

研究报告

黄瓜根际促生菌 *Bacillus subtilis* S1 的分离鉴定与促生抗病

章梦婷, 王二兴, 张雅婷, 刘敬一, 徐鲁荣, 陈云鹏*

上海交通大学农业与生物学院资源与环境系 教育部上海长三角生态环境变化与治理观测研究站 国家林业和草原局上海城市森林生态系统研究站, 上海 200240

章梦婷, 王二兴, 张雅婷, 刘敬一, 徐鲁荣, 陈云鹏. 黄瓜根际促生菌 *Bacillus subtilis* S1 的分离鉴定与促生抗病[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2141-2157.ZHANG Mengting, WANG Erxing, ZHANG Yating, LIU Jingyi, XU Lurong, CHEN Yunpeng. Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* S1 capable of inducing resistance against powdery mildew and promoting cucumber growth from cucumber rhizosphere[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2141-2157.

摘要:【背景】黄瓜白粉病作为黄瓜种植过程中常见的真菌病害之一, 在世界范围内广泛发生, 造成黄瓜品质和产量下降, 引起严重的经济损失。【目的】分离鉴定对黄瓜白粉病具有防治效果的原始生防细菌菌株, 验证其防病促生作用。【方法】利用平板筛选法分离拮抗菌, 并结合使用 16S rRNA 基因序列分析、系统发育分析、全基因组测序、次生代谢物预测及形态特征分析等方法鉴定该菌株对黄瓜白粉病的生防效果以及对黄瓜植株生长的促进作用。【结果】利用玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*) 作为指示菌, 平板筛选得到拮抗细菌 S1, 并验证该菌对盆栽种植黄瓜植株的促生作用以及对白粉病的防治效果。16S rRNA 基因序列分析结果表明该菌株与 *Bacillus subtilis* KZH-E3 具有 100% 的相似性。通过全基因组测序, 借助生物信息学分析工具, 利用系统发育进化关系, 在全基因组水平上菌株 S1 被鉴定为枯草芽孢杆菌, 自主命名为 *Bacillus subtilis* S1。通过温室盆栽防效试验, 证明菌株 S1 对黄瓜白粉病具有显著的防效。【结论】枯草芽孢杆菌 S1 对黄瓜幼苗具有明显的防病促生作用, 具有重要的研究意义。

关键词: 黄瓜; 黄瓜白粉病; 分离鉴定; *Bacillus subtilis* S1; 16S rRNA 基因

资助项目: 上海“科技创新行动计划”之“一带一路”国际合作项目(20310742000)

This work was supported by the “the Belt and Road” International Cooperation Project of Shanghai Science and Technology Innovation Action Program (20310742000).

*Corresponding author. E-mail: ypch7274@sjtu.edu.cn

Received: 2023-12-04; Accepted: 2023-12-30; Published online: 2024-02-19

Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* S1 capable of inducing resistance against powdery mildew and promoting cucumber growth from cucumber rhizosphere

ZHANG Mengting, WANG Erxing, ZHANG Yating, LIU Jingyi, XU Lurong, CHEN Yunpeng*

Department of Resources and Environment, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University; Shanghai Yangtze River Delta Eco-environmental Change and Management Observation and Research Station, Ministry of Education; Shanghai Urban Forest Ecosystem Research Station, National Forestry and Grassland Administration, Shanghai 200240, China

Abstract: [Background] As one of the major fungal diseases in cucumber production, powdery mildew occurs widely in the world, resulting in declined cucumber quality and yield and causing serious economic losses. [Objective] To isolate and identify the original strains for biocontrol against cucumber powdery mildew and to verify their biocontrol and plant growth-promoting effects. [Methods] Multiple methods including plate screening, 16S rRNA gene sequencing, phylogenetic analysis, whole genome sequencing, secondary metabolite analysis, and morphological characterization were employed to isolate, identify, and characterize the strains. [Results] An antagonistic bacterium S1 was obtained from the rhizosphere soil of cucumber with *Bipolaris maydis* as the indicator strain, and its growth-promoting effect on cucumber seedlings and control effect on powdery mildew were examined by pot experiments. The blast result of 16S rRNA gene sequences showed that this strain had a nucleotide identity of 100% compared with *Bacillus subtilis* KZH-E3. The whole genome sequencing combined with the phylogenetic analysis eventually identified the strain as *B. subtilis*. The pot experiments in a greenhouse proved that S1 had a significant biocontrol effect on cucumber powdery mildew. [Conclusion] *B. subtilis* S1 has obvious disease-preventing and growth-promoting effects on cucumber seedlings, having important research significance.

Keywords: cucumber; cucumber powdery mildew; isolation and characterization; *Bacillus subtilis* S1; 16S rRNA gene

黄瓜是我国主要的蔬菜种植品类，深受大众喜爱，是目前主要消费的蔬菜品种之一，广泛种植于世界各地。然而，由于黄瓜在种植过程中常年单一连作，栽培管理欠佳，经常会受到各种病害，特别是白粉病的侵袭，并且黄瓜在整个生长阶段均能被白粉病侵染。黄瓜白粉病是一种传播速度快、侵入期和潜伏期短、发生频率高的蔬菜病害，一旦暴发将对黄瓜的品质和产量造成严重的打击。在病害防治方面，药

剂防治虽然是目前防控病害的首要途径，但是化学药物的长期使用不仅会使得植物获得抗药性，还会对人类和环境造成安全问题。相比之下，低毒性、无残留、不易产生抗药性的生物防治则更胜一筹。

生物防治途径的挖掘开发离不开对生防微生物的研究和应用，而来自土壤中的有益细菌是生防微生物的重要组成部分。其中，芽孢杆菌属的细菌是被探索和开发最多的植物病害生

防细菌之一^[1]。相较于存在危害性的化学肥料而言,根际促生菌被一致认为是化学药剂的良好环保型替代品,是一种能够有效提高作物产量的产品,具有广泛的开发价值与研究意义。芽孢杆菌是一类植物根际促生细菌,它们不仅能在植物根际有效定殖、生存,活跃在植物根系周围,与植物产生互作从而起到促生作用,还能防治土传病害并且帮助植株应对外界胁迫^[2]。根际促生细菌常通过合成抗性相关产物、产生嗜铁素、拮抗以及竞争作用 4 种方式与病原菌相互作用^[3]。有研究表明,芽孢杆菌能产生对高温、紫外光、辐射和部分化学药剂有强抗性的芽孢,以抵抗不良环境状况,具有良好的应用前景^[4]。为了充分利用包括芽孢杆菌在内的植物根际促生菌的优良生物学特性,提高其对黄瓜白粉病的生物防治效果,保护农田生态环境,迫切需要从植物根际土中分离筛选出适宜的生防菌用于黄瓜抗白粉病的生产实践中。

1 材料与方法

1.1 样品

植物根际土壤采自上海交通大学农业与生物学院实践教育基地的黄瓜、辣椒、茄子、番茄、苜蓿、玉米和香柚等的植株根际。共采集 10 份土样,装入塑料自封袋,置于 4 °C 保存备用。所用黄瓜品种为‘新泰密刺’,种子购于山东省新泰市密刺黄瓜原种场。短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 103925 及玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*) 为实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

2×Taq PCR Master Mix 和 DuRed 染色剂,上海少辛生物科技有限公司; DL2000 DNA Marker, 生工生物工程(上海)股份有限公司。

摇床,太仓华利达实验室设备公司;恒温培养箱,上海森信实验仪器有限公司;基因扩

增仪,赛默飞世尔科技公司;显微镜,上海跃河生物科技有限公司;分光光度计,艾本德公司;生物型透射电镜,FEI 公司。

1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。PDA 培养基(g/L): 去皮马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0。

1.4 根际土壤细菌的分离与纯化

1.4.1 土壤悬浮液的制备

在作物根际 3–5 cm 处,取土装至密封袋中,标记土壤源,于 4 °C 保存。将去离子水装入三角瓶中,封口灭菌 20 min。供试土壤风干后用研磨机研碎至粉末状,称 10 g 粉末装入 100 mL 无菌水中,37 °C、180 r/min 摇床培养 30 min,取出后即得浓度为 10^{-1} 的土壤悬浮液。准备 6 支 20 mL 灭菌试管,分别加入 9 mL 无菌水,用移液枪吸取 1 mL 10^{-1} 浓度土壤悬浮液至试管中,混匀后得到浓度为 10^{-2} 土壤悬浮液。重复上述步骤,分别将土壤悬浮液依次稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} ,混匀后待用。

1.4.2 细菌的分离

用移液枪从 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 这 3 个梯度的试管中分别吸取 200 μ L 土壤悬液涂布 LB 平板,每个梯度涂 3 个平板。用封口膜封好后将平板倒置在 37 °C 细菌恒温培养箱中培养 24 h,观察菌落生长情况。从平板上挑取不同形态特征的单菌落分别装至含 1 mL 液体 LB 的 1.5 mL 离心管中,标记编号后放入 37 °C、180 r/min 摇床培养过夜。

1.4.3 细菌的纯化

将培养过夜的菌液分别用接种环在 LB 平板上划线培养 24 h,再从各平板上挑取单菌落重复上述培养步骤,得到的菌株即为从土壤中分离且经过纯化培养的菌株,将所有分离到的菌株于 -80 °C 保存备用。

1.5 拮抗细菌的筛选及鉴定

拮抗细菌的鉴定采用普通显微镜检,并结合 16S rRNA 基因测序、序列比对及系统发育树分析等方法进行^[5]。

1.5.1 拮抗细菌的筛选

以 *B. maydis* 为供试真菌,采用细菌发酵液平板抑菌法测定各菌株对该真菌生长的抑制作用,从而筛选出目标拮抗细菌。具体操作为:用 LB 培养基扩大培养菌株,并分装于离心管内;在 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min 后吸取上清液,将上清液通过孔径为 0.25 μm 的微孔滤膜(材质为混合纤维,直径 50 mm)过滤除菌,得到各菌株的发酵液,装入 1.5 mL 离心管标记后待用;吸取 150 μL 发酵液至 PDA 平板上涂布至完全吸收;预先将玉米小斑病菌接种至 PDA 平板的菌苔边缘,用无菌打孔器等径打取菌饼,用接种针钩取一个菌饼置于已接种的 PDA 平板正中央,设置 3 个重复,以涂无菌水的平板为空白对照;接种后所有平板用封口膜封口,统一放至 28 °C 真菌培养箱中光照培养;在第 2–5 天内,用十字交叉法测量病菌菌苔生长直径变化情况并拍照记录,待空白对照即将长满整个培养皿时即可停止测量;计算第 5 天各平板上病菌菌丝生长抑制率,筛选抑制率较高的菌株。

抑制率(%)=(对照菌苔直径-处理菌苔直径)/对照菌苔直径×100 (1)

1.5.2 16S rRNA 基因鉴定

经过一轮初筛、复筛和终筛,选取拮抗表现始终良好的高抑菌活性菌株进行 16S rRNA 基因测序。以菌液为模板,采用通用引物 27F (5'-ATGCCATTCGTGCGGAGGTTG-3')和 1492R (5'-CGTCTCTGCTGTCATCACTTCGTAT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μL):模板 DNA (菌液) 1 μL, 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μL, 正向

引物 27F (10 μmol/L) 1 μL, 反向引物 1492R (10 μmol/L) 1 μL, 无菌双蒸水 9.5 μL。PCR 反应条件:94 °C 10 min;94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1 min, 35 个循环;72 °C 7 min;4 °C 保存。PCR 产物经琼脂糖电泳检测后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。所得 16S rRNA 基因序列利用 GenBank 数据库在线 BLAST 程序进行序列相似性比对,并应用 MEGA 11 软件进行邻接法聚类分析,构建系统发育树。

1.6 最优拮抗菌株的生长特性研究

1.6.1 菌体形态观察

选取拮抗效果最好的菌株进行生物特性研究。将菌株在 LB 培养液中培养至 OD_{600} 达到 0.9–1.0 时,吸取 1 mL 菌液至 1.5 mL 离心管中,于 4 °C、12 000 r/min 条件下离心 10 min 后弃上清液,用等量无菌水洗涤 2 次,最后用等量无菌水重悬。取 10 μL 重悬菌液小心滴在碳膜载网上,置于空气中阴干过夜。样品制备好后采用生物型透射电镜观察菌体形态。

1.6.2 生长情况对比

挑取经划线纯化培养的单菌落至 200 mL LB 培养基中,37 °C、180 r/min 培养 12 h 后得到种子液。以 1% 接种量将种子液接种至 100 mL LB 培养基中,每个菌设置 3 个重复,37 °C、180 r/min 培养。每隔 2 h 吸取少量菌液,在紫外分光光度计上测定 600 nm 波长处的光密度值。以 OD_{600} 测定值为纵坐标、培养时间为横坐标,绘制菌株的生长曲线,以同样培养条件下的短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*) 103925 的 OD_{600} 为对照。

1.6.3 孢子萌发抑制率测定

将经拮抗细菌筛选试验得到的目标拮抗细菌 S1 发酵液装入离心管中,并加入玉米小斑病菌的分生孢子,于 28 °C、120 r/min 培养。另设空白对照组(液体 LB 中只加入供试真菌分

生孢子)与短小芽孢杆菌 103925 对照组(短小芽孢杆菌 103925 发酵液中加入玉米小斑病菌的分生孢子)在同一摇床上培养。每 2 h 吸取 20 μ L 孢子悬浮液在光学显微镜下观察孢子萌发数量,以分析菌株 S1 发酵液对 *B. maydis* 孢子萌发的抑制情况。要求观察总计超过 200 个孢子,记录萌发的孢子数量,并计算其萌发抑制率。实验重复 3 次,比较各菌株处理组间的差异。

孢子萌发率(%)=孢子萌发数/调查孢子总数 \times 100 (2)

孢子萌发抑制率(%)=(对照组孢子萌发率-处理组孢子萌发率)/对照组孢子萌发率 \times 100 (3)

1.7 温室盆栽防治试验

黄瓜种子表面消毒处理后分为两组,于培养皿中培养。一组用 S1 菌悬液浸泡,隔天更换一次菌悬液至发芽;另一组为对照组,用无菌水浸泡处理。待种子发芽后播种至花盆中。菌株 S1 处理组和无菌水对照组各种植 10 盆,每盆播种 4 粒种子,播种期间密切注意水分和光照湿度管理。待黄瓜苗长出第一片完整的真叶后,将黄瓜白粉病病原菌孢子悬浮液均匀喷施到叶片上并保湿一晚。24 h 后向处理组的叶面喷施 S1 菌悬液,对照组用清水喷施。在黄瓜长出第四片真叶时进行病情指数调查,计算病情指数和相对防效。参照 GB/T 17980.19—2000 农药田间药效试验准则中的病害分级标准^[6]。

病情指数=(发病级数 \times 该级病叶数) \times 100/(调查总叶片数 \times 病情最高级数) (4)

相对防效=(1-处理组病情指数/对照组病情指数) \times 100% (5)

1.8 菌株 S1 全基因组测序

1.8.1 菌株 S1 全基因组测序制样

刮取纯化后的菌株 S1 单菌落接种到 200 mL LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养过夜。

然后将菌液分装到 4 支灭过菌的 50 mL 离心管中,于室温(25 $^{\circ}$ C)、8 000 r/min 离心 10 min 去上清,保留菌体沉淀。加入等量的 50 mL 无菌水,重悬后再次离心 10 min,重复上述步骤 2 次。最后将 4 份菌体分别以 10 mL 无菌水重悬,转移到同一离心管中离心去上清,保留菌体沉淀,标记菌株名称,置于-80 $^{\circ}$ C 保存。菌株 S1 全基因组测序由北京百迈客生物科技有限公司完成。

1.8.2 基因组比较分析

将菌株 S1 全基因组序列上传网络(<https://proksee.ca/projects/new>),采用 CG View 在线绘图软件绘制基因组圈图,添加 G+C 含量和 G+C 偏移,采用 Prokka 法注释基因组序列。在 NCBI 的 GenBank 数据库中下载 9 株芽孢杆菌代表种菌株的全基因组序列,利用 BLAST Ring Image Generator (BRIG)软件绘制比较基因组圈图^[7]。

1.8.3 平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)分析

从 NCBI 网站上下载芽孢杆菌属 9 个种代表菌株的全基因组序列,其中包括枯草芽孢杆菌标准株 168。采用 Orthologous Average Nucleotide Identity Tool (OAT)软件计算各菌株基因组间总核苷酸序列的相似性^[8]。

1.8.4 次生代谢物分析

上传菌株 S1 全基因组序列至 antiSMASH 数据库网站进行在线分析,预测菌株 S1 在生长过程中自身合成的重要次级代谢物,尤其是有抑菌活性的物质。

1.9 菌株 S1 的促生作用

1.9.1 种子催芽

黄瓜种子用 75%乙醇浸泡搅拌 30 s 进行表面灭菌,无菌水冲洗 3-4 次,再用 2% NaClO 溶液浸泡 10 min,间歇性搅拌后再次洗涤 3-4 次。

将两张灭过菌的滤纸放入一次性培养皿中,加入无菌水浸湿后将种子均匀铺在上面,2 d 换1次水,置于37℃培养箱中萌发至出芽。

1.9.2 栽培与管理方法

无菌蛭石栽培系统:将80 g 蛭石装入1 L 烧杯中,厚度约3–5 cm。用牛皮纸包好后于121℃湿热灭菌30 min,待完全冷却至室温后将萌发的黄瓜种子播种其中。播种时注意胚根朝下,种子上面再覆盖浅层无菌蛭石。每个烧杯里种5棵苗,浇透水后放在通风光照处培养,保持水分管理。

菜园土混合泥炭土基质栽培系统:菜园土和泥炭土营养基质按质量比约9:1充分混匀后装盆。将已出芽的黄瓜种子(胚根长约0.4–0.6 cm)胚根向下播种于浅土层,每盆种3颗,将水浇透到盆栽底。出苗后每天浇一次水,子叶充分展平后,每2 d 浇1次水,以土壤保持湿润为宜。

1.9.3 菌株 S1 处理黄瓜根围土壤

将菌株 S1 以1%接种量接于100 mL LB 培养基中,于37℃、180 r/min 培养过夜。将菌液离心去上清,用无菌水重悬菌体再离心,重复以上操作2次,最后将菌体悬浮在等量无菌水中。待黄瓜幼苗第1片真叶完全长出后,将重悬的菌液作为处理组施用到黄瓜幼苗根围土壤,每棵苗20 mL 菌液(10^8 – 10^9 CFU/mL),以施用等量无菌水作为对照组。以上处理每隔3 d 进行一次,共处理5次,处理组和对照组各设置3盆重复。

以同样方法制备菌株 S1 重悬菌液。待蛭石中的黄瓜苗长出两片真叶并完全舒展后(约1周),将重悬的菌液作为处理组施用到黄瓜幼苗根部附近,每棵幼苗10 mL 菌液,以施用等量无菌水作为对照组。每隔3 d 处理1次,共处理3次,处理组和对照组各设置5个重复。

1.9.4 黄瓜幼苗生物量测定

盆栽系统幼苗取样:完成3次促生处理后2周开始取样,每隔15 d 取样,共3次。将整盆土倒出后,用手托住黄瓜苗和根部,轻轻抖落土壤,与幼苗根部粘连的土壤用清水多次泡洗,将黄瓜苗缠绕的根系谨慎分开,用纸巾擦干多余水分。在根颈处剪断幼苗植株得到根系,测量株高、根长,称量株鲜重和根鲜重。

蛭石系统幼苗取样:完成3次促生处理1周后开始取样,每隔7 d 取样,共3次。将黄瓜苗连带蛭石轻轻取出后,用平缓的水流冲洗幼苗根部蛭石,小心地分开根系,用纸巾吸干根部水分后测量黄瓜生物量,包括株高、株鲜重、根长、根鲜重。

2 结果与分析

2.1 菌株的拮抗活性筛选与 16S rRNA 基因测序

从7种植物根际土样中共分离纯化出121个菌株,对这些菌株进行拮抗活性筛选比较,最终得到5株对玉米小斑病菌(*B. maydis*)有拮抗作用的菌株,分别编号为S1、S2、S3、S4、S5。其中,菌株S1、S2分离自大棚黄瓜根际土,菌株S3、S4分离自辣椒根际土,菌株S5分离自玉米根际土(图1)。

2.1.1 菌株发酵液平板拮抗活性筛选结果

筛出的5株拮抗菌株发酵液处理玉米小斑病菌,至第5天时观测菌苔直径。此时,对照组(CK,无菌水处理)的菌苔已长满平板(直径9 cm),所有参试拮抗菌株菌苔直径均不同程度地小于对照组,表现出一定的抑菌活性。其中,菌株S1的抑制效果最佳,可以作为目标拮抗菌株深入研究。

对菌苔直径数据进行统计分析,结果显示菌株S1、S2发酵液处理的菌苔直径分别约为

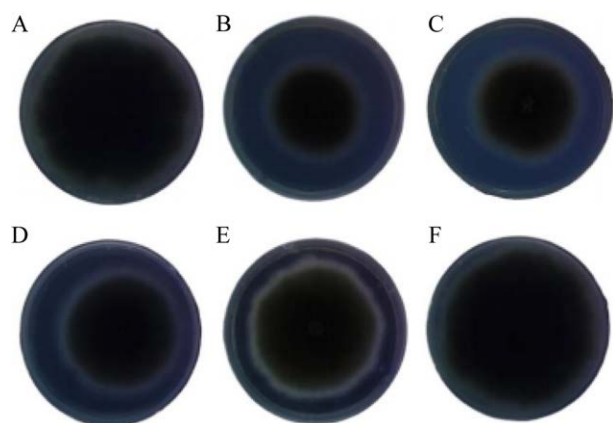


图 1 发酵液处理后 5 d 的玉米小斑病菌苔

Figure 1 The lawn of 5-day-cultured *Bipolaris maydis* with fermentation broth treatment. A: CK. B: Strain S1. C: Strain S2. D: Strain S3. E: Strain S4. F: Strain S5.

(4.77 ± 0.05) cm 和 (6.74 ± 0.03) cm, 抑菌率分别达到 47.03% 和 32.44%, 两菌株发酵液有极显著的抑菌活性 ($P < 0.01$)。菌株 S3 [(7.29 ± 0.03) cm] 和菌株 S4 [(7.65 ± 0.04) cm] 处理组与 CK 组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。菌株 S5 处理组 [(8.87 ± 0.02) cm] 与 CK 组相比菌苔大小差异不显著 ($P > 0.05$)。各拮抗菌株间的抑菌活性差异较大 (图 2), 菌株 S1 发酵液对 *B. maydis* 菌丝生长抑制作用最强, 抑制效果持续稳定。

2.1.2 16S rRNA 基因测序结果

结果显示菌株 S1–S5 均成功扩增出一条特异性条带, 其大小约为 1.5 kb, 与预期相符。对目标条带进行测序, 所得序列提交 GenBank 数据库进行序列相似性比对, 结果表明菌株 S1 的 16S rRNA 基因序列与枯草芽孢杆菌极为相似, 相似度为 99.5%–100%, 因此, 初步判断菌株 S1 在分类上可能归属 *Bacillus subtilis*, 菌株 S2 可能属于 *Bacillus amyloliquefaciens*, 菌株 S3 可能属于 *Klebsiella oxytoca*, 菌株 S4 和菌株 S5 可能分别属于 *Bacillus cereus* 和 *Klebsiella oxytoca*。

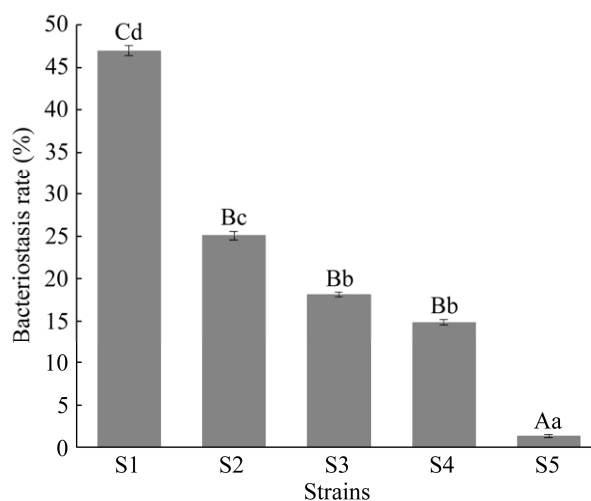


图 2 五株候选拮抗菌株对玉米小斑病菌的抑菌率
图中柱上方不同的大小写字母分别表示两组间存在统计学上极显著或显著性差异

Figure 2 Antibacterial rate of five candidate antagonistic strains against the pathogenic fungus *Bipolaris maydis*. The different uppercase and lowercase letters above the columns in the figure indicate statistically extremely significant or significant differences between the two groups.

依据 BLAST 结果挑选 14 个芽孢杆菌属菌株, 基于 16S rRNA 基因序列采用最大似然法计算菌株间的遗传距离, 与菌株 S1 一起应用邻接法构建系统发育树, 结果如图 3 所示。从图 3 可以看出 S1 和 *Bacillus subtilis* L23 (KU179336.1) 的遗传距离最近, 进一步表明菌株 S1 在分类学上可能归属为枯草芽孢杆菌。

2.2 菌株 S1 的形态观察与生长特性测定

2.2.1 菌体形态

在透射电镜下观察到菌株 S1 菌体呈杆状, 细胞大小为 $(0.6-0.8) \mu\text{m} \times (2.2-2.6) \mu\text{m}$ (图 4)。细胞外被厚荚膜, 周生鞭毛。该菌多个细胞常串联, 呈线性排列。在 LB 固体培养基上的 S1 菌落为乳白色, 边缘为不规则圆形。初期单菌落表面平滑, 内含透明黏液, 放置一段时间后菌落干燥皱缩, 表面有褶皱, 易刮取。

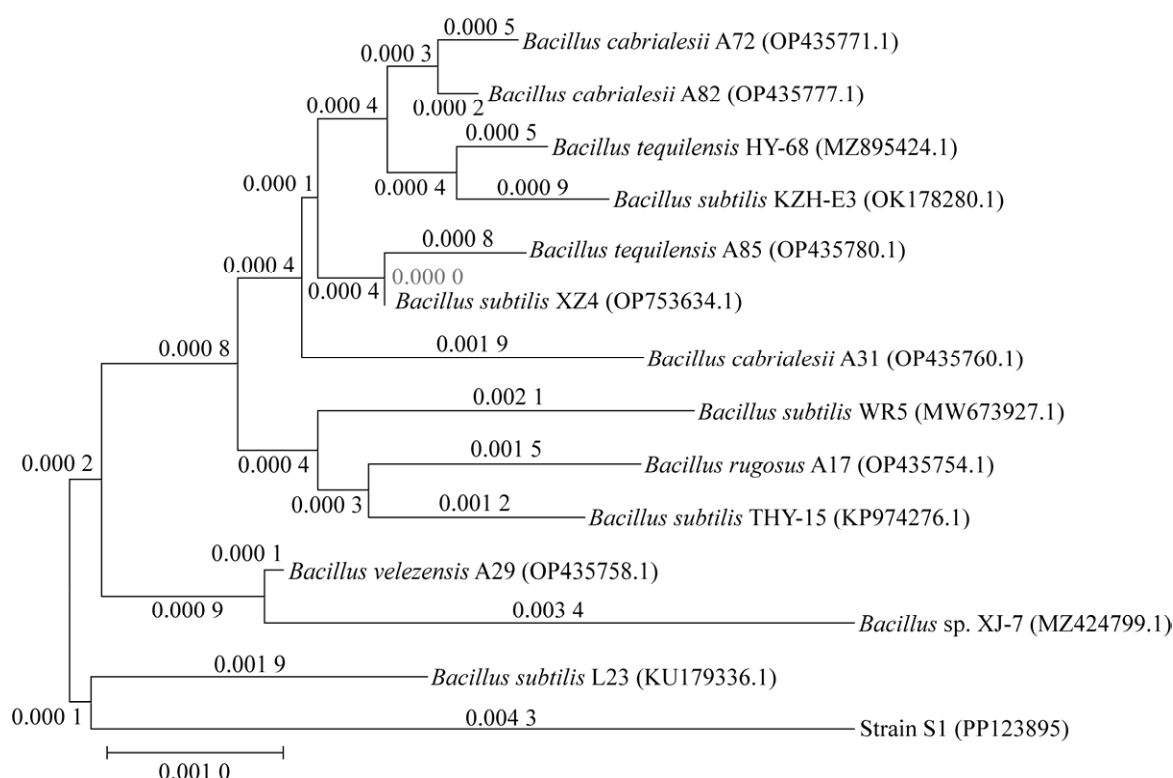


图3 菌株 S1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号为各菌株 16S rRNA 基因在 GenBank 数据库的登录号；步长检验次数为 1 000，分支点上的数字代表遗传变异度(进化距离)；标尺代表发育树的距离单位

Figure 3 Phylogenetic tree of strain S1 based on 16S rRNA gene sequences. The numbers in parentheses represent the accession numbers of the 16S rRNA gene of each strain in the GenBank database. The bootstrap value was set to 1 000, and the number on the branching point indicates the degree of genetic variation (evolutionary distance). The ruler exhibits the distance unit of the phylogenetic tree.

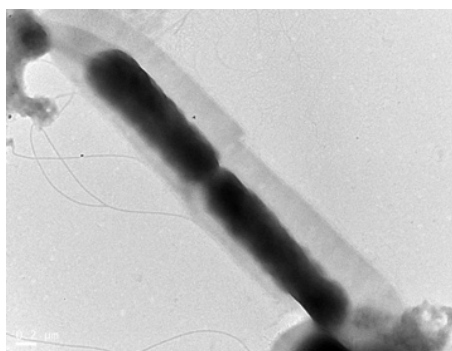


图4 枯草芽孢杆菌 S1 细菌形态[透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM), 30 000×]

Figure 4 Morphology of the bacterial strain *Bacillus subtilis* S1 (transmission electron microscope (TEM), magnification 30 000×).

2.2.2 生长情况对比结果

监测菌株 S1 和对照菌株短小芽孢杆菌 103925 的 24 h 内细胞增殖情况，绘制生长曲线 (图 5)，结果表明在接种 24 h 内两者都未达到菌群生长的停滞期。在接种后 0–2 h，细胞生长速度慢，处于延滞期。短小芽孢杆菌 103925 在 2–4 h 内显示出较快的生长速度，接近对数增长，而后继续保持快速增长；在 18–24 h 生长速度有所降低，但在 24 h 内未显示出明显的稳定期和衰亡期。菌株 S1 在 1–16 h 的生长速度比较稳定，16–18 h 生长速度有大幅提高，18 h 后持续增加，同样也未在 24 h 内出现稳定期和

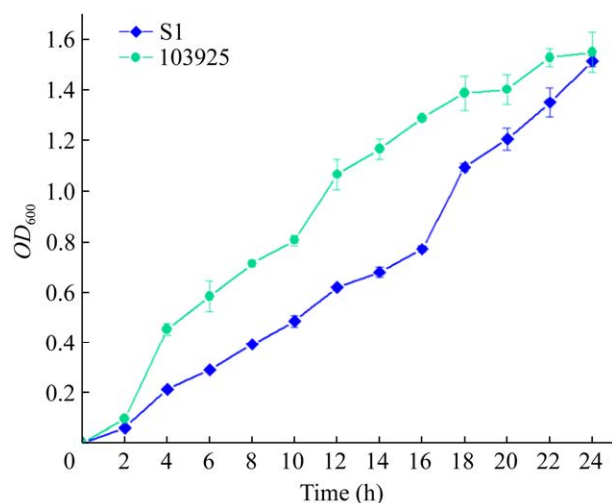


图 5 菌株 S1 的生长曲线

Figure 5 Growth curve of the isolated bacterial strain S1.

衰亡期。两株菌在 24 h 的 OD_{600} 值都在 1.5 左右。由此可见,在常规培养条件下,这两种芽孢杆菌细胞生长速度无明显差异。

2.2.3 孢子抑制率结果

菌株 S1 和菌株 103925 发酵液对 *B. maydis* 孢子萌发抑制结果如表 1、图 6 所示,在 2 h 时,菌株 S1 就对供试真菌的分生孢子显示出一定的抑制作用,这种抑制作用持续到 6 h 时。在 CK 组中,孢子萌发率显著高于菌株 S1 和 103925。菌株 S1 与对照菌株 103925 相比,其发酵液在 2–4 h 就能快速显示出较强的抑制作用。

表 1 菌株 S1 和 103925 发酵液对病原菌的孢子萌发抑制率

Table 1 Inhibition rates of the pathogenic spore germination by the fermentation broth of strains S1 and 103925

Time (h)	Strain 103925	Strain S1
2	13.25%±3.0%	26.17%±2.12%**
4	36.03%±13.59%	36.38%±6.37%
6	34.45%±8.59%	42.16%±9.27%*

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

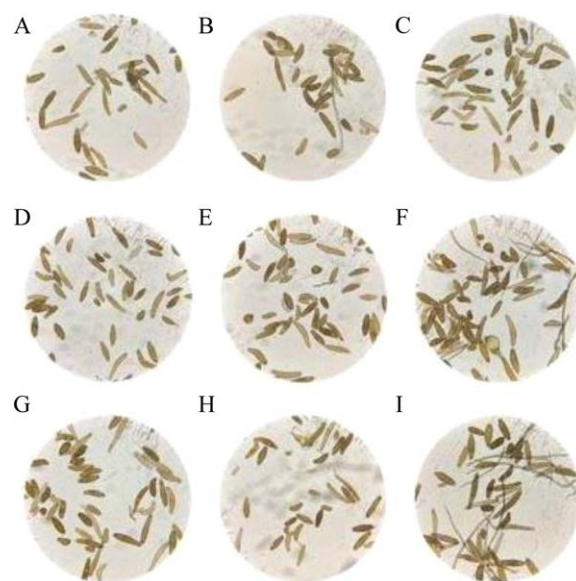


图 6 拮抗菌发酵液对玉米小斑病菌分生孢子萌发的抑制(400×) A–C 分别为菌株 S1、短小芽孢杆菌 103925 发酵液处理和空白对照组的第 2 h 玉米小斑病菌分生孢子萌发情况. D–F 分别为菌株 S1、短小芽孢杆菌 103925 发酵液处理和空白对照组的第 4 h 玉米小斑病菌分生孢子萌发情况. G–I 分别为菌株 S1、短小芽孢杆菌 103925 发酵液处理和空白对照组的第 6 h 玉米小斑病菌分生孢子萌发情况

Figure 6 Inhibition of the antagonistic bacterial fermentation broth on the germination of conidia of *Bacillus maydis* (magnification 400×). A and B respectively represent the germination of the conidia of maize pathogen *B. maydis* at 2 h after treatment with the fermentation broth of strains S1 and *B. pumilus* 103925, and C shows the germination status of fungal conidia in the control group at the corresponding time point. Similarly, D, E, F, and G, H, I in this figure respectively indicate the germination status of the conidia of *B. maydis* at 4 h and 6 h after treatment.

2.3 菌株 S1 对黄瓜白粉病的盆栽防效测定结果

盆栽防效试验结果如表 2 所示,以菌株 S1 菌悬液(浓度约为 10^8 CFU/mL)喷施苗期黄瓜叶

表 2 菌株 S1 对黄瓜苗白粉病的防效

Table 2 Effect of strain S1 against powdery mildew on seedling cucumbers

Seedling group	Disease index	Relative control efficacy (%)
Sterile water treatment	31.93±6.60**	—
S1 treatment	11.78±5.32	63.11

** : $P < 0.01$; —: 以无菌水处理的黄瓜白粉病的发病情况(相对防效为 0)

** : $P < 0.01$; —: The incidence of cucumber powdery mildew treated with sterile water (relative control efficacy is 0).

片,对黄瓜白粉病有一定防治效果。菌株 S1 菌液浸种及叶面喷施处理后黄瓜幼苗的病情指数为 11.78,比无菌水处理的黄瓜幼苗病情指数低,单因素 ANOVA 分析结果显示二者差异极显著。菌株 S1 对黄瓜白粉病的相对防效为 63.11%,表明叶面喷施菌株 S1 对黄瓜白粉病有较好的防治作用。

2.4 全基因组分析结果

测序结果表明,菌株 S1 全基因组由一条长度为 4 083 451 bp 的染色体组成, G+C 含量为

43.83%,细胞中无内源性质粒。预测编码基因数量为 4 020 个,序列总长度为 3 600 498 bp。基因组中重复序列总长度为 4 005 bp,含量约占整个基因组的 0.1%。RNA 基因(转录生成有功能的非编码 RNA 的 DNA 序列) 206 个,其中 rRNA 类非编码基因有 30 个,基因家族数为 3 个; tRNA 类非编码基因有 86 个,基因家族数为 33 个;其他 ncRNA 类非编码基因有 90 个,基因家族数量为 46 个。CRISPR 序列在基因组中的作用是保护细菌免受外源 DNA 的侵入,在 S1 全基因组中预测含 4 个 CRISPR 序列。此外,还发现 S1 基因组中含 6 个假基因、2 个前噬菌体、4 个启动子区域、4 个基因岛及 12 个次生代谢产物合成基因簇。蛋白亚细胞定位分析结果显示有信号肽 292 个、跨膜蛋白 1 139 个、分泌蛋白 292 个。目前, S1 全基因组测序与基因注释相关结果已提交至 GenBank 数据库,登录号为 CP092824。图 7 为菌株 S1 的全基因组圈图,由内向外分别为基因组刻度(单位为 Mb)、

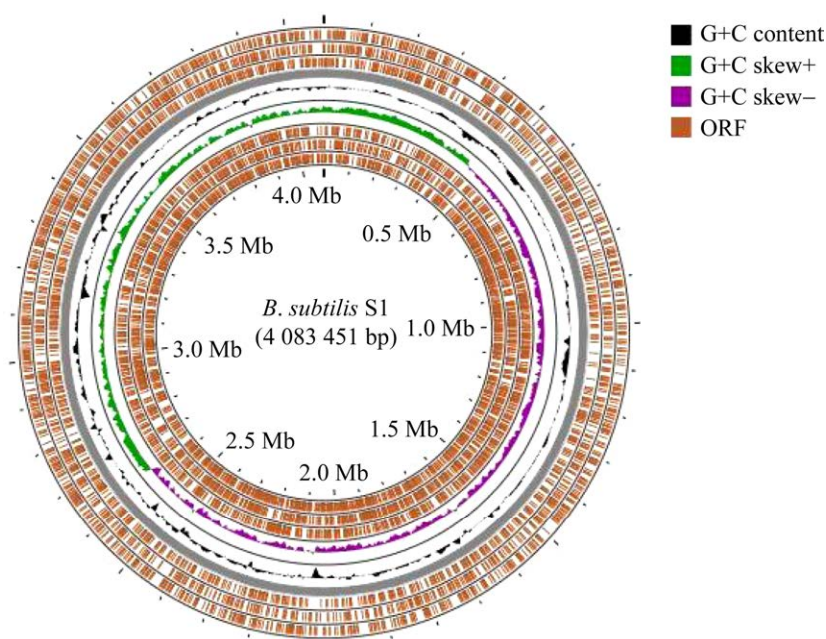


图 7 枯草芽孢杆菌 S1 基因组圈图

Figure 7 Circle diagram of the *Bacillus subtilis* S1 genome. ORF: Open reading frame.

G+C 偏移、G+C 含量。ORF 代表开放阅读框，内 3 圈为 ORF (-)，外 3 圈为 ORF (+)。利用 BRIG 软件进行比较基因组分析，结果显示从基因组结构和序列一致性来看，菌株 S1 和枯草芽孢杆菌的标准株 *B. subtilis* 168 全基因组序列相似性最高，基因变异或缺失相较于其他菌株而言很少(图 8)。

ANI 分析结果表明，菌株 S1 与 *B. subtilis* 168 菌株的全基因组序列一致性约为 98.91%，而与其他 8 株芽孢杆菌属菌株的基因组序列一致性为 67.19%–76.99%，均低于 95% (表 3)。因此，可以确定菌株 S1 在分类上归为枯草芽孢杆菌种，正式定名为 *Bacillus subtilis* S1 菌株。

2.5 次生代谢物合成分析

有研究发现芽孢杆菌对黄瓜病害存在直接

与间接作用两种抑菌机制。直接机制为与病原体竞争空间、营养素或者产生具有抗生素活性和可降解细胞壁的化合物。前者可能是由于生防菌剂吸收营养比病原菌更快，从而妨碍孢子的萌发和菌丝的生长^[9]，或通过胞外水解酶的合成来破坏真菌细胞壁的结构^[10-11]。间接机制主要是诱导抗性和促进植物生长，研究发现生防细菌可通过合成细菌挥发物、分泌活性物质或其他脂肽来诱导抗性^[12]，也可通过提高过氧化氢的积累和有效氮、磷、钾等的含量来促进黄瓜植株的生长^[13]。

通过 antiSMASH 生物信息学分析，结果显示菌株 S1 在自身生长过程中会合成 12 种次级代谢物，表明菌株 S1 具有较强的次生代谢物合成活性。其中，有 6 种次级代谢物有抑菌功能(表 4)。

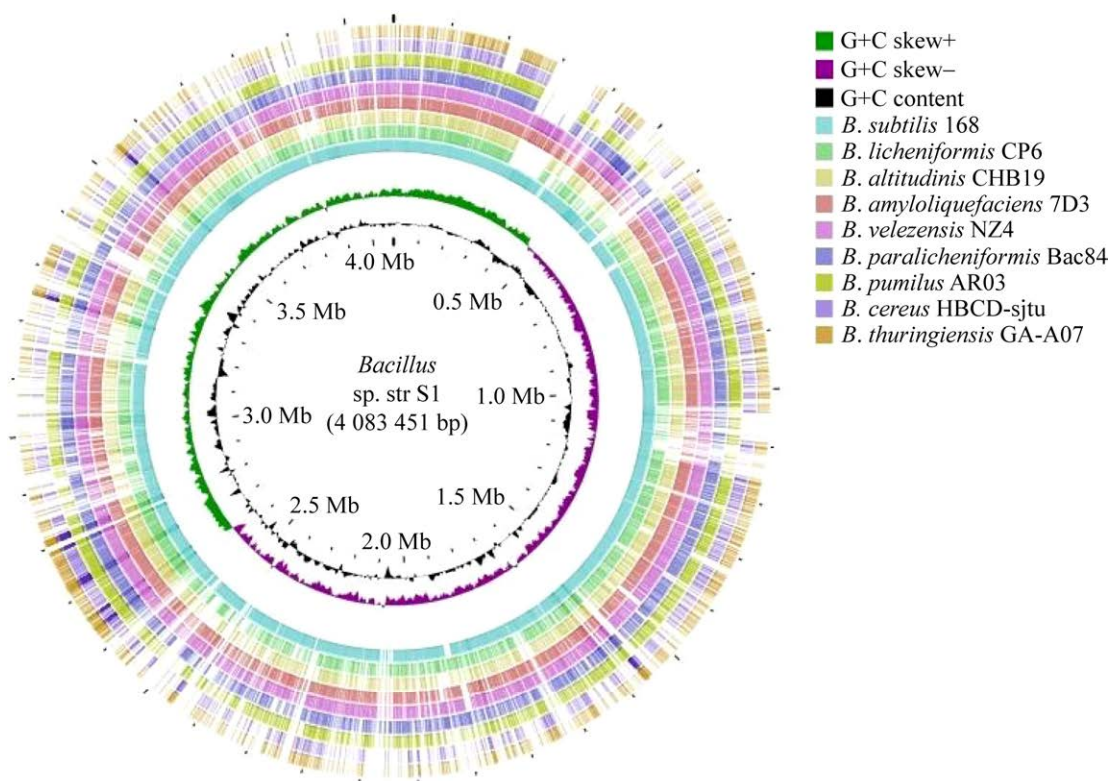


图 8 枯草芽孢杆菌 S1 与同属其他种代表菌株的比较基因组圈图

Figure 8 Comparative genomic circle diagram of *Bacillus subtilis* S1 and representative strains of other species in the same genus.

表 3 菌株 S1 与芽孢杆菌属代表性菌株的基因组一致性比较

Table 3 Comparison of genomic identity between the strain S1 and the representative strains of *Bacillus* genus

Strains No.	S1	CHB19	7D3	HBCD-sjtu	CP6	Bac84	AR03	168	GA-A07	NZ4
S1	*	70.67	76.95	67.27	72.74	72.71	70.86	98.91	67.19	76.99
CHB19		*	70.16	67.50	70.27	70.14	89.25	70.62	67.62	70.28
7D3			*	66.47	72.41	72.32	70.44	77.01	66.50	94.08
HBCD-sjtu				*	66.42	66.57	67.57	67.33	91.70	66.59
CP6					*	94.68	70.27	72.71	66.47	72.61
Bac84						*	70.24	72.93	66.55	72.81
AR03							*	70.76	67.35	70.34
168								*	67.26	77.03
GA-A07									*	66.64
NZ4										*

S1: Strain S1; CHB19: *Bacillus altitudinis* CHB19; 7D3: *Bacillus amyloliquefaciens* 7D3; HBCD-sjtu: *Bacillus cereus* HBCD-sjtu; CP6: *Bacillus licheniformis* CP6; Bac84: *Bacillus paralicheniformis* Bac84; AR03: *Bacillus pumilus* AR03; 168: *Bacillus subtilis* 168; GA-A07: *Bacillus thuringiensis* GA-A07; NZ4: *Bacillus velezensis* NZ4. *: Not applicable.

表 4 菌株 S1 产抑菌活性物质的编码基因簇

Table 4 Gene clusters encoding antibacterial active substances in the genome of *Bacillus subtilis* S1

Gene cluster	Start	End	Length (bp)	Product
r1c1	276 680	381 947	105 268	类双硫醇 Bacillaene
r1c2	457 890	534 816	76 927	丰原素 Fengycin
r1c5	1 646 387	1 692 396	46 010	铁载体 Bacillibactin
r1c7	2 218 021	2 239 632	21 612	枯草杆菌肽 A Subtilosin A
r1c8	2 246 387	2 287 805	41 419	芽孢杆菌溶素 Bacilysin
r1c10	2 984 791	3 050 182	65 392	表面活性素 Surfactin

具体包括: 基因簇 r1c1 编码合成 bacillaene, 是一种新型多烯抗生素, 能够抑制原核蛋白的合成, 从而达到一定的抑菌效果^[14]。基因簇 r1c2 编码合成丰原素, 其为一种抗真菌环脂肽^[15]。基因簇 r1c5 编码合成 bacillibactin, 这是一种儿茶酚型嗜铁素。产嗜铁素生物主要有两种促生防病作用方式: 一是通过向胞外分泌嗜铁素以提高周围环境中铁的有效性; 二是与病原菌竞争周围环境中含量有限的铁离子^[2,16]。基因簇 r1c7 编码合成 subtilosin A, 它是一种细菌素, 被证明对多种病原菌具有很好的抗菌活性^[17-18]。基因簇 r1c8 编码合成的 bacilysin 也是一种抗菌物质, 它能够引起金黄色葡萄球菌的溶解, 对真

菌和细菌生长都有显著的抑制能力^[19]。基因簇 r1c10 编码合成表面活性素, 该物质同样具有抑菌活性^[20]。这些重要抑菌活性代谢物的合成对于 *B. subtilis* S1 发挥拮抗作用具有重要的意义。

2.6 菌株 S1 处理蛭石基质栽培中的黄瓜生物量

菌株 S1 对蛭石基质栽培的黄瓜幼苗具有明显的促生作用(图 9)。在促生处理后的第 1 周, 菌株 S1 处理组的幼苗长势就明显优于 CK 组, 并且这种差距在后续 2 周依然明显。施用菌株 S1 可显著提高黄瓜幼苗的株高、株鲜重、根重, 这 3 个指标均显著高于 CK 组, 可能由于在烧杯中生长受限, 两组间的根长差异并不显著。

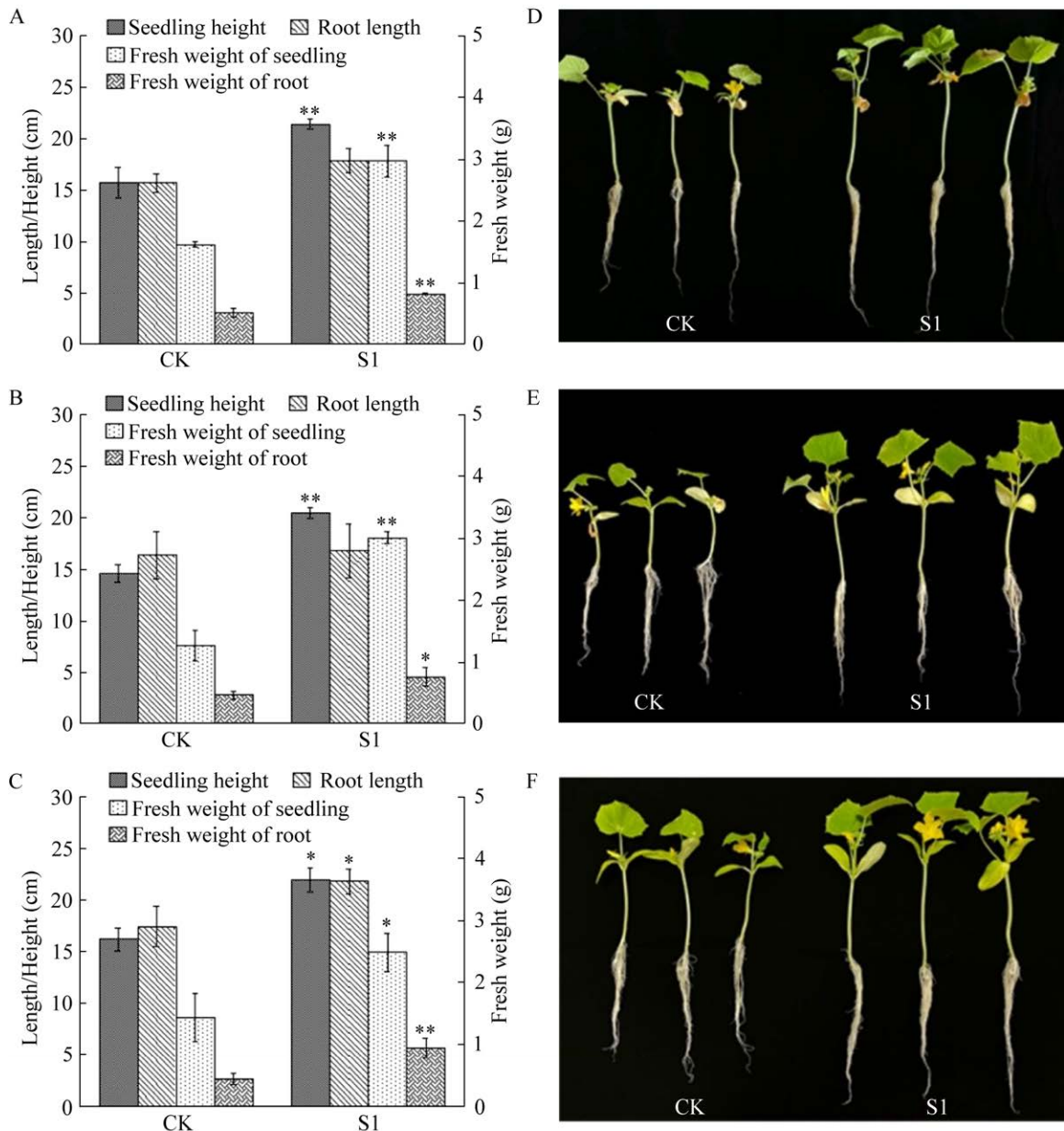


图9 菌株 S1 处理对蛭石基质栽培系统中黄瓜幼苗生物量的影响 A–C 分别为第 15、30 和 45 天时空白组与菌株 S1 处理组间的黄瓜苗的株高、根长、株鲜重和根鲜重的差异显著性分析. D–F 分别展示第 15、30 和 45 天时空白组与菌株 S1 处理组的黄瓜整株差异. 图中柱状图上的单星号、双星号分别表示菌株 S1 与 CK 组间同一生物量存在显著差异($P<0.05$)或极显著性差异($P<0.01$)

Figure 9 Growth promoting effect of strain S1 on cucumber seedlings planted in vermiculite. The significant differences in seedling height, root length, plant fresh weight, and root fresh weight between the control group and the strain S1 treatment group on the 15th, 30th, and 45th days after strain S1 fertilization are shown in A, B and C, respectively. D, E and F exhibit the differences in cucumber whole plants between the control group and the strain S1 treatment group on the 15th, 30th, and 45th day after strain S1 treatment, respectively. The single and double asterisks on the bar chart in the figure indicate significant differences ($P<0.05$) or extremely significant differences ($P<0.01$) in the same biomass between strain S1 and CK groups, respectively.

总体而言,施用菌株 S1 可显著提高黄瓜幼苗的生物量。

2.7 菌株 S1 处理营养土盆栽中的黄瓜生物量

施用菌株 S1 后第 15 天,黄瓜幼苗的株鲜重极显著高于施用无菌水的 CK 组。处理后第 45 天,菌株 S1 处理组的黄瓜幼苗在株高、株鲜重、根长上都显著优于 CK 组(图 10)。这表明菌株 S1 处理对营养土盆栽中的黄瓜生物量有显著的提升作用。

3 讨论与结论

一直以来,生防菌剂被认为是绿色、环保且无公害的农药替代品。从根际土壤中筛选拮抗菌株是生防菌开发的重要途径之一,通过这种途径找到有益菌来维持健康的植物微生物群,对黄瓜生产中的病害防治具有重要意义^[21-22]。本研究采集了来自大棚黄瓜、番茄、玉米、茄子、辣椒、苜蓿、香柚等 7 种植物根际土壤,通过分离、纯化和抑菌活性筛选,最终得到一株理想的黄瓜根际促生生防菌 *B. subtilis* S1,该菌株对玉米小斑病菌和黄瓜白粉病菌均有良好的抑菌活性。白粉菌是活体寄生菌,无法离体培养和保存。若直接以白粉病菌作为指示菌进行拮抗菌的活性筛选需要种植大量的黄瓜植株,筛选周期长、成本高、工作量大,这种筛选方法不适合大量拮抗菌株的筛选。基于此,本研究选用玉米小斑病菌作为供试真菌进行生防菌株的初筛,快速缩小拮抗菌株的筛选范围,再通过黄瓜白粉病菌接种实验对目标菌株进行复筛鉴定,可以加快筛选进度。枯草芽孢杆菌在农业上广泛用作促生防病菌,研究发现枯草芽孢杆菌生物制剂能更好地促进马铃薯生长,增加产量,抑制马铃薯疮痂病发生,具有生产实践

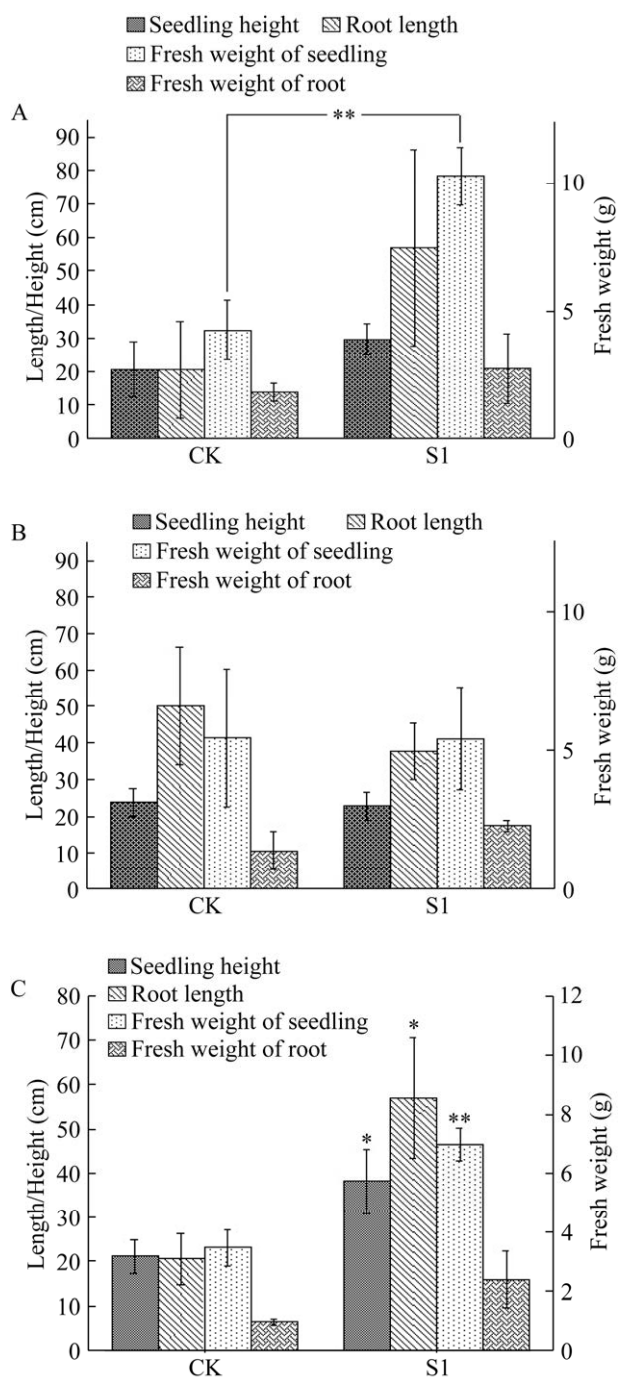


图 10 S1 处理对盆栽系统中黄瓜幼苗的促生作用
A: 15 d. B: 30 d. C: 45 d.

Figure 10 Growth promoting effect of the *Bacillus subtilis* S1 on cucumber seedlings planted in vegetable soils. A: Day 15. B: Day 30. C: Day 45. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

价值^[23]。枯草芽孢杆菌 Bs-15 可通过产嗜铁素及诱导植株系统抗性增强对甜椒枯萎病的防效,并显著提高甜椒苗的株高、平均单果重和单株产量,促进提早开花^[24]。近年来,采用枯草芽孢杆菌防治黄瓜白粉病屡有报道,研究者从枯草芽孢杆菌菌株田间防效测定^[25]、微粉剂的研制^[26]、菌株在黄瓜体内的定殖能力及防病机制等方面开展了系列研究^[27]。但是,这些研究多从宏观层面探索和开发芽孢杆菌防治黄瓜白粉病的应用价值,采用基因组学和遗传工程等技术全面揭示芽孢杆菌促生抗病分子机制的报道不多。菌株 S1 全基因组序列的获得为后续开展其遗传改造、基因生物学功能分析、生防菌剂的研制等提供了便利。同时,也为定向克隆该菌株的生防、促生相关基因和筛选鉴定重要的抗菌蛋白、次级代谢物等打下坚实的基础。

芽孢杆菌生防菌剂在田间的使用效果不稳定,容易受到土壤、气候等环境因子的影响。由于菌株 S1 细胞具有较厚的荚膜及周生鞭毛,这有利于其更好地适应不良的外界环境如高温、干旱和紫外线杀伤,提高在植物根部的定殖和获取营养的能力。许多枯草芽孢杆菌能产促生物质如吲哚乙酸(IAA)、植酸酶、赤霉素等,从而促进植物生长。最近有报道从日本野漆树组培苗中分离鉴定出一株内生枯草芽孢杆菌 BSH-1,该菌株被证明产 IAA 的能力达到 17.27 mg/L,可提升水稻幼苗的株高、茎粗和生根数,从而促进植株生长^[28]。郭英等证实生防枯草芽孢杆菌 T2 胞外植酸酶在增强小麦耐盐性方面起着重要作用^[29]。有研究者通过转座子 Tn917 的转座诱变,构建了枯草芽孢杆菌 B931 的突变体库,从中筛选得到多个产生长素、赤霉素、细胞分裂素能力增加的突变体,并证实这些突变体对甘薯苗的生根有显著的促进作用^[30]。

本研究通过蛭石基质栽培系统和菜园土盆

栽系统的促生试验,证实枯草芽孢杆菌 S1 对黄瓜植株的生长有明显的促进作用。无论是灌根处理还是叶面喷施菌株 S1,这种促生作用均显著有效,表明菌株 S1 的促生作用与施用方式无关,促生效应是菌株自身的生物学特性所致。在实验过程中,我们发现以蛭石作为栽培基质,黄瓜苗的生物量显著小于菜园土栽培系统,这可能是由于蛭石系统除能提供少量的矿质元素,总体上缺乏黄瓜生长所需的充足营养,而菜园土营养基质养分充足,微生物菌群丰富,存在较好的氮、磷营养供应和循环代谢。在研究细菌对植物的促生效应方面,以灭菌蛭石作栽培基质可以避免土壤系统中各种影响因子(生物/非生物的)的干扰,简化了栽培系统,黄瓜生长环境简单稳定,促生结果相对直观。以菜园土作为栽培基质,这种方式更贴合生产实际,这两种栽培系统的结合使用更有力地证明了菌株 S1 对黄瓜生长具有显著的促进作用,但其促生机制如促生物质的鉴定以及合成条件等需要进一步研究。生物信息学分析表明菌株 S1 可产生包括嗜铁素、丰原素等多种抗菌活性物质,这有助于其充分发挥生防抗病能力。采用优化细菌培养条件、基因突变等方法提高抗性物质的产量,理论上可以提高生防效果。枯草芽孢杆菌在田间的抗病促生及在土壤中定殖、增殖能力的发挥与菌剂载体的选择有密切关系。研究表明,在枯草芽孢杆菌 GY801 系列菌剂中,海藻精是比较合适的土壤增殖和促生载体,而豆粕粉是相对比较合适的抑菌防病载体^[31]。

为更好地挖掘枯草芽孢杆菌 S1 在黄瓜生产上的促生抗黄瓜白粉病的潜力,今后可开展 S1 菌剂载体的筛选工作,深入探究菌株 S1 与土壤微生物间的互作机制,考察施用菌株 S1 对黄瓜根际土壤中的微生物菌群结构组成、群落丰度及菌种多样性的影响,为将菌株 S1 开发成理想的生防菌剂提供理论指导。

REFERENCES

- [1] ELSHARKAWY M, KAMEL S, EL-KHATEEB N. Biological control of powdery and downy mildews of cucumber under greenhouse conditions[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2014, 24(2): 407-414.
- [2] LALITHA S, NITHYAPRIYA S. Production of bacillibactin siderophore from soil bacteria, *Bacillus subtilis*: a bioinoculant enhances plant growth in *Arachis hypogaea* L. through elevated uptake of nutrients[C]//Proceedings of the International Seminar on Promoting Local Resources for Sustainable Agriculture and Development (ISPLRSAD 2020) Advances in Biological Sciences Research. October 8, 2020. Bengkulu, Sumatra, Indonesia. Paris, France: Atlantis Press, 2021.
- [3] 贺永华, 沈东升, 朱荫涓. 根系分泌物及其根际效应[J]. 科技通报, 2006, 22(6): 761-766.
- HE YH, SHEN DS, ZHU YM. Root exudates and their rhizospheric effects[J]. Bulletin of Science and Technology, 2006, 22(6): 761-766 (in Chinese).
- [4] HIGGINS D, DWORKIN J. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(1): 131-148.
- [5] 李瑞芳, 赵玉峰, 薛雯雯, 田洪源, 张长付. 一株芽孢杆菌 16S rRNA 基因序列测定和系统进化分析[J]. 广东农业科学, 2011, 38(3): 121-122, 125.
- LI RF, ZHAO YF, XUE WW, TIAN YY, ZHANG CF. Sequencing and phylogenetic analysis of the partial 16S rRNA gene in a *Bacillus* strain[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2011, 38(3): 121-122, 125 (in Chinese).
- [6] 国家质量技术监督局. 农药 田间药效试验准则: GB/T 17980.19—2000[S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- State Bureau of Quality and Technical Supervision of the People's Republic of China. Pesticide-Guidelines for the field efficacy trials: GB/T 17980.19—2000[S]. Beijing: Standards Press of China, 2000 (in Chinese).
- [7] ALIKHAN NF, PETTY NK, BEN ZAKOUR NL, BEATSON SA. BLAST ring image generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 402.
- [8] LEE I, OUK KIM Y, PARK SC, CHUN J. OrthoANI: an improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(2): 1100-1103.
- [9] LASTOCHKINA O, SEIFIKALHOR M, ALINIAEIFARD S, BAYMIEV A, PUSENKOVA L, GARİPOVA S, KULABUHOVA D, MAKSIMOV I. *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables[J]. Plants, 2019, 8(4): 97.
- [10] ONGENA M, JACQUES P, TOURÉ Y, DESTAIN J, JABRANE A, THONART P. Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol potential of *Bacillus subtilis*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 69(1): 29-38.
- [11] AKTUGANOV GE, GALIMZYANOVA NF, MELENT'EV AI, KUZ'MINA LY. Extracellular hydrolases of strain *Bacillus* sp. 739 and their involvement in the lysis of micromycete cell walls[J]. Microbiology, 2007, 76(4): 413-420.
- [12] PAN HQ, LI QL, HU JC. The complete genome sequence of *Bacillus velezensis* 9912D reveals its biocontrol mechanism as a novel commercial biological fungicide agent[J]. Journal of Biotechnology, 2017, 247: 25-28.
- [13] JIANG CH, WU F, YU ZY, XIE P, KE HJ, LI HW, YU YY, GUO JH. Study on screening and antagonistic mechanisms of *Bacillus amyloliquefaciens* 54 against bacterial fruit blotch (BFB) caused by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*[J]. Microbiological Research, 2015, 170: 95-104.
- [14] PATEL PS, HUANG S, FISHER S, PIRNIK D, AKLONIS C, DEAN L, MEYERS E, FERNANDES P, MAYERL F. Bacillaene, a novel inhibitor of prokaryotic protein synthesis produced by *Bacillus subtilis*: production, taxonomy, isolation, physico-chemical characterization and biological activity[J]. The Journal of Antibiotics, 1995, 48(9): 997-1003.
- [15] WISE C, FALARDEAU J, HAGBERG I, AVIS TJ. Cellular lipid composition affects sensitivity of plant pathogens to fengycin, an antifungal compound produced by *Bacillus subtilis* strain CU12[J]. Phytopathology, 2014, 104(10): 1036-1041.
- [16] DERTZ EA, XU JD, STINTZI A, RAYMOND KN. Bacillibactin-mediated iron transport in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of the American Chemical Society, 2006, 128(1): 22-23.
- [17] SHELBURNE CE, AN FY, DHOLPE V, RAMAMOORTHY A, LOPATIN DE, LANTZ MS. The spectrum of antimicrobial activity of the bacteriocin subtilosin A[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2007, 59(2): 297-300.
- [18] BABASAKI K, TAKAO T, SHIMONISHI Y, KURAHASHI K. Subtilosin A, a new antibiotic peptide produced by *Bacillus subtilis* 168: isolation, structural analysis, and biogenesis[J]. The Journal of Biochemistry, 1985, 98(3): 585-603.
- [19] 吴黎明, 李曦, 伍辉军, 高学文. 芽孢杆菌抗菌二肽

- 溶杆菌素的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(5): 778-783.
- WU LM, LI X, WU HJ, GAO XW. Research advances on Bacilysin from *Bacillus*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(5): 778-783 (in Chinese).
- [20] MOHAMMADIPOUR M, MOUSIVAND M, JOUZANI GS, ABBASALIZADEH S. Molecular and biochemical characterization of Iranian surfactin-producing *Bacillus subtilis* isolates and evaluation of their biocontrol potential against *Aspergillus flavus* and *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2009, 55(4): 395-404.
- [21] BERG G, KÖBERL M, RYBAKOVA D, MÜLLER H, GROSCH R, SMALLA K. Plant microbial diversity is suggested as the key to future biocontrol and health trends[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2017, 93(5): fix050.
- [22] SYED AB RAHMAN, SHARIFAH FARHANA, SINGH EUGENIE, PIETERSE CORNÉ MJ, SCHENK PEER M. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens[J]. Plant Science (Limerick), 2018, 267: 102-111.
- [23] 胡金雪, 樊建英, 相丛超, 贾明飞, 封志明, 李东玉, 张淑青. 枯草芽孢杆菌对马铃薯的促生防病效应[J]. 中国瓜菜, 2023, 36(10): 121-128.
- HU JX, FAN JY, XIANG CC, JIA MF, FENG ZM, LI DY, ZHANG SQ. Effects of *Bacillus subtilis* on growth promotion and disease control of potato[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2023, 36(10): 121-128 (in Chinese).
- [24] 余贤美, 周广芳, 辛力. 枯草芽孢杆菌 Bs-15 产嗜铁素条件及其对甜椒的防病促生效应[J]. 农药学报, 2010, 12(2): 135-141.
- YU XM, ZHOU GF, XIN L. Study on factors influencing the siderophore production of *Bacillus subtilis* Bs-15 and effects of Bs-15 on disease control and growth promotion of sweet pepper[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2010, 12(2): 135-141 (in Chinese).
- [25] 熊宏玉, 郭永星, 王婉莹, 熊宏斌. 枯草芽孢杆菌对黄瓜白粉病的生物防治[J]. 云南农业, 2021(10): 65-67.
- XIONG HY, GUO YX, WANG WY, XIONG HB. Biological control of cucumber powdery mildew by *Bacillus subtilis*[J]. Yunnan Agriculture, 2021(10): 65-67 (in Chinese).
- [26] 揣红运, 谢学文, 石延霞, 柴阿丽, 李宝聚. 枯草芽孢杆菌微粉剂的研制及其对黄瓜白粉病的防治效果[J]. 植物病理学报, 2019, 49(5): 660-669.
- CHUAI HY, XIE XW, SHI YX, CHAI AL, LI BJ. Preparation of micropowder of *Bacillus subtilis* and its control effect on cucumber powdery mildew[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2019, 49(5): 660-669 (in Chinese).
- [27] 祁超, 寸海春, 何鹏飞, 李兴玉, 吴毅歆, 何鹏搏, 何月秋. 生防菌 YN201490 在黄瓜植株体内的定殖能力及防病机制的初步研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2019, 41(1): 172-180.
- QI C, CUN HC, HE PF, LI XY, WU YX, HE PB, HE YQ. Colonization ability in cucumber plant and biocontrol mechanism of *Bacillus subtilis* YN201490[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2019, 41(1): 172-180 (in Chinese).
- [28] 卢宇, 马东晓, 周锦涛, 胡治旭, 杨泽慧, 段晓盟, 纵丹, 何承忠. 一株产吡啶乙酸的日本野漆树内生枯草芽孢杆菌生长条件及其促生特性研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(3): 392-399.
- LU Y, MA DX, ZHOU JT, HU ZX, YANG ZH, DUAN XM, ZONG D, HE CZ. Growth conditions and growth-promoting characteristics of an endophytic bacterium from *Toxicodendron succedaneum*[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2023, 38(3): 392-399 (in Chinese).
- [29] 郭英, 刘栋, 赵蕾. 生防枯草芽孢杆菌胞外植酸酶对小麦耐盐性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(1): 39-43.
- GUO Y, LIU D, ZHAO L. Effects of extracellular phytase produced by a biocontrol strain of *Bacillus subtilis* T2 on salt tolerance of wheat seedlings[J]. Chinese Journal of Applied Environmental Biology, 2009(1): 39-43 (in Chinese).
- [30] 张霞, 唐文华, 张力群. 枯草芽孢杆菌 B931 防治植物病害和促进植物生长的作用[J]. 作物学报, 2007, 33(2): 236-241.
- ZHANG X, TANG WH, ZHANG LQ. Biological control of plant diseases and plant growth promotion by *Bacillus subtilis* B931[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(2): 236-241 (in Chinese).
- [31] 李慧芬, 方安然, 冯海霞, 赵明珠, 周波. 不同载体在枯草芽孢杆菌菌剂中的作用研究[J]. 中国土壤与肥料, 2023(7): 213-222.
- LI HF, FANG AR, FENG HX, ZHAO MZ, ZHOU B. Study on the function of different carriers in *Bacillus subtilis*[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2023(7): 213-222 (in Chinese).