

研究报告

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus 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

王麒^{1,2}, 许婧霞^{1,2}, 张亚妮², 孙婧³, 张升潮³, 王腊³, 冯作山⁴, 易菊平², 杨亚珍^{*1}, 胡洪涛^{*2}

1 长江大学生命科学学院, 湖北 荆州 434025

2 湖北省生物农药工程研究中心, 湖北 武汉 430064

3 武昌首义学院, 湖北 武汉 430064

4 北京嘉博文生物科技有限公司, 北京 100015

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. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus 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 Qi, XU Jingxia, ZHANG Yani, SUN Jing, ZHANG Shengchao, WANG La, FENG Zuoshan, YI Juping, YANG Yazhen, HU Hongtao. *Bacillus velezensis* JJYY against soil-borne diseases: biocontrol effect, whole genome sequencing, and antimicrobial components[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 155-171.

摘要:【背景】土传病害是世界农业可持续发展的关键限制因子, 在我国蔬菜和中药材上发生日趋严重, 引起严重的连作障碍。生物防治对环境和农产品安全, 是目前研究的热点和重点。【目的】明确对土传病原菌具有广谱抗菌活性菌株 JJYY 的种类及其防控效果和主要抗菌产物, 为新型生物农药开发奠定基础。【方法】结合扫描电镜观察、生理生化分析和 16S rRNA 基因扩增测序技术鉴定菌株 JJYY。分别利用比浊法和菌丝生长抑制法测定该菌提取物对 4 种土传病原细菌和 5 种土传病原真菌的 EC_{50} , 利用盆栽试验评价对番茄青枯病等病害的防控效果。利用二代 Illumina NovaSeq 与三代 PacBio Sequel 相结合测序技术对菌株 JJYY 进行全基因组测序, 使用 PGAP 等软件进行基因注释等分析, 利用反相制备液相色谱和质谱初步分离鉴定抗菌物质。【结果】菌株 JJYY 是一株贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), 该菌提取物对 4 种土传细菌和 5 种土传真菌的 EC_{50} 分别为 0.940–1.092 mg/mL 和 2.733–3.678 mg/mL。对番茄青枯病、菊花根腐病和辣椒枯萎病的最高防效在 80.00%–87.74%之间, 与化学药剂链霉素或噁霉灵无显著差异($P>0.05$)。该菌基因组大小为

资助项目: 湖北省重点研发计划(2021BBA226); 湖北省农业科技创新中心重大项目(2020-620-000-002-06); 河北省土传病害绿色防控技术创新中心开放课题(2021K01)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Hubei Province (2021BBA226), the Major Project of Agricultural Science and Technology Innovation Center of Hubei Province (2020-620-000-002-06), and the Open Project of Green Control Technologies Innovation Center of Soil-borne Diseases of Hebei Province (2021K01).

*Corresponding authors. E-mail: YANG Yazhen, yyangyazhen@163.com; HU Hongtao, hongtaohu@hbaas.com

Received: 2023-05-31; Accepted: 2023-07-05; Published online: 2023-08-16

3 929 792 bp, 编码 3 895 个基因, 与 *B. velezensis* JS25R 和 *B. subtilis* 168 具有 3 445 个和 2 997 个同源编码基因。预测该基因组共有 12 个次级代谢产物合成功能基因簇。从该菌株提取物中共分离出 9 种抗菌组分, 其中 2 个初步判定为已知大环内酯类抗生素 macrolactin D 和 7-O-malonyl-macrolactin A。

【结论】菌株 JJYY 是一株对土传病原细菌和真菌病害均有较高防效的贝莱斯芽孢杆菌, 该菌基因组与已知贝莱斯芽孢杆菌不同, 并产生多种已知和未知的抗菌物质, 继续深入分析鉴定其抗菌物质和抗菌机制将为开发新型高效的生物农药奠定良好基础。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 土传病害; 青枯病; 抗菌活性; 反相制备液相色谱; 质谱

***Bacillus velezensis* JJYY against soil-borne diseases: biocontrol effect, whole genome sequencing, and antimicrobial components**

WANG Qi^{1,2}, XU Jingxia^{1,2}, ZHANG Yani², SUN Jing³, ZHANG Shengchao³, WANG La³, FENG Zuoshan⁴, YI Juping², YANG Yazhen^{*1}, HU Hongtao^{*2}

1 College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou 434025, Hubei, China

2 Hubei Biopesticide Engineering Research Center, Wuhan 430064, Hubei, China

3 Wuchang Shouyi University, Wuhan 430064, Hubei, China

4 Beijing Goldenway Bio-Tech Co., Ltd., Beijing 100015, China

Abstract: [Background] Soil-borne diseases are a key factor limiting the agriculture sustainable development in the world and become increasingly serious in vegetables and Chinese medicinal herbs in China, leading to critically continuous-cropping obstacles. Biocontrol of soil-borne diseases, without causing safety problems to the environment and agricultural products, is a hot research topic. **[Objective]** To identify the strain JJYY with a broad antimicrobial spectrum to soil-borne pathogens, evaluate its control effects on major soil-borne diseases, and identify its major antimicrobial metabolic products. **[Methods]** This strain was identified by a combination of morphological observation with scanning electron microscopy, physiological and biochemical tests, and 16S rRNA gene sequencing. Turbidimetry and mycelial growth inhibition assay were employed to determine the EC_{50} of this strain against four soil-borne bacterial pathogens and five fungal pathogens, respectively. Pot experiments were carried out to evaluate the control effects of the strain on tomato bacterial wilt and other diseases. Illumina NovaSeq and PacBio Sequel were used for whole genome sequencing of this strain, followed by functional annotation in PGAP. Preparative reversed-phase liquid chromatography (prep-RPLC) and mass spectrometry (MS) were employed to isolate and identify the metabolites of this strain. **[Results]** The strain JJYY was identified as *Bacillus velezensis*. The EC_{50} values of the extract of this strain against four soil-borne bacterial pathogens and five soil-borne fungal pathogens were 0.940–1.092 mg/mL and 2.733–3.678 mg/mL, respectively. The strain showed the highest control effects of 80.00%–87.74% on tomato bacterial wilt, *Chrysanthemum morifolium* root rot, and capsicum *Fusarium* wilt, with no significant difference compared with streptomycin or hymexazol ($P>0.05$). The whole genome of

this strain was 3 929 792 bp in length, carrying 3 895 genes. The genome of this strain shared 3 445 and 2 997 homologous genes with *B. velezensis* JS25R and *B. subtilis* 168, respectively. Twelve gene clusters were predicted to be associated with the synthesis of secondary metabolites. A total of 9 antimicrobial components were separated from the extract of this strain, of which two were preliminarily identified as macroactin D and 7-O-malonyl-macroactin A. **[Conclusion]** *B. velezensis* JJYY demonstrates definite control effects on both soil-borne bacterial and fungal diseases, with the genome distinct from reported *B. velezensis* strains. It produces diverse known and possible novel antibiotics. Identifying the antimicrobial substances and deciphering the antimicrobial mechanisms of this strain would facilitate the development of novel effective biocontrol agents.

Keywords: *Bacillus velezensis*; soil-borne disease; bacterial wilt; antimicrobial activities; preparative reverse-phase liquid chromatography; mass spectrometry

土传病害是潜伏在土壤中的病原菌从作物根部或茎基部侵染导致的病害,该病害在世界上广为分布并造成严重损失,轻者导致 30%左右的产量损失,重者损失达到 70%以上^[1]。我国耕地因复种指数高,土传病害在我国呈加重发生趋势,是连作障碍的主要原因^[2]。土传病原菌种类繁多,主要分为细菌、真菌和病毒等,以细菌性和真菌性土传病害分布最为广泛。细菌性土传病害以青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的青枯病发生最为严重,可感染 50 多个科的 200 多种植物^[3],其中茄科作物受害最重,经常导致毁灭性损失;真菌性土传病害以镰刀菌(*Fusarium*)引起的根腐病和枯萎病等危害最为严重,在蔬菜、中药材等作物上广为发生^[4-5],造成作物产量显著下降,尤其影响中药材的品质和疗效^[6]。目前,土传病害的防治方法主要分为化学防治、生物防治、农业防治等。化学防治是目前最主要的防治措施,但长期大量地使用化学农药,不仅导致病原菌产生较为严重的抗药性^[7],而且造成环境和食品安全问题^[8-9]。农业防治主要包括种植抗病品种、改变种植制度或方式,如采用水旱轮作、间作套种^[10]等来控制土传病害的发生,其中以选育抗病品种最为经济有效,但病原菌变异快,品种抗性易丧失^[11],并且缺乏高

抗细菌性病害的商业化品种。生物防治是利用有益微生物来防控病害的方法,同化学防治相比,该方法不仅环境兼容性好,对土壤、水体等无污染,而且在农产品中无残留^[12]。此外,许多有益微生物不仅能抑制病原菌的生长,同时还能够在作物根系形成生物膜来抵御病原菌的入侵^[13-14],部分菌株还能诱导作物抗性基因的表达,提高作物的抗病性^[15]。因此,生物防治成为世界研究的热点和重点,芽孢杆菌因具有良好的抗菌性和能产生抗逆性的芽孢,一直是生物防治研究的重点,其中许多菌株,包括解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌等^[16],现已被开发成生物农药且在农业中广泛应用。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)是近年新发现的一种芽孢杆菌属细菌,具有抑菌活性好、抗菌谱广等特点^[17-18],如贝莱斯芽孢杆菌 TSA32-1 菌株能抑制禾谷镰刀菌、链格孢等 16 种植物病原真菌菌丝的生长^[19]。贝莱斯芽孢杆菌 SF327 菌株对稻瘟病菌等病原菌生长抑制率在 58.57%–75.92%之间,对水稻白叶枯病的田间防效为 87.27%^[20]。另外,贝莱斯芽孢杆菌还能产生吲哚乙酸(indoleacetic acid, IAA)与铁载体,可促进作物生长与根系发育^[21]。尽管目前已筛选出多种对植物病害具有较好的防控效果的微生物菌株,但针对土传病害的研究

不多,具有土传病原真菌和细菌双重抗菌活性的菌株更少,而且多数仅限于防控效果研究,未深入分析其有效成分和抗菌机制,导致其在生产中应用效果不稳定,使用范围受到限制。

本研究分离到一株具有高效抑菌活性的菌株,为更好利用该菌株,利用扫描电镜和分子鉴定等技术明确了它的分类地位,利用第2代Illumina NovaSeq与第3代PacBio Sequel相结合的测序技术对该菌基因组进行了测序分析,并进行了种内和近缘种的基因组比较和合成次生代谢产物基因簇挖掘,同时利用反相高效液相色谱和质谱对其抗菌组分进行了初步分离和鉴定,继续深入研究该菌的抗菌机制和完善生产加工工艺,将为开发新一代防控土传病害的生物农药奠定良好基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 供试病原菌

本研究所用4种土传病原细菌分别为番茄青枯菌生理小种1号、生姜青枯菌生理小种4号、胡萝卜软腐果胶杆菌(*Pectobacterium carotovorum*)和菊果胶杆菌(*Pectobacterium chrysanthemi*);5种土传病原真菌分别为福白菊腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、辣椒尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*),以及菌株JJYY均由湖北省生物农药工程研究中心保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

720 IU/mg链霉素,上海源叶生物科技有限公司;30%噁霉灵水剂,四川润尔科技有限公司;TruSeq™ DNA Sample Prep Kit, 因美纳(中国)科学器材有限公司;Smrtbell Template Prep Kit 1.0, Pacific Biosciences。二代测序仪,因美纳(中

国)科学器材有限公司;三代测序仪, Pacific Biosciences;场发射扫描电镜(scanning electron microscope, SEM),日立(中国)有限公司;制备液相色谱仪、色谱柱、超高效液质联用,沃特世科技(上海)公司;NanoDrop 仪,赛默飞世尔科技公司。

1.1.3 培养基

LB培养基参考文献[22]配制,PDA培养基参考文献[22]配制,PDB培养基为不加琼脂的PDA培养基,TTC培养基参考文献[23]配制,SPA培养基参考文献[23]配制,豆粕培养基(g/L):豆粕12.5,玉米淀粉10.0,玉米浆5.5,pH7.5。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 形态学鉴定

将-80℃甘油管保存的菌株JJYY在LB平板上活化,28℃条件下培养24-48h,观察菌落形态,采用Guo等^[24]方法制备样品用于扫描电镜观察。

1.2.2 生理生化鉴定

参照文献[25]与《常见细菌系统鉴定手册》^[26]所述方法进行生理生化鉴定,包括革兰氏染色、V-P试验、葡萄糖利用、木糖利用、甘露糖利用、蛋白水解、H₂O₂酶、乳糖、淀粉水解等测试。

1.2.3 16S rRNA 基因序列扩增与同源分析

采用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法^[27]提取菌株JJYY基因组DNA,采用16S rRNA基因通用引物27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTTCAG-3')进行PCR扩增^[28],测序后在NCBI网站上进行BLAST^[29]比对,并利用MEGA 11.0软件采用邻接法构建系统发育树^[30]。

1.3 代谢产物提取

采用乙酸乙酯萃取法^[31]提取菌株JJYY代谢

产物, 所得提取物于-20℃冰箱保存。

1.4 对土传病原菌 EC_{50} 测定

分别采用比浊法^[32]和菌丝生长抑制法^[33]测定菌株 JJYY 乙酸乙酯提取物对 4 种土传病原细菌和 5 种土传病原真菌的 EC_{50} 。

1.5 对 3 种土传病害的防控效果评价

1.5.1 菌株发酵液制备

取-80℃甘油管保存的菌株 JJYY 在 LB 培养基上活化 24 h, 挑取单菌落于豆粕培养基中 28℃、150 r/min 振荡培养 48 h, 调整菌液浓度至 10^8 、 10^7 和 10^6 CFU/mL 备用。

1.5.2 病原菌制备

番茄青枯菌的制备: 取-80℃甘油管保存的番茄青枯菌在 TTC 培养基上活化 48 h, 挑取中间粉红色、周围白边的单菌落接种于 SPA 培养基中 28℃、150 r/min 发酵 48 h, 调整菌液浓度至 10^8 CFU/mL 备用。

福白菊腐皮镰刀菌孢子悬浮液制备: 取-80℃甘油管保存的腐皮镰刀菌菌株在 PDA 培养基上活化 48 h, 挑取单菌落菌丝块于 PDB 液体培养基中 28℃、150 r/min 振荡培养 72 h, 发酵液采用四层无菌纱布过滤, 调整孢子浓度至 10^7 个孢子/mL。

辣椒尖孢镰刀菌孢子悬浮液制备: 参照福白菊腐皮镰刀菌孢子悬浮液制备方法制备 10^7 个孢子/mL 辣椒尖孢镰刀菌孢子悬浮液。

1.5.3 对番茄青枯病防控效果的评价

将 3 种不同浓度的 JJYY 发酵液按 10 mL/株灌到 4-6 叶期番茄苗根部, 24 h 后接种 5 mL 浓度为 10^8 CFU/mL 的番茄青枯菌, 链霉素作为化学药剂对照, 无菌水作为空白对照, 每个处理 10 株, 3 个重复。幼苗放置于温室中培养, 温度 30℃, 12 h 光照, 12 h 黑暗。接种 15 d 后观察发病情况, 调查病情指数, 番茄青枯病病情分级标准^[34]如下: 0 级: 无症状; 1 级: 1%-25%

萎蔫; 2 级: 26%-50%萎蔫; 3 级: 51%-75%萎蔫; 4 级: 76%-100%萎蔫。

1.5.4 对福白菊根腐病和辣椒枯萎病防控效果的评价

试验分别采用温室培养健康的 4-6 叶期福白菊和辣椒幼苗, 方法如下: 将不同浓度的菌株 JJYY 发酵液按照 10 mL/株灌入幼苗根部。24 h 后, 灌入 5 mL 10^7 个孢子/mL 腐皮镰刀菌孢子悬浮液(福白菊), 或尖孢镰刀菌孢子悬浮液(辣椒)。30%噁霉灵 1 000 倍液为阳性对照, 无菌水作为空白对照。每个处理 10 株, 3 个重复。温室培养条件: 温度 28℃, 12 h 光照, 12 h 黑暗。接种 30 d 后, 分别调查福白菊与辣椒病情指数。

福白菊根腐病病情指数分级标准如下: 0 级: 叶片无症状; 1 级: 1%-25%叶片枯萎变黄; 2 级: 26%-50%叶片枯萎变黄; 3 级: 51%-75%叶片枯萎变黄; 4 级: 76%以上叶片枯萎变黄。辣椒枯萎病病情分级标准^[35]如下: 0 级: 叶片无症状; 1 级: 1%-25%叶片枯萎; 2 级: 26%-50%叶片枯萎; 3 级: 51%-75%叶片枯萎; 4 级: 76%-100%叶片枯萎, 植株死亡。

1.5.5 防效计算方法

病情指数和防效采用下列公式进行计算:

病情指数 =

$$\frac{\sum(\text{各级病株数} \times \text{相对级数值})}{\text{调查总株数} \times 4} \times 100;$$

防效(%) =

$$\frac{(\text{空白对照病指} - \text{处理病指})}{\text{空白对照病指}} \times 100。$$

采用 IBM SPSS 19 调用 Duncan 法计算不同处理防效的方差显著性。

1.6 代谢产物分离和鉴定

参照张亚妮等^[36]方法采用反相制备液相色谱对菌株 JJYY 发酵提取物进行初步分离纯化, 使用氮吹仪将分离组分干燥后使用甲醇进行溶解使其浓度为 2 mg/mL, 采用牛津杯法^[37]对分离

得到的组分对青枯菌的抑制活性进行检测,分别取 100 μL 加入至牛津杯,每个组分重复 3 次,甲醇为对照,对有活性的组分采用超高效液质联用进行分析。根据组分的分子离子、碎片离子、紫外吸收光谱和保留时间等数据,查阅相关文献进行化合物初步鉴定。

1.7 全基因组测序与分析

1.7.1 基因组 DNA 提取

采用 CTAB 法^[27]提取菌株 JJYY 基因组 DNA,所得 DNA 使用 1%琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 仪检测其完整性和纯度,测试合格后用于基因组测序。

1.7.2 基因组测序与组装

按照厂家说明书,分别采用 TruSeq™ DNA Sample Prep Kit 和 Smrtbell Template Prep Kit 1.0 制备二代和三代测序文库。采用 FastQC v0.11.7^[38]对 Illumina NovaSeq 测序数据进行质量控制,使用 AdapterRemoval v2.2.2^[39]过滤低质量 reads 和接头,采用 SOAPec v2.03^[40]对所有 reads 进行质量校正,获得高质量的 reads 序列。PacBio Sequel 数据使用 CANU v1.7.1^[41]进行拼接,使用 Pilon v1.18^[42]对拼装序列利用 Illumina NovaSeq 数据进行碱基校正。所有软件均采用默

认参数。

1.7.3 生物信息学分析

采用 NCBI 原核基因组注释工具 Prokaryotic Genome Annotation Pipeline 对菌株 JJYY 基因组进行注释。采用 MCSanX^[43]对菌株 JJYY 与 *B. velezensis* JS25R (GenBank 登录号为 CP009679)和 *B. subtilis* 168 (GenBank 登录号为 AL009126)进行共线性分析,采用 Mauve 软件^[44]对结果进行可视化。采用 antiSMASH v7.0^[45]分析合成次生代谢产物的基因簇。

2 结果与分析

2.1 菌株 JJYY 鉴定结果

2.1.1 形态学鉴定结果

菌株 JJYY 在 LB 培养基上生长的菌落呈乳白色、半透明状,表面褶皱,有黏性(图 1A)。菌体为杆状,大小为 2.0–3.5 μm (图 1B)。

2.1.2 生理生化鉴定结果

菌株 JJYY 生理生化鉴定结果见表 1。该菌株革兰氏染色、V-P 试验、葡萄糖利用、木糖利用、甘露糖利用、蛋白水解、 H_2O_2 酶、乳糖、淀粉水解、脲酶、甘油、果糖利用、蔗糖利用和柠檬酸盐利用阳性,甲基红、硝酸还原阴性。

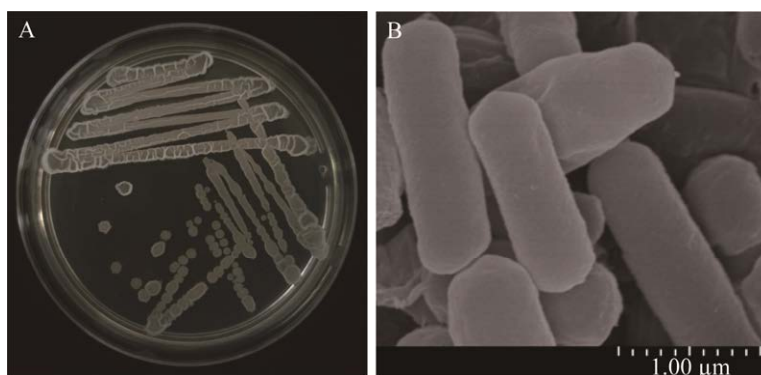


图 1 菌株 JJYY 菌落和菌体图 A: LB 培养基上的菌落. B: 菌体扫描电镜图

Figure 1 The colonies and SEM image of cells of the strain JJYY. A: The colonies on LB medium. B: The SEM image of cells of the strain JJYY.

表 1 菌株 JJYY 的生理生化分析结果

Table 1 Results of physiological and biochemical assays of the strain JJYY

Test item	Result	Test item	Result
Gram stain	+	Proteolysis	+
Methyl red test	-	Catalase	+
V-P test	+	Lactose	+
Nitrate reduction	-	Starch hydrolysis	+
Citrate	+	Urease	+
Glucose	+	Glycerol	+
Xylose	+	Fructose	+
Mannose	+	Sucrose	+

+: 阳性反应; -: 阴性反应

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

2.1.3 16S rRNA 基因鉴定结果

采用通用引物 27F/1492R 扩增出菌株 JJYY 的 16S rRNA 基因长度为 1 000 bp (GenBank 登录号为 OQ749654), 在 NCBI 数据库中进行同源

性序列比对(图 2), 该菌株的 16S rRNA 基因序列与 *B. velezensis* GS-7 (GenBank 登录号为 MT365117)相似性最高, 为 99.80%。综合形态学、生理生化和 16S rRNA 基因鉴定结果, 将该菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) JJYY。

2.2 对 3 种土传病害的防控效果

2.2.1 对重要土传病原菌 EC_{50} 测定结果

菌株 JJYY 代谢产物对 9 种土传病原菌的 EC_{50} 测定结果见表 2。对 4 种土传病原细菌的 EC_{50} 在 0.940–1.092 mg/mL 之间, 对菊果胶杆菌的 EC_{50} 最小(0.940 mg/mL), 然后依次为生姜青枯菌(0.949 mg/mL)、胡萝卜软腐果胶杆菌(1.069 mg/mL)和番茄青枯菌(1.092 mg/mL); 对 5 种土传病原真菌的 EC_{50} 在 2.733–3.678 mg/mL 之间, 对腐皮镰刀菌的 EC_{50} 最小(2.733 mg/mL), 然后依次为尖孢镰刀菌(2.900 mg/mL)、辣椒疫霉菌(3.001 mg/mL)、核盘菌(3.377 mg/mL)和立枯丝核菌(3.678 mg/mL)。

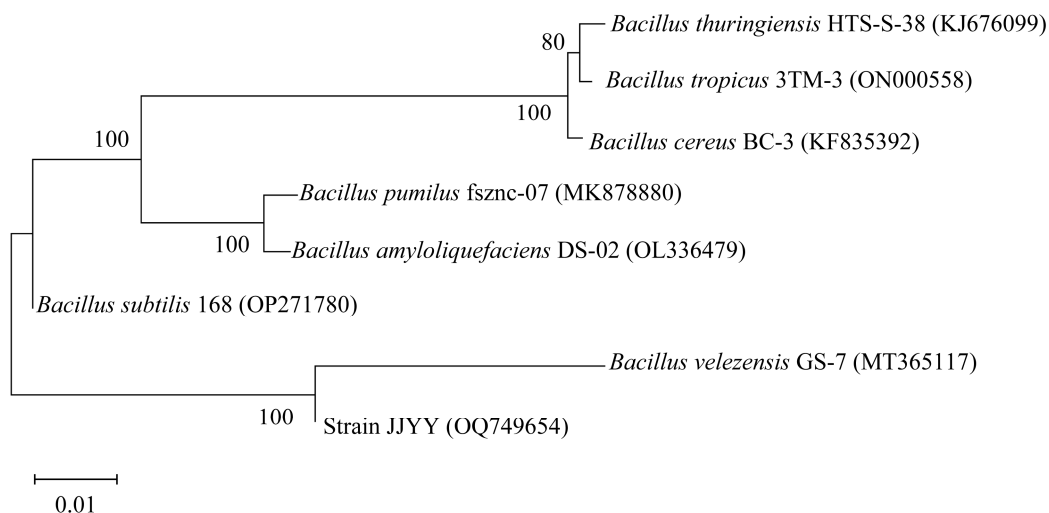


图 2 菌株 JJYY 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中序号代表菌株的登录号; 分支点上的数字代表 bootstrap 值; 标尺代表进化距离

Figure 2 Phylogenetic tree of the strain JJYY based on 16S rRNA gene sequence. Number in parentheses represent the accession number of the strain in GenBank; The number on the branch point represents the bootstrap; The scale represents the evolutionary distance.

表 2 菌株 JJYY 对 9 种土传病原菌的 EC_{50} 测定结果Table 2 Measurements of EC_{50} of the strain JJYY to 9 soil-borne pathogens

Type	Plant soil borne pathogens	Host plants	EC_{50} (mg/mL)	Regression equation	R^2
Bacteria	<i>R. solanacearum</i>	Tomato	1.092	$Y=0.529X-0.521$	0.932
	<i>R. solanacearum</i>	Ginger	0.949	$Y=0.724X-0.621$	0.920
	<i>P. carotovorum</i>	Rape	1.069	$Y=0.517X-0.495$	0.945
	<i>P. chrysanthemi</i>	Konjak	0.940	$Y=0.648X-0.536$	0.944
Fungi	<i>F. solani</i>	<i>Chrysanthemum morifolium</i>	2.733	$Y=0.157X-0.332$	0.936
	<i>F. oxysporum</i>	Pepper	2.900	$Y=0.136X-0.299$	0.929
	<i>S. sclerotiorum</i>	Rape	3.377	$Y=0.122X-0.335$	0.951
	<i>P. capsica</i>	Pepper	3.001	$Y=0.092X-0.170$	0.932
	<i>R. solani</i>	Cucumber	3.678	$Y=0.095X-0.276$	0.945

2.2.2 对 3 种重要土传病害的防控效果

菌株 JJYY 对番茄青枯病、福白菊根腐病和辣椒枯萎病的防控效果见表 3。在 3 种不同浓度 JJYY 发酵液处理中,以 10^8 CFU/mL 处理对番茄青枯病的病情指数最低(10.83)且防效最高(87.74%),其防效与链霉素处理相比无显著差异(90.57%, $P>0.05$),高于 10^7 CFU/mL 处理(84.91%),显著高于 10^6 CFU/mL 处理(69.81%, $P<0.05$)。

对福白菊根腐病的防效,以 10^8 CFU/mL 处理病情指数最低(13.33)且防效最高(82.02%),其防效高于 10^7 CFU/mL 处理(77.53%),显著高于 10^6 CFU/mL 处理(60.67%, $P<0.05$),而与噻霉灵处理相比无显著差异(84.27%, $P>0.05$)。

对辣椒枯萎病的防效,以 10^8 CFU/mL 处理的病情指数最低(14.17)且防效最高(80.00%),其防效高于 10^7 CFU/mL 处理(75.29%),显著高于 10^6 CFU/mL 处理(61.18%, $P<0.05$),而与噻霉灵处理相比无显著差异(82.35%, $P>0.05$)。

2.3 全基因组测序与分析

菌株 JJYY 基因组二代测序深度为 $241\times$,三代测序深度为 $571\times$,基因组组装后得到 1 个 contig (图 3),整个基因组(GenBank 登录号为 CP122460)大小为 3 929 792 bp, G+C 含量为 46.50%,该基因组含有 3 895 个基因,3 777 个编码序列(coding sequences, CDS),86 个 tRNA,27 个 rRNA 基因(5S、16S 和 23S rRNA 各 9 个),5 个 non-coding RNAs (ncRNAs)。

表 3 菌株 JJYY 对 3 种土传病害的防控效果

Table 3 The control effect of the strain JJYY on 3 soil-borne diseases

Treatment	Tomato bacterial wilt		<i>Chrysanthemum</i> root rot		Pepper <i>Fusarium</i> wilt	
	Disease incidence	Control efficiency (%)	Disease incidence	Control efficiency (%)	Disease incidence	Control efficiency (%)
10^6 CFU/mL	26.67±3.82b	69.81±4.32b	29.17±5.20b	60.67±7.02b	27.50±4.33b	61.18±6.11b
10^7 CFU/mL	13.33±3.82c	84.91±4.32a	16.67±1.44c	77.53±1.95a	17.50±2.50c	75.29±3.53a
10^8 CFU/mL	10.83±1.44c	87.74±1.63a	13.33±2.89c	82.02±3.89a	14.17±3.82c	80.00±5.39a
Streptomycin	8.33±3.82c	90.57±4.32a	—	—	—	—
Hymexazol	—	—	11.67±1.44c	84.27±1.95a	12.50±2.50d	82.35±3.53a
CK	88.33±1.44a	—	74.17±7.22a	—	70.83±2.89a	—

—: 无; 同列数据后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异显著

—: None; Different lowercase letters behinds the data in the same column represented significant difference at $P<0.05$ level.

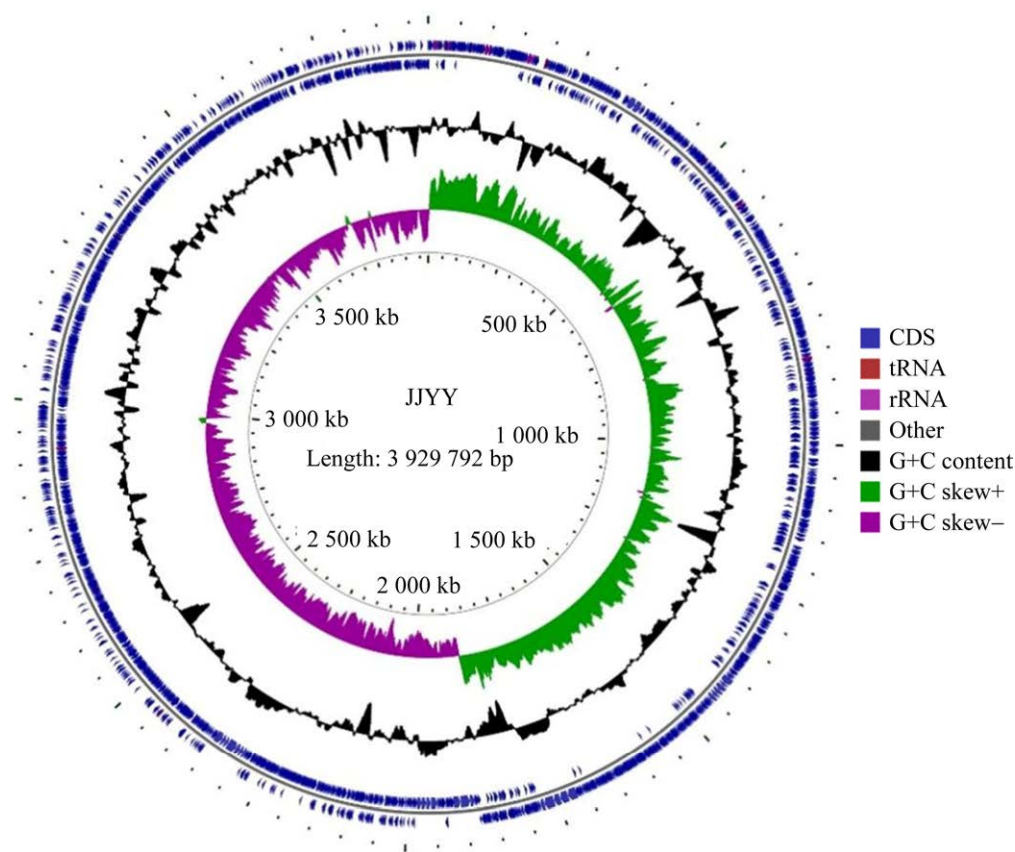


图3 菌株 JJYY 基因组圈图 从内到外,第1圈代表基因组序列位置坐标;第2圈代表 G+C skew;第3圈代表 G+C 含量;第4圈和第5圈代表 CDS、tRNA 及 rRNA 在基因组上的位置

Figure 3 Genomic map of the strain JJYY. From the inside to the outside of the genomic map image, the first circle represents position marker; The second circle represents G+C skew; The third circle represents the G+C content; The fourth and fifth circles represent the positions of CDS, tRNAs and rRNAs, respectively.

如图4所示,基因组共线性分析结果表明该菌株与 *B. velezensis* JS25R 有 3 445 个同源基因,占菌株 JJYY 编码基因数 91.21%,与 *B. subtilis* 168 有 2 997 个同源基因,占菌株 JJYY 编码基因数 79.35%。

2.4 基因组功能注释

在 NR、Swiss-Prot 等 5 个数据库中对菌株 JJYY 基因功能注释结果见表 4。在 NR 数据库得到注释的功能基因的数量最多,共 3 858 个基因得到注释,占总数的 99.05%;其次为 Swiss-Prot 数据库,共 3 533 个基因得到注释,占总数的 90.71%;eggNOG、GO 和 KEGG 数据库分别有 3 355 (86.14%)、2 737 (70.27%)和

2 162 (55.51%)个基因得到注释。

KEGG 基因功能通路分析获得 8 个不同的代谢功能通路(图 5),其中 BTITE hierarchies 包含基因数量最多(1 413),其次为 metabolism (1 333)、not included in pathway or BRITE (413)、environmental information processing (291)、genetic information processing (208)、cellular processes (160)、human diseases (96)和 organismal systems (67)。进一步分类的二级功能类别中,共有 47 条 KEGG 二级功能类别,其中 genetic information processing、signaling and cellular processes 和 carbohydrate metabolism 通路包含的基因数量最多,分别为 563 (26.04%)、542 (25.07%)和 375 (17.35%)。

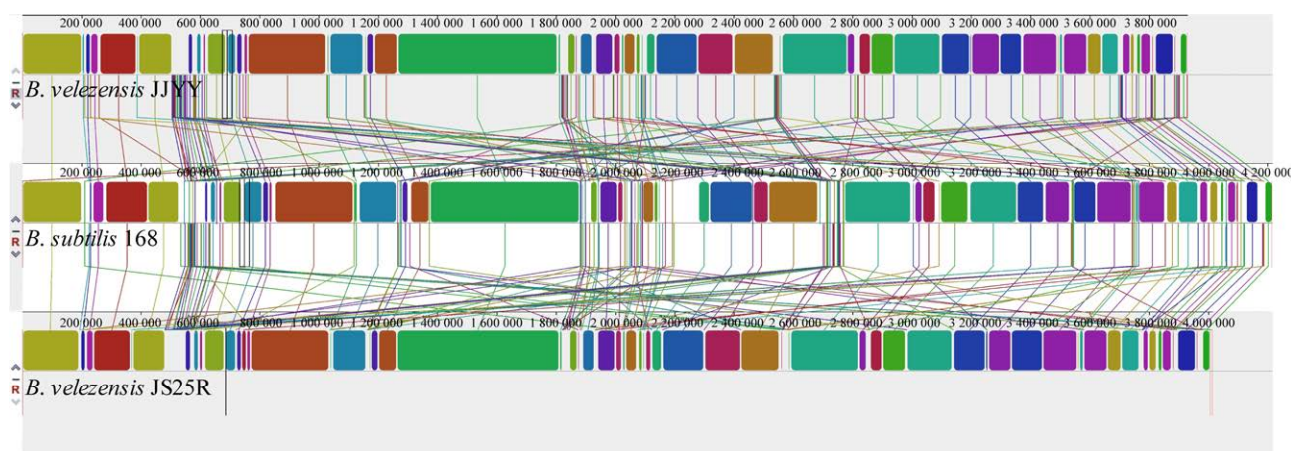


图4 菌株JJYY与*Bacillus velezensis* JS25R和*Bacillus subtilis* 168的共线性分析 跨基因组连接的相同颜色的区域为每个基因组中的同源区块

Figure 4 Synteny analysis of the strain JJYY with *Bacillus velezensis* JS25R and *Bacillus subtilis* 168. Homologous blocks in each genome are shown as identically colored regions linked across genomes.

表4 菌株JJYY基因组在不同数据库中注释结果

Table 4 Results of annotations of the genome of the strain JJYY in different databases

Database	Gene number	Proportion (%)
NR	3 858	99.05
Swiss-Prot	3 533	90.71
eggNOG	3 355	86.14
GO	2 737	70.27
KEGG	2 162	55.51

2.5 次生代谢产物合成基因簇分析结果

预测菌株JJYY基因组存在12个次生代谢产物合成基因簇(表5),其中6个与已知基因簇相似度为100%,分别合成 macrolactin、bacillaene、fengycin、difficidin、bacillibactin 和 bacilysin; 1个与 surfactin 合成基因簇相似度为82%,1个与 butirosin A/butirosin B 合成基因簇相似度为7%。此外4个次生代谢产物基因簇与已知的基因簇无相似性,分别合成1个II类羊毛硫肽类化合物(lantipeptide-class-II)、1个III型聚酮合酶(T3PKS)类和2个萜类。

2.6 抗菌成分分离和鉴定结果

菌株JJYY代谢产物经反向制备液相色谱分离获得30个组分,如图6所示,其中9个组分表现出抗青枯菌活性,保留时间(retention time, RT)分别为13.30、13.65、14.18、15.30、15.75、16.80、17.30、18.93和24.90 min,其抑菌圈半径(inhibition zone radius, IR)在0.60–1.70 cm之间。质谱分析结果表明组分4(RT: 15.30 min)最大紫外吸收峰值为227 nm; 264 nm, ESI-MS m/z : 663.46 $[M-H]^-$, 687.53 $[M+Na]^+$, 正离子模式下主要碎片离子为349.34、367.36和385.57,得出该化合物分子量为664.46;组分8(RT: 18.93 min)最大紫外吸收峰值为226 nm; 262 nm, ESI-MS m/z : 487.63 $[M-H]^-$, 511.53 $[M+Na]^+$, 正离子模式下主要碎片离子为349.44、367.55,得出该化合物分子量为488.35。这2种化合物质谱特征与文献[46]报道的 macrolactin D 和 7-O-malonyl-macrolactin A 的分子量和碎片离子完全一致,因此将其初步推断为 macrolactin D 和 7-O-malonyl-macrolactin A。另外7个组分因成分复杂,有待进一步纯化鉴定。

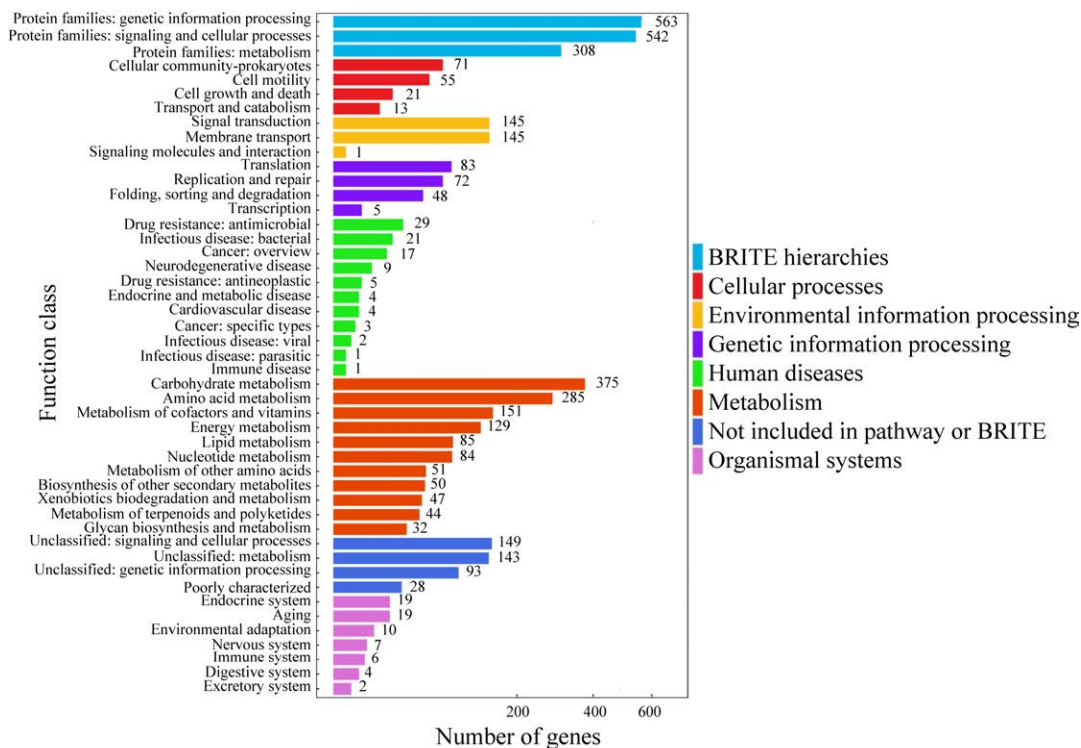


图 5 KEGG 基因组功能注释
Figure 5 KEGG functional annotation of the genome.

表 5 JJYY 菌株次生代谢产物基因簇预测结果
Table 5 Prediction of gene clusters of the strain JJYY for synthesis of secondary metabolites

Cluster ID	Type	Gene-start	Gene-end	Most similar known cluster	Similarity (%)
Cluster 1	NRPS	323 410	387 387	Surfactin	82
Cluster 2	PKS-like	924 057	965 301	Butirosin A/Butirosin B	7
Cluster 3	Terpene	1 050 180	1 067 588	—	—
Cluster 4	Lanthipeptide-class-II	1 188 578	1 217 466	—	—
Cluster 5	transAT-PKS	1 384 086	1 471 921	Macrolactin	100
Cluster 6	trasAT-PKS, T3PKS, NRPS	1 691 450	1 792 015	Bacillaene	100
Cluster 7	NRPS, trasAT-PKS, betalactone	1 865 757	2 000 067	Fengycin	100
Cluster 8	Terpene	2 028 705	2 050 588	—	—
Cluster 9	T3PKS	2 113 906	2 155 006	—	—
Cluster 10	transAT-PKS	2 282 382	2 376 174	Difficidin	100
Cluster 11	NRP-matallophore, NRPS, RiPP-like	3 000 878	3 052 669	Bacillibactin	100
Cluster 12	Other	3 588 979	3 630 397	Bacilysin	100

—: 未预测到相似的基因簇
—: No similar gene cluster is predicted.

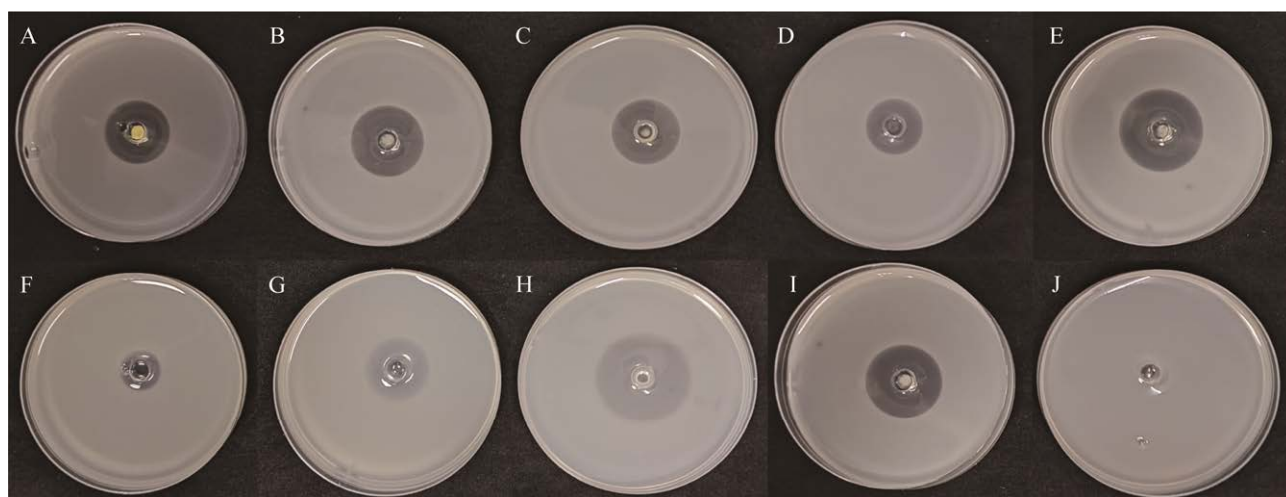


图6 分离得到9种抗菌组分对青枯菌抗性结果 A: 组分1 [RT: 13.30 min, IR=(1.30±0.10) cm]. B: 组分2 [RT: 13.65 min, IR=(1.43±0.06) cm]. C: 组分3 [RT: 14.18 min, IR=(1.33±0.06) cm]. D: 组分4 [RT: 15.30 min, IR=(1.03±0.10) cm]. E: 组分5 [RT: 15.75 min, IR=1.70±0.10) cm]. F: 组分6 [RT: 16.80 min, IR=(0.60±0.00) cm]. G: 组分7 [RT: 17.30 min, IR=(1.03±0.06) cm]. H: 组分8 [RT: 18.93 min, IR=(1.53±0.10) cm]. I: 组分9 [RT: 24.90 min, IR=(1.30±0.10) cm]. J: 甲醇处理

Figure 6 Results of identification of antagonistic activities of isolated 9 fractions to *Ralstonia solanacearum*. A: Fraction 1 (RT: 13.30 min, IR=(1.30±0.10) cm). B: Fraction 2 (RT: 13.65 min, IR=(1.43±0.06) cm). C: Fraction 3 (RT: 14.18 min, IR=(1.33±0.06) cm). D: Fraction 4 (RT: 15.30 min, IR=(1.03±0.06) cm). E: Fraction 5 (RT: 15.75 min, IR=(1.70±0.10) cm). F: Fraction 6 (RT: 16.80 min, IR=(0.60±0.00) cm). G: Fraction 7 (RT: 17.30 min, IR=(1.03±0.06) cm). H: Fraction 8 (RT: 18.93 min, IR=(1.53±0.06) cm). I: Fraction 9 (RT: 24.90 min, IR=(1.30±0.10) cm). J: Methanol treatment.

3 讨论与结论

土传病害是农业可持续发展的重要限制因子,因病原菌潜伏于土壤中,从根部或茎基部感染植物,并且受到感染的植物在发病初期并无明显症状,同时病原菌在植物维管束内繁殖,导致植物输导组织完全堵塞,致使药剂无法有效发挥作用^[47],所以预防病原菌感染是防控土传病害的关键。化学防治是防治土传病害的主要措施,但大量的化学农药的使用,导致病原菌抗性增加、环境污染和食品安全问题日益突出^[9-10]。与化学防治比较,生物防治具有以下明显的优点:(1)有益微生物能在根系表面或内部定殖而占领生态位,并能产生生物膜和分泌抗生素,抵御

病原菌的入侵^[13-14,48]。(2)微生物在土壤中具有有一定的繁殖能力,能在较长时间内保持一定的种群数量,并能通过水等媒介进行传播,从而在较大范围内发挥作用^[49]。化学农药在土壤中易被吸收、固定和降解,导致半衰期短和作用范围小^[50]。菌株JJYY是从土壤中分离到的一株对土传病害防控效果较好的贝莱斯芽孢杆菌,该菌株对4种土传病原细菌和5种土传病原真菌的生长具有显著的抑制作用, EC_{50} 在0.940–3.678 mg/mL之间(表2)。该菌对番茄青枯病、菊花根腐病和辣椒枯萎病的预防效果最高达到87.74%,与化学农药噁霉灵或者链霉素无显著差异(表3),说明该菌株对土传病害具有较好的预防效果。目前文献报道的贝莱斯芽孢杆菌多限于对病原真菌

有较好的抑制效果^[19-20], 较少报道其对土传病原细菌以及对真菌和细菌均具有较高的抑制活性, 而菌株 JJYY 对细菌和真菌均具有较好的抑制效果, 说明该菌株具有开发成为新一代防控土传病害生物农药的潜力。

比较基因组分析证实该菌株分别有 91.21% 和 79.35% 编码基因与现有的贝莱斯芽孢杆菌 JS25R 和枯草芽孢杆菌 168 同源(图 2), 说明该菌株基因组与现有贝莱斯芽孢杆菌及其近缘种存在着明显的差异。从该菌株基因组挖掘到 12 个合成次生代谢产物的基因簇, 其中 8 个合成已知的抗生素, 包括 surfactin、bacillaene、fengycin 和 macrolactin 等, 还有 4 个基因簇可能合成新的次生代谢产物(表 5)。通过反向制备液相色谱和质谱分析明确了菌株 JJYY 产生 9 种抗菌活性组分, 其中 2 种初步推断为 macrolactin D 与 7-O-malonyl-macrolactin A 这 2 种大环内酯类抗生素, 而其余 7 种有待进一步鉴定, 该结果与 antiSMASH 预测其基因组中存在 macrolactin 类次生代谢产物基因簇结果一致。Macrolactin 类抗生素能抑制病原真菌孢子萌发、芽管伸长和菌丝生长, 也能破坏细胞膜的结构, 引起细胞膜通透性变化, 造成蛋白质、核酸等生物大分子外泄, 进而导致细胞凋亡^[51], 对土传病原菌如青枯菌、尖孢镰刀菌等生长具有明显抑制效果^[52]。其余预测得到的几种抗生素如 bacillaene 与 difficidin 可通过破坏青枯菌细胞壁和细胞膜的完整性, 并抑制蛋白质的合成而起到抑制青枯菌生长的效果^[53-54]。Fengycin 是一种脂肽, 该物质被报道是贝莱斯芽孢杆菌产生的主要抗菌物质, 能显著抑制青枯菌与尖孢镰刀菌的生长^[17], 并通过对细胞膜的干扰作用来抑制腐皮镰刀菌的生长^[55], 且可诱导植物系统抗性^[56]。Bacillibactin 是一种铁载体类抗生素, 对腐皮镰刀菌、胡萝卜软腐果胶杆菌等多种土传病原菌具有杀菌活性^[57]。

Chen 等^[17]报道贝莱斯芽孢杆菌 FJAT-46737 也产生以上抗生素, 但通过比较发现, 菌株 FJAT-46737 合成 surfactin 的基因簇与现有的基因簇的相似性为 91%, 而菌株 JJYY 的相似性仅为 82%, 说明菌株 JJYY 可能合成与菌株 FJAT-46737 不同的 surfactins。此外, 菌株 JJYY 另外 4 个与已知基因簇无相似度的基因簇合成 II 类羊毛硫肽类化合物、III 型聚酮合酶和 2 个萜类物质。II 类羊毛硫肽类化合物是由核糖体合成的一大类肽类天然产物, 对尖孢镰刀菌菌丝生长具有明显抑制效果^[58]。聚酮合酶是一种多功能酶, 合成了自然界中多种聚酮化合物, 研究表明在真菌感染植物宿主根部后, 植物内生菌通过合成大量聚酮合酶类化合物以及与真菌细胞壁降解相关的酶来抵御病原菌的入侵^[59]。萜类化合物是由甲戊二羟酸衍生、且分子骨架以异戊二烯为基本结构单元的化合物及其衍生物, 是重要的医药和化工原料, 该物质通过调节细菌的氧摄入和氧化磷酸化抑制细菌的呼吸作用起到杀菌作用, 并且对耐药性细菌具有较好的杀菌作用^[60], 而青枯菌是一种含有多个抗生素抗性基因的病原细菌^[61], 容易对常见抗生素产生抗性, 而菌株 JJYY 能合成萜类物质, 将有利于提高对青枯菌尤其是抗性青枯菌的杀菌活性。结合基因簇分析和色谱测定结果, 菌株 JJYY 具有抑制病原菌的能力可能是因为其基因组中存在多个与抗菌活性相关的次级代谢产物编码基因簇, 可通过合成上述代谢产物从而发挥对多种病原菌的抑制效果, 并且菌株 JJYY 除了分泌已知的抗生素发挥抑菌活性外, 还可能产生新的、未知的抗生素。

综上所述, 贝莱斯芽孢杆菌 JJYY 对土传病原细菌和真菌具有较高的抑制效果, 能有效防治重要的土传病害, 进一步深入挖掘其抗菌物质及抗菌机制, 将为开发新的生物农药奠定良好的基础。

REFERENCES

- [1] 曹勘程, 刘晓漫, 郭美霞, 王秋霞, 李园, 欧阳灿彬, 颜冬冬. 作物土传病害的危害及防治技术[J]. 植物保护, 2017, 43(2): 35-36.
CAO AC, LIU XM, GUO MX, WANG QX, LI Y, OUYANG CB, YAN DD. Incidences of soil-borne diseases and control measures[J]. Plant Protection, 2017, 43(2): 35-36 (in Chinese).
- [2] 侯慧, 董坤, 杨智仙, 董艳, 汤利, 郑毅. 连作障碍发生机理研究进展[J]. 土壤, 2016, 48(6): 1068-1076.
HOU H, DONG K, YANG ZX, DONG Y, TANG L, ZHENG Y. Advance in mechanism of continuous cropping obstacle[J]. Soils, 2016, 48(6): 1068-1076 (in Chinese).
- [3] MANSFIELD J, GENIN S, MAGORI S, CITOVSKY V, SRIARIYANUM M, RONALD P, DOW M, VERDIER V, BEER SV, MACHADO MA, TOTH I, SALMOND G, FOSTER GD. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(6): 614-629.
- [4] TONG L, ZHAO CB, LIU JH, YANG LM, ZHUANG M, ZHANG YY, WANG Y, JI JL, KUANG BF, TANG KL, FANG ZY, FUJIMOTO R, LV HH. Resource screening and inheritance analysis of *Fusarium oxysporum* sp. *conglutinans* race 2 resistance in cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*)[J]. Genes, 2022, 13(9): 1590.
- [5] 杨昌贵, 江维克, 杨野, 郭兰萍, 张小波, 张成刚, 赵丹, 张红霞, 周涛. 中药材生产常见病害及用药特征分析与建议[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(11): 2925-2930.
YANG CG, JIANG WK, YANG Y, GUO LP, ZHANG XB, ZHANG CG, ZHAO D, ZHANG HX, ZHOU T. Common diseases and drug use characteristics of Chinese herbal medicines and suggestions[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(11): 2925-2930 (in Chinese).
- [6] 杨兴晶, 刘妍如, 唐志书, 宋忠兴, 常百金, 赵艳婷, 刘长乐. 超高效液相色谱-串联质谱法快速测定沙棘药材及食品制品中 10 种真菌毒素[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(2): 366-373.
YANG XJ, LIU YR, TANG ZS, SONG ZX, CHANG BJ, ZHAO YT, LIU CL. Determination of 10 mycotoxins in *Hippophae* Fructus medicinal and edible products by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2023, 48(2): 366-373 (in Chinese).
- [7] de CHAVES MA, REGINATTO P, Da COSTA BS, de PASCHOAL RI, TEIXEIRA ML, FUENTEFRIA AM. Fungicide resistance in *Fusarium graminearum* species complex[J]. Current Microbiology, 2022, 79(2): 62.
- [8] BJØRLING-POULSEN M, ANDERSEN HR, GRANDJEAN P. Potential developmental neurotoxicity of pesticides used in Europe[J]. Environmental Health, 2008, 7(1): 50.
- [9] KOMÁREK M, ČADKOVÁ E, CHRASTNÝ V, BORDAS F, BOLLINGER JC. Contamination of vineyard soils with fungicides: a review of environmental and toxicological aspects[J]. Environment International, 2010, 36(1): 138-151.
- [10] CHADFIELD VGA, HARTLEY SE, REDEKER KR. Associational resistance through intercropping reduces yield losses to soil-borne pests and diseases[J]. New Phytologist, 2022, 235(6): 2393-2405.
- [11] CHITWOOD-BROWN J, VALLAD GE, LEE TG, HUTTON SF. Breeding for resistance to *Fusarium* wilt of tomato: a review[J]. Genes, 2021, 12(11): 1673.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] BEAUREGARD PB, CHAI YR, VLAMAKIS H, LOSICK R, KOLTER R. *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(17): E1621-E1630.
- [15] HO TH, CHUANG CY, ZHENG JL, CHEN HH, LIANG YS, HUANG TP, LIN YH. *Bacillus amyloliquefaciens* strain PMB05 intensifies plant immune responses to confer resistance against bacterial wilt of tomato[J]. Phytopathology®, 2020, 110(12): 1877-1885.
- [16] FIRA D, DIMKIĆ I, BERIĆ T, LOZO J, STANKOVIĆ S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species[J]. Journal of Biotechnology, 2018, 285: 44-55.
- [17] CHEN MC, WANG JP, LIU B, ZHU YJ, XIAO RF, YANG WJ, GE CB, CHEN Z. Biocontrol of tomato bacterial wilt by the new strain *Bacillus velezensis* FJAT-46737 and its lipopeptides[J]. BMC Microbiology, 2020, 20(1): 160.
- [18] WANG Q, GONG Y, YANG YZ, HU HT, ZHOU RH. Complete genome sequence of antibiotic-producing

- Bacillus velezensis* H208, isolated from ginger rhizosphere in Laifeng County, China[J]. Microbiology Resource Announcements, 2023, 12(1): e0055122.
- [19] KIM JA, SONG JS, KIM PI, KIM DH, KIM Y. *Bacillus velezensis* TSA32-1 as a promising agent for biocontrol of plant pathogenic fungi[J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2022, 8(10): 1053.
- [20] 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[J]. 微生物学报, 2022, 62(10): 4071-4088.
- FANG Y, PENG YZ, LIAO CG, CHEN LS, ZHOU Q, HUANG J, YAN YC, WANG MY, ZHANG YK, ZOU LF, CHEN GY. *Bacillus velezensis* SF327, a potential biocontrol agent with the functions of preventing plant diseases and promoting plant growth[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(10): 4071-4088 (in Chinese).
- [21] SU ZH, LIU GG, LIU XM, LI SZ, LU XY, WANG PP, ZHAO WS, ZHANG XY, DONG LH, QU YH, ZHANG JQ, MO SJ, GUO QG, MA P. Functional analyses of the *Bacillus velezensis* HMB26553 genome provide evidence that its genes are potentially related to the promotion of plant growth and prevention of cotton *Rhizoctonia* damping-off[J]. Cells, 2023, 12(9): 1301.
- [22] 张素玮, 王艳玲, 毕阳, 负建民. 一株马铃薯干腐病拮抗菌的筛选、鉴定及其生物防效[J]. 微生物学通报, 2018, 45(8): 1726-1736.
- ZHANG WW, WANG YL, BI Y, YUN JM. Screening and identification of an antagonistic strain against potato dry rot[J]. Microbiology China, 2018, 45(8): 1726-1736 (in Chinese).
- [23] 陈小强, 陈德局, 朱育菁, 陈燕萍, 张海峰, 刘波. 青枯雷尔氏菌胞外多糖合成缺失突变株构建及其生物学特性[J]. 微生物学报, 2018, 58(5): 926-938.
- CHEN XQ, CHEN DJ, ZHU YJ, CHEN YP, ZHANG HF, LIU B. Construction and characterization of extracellular polysaccharide deletion mutant of *Ralstonia solanacearum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(5): 926-938 (in Chinese).
- [24] GUO JJ, GAO ZP, LI GY, FU FH, LIANG Z, ZHU H, SHAN Y. Antimicrobial and antibiofilm efficacy and mechanism of essential oil from *Citrus Changshan-huyou* Y. B. chang against *Listeria monocytogenes*[J]. Food Control, 2019, 105: 256-264.
- [25] BRENNER DJ, KRIEG NR, STALEY JT, GARRITY GM. Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology[M]. Boston, MA: Springer US, 2005.
- [26] 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.
- DONG XZ, CAI MY. Handbook of Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [27] 穰杰, 李莉, 唐琼, 杨琦, 何恋, 丁学知, 夏立秋. 第三代测序细菌基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2015, 38(6): 14-20.
- RANG J, LI L, TANG Q, YANG Q, HE L, DING XZ, XIA LQ. Comparative study of bacterial DNA extraction methods for the third generation sequencing technology[J]. Journal of Natural Science of Hunan Normal University, 2015, 38(6): 14-20 (in Chinese).
- [28] 石莹莹, 赵盼, 宋双伟, 熊惘梓, 莫乘宝, 仲乃琴. 马铃薯疮痂病拮抗菌 YN-2-2 的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2425-2435.
- SHI YY, ZHAO P, SONG SW, XIONG MZ, MO CB, ZHONG NQ. Isolation and characterization of the antagonistic bacterium YN-2-2 against potato common scab[J]. Microbiology China, 2020, 47(8): 2425-2435 (in Chinese).
- [29] JOHNSON M, ZARETSKAYA I, RAYTSELIS Y, MERZHUH Y, MCGINNIS S, MADDEN TL. NCBI BLAST: a better web interface[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(Web Server issue): W5-W9.
- [30] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [31] 兰宝锋, 王睿, 何双, 周礼芹, 蒙健宗. 解淀粉芽孢杆菌抑菌物质粗提取的优化及分析[J]. 中国酿造, 2022, 41(6): 195-199.
- LAN BF, WANG R, HE S, ZHOU LQ, MENG JZ. Optimization and analysis of crude extraction of bacteriostatic substances from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. China Brewing, 2022, 41(6): 195-199 (in Chinese).
- [32] 朱志刚, 胡洪涛, 石丽桥, 曹春霞, 姚经武, 黄大野, 龙同, 邱正明, 陈伟, 杨自文. 生姜青枯病防治药剂室内筛选及评价[J]. 植物保护, 2017, 43(6): 202-206, 212.
- ZHU ZG, HU HT, SHI LQ, CAO CX, YAO JW, HUANG DY, LONG T, QIU ZM, CHEN W, YANG ZW. Indoors screening and evaluation of bactericides controlling ginger bacterial wilt[J]. Plant Protection, 2017, 43(6): 202-206, 212 (in Chinese).
- [33] 刘海娇, 徐杰, 左登鸿, 苏应威, 朱书生, 杨敏. 茼蒿水浸液和挥发物对三七根腐病菌的抑制活性及其抑菌物质分析[J]. 植物保护, 2023, 49(2): 206-214.

- LIU HJ, XU J, ZUO DH, SU YW, ZHU SS, YANG M. Inhibitory activities and antifungal substances of water extracts and volatiles from *Glebionis coronaria* on root rot pathogens of *Panax notoginseng*[J]. Plant Protection, 2023, 49(2): 206-214 (in Chinese).
- [34] WU K, SU L, FANG ZY, WANG LL, SHEN B, SHEN QR. Competitive use of root exudates by *Bacillus amyloliquefaciens* with *Ralstonia solanacearum* decreases the pathogenic population density and effectively controls tomato bacterial wilt[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 218: 132-138.
- [35] EL-NAGAR A, ELZAAWELY AA, DANG XUAN T, GABER M, EL-WAKEIL N, EL-SAYED Y, NEHELA Y. Metal complexation of bis-*Chalcone* derivatives enhances their efficacy against *Fusarium* wilt disease, caused by *Fusarium equiseti*, via induction of antioxidant defense machinery[J]. Plants, 2022, 11(18): 2418.
- [36] 张亚妮, 方伟, 王开梅, 张志刚, 王燕, 万中义, 吴兆圆. 真菌 NBERC-170301 中农药活性化合物的研究[J]. 湖北农业科学, 2018, 57(22): 60-63.
- ZHANG YN, FANG W, WANG KM, ZHANG ZG, WANG Y, WAN ZY, WU ZY. Study on the pesticide activity compounds from fungus NBERC-170301[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2018, 57(22): 60-63 (in Chinese).
- [37] 汪茜, 宋娟, 李冬萍, 覃晓娟, 陈廷速, 周生茂. 巨大芽胞杆菌 YB-3 的筛选、鉴定及其对生姜青枯病的生防效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(1): 204-211.
- WANG Q, SONG J, LI DP, QIN XJ, CHEN TS, ZHOU SM. Screening, identification and control efficacy of *Bacillus megaterium* with antagonist activity against ginger wilt[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(1): 204-211 (in Chinese).
- [38] PATEL RK, JAIN M. NGS QC Toolkit: a toolkit for quality control of next generation sequencing data[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30619.
- [39] SCHUBERT M, LINDGREEN S, ORLANDO L. AdapterRemoval v2: rapid adapter trimming, identification, and read merging[J]. BMC Research Notes, 2016, 9: 88.
- [40] LUO RB, LIU BH, XIE YL, LI ZY, HUANG WH, YUAN JY, HE GZ, CHEN YX, PAN Q, LIU YJ, TANG JB, WU GX, ZHANG H, SHI YJ, LIU Y, YU C, WANG B, LU Y, HAN CL, CHEUNG DW, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. GigaScience, 2012, 1: 18.
- [41] KOREN S, WALENZ BP, BERLIN K, MILLER JR, BERGMAN NH, PHILLIPPY AM. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation[J]. Genome Research, 2017, 27(5): 722-736.
- [42] 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.
- [43] WANG YP, TANG HB, DEBARRY JD, TAN X, LI JP, WANG XY, LEE TH, JIN HZ, MARLER B, GUO H, KISSINGER JC, PATERSON AH. MCSanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity[J]. Nucleic Acids Research, 2012, 40(7): e49.
- [44] DARLING ACE, MAU B, BLATTNER FR, PERNA NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements[J]. Genome Research, 2004, 14(7): 1394-1403.
- [45] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN HE, REITZ ZL, BIERMANN F, ALANJARY M, FETTER A, TERLOUW BR, METCALF WW, HELFRICH EJN, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(W1): W46-W50.
- [46] SCHNEIDER K, CHEN XH, VATER J, FRANKE P, NICHOLSON G, BORRIS R, SÜSSMUTH RD. Macrolactin is the polyketide biosynthesis product of the *pks2* cluster of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Journal of Natural Products, 2007, 70(9): 1417-1423.
- [47] ZHANG Y, ZHANG J, GAO J, ZHANG G, YU Y, ZHOU H, CHEN W, ZHAO J. The colonization process of sunflower by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae* and its seed transmission[J]. Plant Disease, 2018, 102(9): 1772-1778.
- [48] WEI Z, YANG TJ, FRIMAN VP, XU YC, SHEN QR, JOUSSET A. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health[J]. Nature Communications, 2015, 6: 8413.
- [49] XU S, XIE XW, SHI YX, CHAI AL, LI BJ, LI L. Development of a real-time quantitative PCR assay for the specific detection of *Bacillus velezensis* and its application in the study of colonization ability[J]. Microorganisms, 2022, 10(6): 1216.

- [50] PANG X, LI J, XU P, YANG W, HUANG L, ZHANG S, YU Z, YE Q. Environmental fate and metabolism of the systemic triazolinthione fungicide prothioconazole in different aerobic soils[J]. Journal of Hazardous Materials, 2023, 445: 130583.
- [51] NI J, YU L, LI F, LI YL, ZHANG MF, DENG YP, LIU XL. Macrolactin R from *Bacillus siamensis* and its antifungal activity against *Botrytis cinerea*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2023, 39(5): 1-9.
- [52] YUAN J, LI B, ZHANG N, WASEEM R, SHEN QR, HUANG QW. Production of bacillomycin- and macrolactin-type antibiotics by *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6 for suppressing soilborne plant pathogens[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2012, 60(12): 2976-2981.
- [53] LI YT, QI GF, XIE ZQ, LI BL, WANG R, TAN J, SHI HL, XIANG BK, ZHAO XY. The endophytic root microbiome is different in healthy and *Ralstonia solanacearum*-infected plants and is regulated by a consortium containing beneficial endophytic bacteria[J]. Microbiology Spectrum, 2023, 11(1): e0203122.
- [54] YUAN WF, RUAN S, QI GF, WANG R, ZHAO XY. Plant growth-promoting and antibacterial activities of cultivable bacteria alive in tobacco field against *Ralstonia solanacearum*[J]. Environmental Microbiology, 2022, 24(3): 1411-1429.
- [55] WANG CC, YE XJ, NG TB, ZHANG WJ. Study on the biocontrol potential of antifungal peptides produced by *Bacillus velezensis* against *Fusarium solani* that infects the passion fruit *Passiflora edulis*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(7): 2051-2061.
- [56] ONGENA M, JOURDAN E, ADAM A, PAQUOT M, BRANS A, JORIS B, ARPIGNY JL, THONART P. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(4): 1084-1090.
- [57] CAULIER S, GILLIS A, COLAU G, LICCIARDI F, LIÉPIN M, DESOIGNIES N, MODRIE P, LEGRÈVE A, MAHILLON J, BRAGARD C. Versatile antagonistic activities of soil-borne *Bacillus* spp. and *Pseudomonas* spp. against *Phytophthora infestans* and other potato pathogens[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 143.
- [58] KIM DR, JEON CW, SHIN JH, WELLER DM, THOMASHOW L, KWAK YS. Function and distribution of a lantipeptide in strawberry *Fusarium* wilt disease-suppressive soils[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2019, 32(3): 306-312.
- [59] CARRIÓN VJ, PEREZ-JARAMILLO J, CORDOVEZ V, TRACANNA V, de HOLLANDER M, RUIZ-BUCK D, MENDES LW, van IJCKEN WFJ, GOMEZ-EXPOSITO R, ELSAYED SS, MOHANRAJU P, ARIFAH A, van der OOST J, PAULSON JN, MENDES R, van WEZEL GP, MEDEMA MH, RAAIJMAKERS JM. Pathogen-induced activation of disease-suppressive functions in the endophytic root microbiome[J]. Science, 2019, 366(6465): 606-612.
- [60] MAHIZAN NA, YANG SK, MOO CL, SONG AAL, CHONG CM, CHONG CW, ABUSHELAIBI A, LIM SH E, LAI KS. Terpene derivatives as a potential agent against antimicrobial resistance (AMR) pathogens[J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(14): 2631.
- [61] SUN YH, SU YT, HUSSAIN A, XIONG LN, LI CJ, ZHANG J, MENG Z, DONG ZY, YU GH. Complete genome sequence of the *Pogostemon cablin* bacterial wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* strain SY1[J]. Genes & Genomics, 2023, 45(1): 123-134.