissues of rice. *Plant Disease*, 2022: PDIS05210996A.
- [26] Vignesh M, Shankar SRM, MubarakAli D, Hari BNV. A novel rhizospheric bacterium: *Bacillus velezensis* NKMV-3 as a biocontrol agent against *Alternaria* leaf blight in tomato. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2022, 194(1): 1–17.
- [27] Zaid DS, Cai SY, Hu C, Li ZQ, Li YG. Comparative genome analysis reveals phylogenetic identity of *Bacillus velezensis* HNA3 and genomic insights into its plant growth promotion and biocontrol effects. *Microbiology Spectrum*, 2022, 10(1): e0216921.
- [28] Wei HL, Zhang LQ. Quorum-sensing system influences root colonization and biological control ability in *Pseudomonas fluorescens* 2P24. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 89(2): 267–280.
- [29] Salzberg SL, Sommer DD, Schatz MC, Phillippy AM, Rabinowicz PD, Tsuge S, Furutani A, Ochiai H, Delcher AL, Kelley D, Madupu R, Puiu D, Radune D, Shumway M, Trapnell C, Aparna G, Jha G, Pandey A, Patil PB, Ishihara H, Meyer DF, Szurek B, Verdier V,

- Koebnik R, Dow JM, Ryan RP, Hirata H, Tsuyumu S, Won Lee S, Seo YS, Sriariyanum M, Ronald PC, Sonti RV, Van Sluys MA, Leach JE, White FF, Bogdanove AJ. Genome sequence and rapid evolution of the rice pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* PXO99^A. *BMC genomics*, 2008, 9: 204.
- [30] Roine E, Wei WS, Yuan J, Nurmiaholaassila EL, Kalkkinen N, Romantschuk M, He SY. Hrp pilus: an hrp-dependent bacterial surface appendage produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *PNAS*, 1997, 94(7): 3459–3464.
- [31] Han XS, Shen DX, Xiong Q, Bao BH, Zhang WB, Dai TT, Zhao YJ, Borriss R, Fan B. The plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42 controls the soybean pathogen *phytophthora sojae* due to bacilysin production. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(23): e0160121.
- [32] Meng QX, Jiang H, Hao JJJ. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth. *Biological Control*, 2016, 98: 18–26.
- [33] 廖开吉, 罗媛, 夏振远, 魏海雷, 曾凯芳. 具有III型分泌系统的 *Pseudomonas moraviensis* FP1761 植物益生功能及其全基因组分析. *植物病理学报*, 2020, 50(6): 748–757.
- Liao KJ, Luo Y, Xia ZY, Wei HL, Zeng KF. Characterization of plant probiotic traits and whole-genome analysis of a type III secretion system harboring bacterium *Pseudomonas moraviensis* FP1761. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2020, 50(6): 748–757. (in Chinese)
- [34] Tzipilevich E, Russ D, Dangel JL, Benfey PN. Plant immune system activation is necessary for efficient root colonization by auxin-secreting beneficial bacteria. *Cell Host & Microbe*, 2021, 29(10): 1507–1520.e4.
- [35] Sun XL, Xu ZH, Xie JY, Hesselberg-Thomsen V, Tan TM, Zheng DY, Strube ML, Dragoš A, Shen QR, Zhang RF, Kovács ÁT. *Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions. *The ISME Journal*, 2022, 16(3): 774–787.
- [36] Liu HY, Zeng QC, Yalimaimaiti N, Wang W, Zhang RF, Yao J. Comprehensive genomic analysis of *Bacillus velezensis* AL7 reveals its biocontrol potential against *Verticillium* wilt of cotton. *Molecular Genetics and Genomics*, 2021, 296(6): 1287–1298.
- [37] Xu ZH, Shao JH, Li B, Yan X, Shen QR, Zhang RF. Contribution of bacillomycin D in *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 to antifungal activity and biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(3): 808–815.
- [38] 冯江鹏, 邱莉萍, 梁秀燕, 陈碧秀, 夏海洋, 彭春龙, 钟永军. 草莓胶孢炭疽菌拮抗细菌贝莱斯芽孢杆菌 JK3 的鉴定及其抗菌活性. *浙江农业学报*, 2020, 32(5): 831–839.
- Feng JP, Qiu LP, Liang XY, Chen BX, Xia HY, Peng CL, Zhong YJ. Identification of antagonistic bacteria *Bacillus velezensis* JK3 against anthracnose of strawberry and its antipathogenic activity. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(5): 831–839. (in Chinese)
- [39] Chen L, Liu YP, Wu GW, Veronican Njeri K, Shen QR, Zhang N, Zhang RF. Induced maize salt tolerance by rhizosphere inoculation of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9. *Physiologia Plantarum*, 2016, 158(1): 34–44.
- [40] Simunovic V, Zapp J, Rachid S, Krug D, Meiser P, Müller R. Myxovirescin A biosynthesis is directed by hybrid polyketide synthases/nonribosomal peptide synthetase, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthases, and trans-acting acyltransferases. *ChemBiochem*, 2006, 7(8): 1206–1220.
- [41] Chatterjee S, Chatterjee DK, Jani RH, Blumbach J, Ganguli BN, Klesel N, Limbert M, Seibert G. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. *In vitro* and *in vivo* antibacterial activity. *The Journal of Antibiotics*, 1992, 45(6): 839–845.
- [42] Chatterjee S, Lad SJ, Phansalkar MS, Rupp RH, Ganguli BN, Fehlhaber HW, Kogler H. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization. *The Journal of Antibiotics*, 1992, 45(6): 832–838.