

研究报告

萎缩芽胞杆菌 CKL1 促盐胁迫下燕麦生长活性及其功能基因分析

陈兰¹, 谢永丽^{*1,2}, 吴晓晖¹, 杨雪¹, 王添¹, 武玲玲¹

1 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室, 青海 西宁 810016

2 青海省青藏高原优良牧草种质资源利用重点实验室, 青海 西宁 810016

陈兰, 谢永丽, 吴晓晖, 杨雪, 王添, 武玲玲. 萎缩芽胞杆菌 CKL1 促盐胁迫下燕麦生长活性及其功能基因分析[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3150-3164

Chen Lan, Xie Yongli, Wu Xiaohui, Yang Xue, Wang Tian, Wu Lingling. *Avena sativa* growth-promoting activity of *Bacillus atrophaeus* CKL1 under salt stress and the functional genes[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3150-3164

摘要:【背景】青海省特殊生境孕育了特殊微生物资源。【目的】探究适合生活于高原生境的芽胞杆菌菌源。【方法】采用平板对峙法、显色法对萎缩芽胞杆菌(*Bacillus atrophaeus*) CKL1 的拮抗、产吡啶乙酸活性进行测定, 并检测耐低温、耐盐性及菌株对盐胁迫下燕麦品种(*Avena sativa*)“青燕 1 号”种子萌发、幼苗生长效应及叶绿素、脯氨酸、丙二醛的含量变化, 利用二代测序技术对菌株进行基因组测序并分析相关功能基因。【结果】菌株 CKL1 对禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)、锐顶镰孢菌(*Fusarium acuminatum*)表现出显著的拮抗活性(抑菌圈直径>15 mm); 与 Salkowski 比色液反应变红, 能在 NaCl 浓度为 13% 的 LB 培养基及 4 °C 低温下生长, 表现出一定的产吡啶乙酸、耐盐及耐低温活性; 盐胁迫下, 菌株 CKL1 对“青燕 1 号”种子萌发及幼苗生长具有显著促进作用, 叶绿素及脯氨酸含量显著增加, 丙二醛含量下降, 增强了燕麦的抗盐性。菌株 CKL1 基因组全长为 14 281 280 bp, 与 GO 功能数据库比对注释到 3 303 个功能基因; 基因组编码与脂肽类化合物 iturin、surfactin 合成及与吡啶乙酸合成相关基因, 编码与逆境应答相关 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白及脯氨酸、甜菜碱等渗透调节物质合成相关基因簇, 编码参与高盐及低温胁迫应答转录调控因子的关键基因。【结论】本研究为利用芽胞杆菌促盐胁迫下燕麦生长、提高燕麦抗盐性提供了优异菌株及理论依据。

关键词: 萎缩芽胞杆菌; 盐胁迫; 促燕麦生长活性; 耐逆性; 功能基因分析

基金项目: 青海省科技厅国际科技合作专项(2018-HZ-813); 青海大学省部共建三江源生态与高原农牧业国家重点实验室自主课题(2019-ZZ-12); 国家自然科学基金(32160030)

Supported by: International Sci-Technology Cooperation Project of Qinghai Provincial Department of Science and Technology (2018-HZ-813); State Key Laboratory of Ecology and Plateau Agriculture and Animal Husbandry in Qinghai University (2019-ZZ-12); National Natural Science Foundation of China (32160030)

*Corresponding author: E-mail: qhdxxyl@163.com

Received: 2021-11-25; Accepted: 2021-12-30; Published online: 2022-02-09

Avena sativa growth-promoting activity of *Bacillus atrophaeus* CKL1 under salt stress and the functional genes

CHEN Lan¹, XIE Yongli^{*1,2}, WU Xiaohui¹, YANG Xue¹, WANG Tian¹, WU Lingling¹

1 State Key Laboratory of Plateau Ecology and Agriculture, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

2 Key Laboratory of Superior Forage Germplasm in the Qinghai-Tibetan Plateau, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Background] The unique eco-environment in Qinghai province allows the growth of special microbial resources. [Objective] To explore *Bacillus* resources that can tolerate the plateau environment. [Methods] Antagonistic activity and indole-3-acetic acid (IAA) production of *Bacillus atrophaeus* CKL1 were determined by plate confrontation and chromogenic method, respectively. Moreover, the low-temperature tolerance and salt resistance of CKL1, as well as the influence of CKL1 on seed germination, seedling growth and the content of chlorophyll, proline, and malondialdehyde of *Avena sativa* ‘Qingyan 1’ under salt stress were detected. Then, the whole genome of CKL1 was analyzed by next-generation sequencing and the functional genes were dissected. [Results] CKL1 significantly antagonized *Fusarium graminearum* and *F. acuminatum* (inhibition zone diameter >15 mm). The reaction solution of CKL1 and Salkowski reagent turned red and the strain grew in LB medium with 13% NaCl and at 4 °C, indicating that it could produce IAA and was tolerant to salt and low temperature. CKL1 significantly promoted seed germination and seedling growth of ‘Qingyan 1’ under salt stress, significantly increased the content of chlorophyll and proline, decreased the content of malondialdehyde, and enhanced the salt resistance of ‘Qingyan 1’. The genome of CKL1 was 14 281 280 bp, and 3 303 functional genes were annotated against GO. The genome encodes genes related to the synthesis of lipopeptides iturin and surfactin, and the synthesis of IAA, gene clusters related to the synthesis of osmoregulation substances such as proline and betaine, and the Na⁺/H⁺ antiporter in stress response, as well as the key genes encoding transcriptional regulators involved in response to high salt and low temperature. [Conclusion] The study lays a theoretical basis for using *Bacillus* to promote the growth of *A. sativa* under salt stress.

Keywords: *Bacillus atrophaeus*; salt stress; *Avena sativa* growth-promoting activity; stress resistance; functional gene analysis

燕麦(*Avena sativa*)为禾本科燕麦属草本植物,是优良的草料兼用栽培作物^[1],具有耐寒、耐旱、耐盐碱的特点,在青藏高原高寒环境中具有独特的生存及适应能力^[2]。其茎叶嫩而多汁、适口性好、营养价值高,青贮或干草均可作为家畜饲料^[3],是提高牧区抗灾保畜能力及稳定和推进畜牧业发展的重要基础。

青海高原缺氧、低温、强紫外线的极端环

境使牧草生长缓慢、产草量低^[4],同时过度放牧、鼠虫害等作用加剧了天然草地退化,导致“黑土滩”大量出现^[5]。此外,青海省多为盐碱地和荒漠地,盐渍化会降低土壤水势,引起植物生理干旱,阻碍植物正常生长;同时,盐浓度过高导致植物发生单盐毒害,影响植物正常代谢^[6]。燕麦须根系发达,可减少无效蒸发和地表径流,是青藏高原保护生态环境和防止水土

流失的重要栽培牧草^[7]。因此,利用栽培牧草扩大草场面积,提高盐碱地等贫瘠土地植被覆盖率是实现草场可持续发展的有效措施。

芽胞杆菌作为一类重要的植物根际促生菌,可产生能够抵抗盐碱、干旱、低温、紫外线等不良环境的芽胞,是一类被广泛研究和应用的生防细菌^[8]。研究发现,芽胞杆菌可定殖在植物根围,分泌生长素等激素类物质,直接促进植物生长;可抑制植物病原物生长或诱导植物抗病性,间接促进植物生长^[9]。代金霞等^[10]研究发现对苜蓿(*Medicago sativa*)和柳枝稷(*Panicum virgatum*)幼苗接种复合菌群 C3 和 C8,可明显提高其生物量;谢永丽等^[11]研究发现,分离自青海北山林场的 QB11、QB12、QB13 等 11 株芽胞杆菌对油菜菌核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)具有显著拮抗活性,推断与其产生了具有抑菌作用的脂肽类化合物泛革素有关。因此,利用根围促生菌促进牧草生长、提高草地生物量、改善生态环境在青海省草业发展中极其重要。

本研究对分离自青海茶卡盐湖骆驼蓬(*Peganum L.*)根际的萎缩芽胞杆菌 CKL1 的拮抗活性、产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)活性、耐低温及耐盐性进行测定,并通过测定 CKL1 对盐胁迫下青海本土燕麦品种“青燕 1 号”地上生物量、叶绿素含量、脯氨酸含量及丙二醛含量的影响,探究 CKL1 对燕麦的促生作用,并利用二代测序技术对菌株 CKL1 的基因组进行测序及分析,同时对菌株的拮抗、促生、应答逆境胁迫等相关功能基因进行分析,以期揭示菌株 CKL1 对盐胁迫下燕麦的促生机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

芽胞杆菌:以课题组前期分离鉴定的青海

茶卡盐湖骆驼蓬(*Peganum L.*)根围的萎缩芽胞杆菌 CKL1 为研究对象^[12]。

病原真菌:禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、锐顶镰孢菌(*Fusarium acuminatum*)保存于青海大学高原草地资源与生态省部共建重点实验室。

培养基及试剂:LB 培养基^[13];PDA 培养基^[14];低温 1C 培养基^[15];Salkowski 比色液^[16]。

草种:燕麦(*A. sativa*)品种“青燕 1 号”保存于青海省青藏高原优良牧草种质资源利用重点实验室。

1.2 方法

1.2.1 菌株 CKL1 拮抗病原真菌活性测定

分别打取禾谷镰孢菌、锐顶镰孢菌菌碟接种到 PDA 平板中央,倒置于 28 °C 恒温箱中培养至菌落直径为平板直径的 1/2,在距离平板中央 2.5 cm 处的 4 个对称点各放置一个直径 4 mm 的滤纸小圆片;菌株 CKL1 于 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 振荡培养 14 h,吸取 5 μ L CKL1 菌悬液至滤纸小圆片,将处理平板继续倒置于恒温培养箱中 2–3 d,一个处理 3 次重复,观测并记录抑菌结果^[17]。

1.2.2 菌株 CKL1 产吲哚乙酸能力测定

已活化的 CKL1 菌悬液与 Salkowski 比色液按体积比 2:1 混合至白色陶瓷板中,避光静置 30 min,一个处理 3 个重复,以 LB 液体培养基为对照,若显色后变为红色,表示 CKL1 能够分泌吲哚乙酸。将 CKL1 菌悬液 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 5 mL 离心管中,加入等量比色液,避光静置 30 min 后测定 OD_{530} 值,根据标准曲线计算菌株 CKL1 分泌吲哚乙酸的量^[16]。

1.2.3 菌株 CKL1 耐逆性测定

耐盐性测定:菌株 CKL1 接种到 LB 液体培养基中,37 °C、200 r/min 振荡培养 14 h;吸取 50 μ L 菌液涂布于含 NaCl 浓度分别为 3%、

5%、7%、9%、11%、13%和 15%的 LB 固体培养基上,倒置于 37 °C 恒温培养箱中培养 5 d,一个处理 3 个重复,每天观察并记录菌株的生长情况^[17]。

耐低温测定:将菌株 CKL1 接种到 1C 液体培养基中,37 °C、200 r/min 振荡培养 14 h,取 10 μ L 菌液点到 1C 固体培养基上,设置 4、10、14、18 °C 4 个温度梯度培养 5 d,一个处理 3 次重复,每天观察并记录生长情况^[18]。

1.2.4 菌株 CKL1 促盐胁迫下燕麦的生长效应测定

CKL1 对盐胁迫下燕麦种子萌发效应:经 20%次氯酸钠溶液消毒处理 20 min 后的燕麦草种在 CKL1 菌悬液(细胞浓度 1×10^7 CFU/mL)中浸种 2 h 后,播入铺有滤纸的培养皿中,置于光照培养箱中培养(28 °C,光/暗周期 16 h/8 h),3 d 后用 30 mL 的 200 mmol/L NaCl 溶液进行盐胁迫处理;每 2 天测定种子发芽数,12 d 后测定燕麦种子芽长、根长。一个处理 3 个重复,无菌水处理作对照。每个重复选 20 粒种子进行测定和记录^[19-20]。

CKL1 对盐胁迫下燕麦幼苗生长效应:天然土与蛭石按 2:1 (体积比)混合后以 120 °C 灭菌;消毒处理后的燕麦种子播入穴盆中,置于光照培养箱中培养(25 °C,光/暗周期 16 h/8 h)。设置 3 个处理:CKL1+200 mmol/L NaCl、ddH₂O+200 mmol/L NaCl、ddH₂O+0 mmol/L NaCl。待植株高达到 3 cm 时,以无菌水悬浮 CKL1 菌体,制成浓度为 1×10^7 CFU/mL 的 CKL1 菌悬液,取 50 mL 对植株进行灌根处理,对照组用同体积无菌水处理,每 5 天灌根一次,共 2 次灌根;灌根结束 5 d 后,用 30 mL 的 200 mmol/L NaCl 溶液进行灌根处理,即为盐胁迫,待胁迫结束 5 d 后取出燕麦幼苗,用无菌水将根冲洗干净,测量其株高和根长,擦干燕

麦幼苗表面水分后测定鲜重并检测其生理生化特性^[19-20]。

1.2.5 菌株 CKL1 促盐胁迫下燕麦的抗逆生理测定

盐胁迫下叶绿素含量的测定:参考《植物生理学实验指导》^[21]。燕麦叶片 0.2 g 剪碎至研钵中充分研磨,加入 3 mL 的 80%丙酮继续研磨发白,静置 5 min,过滤并用 96%乙醇定容至 25 mL 棕色容量瓶中;以 96%乙醇为空白,于 665、649、470 nm 处分别测定吸光度,按公式计算叶绿体色素含量。

盐胁迫下脯氨酸含量的测定:参考《植物生理学实验指导》^[21]。燕麦叶片 0.2 g,加入 5 mL 的 8%磺基水杨酸溶液,水浴加热 10 min,冷却至室温,加入冰乙酸和显色液继续加热 40 min,甲苯萃取至分层,于 520 nm 处测定吸光度,按公式计算脯氨酸含量。

盐胁迫下丙二醛含量的测定:参考《植物生理学实验指导》^[21]。燕麦叶片 0.5 g,加入 5 mL 10% TCA 及少量石英砂进行研磨,4 000 r/min 离心 10 min;取上清液 2 mL (对照加 2 mL 蒸馏水),加入 2 mL 的 0.6% TBA 溶液,水浴加热 15 min,迅速冷却,再次离心;于 532、600、450 nm 处分别测定上清液的吸光度,按公式计算丙二醛含量。

1.2.6 菌株 CKL1 全基因组测序

芽胞杆菌 CKL1 接种于 LB 液体培养基中,以 37 °C、200 r/min 振荡培养 14 h,10 000 r/min 离心 10 min 获取菌体,液氮速冻后,置于装有干冰的保温箱中送至上海美吉生物医药科技有限公司进行全基因组测序。

2 结果与分析

2.1 芽胞杆菌 CKL1 的拮抗病原真菌活性拮抗实验结果表明,菌株 CKL1 对禾谷镰

孢菌、锐顶镰孢菌均可产生明显的抑菌圈，其中菌株 CKL1 拮抗锐顶镰孢菌抑菌圈平均直径为 18 mm，具有显著的拮抗活性，能较大幅度地抑制病原真菌的生长。说明芽胞杆菌可利用微生物之间拮抗、竞争作用阻止致病菌的菌丝生长(图 1)。

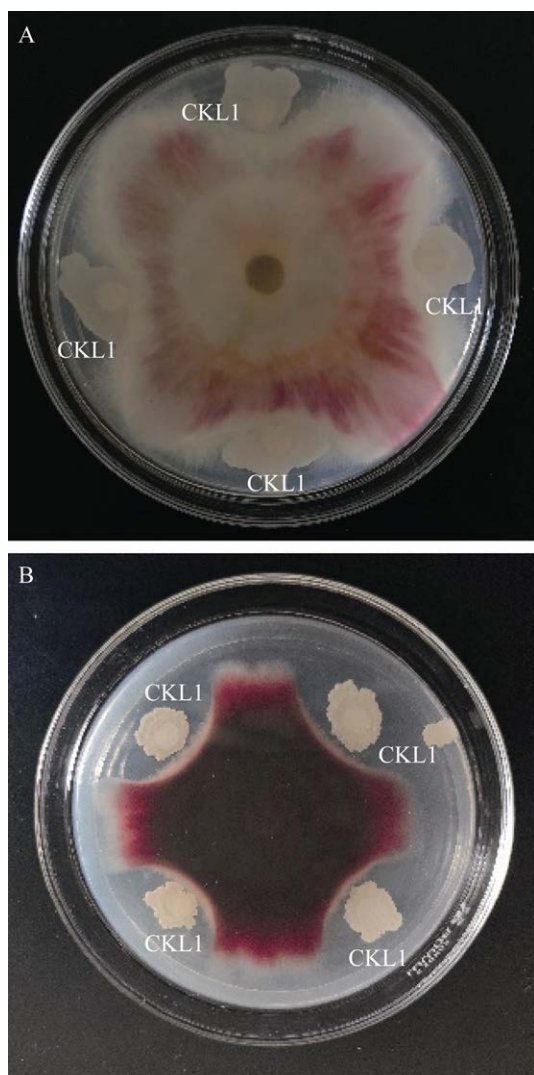


图 1 芽胞杆菌 CKL1 拮抗病原真菌活性 A: 拮抗禾谷镰孢菌; B: 拮抗锐顶镰孢菌

Figure 1 Antagonistic activity of *Bacillus* CKL1 to pathogens. A: Antagonistic activity to *Fusarium graminearum*; B: Antagonistic activity to *Fusarium acuminatum*.

2.2 芽胞杆菌 CKL1 的产吲哚乙酸能力

通过 Salkowski 显色法和 IAA 标准曲线对芽胞杆菌 CKL1 进行产 IAA 能力的定性、定量测定。将振荡培养的 CKL1 菌悬液与 Salkowski 比色液按比例混合至比色盘，静置 30 min 后溶液变红，表明芽胞杆菌 CKL1 具有产吲哚乙酸的能力；绘制 IAA 标准曲线，得到标准方程为 $y=0.0189x+0.1271$ ，测得菌株 CKL1 在 530 nm 处的吸光度为 0.279，计算出菌株 CKL1 在含 100 mg/L 色氨酸的金氏培养基中 IAA 的合成量为 8.037 $\mu\text{g/mL}$ (图 2)。

2.3 芽胞杆菌 CKL1 的耐逆性

2.3.1 耐盐性

将菌株 CKL1 的菌液分别涂布于含 NaCl 浓度为 3%、5%、7%、9%、11%、13%和 15% 的 LB 固体培养基，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养。结果表明，菌株 CKL1 在含 NaCl 浓度为 3%、5%、7%、9%、11%和 13%的 LB 平板上均可正常生长，在含 NaCl 浓度为 15%的 LB 培养基上不能正常生长，表现出一定的耐盐性(表 1)。

2.3.2 低温适生性

芽胞杆菌 CKL1 在 14 $^{\circ}\text{C}$ 和 18 $^{\circ}\text{C}$ 条件下，培养 1 d 后长出菌圈；10 $^{\circ}\text{C}$ 低温条件下，其生长和扩展较快，培养 2 d 后即出现明显的菌苔；

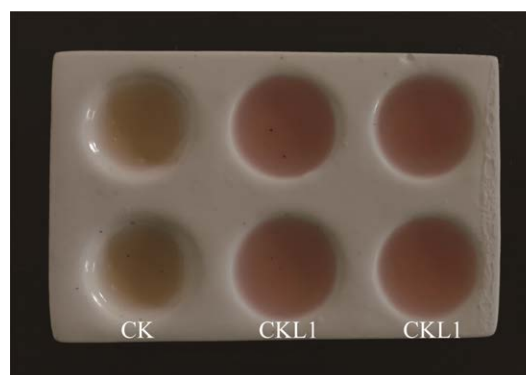


图 2 芽胞杆菌 CKL1 产吲哚乙酸显色反应

Figure 2 Colorimetric reaction of *Bacillus* CKL1.

表 1 芽胞杆菌 CKL1 的耐盐性及低温适生性

Strain	Salt-resistance characteristic (%)							Low-temperature adaptability (°C)			
	3	5	7	9	11	13	15	18	14	10	4
CKL1	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	+++	+++	+++	+

注: +++: 生长良好; ++: 正常生长; +: 缓慢生长; —: 不能生长
Note: +++: Growth well; ++: Growth normal; +: Growth slowly; —: Nonviable.

4 °C 低温条件, 可缓慢生长, 在培养 3 d 后出现菌苔, 表现出良好的低温适生性。因此, 菌株 CKL1 对高原低温环境具有更好的耐受性(表 1)。

2.4 菌株CKL1促盐胁迫下燕麦的生长效应

2.4.1 CKL1 促盐胁迫下燕麦种子萌发效应

经 CKL1 菌悬液浸种的燕麦种子播种 2 d 后其发芽率高于 CK 组, 而且在整个观察期中菌悬液浸种后的种子发芽率及发芽势都明显高于 CK 组, 其中, 第 12 天悬液浸种的燕麦种子发芽率为 100%, CK 组发芽率为 80%(图 3)。测定菌悬液浸种与 CK 组已发芽的燕麦种子的芽长及根长, 菌悬液浸种后芽长和根长的最大值分别为 5.25 cm 和 3.75 cm, 显著大于 CK 组, 芽胞杆菌 CKL1 对芽长和根长的促生效果分别为 79.83%和 87.33%(图 3)。

2.4.2 CKL1 促盐胁迫下燕麦幼苗生长效应

用 CKL1 菌悬液(浓度为 1×10^7 CFU/mL)对燕麦幼苗进行二次灌根, 再以 30 mL 的 200 mmol/L NaCl 进行胁迫处理后, 发现与 ddH₂O+200 mmol/L NaCl 组相比其长势较好。测定燕麦幼苗的株高、根长及鲜重发现, 盐胁迫下经菌株 CKL1 灌根对燕麦的生长有促进作用。CKL1+200 mmol/L NaCl 组中测得燕麦植株的株高、根长及鲜重最大值分别为 24.5 cm、12.2 cm 和 0.449 g, 与 ddH₂O+200 mmol/L NaCl 组相比其株高、根长及鲜重分别提高了 44.54%、66.98%和 45.42%, 与 ddH₂O+0 mmol/L NaCl 组相比其株高、根长及鲜重分别提高了 40.61%、59.52%和 130.81%(图 4, 表 2)。实验结果表明, 芽胞杆菌 CKL1 可减轻盐胁迫对燕麦生长的影响, 促进燕麦生长, 积累生物量。

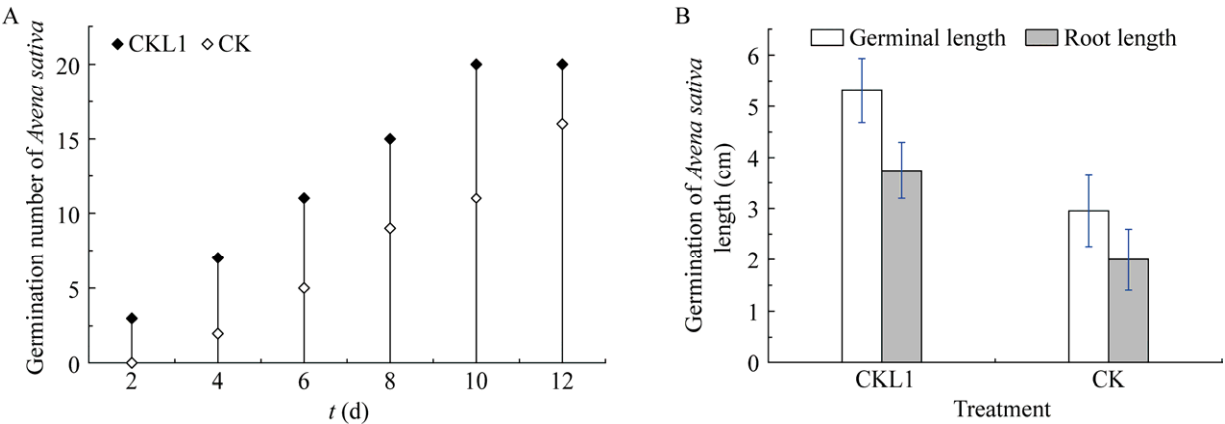


图 3 盐胁迫下 CKL1 促燕麦种子萌发及生长 A: 燕麦种子发芽数; B: 燕麦种子萌发能力
Figure 3 The strain CKL1 promotes the germination of *Avena sativa* under salt stress. A: Germination number of *Avena sativa*; B: Germination ability of *Avena sativa*.

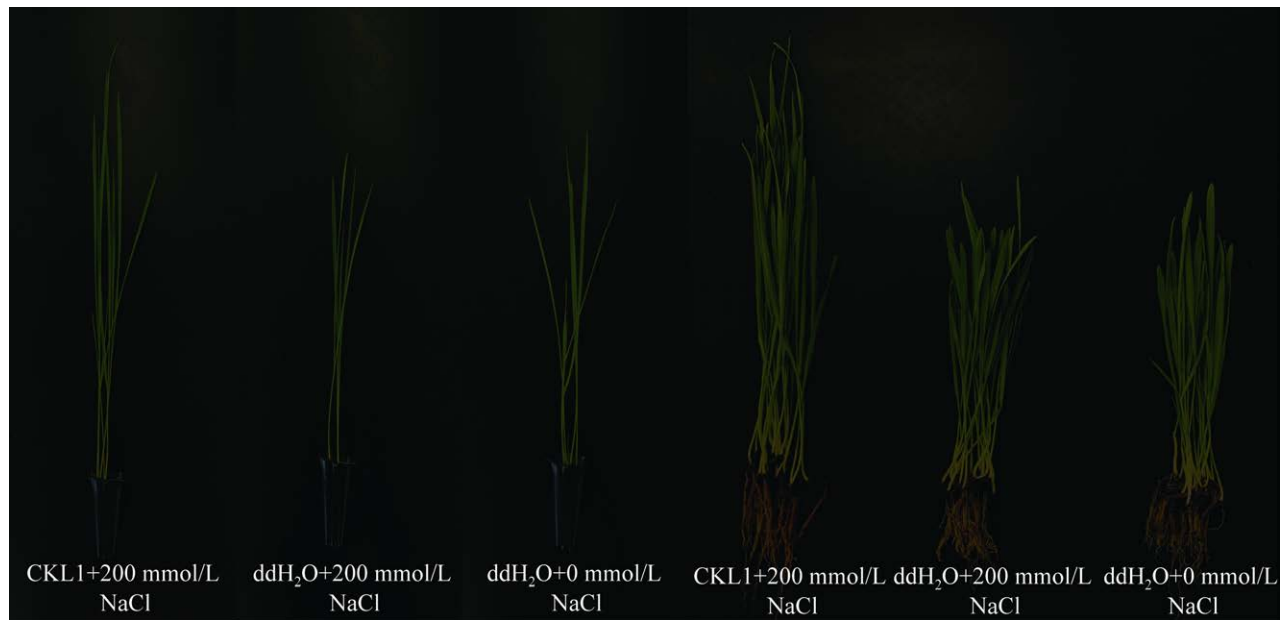


图 4 盐胁迫下 CKL1 对燕麦幼苗生物量的影响
Figure 4 Effects of strain CKL1 on boimass of *Avena sativa* under salt stress.

表 2 盐胁迫下 CKL1 对燕麦幼苗促生效果
Table 2 Effect of *Bacillus* strains on seedlings growth under salt stress

Isolates	Aboveground part		Underground part		Fresh weight of seedling (g)	Weight increased effect (%)
	Average plant height (cm)	Growth promoting effect (%)	Average root length (cm)	Growth promoting effect (%)		
CKL1+200 mmol/L NaCl	22.245±2.783	44.54*	8.040±1.846	66.98*	0.397±0.074	45.42*
ddH ₂ O+200 mmol/L NaCl	15.390±1.371	0.00	4.815±1.358	0.00	0.273±0.064	0.00
CKL1+200 mmol/L NaCl	22.245±2.783	40.61*	8.040±1.846	59.52*	0.397±0.074	130.81**
ddH ₂ O+0 mmol/L NaCl	15.820±1.976	0.00	5.040±0.880	0.00	0.172±0.045	0.00

注：±：标准差，*：在 5%水平上差异显著，**：在 1%水平上差异显著
Note: ±: Standard deviation, *: Significant difference at the 0.05 level, **: Significant difference at the 0.01 level.

2.5 菌株 CKL1 促盐胁迫下燕麦的抗逆性分析

2.5.1 盐胁迫下燕麦的叶绿素含量

测定盐胁迫下燕麦叶片中叶绿素含量，以 CKL1 菌悬液灌根处理后燕麦叶片中的叶绿素含量为 27.002 mg/g-FW，与 ddH₂O+0 mmol/L NaCl 组相比叶绿素含量稍有提高，但不明显；相较于 ddH₂O+200 mmol/L NaCl 组，CKL1 处理过的叶片中叶绿素含量明显提高(图 5)。推测

芽胞杆菌 CKL1 对盐胁迫下燕麦的叶绿素降解有一定的抑制作用，从而使植株在盐胁迫下维持相对正常的光合作用。

2.5.2 盐胁迫下燕麦的脯氨酸含量

制作脯氨酸含量的标准曲线，得到标准方程为 $y=0.0377x-0.0097$ ，获得各处理组的脯氨酸含量。在盐胁迫下，以 CKL1 菌悬液处理后的燕麦植株脯氨酸含量为 20.309 μg/g-FW，相较于 ddH₂O+200 mmol/L NaCl 组提高了 25.25% (图 6)。

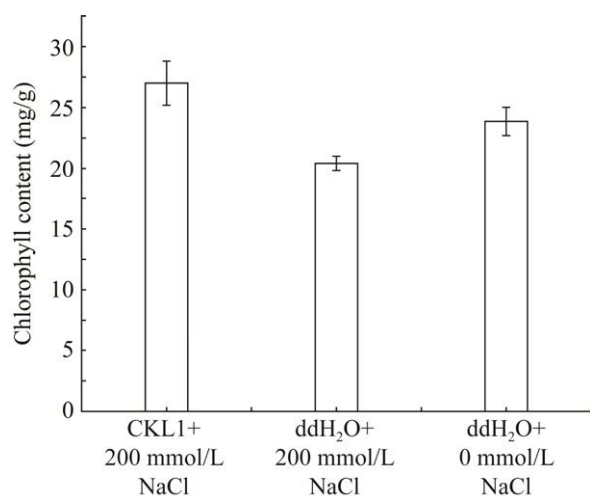


图5 盐胁迫下 CKL1 对燕麦叶绿素含量的影响
Figure 5 Effect of CKL1 on chlorophyll content of *Avena sativa* in salt stress.

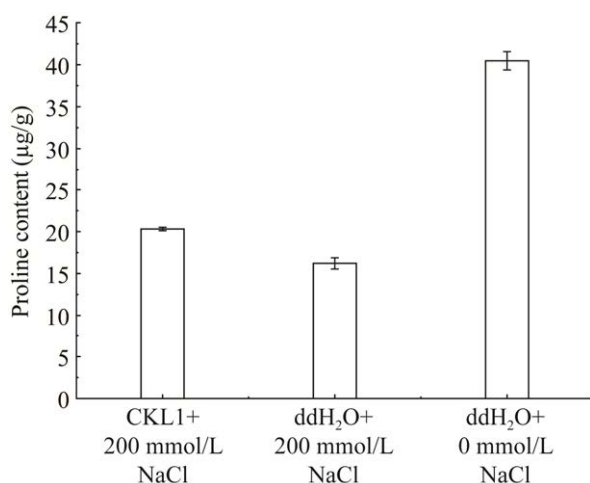


图6 盐胁迫下 CKL1 对燕麦脯氨酸含量的影响
Figure 6 Effects of CKL1 on proline content of *Avena sativa* in salt stress.

说明芽胞杆菌 CKL1 可使遭受盐胁迫燕麦中的脯氨酸含量提高, 通过细胞渗透调节减轻盐胁迫对燕麦的伤害。

2.5.3 盐胁迫下燕麦的丙二醛含量

植物在逆境胁迫下会发生膜脂过氧化作用, 其产物丙二醛的含量可以反映植物遭受

逆境伤害的程度。CKL1 菌悬液处理后燕麦幼苗的丙二醛含量为 6.160 μmol/g-FW, ddH₂O+200 mmol/L NaCl 组与 ddH₂O+0 mmol/L NaCl 组的丙二醛含量分别为 5.447 μmol/g-FW 和 7.527 μmol/g-FW (图 7)。CKL1 菌悬液处理后, 燕麦在盐胁迫下丙二醛含量降低, 说明芽胞杆菌 CKL1 能缓解燕麦植株在盐胁迫下的细胞膜脂过氧化作用, 减缓细胞膜受到伤害。

2.6 菌株 CKL1 基因组序列分析

2.6.1 基因组的基本特征

全基因组测序结果表明, CKL1 菌株基因组由一个 DNA 序列为 4 281 280 bp 的染色体组成, GC 含量为 43.0%, 共编码 4 078 个蛋白; 基因数量为 4 305, 具有 16 个 rRNA, 69 个 tRNA; CKL1 与萎缩芽胞杆菌的相似性为 89.723%, 最接近的基因相似性达 91.812 3%, 2 个基因簇之间的一致性达到 91%; CKL1 基因组序列在 NCBI 的登录号为 NZ_PVWA000000000.1。

2.6.2 基因组功能注释

将菌株 CKL1 的基因序列与 GO 数据库进行比对, 共注释到 3 303 个功能基因, 占基因

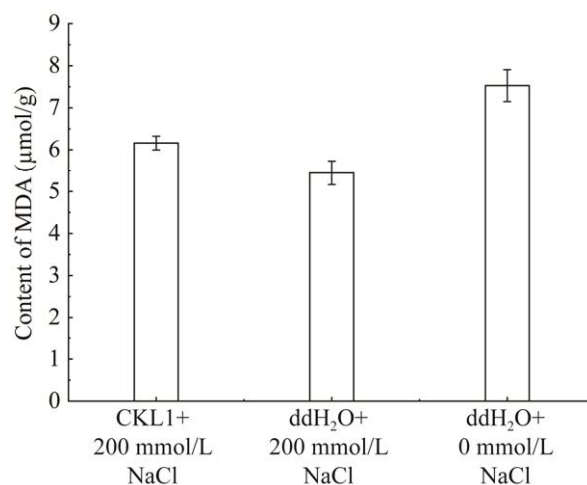


图7 盐胁迫下 CKL1 对燕麦丙二醛含量的影响
Figure 7 Effects of CKL1 on malondialdehyde content of *Avena sativa* under salt stress.

总量的 76.72%，划分为生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)三类。其中与生物过程相关功能基因有 907 个，主要与转录调控、DNA 模板、翻译及跨膜运输密切相关，也参与碳水化合物代谢、DNA 修复等过

程；与细胞组分相关功能基因有 1 069 个，主要与膜的组成成分、细胞质、质膜相关；与分子功能相关基因有 1 642 个，主要与 ATP 结合、DNA 结合相关，同时也参与金属离子结合、转录因子活性、跨膜转运体活动、腺苷三磷酸酶活性等活动(图 8 和图 9)。

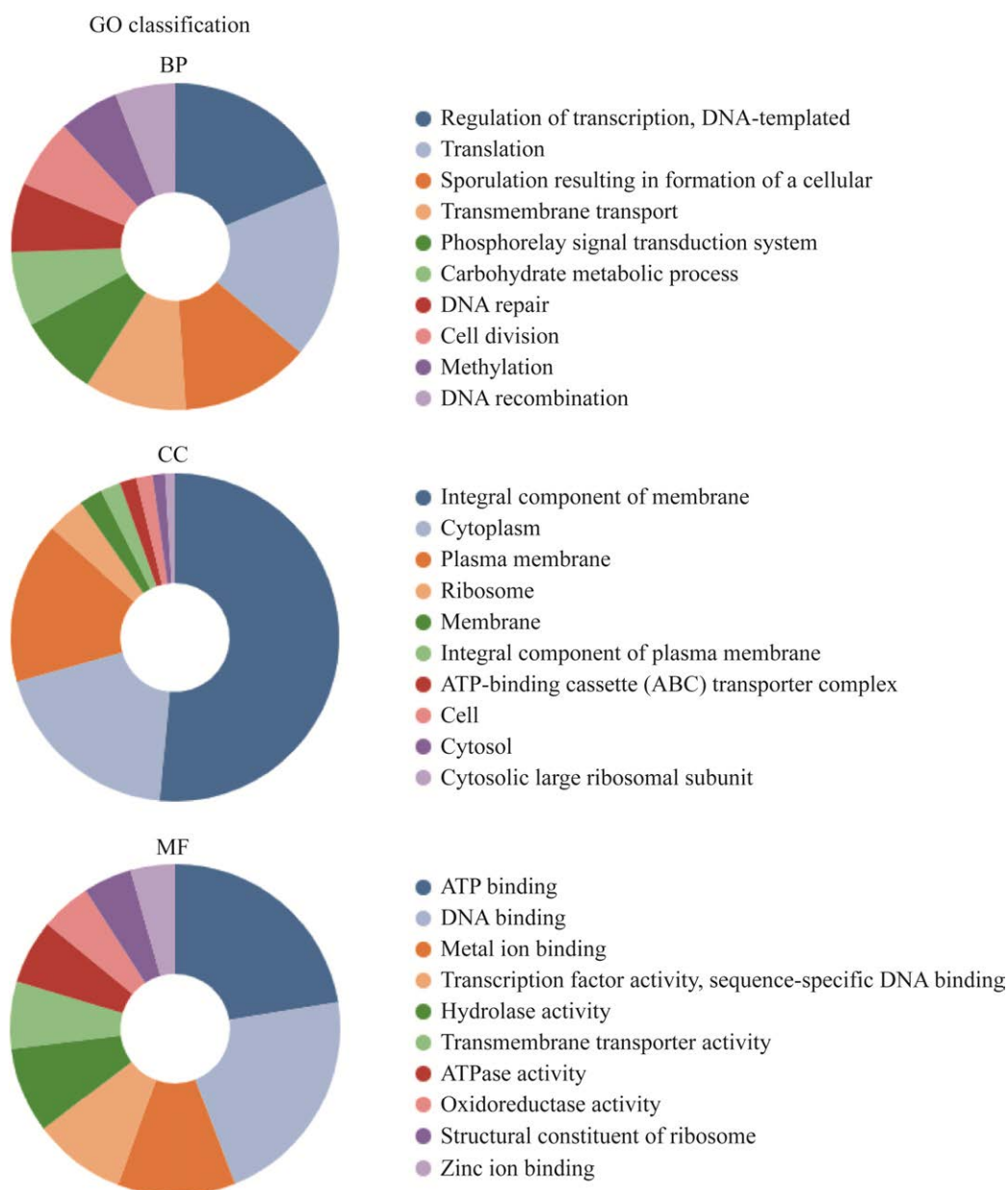


图 8 GO 功能分类分析

Figure 8 Gene distribution based on GO classification.

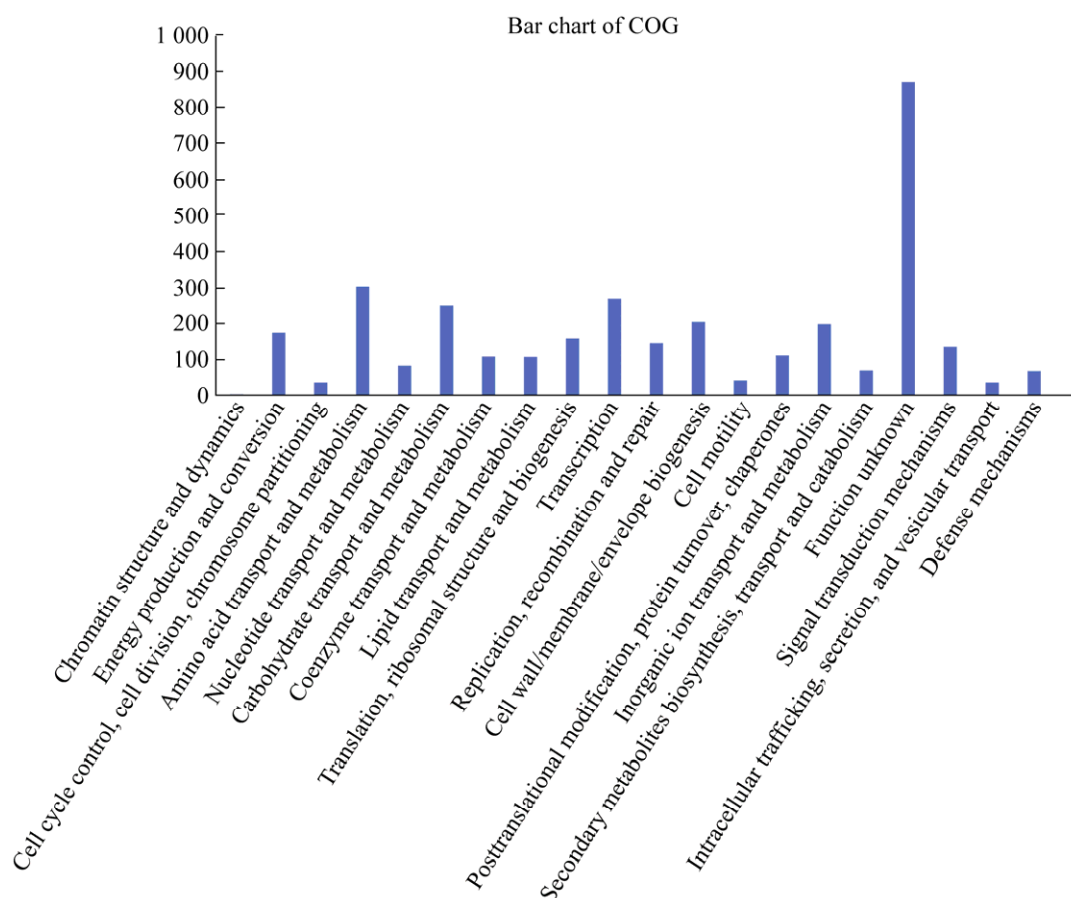


图9 COG 注释聚类分析

Figure 9 Gene distribution based on COG classification.

2.6.3 菌株 CKL1 的相关功能基因分析

(1) 拮抗活性相关基因分析

菌株 CKL1 可拮抗病原真菌禾谷镰孢菌、锐顶镰孢菌, 又可知芽胞杆菌的拮抗活性与可产生具有拮抗活性的脂肽类抗生素有关。基因组序列分析表明: CKL1 具有编码抑菌活性的脂肽化合物蛋白的基因簇, 包括编码脂肽类化合物 iturin 合成的关键基因 *ituA*、*ituB* 和 *ituC*, 编码 surfactin 合成的关键基因 *srfATE*、*srfAC*、*srfAB* 和 *srfAA*, 表明菌株 CKL1 可通过非核糖体肽途径合成脂肽类抗菌物质伊枯草菌素(iturin)和表面活性素(surfactin), 拮抗病原真菌, 抑制其生长(表 3)。此外, CKL1 菌株具有编码细胞色素 P450、甲基转移酶、ACP 合成酶的 PKS 家族的

基因 *pksS*、*pksR* 和 *pksF*, 这 3 个蛋白参与细胞的抗病促生作用。

(2) 促生相关功能基因分析

菌株 CKL1 可产生 IAA 从而促进植物生长(表 3)。基因组测序分析表明, CKL1 基因组中包含编码与生长激素合成相关的关键基因 *trpC*、*trpB* 和 *trpA*^[22], 参与色氨酸依赖的 IAA 合成途径, 直接促进植物生长。此外, 发现 CKL1 存在一个未知基因具有铁载体能力, 可提高植物体内铁素含量, 诱导植物抗病性, 间接促进植物生长^[23]。

(3) 耐胁迫相关功能基因分析

据报道, 植物应答胁迫的渗透调节物质包含 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 等无机盐离子和甜菜碱、脯氨

表 3 菌株 CKL1 编码的相关功能基因分析

Table 3 Related function gene analysis of CKL1

Gene names	Location	Length	Function
<i>ituA</i>	28 596–40 541	11 946	Iturin synthase gene, with inhibition of fungal activity
<i>ituB</i>	40 592–56 683	16 092	Iturin synthase gene, with inhibition activity
<i>ituC</i>	56 958–64 571	7 614	Iturin synthase gene, with inhibition activity
<i>srfATE</i>	224 866–224 132	735	Surfactin biosynthesis thioesterase gene
<i>srfAC</i>	228 724–224 894	3 831	Surfactin synthetase gene, with inhibition activity
<i>srfAB</i>	239 512–228 743	10 770	Surfactin synthetase gene, with inhibition activity
<i>srfAA</i>	250 307–239 535	10 773	Surfactin synthetase gene, with inhibition activity
<i>pksS</i>	281 931–283 172	1 242	Cytochrome P450, with antimicrobial activity
<i>pksR</i>	291 002–283 278	7 725	Methyltransferase gene, involved in growth-promoting gene expression
<i>pksF</i>	353 688–352 441	1 248	ACP synthase gene, regulated cell membrane fluidity
<i>trpC</i>	735 425–736 177	753	Involved in the tryptophan-dependent IAA synthesis pathway, associated with defense responses
<i>trpB</i>	736 819–738 021	1 203	Beta gene
<i>trpA</i>	738 014–738 817	804	Tryptophan synthase subunit alpha gene
–	186 664–185 711	954	Siderophore ABC transporter substrate-binding protein gene
<i>mnhA</i>	71 395–73 815	2 421	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit A, maintained normal growth under high salt stress
<i>mnhB</i>	73 793–74 224	432	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit B, maintained normal growth under high salt stress
<i>mnhC</i>	74 224–74 565	342	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit C, maintained normal growth under high salt stress
<i>mnhD</i>	74 549–76 039	1 491	Mrp gene, enhanced resistance to adversity and synergetic transport of serine
<i>mnhE</i>	76 045–76 521	477	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit E, maintained normal growth under high salt stress
<i>mnhF</i>	76 521–76 805	285	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit F, maintained normal growth under high salt stress
<i>mnhG</i>	76 789–77 163	375	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit G, maintained normal growth under high salt stress
<i>proS</i>	420 054–418 360	1 695	Proline-tRNA ligase gene, increased tolerance to osmotic stress
<i>proC</i>	789 642–788 803	840	Involved in proline synthesis, alleviated cell apoptosis
<i>opuA</i>	298 729–297 584	1 146	Betaine/proline/choline family ABC transporter ATP-binding protein gene
<i>opuBD</i>	300 262–299 588	675	Glycine betaine/carnitine/choline/choline sulfate ABC transporter permease gene
<i>opuC</i>	301 203–300 286	918	Osmotic transporter gene
<i>desR</i>	895 474–894 875	600	Response regulator transcription factor, involved in fatty acid synthesis
<i>desK</i>	896 607–895 471	1 137	Sensor histidine kinase gene, involved in low temperature response
<i>yesM</i>	111 473–113 203	1 731	Response regulator transcription factor, involved in metabolism and stress response
<i>yesN</i>	113 203–114 330	1 128	Response regulator transcription factor, involved in stress response

注：–：未知基因

Note: –: Unknown gene.

酸、可溶性糖等小分子有机物。基因组测序分析表明, CKL1 基因组中存在多个抗逆蛋白及编码渗透调节蛋白的基因簇, 具有编码 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的基因簇, 该基因簇包含 *mnhA*、*mnhB*、*mnhC*、*mnhD*、*mnhE*、*mnhF* 和 *mnhG*; 也具有编码脯氨酸、甜菜碱等渗透蛋白合成的基因簇, 其中, 基因 *proS*、*proC* 参与脯氨酸合成, 可增加对渗透胁迫的耐性, OPU 家族的 *opuA*、*opuBD* 和 *opuC* 编码渗透转运蛋白参与渗透调节, 可缓解细胞凋亡。此外, 转录调控因子关键基因 *desR*、*desK*、*yesM* 和 *yesN* 可参与高盐、低温胁迫应答^[24], 菌株 CKL1 促进盐胁迫下燕麦体内脯氨酸含量明显变化, 通过合成脯氨酸等渗透调节物质以提高植物抗逆性, 促进燕麦生长(表 3)。

3 讨论与结论

青海高原地处世界屋脊, 具有沙化严重、植被稀少和土壤盐渍化等特点, 燕麦(*A. sativa*)作为优质牧草, 逐渐成为青海高寒牧区推广的栽培草种, 是冷季喂养中不可或缺的优良牧草^[25], 因此, 提高燕麦在恶劣环境中的产草量和品质是维持青海省畜牧业持续发展和生态稳定的重要措施。据报道, 在干旱、盐碱、低温等非生物胁迫条件下, 植物根际促生菌能够通过调节植物乙烯合成速度, 调控乙烯相关信号通路, 诱导逆境蛋白的产生, 从而缓解盐碱、干旱、水涝、温度等对植物的逆境胁迫^[26]。因此, 在极端生境中利用有益菌类使燕麦达到高产稳产是推进畜牧业可持续发展和维持高原生态良好的基础。

芽胞杆菌作为一类重要的生防细菌, 通过拮抗作用、竞争作用、诱导抗性和促生作用等方式对植物起到防病促生作用^[27]。崔文艳等^[28]研究发现, 解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)

B9601-Y2 菌株能够抑制玉米叶斑病和茎基腐病的生长, 促进植株生长。本研究中萎缩芽胞杆菌 CKL1 拮抗能侵染禾谷类作物及其他植物的禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)和引起马铃薯干腐病的锐顶镰孢菌(*F. acuminatum*), 说明芽胞杆菌 CKL1 能有效防止病原真菌生长及扩散, 提高植物抗病性, 间接促进植物生长; 并且发现菌株 CKL1 有产 IAA 的能力, 通过促进植物细胞生长、分裂及分化直接促进植物生长。张慧等^[29]研究发现, 编码 iturin 蛋白的 *ituD* 基因是 S44 菌株抑菌活性、植物根际定殖与调控的关键因子, 菌株 CKL1 全基因组测序表明, CKL1 基因组中存在编码抑菌活性的脂肽化合物伊枯草菌素(iturin)和表面活性素(surfactin)的基因 *ituA*、*ituB*、*ituC* 及 *srfATE*、*srfAC*、*srfAB*、*srfAA*, 具有抗菌活性, 可间接促进植物生长; CKL1 基因组中也存在参与色氨酸依赖的 IAA 合成途径所必需的基因 *trpC* 及编码色氨酸合酶的基因 *trpB*、*trpA*, 可直接促进植物生长。

刘畅等^[30]报道盐胁迫下施用木霉菌肥小麦叶片的丙二醛含量和过氧化氢含量显著低于施用化肥的小麦。本研究中经 CKL1 菌悬液浸种后的燕麦种子在盐胁迫处理后萌发率可达 100%, 而且发芽速度较快, 长势也优于对照; 经 CKL1 菌悬液灌根处理后的燕麦幼苗在盐胁迫下其株高、根长、鲜重显著提高。燕麦幼苗经 CKL1 菌悬液处理后维持了燕麦植株在盐胁迫下相对正常的光合作用, 测得其叶绿素含量均高于对照组; 并且维持了燕麦在盐胁迫下的脯氨酸合成, 通过积累较高水平的脯氨酸含量进行渗透调节从而提高燕麦的抗盐性; 此外, 燕麦在盐胁迫下的丙二醛含量显著降低, 表明芽胞杆菌 CKL1 的处理可抑制燕麦细胞膜脂过氧化, 降低膜脂过氧化产物丙二醛的积累, 保护生物膜结构的完整性。综合可知, 萎缩芽胞

杆菌 CKL1 具有一定的耐盐性, 而且对盐胁迫下燕麦的生长具有较好的促进作用。菌株 CKL1 基因组分析表明存在编码渗透调节物质的基因簇, 其中, 参与 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白合成的基因包括 *mnhA*、*mnhB* 和 *mnhC* 等, 参与脯氨酸、甜菜碱等合成的基因簇包含 *proS*、*proC* 及 *OPU* 家族, 参与转录调控的关键基因包含 *desR*、*desK*、*yesM* 和 *yesN*。

萎缩芽胞杆菌 CKL1 具有低温适生性及耐盐性的特点, 同时具有显著拮抗病原真菌活性及产吡啶乙酸的能力, 在极端环境中具有更好的适应性, 从而增强植物抗病性、促进植物生长, 在盐碱地等贫瘠土壤植被恢复中具有一定的应用潜力。本研究综合菌株 CKL1 的生物学活性及基因组序列分析, 揭示了盐胁迫下 CKL1 对燕麦的促生效应, 展现了菌株 CKL1 良好的逆境适生能力及抗病促生能力, 为利用促生菌促燕麦生长提供了优质菌株及理论依据。

REFERENCES

- [1] 侯龙鱼, 朱泽义, 杨杰, 马赫, 李青梅, 陶金, 范冰, 郝建玺, 闫景赞, 周青平, 等. 我国饲草用燕麦现状、问题和潜力[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2019, 45(3): 248-253
Hou LY, Zhu ZY, Yang J, Ma H, Li QM, Tao J, Fan B, Hao JX, Yan JY, Zhou QP, et al. Current status, problems and potentials of forage oat in China[J]. Journal of Southwest Minzu University (Natural Science Edition), 2019, 45(3): 248-253 (in Chinese)
- [2] 崔雄雄, 侯扶江, 常生华, 王召锋. 高寒牧区两个燕麦品种的产量与品质比较[J]. 草业科学, 2018, 35(6): 1489-1495
Cui XX, Hou FJ, Chang SH, Wang ZF. Comparison of yield and nutritional quality of two oat (*Avena sativa*) varieties grown in the alpine pastoral region of China[J]. Pratacultural Science, 2018, 35(6): 1489-1495 (in Chinese)
- [3] 刘凯强, 刘文辉, 贾志锋, 梁国玲, 马祥. 干旱胁迫对‘青燕1号’燕麦产量及干物质积累与分配的影响[J]. 草业学报, 2021, 30(3): 177-188
Liu KQ, Liu WH, Jia ZF, Liang GL, Ma X. Effects of drought stress on yield and dry matter accumulation and distribution of *Avena sativa* cv. Qingyan No.1[J]. Acta Pratacultural Sinica, 2021, 30(3): 177-188 (in Chinese)
- [4] 杨雪, 谢永丽, 陈兰, 吴晓晖, 王添, 青丽婷, 陈海龙. 青海沙地白刺根际解淀粉芽孢杆菌 DGL1 的牧草促生活性及其基因组分析[J]. 草地学报, 2021, 29(8): 1637-1648
Yang X, Xie YL, Chen L, Wu XH, Wang T, Qing LT, Chen HL. Biological activity of grass growth-promoting and genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* DGL1 isolated from the rhizosphere of *Nitraria tangutorum* of sand soil in Qinghai province[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(8): 1637-1648 (in Chinese)
- [5] 李希来. 高寒草甸草地与其退化产物——“黑土滩”生物多样性和群落特征的初步研究[J]. 草业科学, 1996, 13(2): 21-23
Li XL. A preliminary study on biological diversity and features of communities in alpine meadow and its deteriorative result——“black soil patch”[J]. Pratacultural Science, 1996, 13(2): 21-23 (in Chinese)
- [6] 高珊, 杨劲松, 姚荣江, 曹逸凡, 唐冲. 改良措施对苏北盐渍土盐碱障碍和作物磷素吸收的调控[J]. 土壤学报, 2020, 57(5): 1219-1229
Gao S, Yang JS, Yao RJ, Cao YF, Tang C. Effects of soil amelioration measures mitigating soil salinity and improving crop P uptake in coastal area of North Jiangsu[J]. Acta Pedologica Sinica, 2020, 57(5): 1219-1229 (in Chinese)
- [7] 陈功, 张自和, 胡自治. 高寒地区一年生人工草地上生物量动态及光能转化效率[J]. 草业学报, 2003(1): 69-73
Chen G, Zhang ZH, Hu ZZ. Herbage yield dynamics and solar energy conversion of annual cultivated grassland in Xining city[J]. Acta Pratacultural Science, 2003(1): 69-73 (in Chinese)
- [8] 刘邮洲, 陈夕军, 尹小乐, 梁雪杰, 乔俊卿, 刘永锋. 23 株芽胞杆菌及其脂肽类化合物抑菌活性比较[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(3): 533-542
Liu YZ, Chen XJ, Yin XL, Liang XJ, Qiao JQ, Liu YF. Comparative analysis of the antagonistic activities of 23 *Bacillus* spp. strains and their lipopeptide compounds[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2017, 33(3): 533-542 (in Chinese)
- [9] 王梅菊, 刘晨, 吴明德, 张静, 杨龙, 李国庆. 油菜内生细菌多样性分析及菌株 CanL-30 生防潜力评估[J]. 中国油料作物学报, 2018, 40(2): 258-268

- Wang MJ, Liu C, Wu MD, Zhang J, Yang L, Li GQ. Diversity of endophytic bacteria in *Brassica napus* and biocontrol potential of *Bacillus subtilis* CanL-30[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2018, 40(2): 258-268 (in Chinese)
- [10] 代金霞, 田平雅, 沈聪, 刘爽. 耐盐植物根际促生菌筛选及促生效应研究[J]. 生态环境学报, 2021, 30(5): 968-975
- Dai JX, Tian PY, Shen C, Liu S. Screening of rhizosphere bacteria from salt tolerant plants and their growth promoting effects[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2021, 30(5): 968-975 (in Chinese)
- [11] 谢永丽, 徐志伟, 马莉贞, 高学文. 青海北山林场桦树根围芽胞杆菌分子鉴定及其拮抗活性分析[J]. 植物保护学报, 2012, 39(3): 246-252
- Xie YL, Xu ZW, Ma LZ, Gao XW. Molecular identification of *Bacillus* strains isolated from rhizosphere of *Betula platyphylla* in Qinghai Beishan timberland and its antagonistic activity analysis[J]. Journal of Plant Protection, 2012, 39(3): 246-252 (in Chinese)
- [12] 杨雪, 谢永丽, 陈兰, 吴晓晖, 武玲玲, 孟晓霞, 夏介卓玛. 青海极端生境 7 株萎缩芽胞杆菌的生物活性[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2020, 49(4): 459-466
- Yang X, Xie YL, Chen L, Wu XH, Wu LL, Meng XX, Xia JZM. Biological activity of 7 *Bacillus atrophaeus* strains isolated under extreme environment in Qinghai[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2020, 49(4): 459-466 (in Chinese)
- [13] Wu HJ, Wang S, Qiao JQ, Liu J, Zhan J, Gao XW. Expression of HpaGXooc protein in *Bacillus subtilis* and its biological functions[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(2): 194-203
- [14] 薛鹏琦, 刘芳, 乔俊卿, 伍辉军, 冯致科, 高学文. 油菜菌核病生防芽胞杆菌的分离鉴定及其脂肽化合物分析[J]. 植物保护学报, 2011, 38(2): 127-132
- Xue PQ, Liu F, Qiao JQ, Wu HJ, Feng ZK, Gao XW. Screening of *Bacillus* strains with high inhibition on rape *Sclerotinia* disease and its lipopeptide compounds detection[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2011, 38(2): 127-132 (in Chinese)
- [15] 刘芳, 薛鹏琦, 乔俊卿, 伍辉军, 孙健, 高学文. 西藏低温适生芽胞杆菌的分离鉴定及其抗菌和促生作用[J]. 中国生物防治, 2010, 26(4): 453-460
- Liu F, Xue PQ, Qiao JQ, Wu HJ, Sun J, Gao XW. Isolation and identification of a low-temperature-adapted *Bacillus* in Tibet and its antagonistic and growth-promoting effect[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(4): 453-460 (in Chinese)
- [16] 邢芳芳, 高明夫, 胡兆平, 李新柱. 1 株高产 IAA 菌株的筛选、鉴定及对白菜的促生作用[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(10): 458-460
- Xing FF, Gao MF, Hu ZP, Li XZ. Screening and identification of a strain with high yield of IAA and its growth promoting effect on Chinese cabbage[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2016, 44(10): 458-460 (in Chinese)
- [17] 谢永丽, Renato D'Ovidio, Stefania Masci, 范晶, 李云龙. 几株解纤维素生防芽胞杆菌的分子鉴定及其抗逆促生特性分析[J]. 微生物学通报, 2017, 44(2): 348-357
- Xie YL, D'Ovidio R, Masci S, Fan J, Li YL. Molecular identification of cellulose-degrading bio-control *Bacillus* strains and their stress-resistance and growth-promoting characteristics[J]. Microbiology China, 2017, 44(2): 348-357 (in Chinese)
- [18] 谢永丽, 马莉贞, 徐志伟, 张英, 李希来. 冻土荒漠区分离低温适生 PGPR 菌的鉴定及其抗菌促生特性[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 94-100
- Xie YL, Ma LZ, Xu ZW, Zhang Y, Li XL. Identification of low-temperature adapting PGPR strains isolated from frozen desert area and their antimicrobial and growth-promoting activity[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(1): 94-100 (in Chinese)
- [19] 吴晓晖, 谢永丽, Renato D'Ovidio, 张英, 芦光新, 辛总秀, Stefania Masci. 3 株分离自高寒草甸根际芽胞杆菌的分子鉴定及其生物活性[J]. 草业科学, 2017, 34(12): 2454-2463
- Wu XH, Xie YL, D'Ovidio R, Zhang Y, Lu GX, Xin ZX, Masci S. Molecular identification and biological activity of three *Bacillus* strains isolated from an alpine meadow rhizosphere in Qinghai province[J]. Pratacultural Science, 2017, 34(12): 2454-2463 (in Chinese)
- [20] 王田田. 盐胁迫下弯曲芽胞杆菌 KLBMP 4941 对中华补血草的促生效应及其根际互作机理初步研究[D]. 徐州: 江苏师范大学硕士学位论文, 2018
- Wang TT. Preliminary study on the growth promoting effect of *Bacillus flexus* KLBMP 4941 on its host plant *Limonium sinense* and its rhizosphere interaction mechanism under salt stress[D]. Xuzhou: Master's Thesis of Jiangsu Normal University, 2018 (in Chinese)
- [21] 邹琦. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000
- Zou Q. Experimental Guidance in Plant Physiology[M].

- 1st Edition. Beijing: China Agriculture Press, 2000 (in Chinese)
- [22] 刘新仿, 欧阳剑, 何奕昆, 李家洋. 拟南芥吲哚-3-甘油磷酸合酶免疫分析[J]. 植物学报, 1999, 41(7): 78-83
Liu XF, Ouyang J, He YK, Li JY. Immunological analysis of *Arabidopsis* indole 3 glycerol phosphate synthase[J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(7): 78-83 (in Chinese)
- [23] 毛得奖, 朱亚玲, 韩宁. 假单胞菌铁载体及色素研究[J]. 微生物学通报, 2013, 40(3): 500-516
Mao DJ, Zhu YL, Han N. Siderophores and pigments produced by *Pseudomonas* bacteria[J]. Microbiology China, 2013, 40(3): 500-516 (in Chinese)
- [24] 吴冬云, 朱碧岩, 李玲. 拟南芥反应调节因子研究进展[J]. 植物学通报, 2002(5): 629-633, 619
Wu DY, Zhu BY, Li L. Recent advances on the response regulators in *Arabidopsis thaliana*[J]. Chinese Bulletin of Botany, 2002(5): 629-633, 619 (in Chinese)
- [25] 刘文辉, 秦燕, 梁国玲, 贾志锋. 高寒区栽培措施对燕麦人工草地系统碳氮储量及分配机制的影响[J]. 核农学报, 2019, 33(3): 565-573
Liu WH, Qin Y, Liang GL, Jia ZF. Effect of different agronomy treatments on the carbon and nitrogen stock and allocation of the oat cultivation grassland on alpine meadow[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2019, 33(3): 565-573 (in Chinese)
- [26] Lee SW, Lee SH, Balaraju K, Park KS, Nam KW, Park JW, Park K. Growth promotion and induced disease suppression of four vegetable crops by a selected plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) strain *Bacillus subtilis* 21-1 under two different soil conditions[J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2014, 36(6): 1353-1362
- [27] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003(2): 97-103
Chen ZY, Zhang J, Huang DF. Research progress on antimicrobial mechanism and genetic engineering of *Bacillus* for plant diseases biocontrol[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003(2): 97-103 (in Chinese)
- [28] 崔文艳, 何朋杰, 杨丽娟, 何鹏飞, 何鹏搏, 吴毅歆, 李兴玉, 何月秋. B9601-Y2 溶磷解钾固氮能力及促玉米生长效果研究[J]. 玉米科学, 2019, 27(3): 155-160, 168
Cui WY, He PJ, Yang LJ, He PF, He PB, Wu YX, Li XY, He YQ. Phosphorus-and potassium-dissolving and nitrogen-fixing capabilities and growth-promotion effect of B9601-Y2 on maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2019, 27(3): 155-160, 168 (in Chinese)
- [29] 张慧, 杜娟, 赵思峰. 枯草芽孢杆菌 S44 抑菌化合物合成关键基因 *ituD* 的功能分析[J]. 西南农业学报, 2020, 33(10): 2281-2285
Zhang H, Du J, Zhao SF. Functional analysis of antibacterial compound synthesis *ituD* in *Bacillus subtilis* S44[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(10): 2281-2285 (in Chinese)
- [30] 刘畅, 段京涛, 张建夫, 庞丽, 宋昊跃, 陈发菊, 何正权, 张福丽. 盐胁迫条件下木霉菌肥对小麦抗病性和土壤酶活性的影响[J]. 华北农学报, 2021.
Liu C, Duan JT, Zhang JF, Pang L, Song HY, Chen FJ, He ZQ, Zhang FL. Effects of *Trichoderma* fertilizer on wheat disease resistance and soil enzyme activity under salt stress[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2021. (in Chinese)