

研究报告

芽孢杆菌 WL911 促低温下小麦生长效应及其功能基因分析

高英¹, 谢永丽^{*1,2,3}, 陈兰¹, 杨雪^{1,2}, 陈俊奇¹, 王添¹, 武玲玲¹, 李俊熹¹

1 青海大学农牧学院, 青海 西宁 810016

2 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

3 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

高英, 谢永丽, 陈兰, 杨雪, 陈俊奇, 王添, 武玲玲, 李俊熹. 芽孢杆菌 WL911 促低温下小麦生长效应及其功能基因分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 209-224.

GAO Ying, XIE Yongli, CHEN Lan, YANG Xue, CHEN Junqi, WANG Tian, WU Lingling, LI Junxi. *Bacillus* WL911: wheat growth-promoting effects under low temperature and functional genes[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 209-224.

摘要: 【背景】青藏高原特殊生境孕育着强耐逆性的微生物资源。【目的】探究青藏高原特殊生境的芽孢杆菌对小麦的促生效应。【方法】以分离自青海省海西蒙古族藏族自治州乌兰县的红柳(*Tamarix ramosissima*)根围菌株 WL911 为研究对象进行 16S rRNA 基因及 *gyrB* 基因鉴定; 测定其低温适生性; 以 WL911 菌悬液(浓度为 1×10^7 CFU/mL)对 4 °C 条件下的小麦(*Triticum aestivum*)品种“青麦 7 号”幼苗进行灌根处理, 测定其对小麦幼苗的促生效应; 采用二代测序平台 Illumina HiSeq×10 对菌株 WL911 进行全基因组测序、功能注释及相关功能基因分析。【结果】菌株 WL911 鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), 可耐受 4 °C 低温; 菌株 WL911 对“青麦 7 号”幼苗生长具有显著的促生效果, 26 °C 时小麦株高、根长和鲜重分别提高 12.22%、50.12% 和 70.99%; 4 °C 条件下小麦生物量提高的同时, 叶绿素含量提高 19.72%, H_2O_2 、丙二醛(malondialdehyd, MDA)的积累量分别下降 23.50%、40.68%, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)活性分别提高 45.82%、17.35% 和 14.18%; WL911 基因组大小为 3 915 549 bp, G+C 百分含量为 46.47%; 生物学功能 gene ontology (GO)注释到的基因占基因总量的 75.74%, 包括促生相关功能基因 *glnB*、*yclQ* 和 *fetB* 等, 可参与合成生长激素、营养元素等途径; 存在 *mnhA*、*mnhE*、*pheT*、*pheS* 和 *proV* 等关键基因参与 Na^+ 外排机制、编码脯氨酸和酚类化合物等反应; 也存在编码冷休克蛋白 CspC、CspB 和 CspD 的关键基因 *cspA*。【结论】*B. velezensis* WL911 (登录号为 OP874802)是一种优质的生物肥料研发菌株。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 低温; 促生效应; 功能基因

资助项目: 国家自然科学基金(32160030); 青海省科技厅应用基础研究项目(2023-ZJ-709)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160030) and the Applied Basic Research Project of Qinghai Provincial Department of Science and Technology (2023-ZJ-709).

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

Received: 2023-06-15; Accepted: 2023-10-07; Published online: 2023-11-07

***Bacillus* WL911: wheat growth-promoting effects under low temperature and functional genes**

GAO Ying¹, XIE Yongli^{*1,2,3}, CHEN Lan¹, YANG Xue^{1,2}, CHEN Junqi¹, WANG Tian¹, WU Lingling¹, LI Junxi¹

1 College of Agriculture and Animal Husbandry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai, China

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

3 Key Laboratory of Use of Forage Germplasm Resources on Qinghai-Xizang Plateau of Qinghai Province, Xining 810016, Qinghai, China

Abstract: [Background] The special habitat of the Qinghai-Xizang Plateau harbors the microbial resources with strong tolerance to stress. [Objective] To explore the wheat (*Triticum aestivum*) growth-promoting effect of *Bacillus* in the special habitats of Qinghai-Xizang Plateau. [Methods] The 16S rRNA gene and *gyrB* of the strain WL911 isolated from the rhizosphere of *Tamarix ramosissima* in Haixi Mongolian and Tibetan autonomous prefecture, Qinghai province were identified. The tolerance of the strain to low temperature was examined. The growth-promoting effect of the WL911 suspension (concentration of 1×10^7 CFU/mL) on the seedlings of the wheat cultivar ‘Qingmai 7’ at 4 °C was determined. Illumina HiSeq×10 was used for the whole genome sequencing of the strain, which was followed by functional gene annotation and analysis. [Results] The strain WL911 was identified as *Bacillus velezensis* and could tolerate the low temperature of 4 °C. It had a significant growth-promoting effect on the growth of ‘Qingmai 7’ seedlings. At 26 °C, the strain increased the plant height, root length, and fresh weight of the seedlings by 12.22%, 50.12%, and 70.99%, respectively. At 4 °C, the strain increased the chlorophyll content by 19.72% and decreased the accumulation of H₂O₂ and malondialdehyde by 23.50% and 40.68%, respectively, while increasing the biomass of the seedlings. At the same time, it increased the activities of superoxide dismutase, peroxidase, and catalase by 45.82%, 17.35%, and 14.18%, respectively. The genome size of WL911 was 3 915 549 bp, with the G+C content of 46.47%. The functional genes annotated by gene ontology accounted for 75.74% of the total genes. Specifically, the strain carried growth-promoting genes such as *glnB*, *yclQ*, and *fetB*, which participated in the synthesis of growth hormone and nutrients; it carried *mnhA*, *mnhE*, *pheT*, *pheS* and *proV* involved in Na⁺ efflux, proline synthesis, and phenolic compound; and it carried a key gene *cspA* encoding the cold shock proteins CspC, CspB, and CspD. [Conclusion] *B. velezensis* WL911 (GenBank accession number: OP874802) serves as a strain for the research and development of high-quality biological fertilizers.

Keywords: *Bacillus velezensis*; low temperature; growth-promoting effect; functional genes

非生物胁迫导致农作物产量减少、品质降低, 严重影响了农业生产的发展; 低温是影响作物生长的重要非生物因素之一, 可引起植物膜脂过氧化、细胞膜透性增大、细胞非正常代

谢等一系列问题, 进而导致冷敏感植物生长发育受阻^[1-2]。郭扬^[3]报道低温会导致膜脂过氧化, 从而产生具有强氧化性的丙二醛 (malondialdehyd, MDA), 破坏植物生物膜结构;

同时, 低温也会诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累, 破坏细胞结构和功能的完整性; 但在低温条件下, 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化物酶(peroxidase, POD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)等抗氧化酶活性会增加, 可清除体内超氧阴离子和自由基, 减轻 ROS 对细胞的损伤, 维持植物的正常生长^[4]。青藏高原地区普遍低温, 导致农作物减产, 但微生物资源丰富^[5-6], 极端生境孕育的抗逆性资源菌株有待挖掘。

植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)可通过增强植物抗逆性、防治病害、增强营养吸收等生化机制促进植物生长^[7]。芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)是一类重要的植物根际促生菌, 是一种制备生物防治剂的重要菌种资源, 可用于植物病害防治^[8]。Ji 等^[9]研究发现枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) HG-15 是一种耐盐细菌, 可诱导小麦(*Triticum aestivum*)的系统耐受性, 从而有效促进其生长。Chen 等^[10]报道芽孢杆菌 A28 在低温下可显著促进玉米(*Zea mays*)的生长速度, 维持光合作用, 最终使玉米产量提高 22%。此外, 芽孢杆菌可通过调节植物的防御系统提高 SOD、CAT 和 POD 酶活力, 降低活性氧(ROS)和 MDA 的含量来减轻脂质损伤, 从而保证植物正常的生长发育、提高产量^[11]。FZB42 是芽孢杆菌的模式菌株之一, 其全基因组测序与功能预测结果表明, 约有 10%的基因资源用于产生各类次级代谢产物, 途径广泛、类型多样, 且这些次级代谢产物均具备不同程度的抑菌、耐逆和促进植物生长的能力^[12]。因此, 利用生防芽孢杆菌促进高原农作物生长、防治病害、减轻非生物胁迫对青藏高原植物的不良影响对高原农业发展具有重要意义。

小麦(*Triticum aestivum*)是青藏高原主要的膳食农作物, 产量高、种植面积广、营养价值

高^[13-14]。“青麦 7 号”是具有籽粒饱满、抗倒伏、耐旱和高产等优点的高原优良作物^[15]; 而青藏高原低温、盐碱等条件使小麦结实率下降, 从而导致其品质降低、产量下降^[16]; 柯媛媛等^[17]发现低温胁迫下, 活性氧积累会影响叶片的光合及呼吸作用来降低“源”器官的生产过程, 也会损伤“库”器官; 多余的 ROS 使小麦细胞膜受损, 阻截小麦根系对营养物质的吸收利用。因此, 将优良芽孢杆菌应用到低温胁迫下促进小麦的正常生长, 对其稳产、丰产具有重要意义。

本文以分离筛选^[18]自青海省海西蒙古族藏族自治州乌兰县红柳(*Tamarix ramosissima*)根围的细菌 WL911 为研究对象。通过 16S rRNA 基因及 *gyrB* 基因序列鉴定菌株, 测定其低温适生性; 以芽孢杆菌 WL911 菌悬液在低温下对“青麦 7 号”幼苗进行灌根处理, 结合其表型及生理指标的变化探究菌株 WL911 在低温下对小麦幼苗生长的影响; 对菌株 WL911 进行基因组测序、功能注释及关键基因分析, 探究菌株 WL911 相关功能基因; 综合分析菌株相关功能, 以期应用到高原作物生长中, 从而促进高原农业发展。

1 材料与方法

1.1 材料

芽孢杆菌 WL911 分离筛选^[18]自青海省海西蒙古族藏族自治州乌兰县的红柳(*Tamarix ramosissima*)根围。

小麦(*Triticum aestivum*)品种“青麦 7 号”由青海大学农林科学院提供。

LB 培养基参考文献^[19]配制。恒温培养振荡器, 上海智城分析仪器制造有限公司; 智能人工气候箱, 宁波普朗特仪器有限公司; 高速冷冻离心机, 希格玛离心机有限公司; 超净工作台, 天津市泰斯特仪器有限公司; 生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司。

1.2 菌株 WL911 的分子鉴定

1.2.1 16S rRNA 基因序列的鉴定

参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]使用说明提取菌株的 DNA。采用正向引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCM TGGCTCAG-3')和反向引物 1492R (5'-GGYTAC CTTGTTACGACTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 4 μL , 模板 2 μL , 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μL , ddH₂O 15 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 34 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。将 16S rRNA 基因扩增产物纯化后测序, 测序结果通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 并通过 MEGA 7.0 软件制作系统发育树^[20-21]。

1.2.2 *gyrB* 基因序列的鉴定

参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]使用说明提取菌株的 DNA。采用引物 UP2r (5'-AGCAGGGTACGGAT GTGCGAGCCRTCACRTCTCNGCRTCNGT-CAT-3')和反向引物 UP1 (5'-GAAGTCATCATGACCG TTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 4 μL , 模板 2 μL , 2 \times Taq PCR Master Mix 25 μL , ddH₂O 15 μL 。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min。将 *gyrB* 基因扩增产物纯化后测序, 测序结果通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 并通过 MEGA 7.0 软件制作系统发育树^[20-21]。

1.3 菌株 WL911 低温适生性的测定

用 10 μL 接种环将菌株 WL911 接种于 5 mL LB 液体培养基中, 以 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 条件振荡培养 14 h; 取 0.01 mL 菌液(浓度为 1×10^7 CFU/mL)涂布于 LB 固体培养基, 并分别置于 4、8、12 和 18 $^{\circ}\text{C}$ 进行培养, 共 3 次生物学重复, 每天观察并记录生长情况^[22]。

1.4 低温下菌株 WL911 对小麦生长影响的测定

菌悬液的制备: 挑取 WL911 单菌落接种到 35 mL LB 液体培养基中, 以 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 的条件振荡培养 12 h; 培养结束后取 30 mL 置于 45 mL 离心管中, 以 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 ddH₂O 涡旋悬浮至均匀制成菌悬液, 细胞浓度调整至 10^7 CFU/mL ($OD_{600}=1.0$)^[23]。

小麦生物量的测定: 挑选籽粒饱满且大小一致的“青麦 7 号”种子, 用 20% 次氯酸钠溶液消毒 20 min, 无菌水冲洗多次; 蛭石与自然土以质量比 1:2 混合于 120 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min, 分装于土容量为 1 000 mL 的花盆中; 每 20 棵幼苗为一个生物学重复, 共 3 次重复, 在人工气候箱培养(昼/夜温度 27 $^{\circ}\text{C}$ /20 $^{\circ}\text{C}$, 光照 16 h, 黑暗 8 h, 相对湿度 65%)。待幼苗长至约 8 cm, 分为 4 个处理: CK (26 $^{\circ}\text{C}$, 无菌水灌根)、CK+B (26 $^{\circ}\text{C}$, 菌悬液灌根)、L (4 $^{\circ}\text{C}$, 无菌水灌根)、L+B (4 $^{\circ}\text{C}$, 菌悬液灌根); 每隔 3 d 以 45 mL 的 WL911 菌悬液灌根一次, 共灌根 3 次, 每个处理 3 次生物学重复。对照组以同体积无菌水灌根; 灌根结束继续培养 3 d 后, 各处理随机选 20 株幼苗, 以无菌水冲洗根部土壤和残留物质, 用滤纸稍稍吸干根部水分, 进行株高、根长和鲜重测定^[24]。

1.5 低温下 WL911 对小麦生理影响的测定

1.5.1 叶绿素含量

参考《植物生理学实验指导》^[25]测定叶绿素含量。称取 0.2 g 新鲜小麦叶片, 擦净剪碎再放入研钵中, 加入 2 mL 提取液(96%乙醇), 充分研磨成匀浆状至组织变白; 经滤纸过滤后以提取液洗涤, 定容至 25 mL 棕色容量瓶, 摇匀; 立即测定 OD_{665} 、 OD_{649} 和 OD_{470} 值并按照公式计算小麦幼苗组织中叶绿素的含量。

1.5.2 过氧化物含量

丙二醛(MDA)含量的测定参考《植物生理学实验指导》^[25]。称取 1 g 新鲜小麦叶片, 加入少量 10% 三氯乙酸和石英砂于研钵中, 研磨至匀

浆;以 4 000 r/min 离心 10 min,吸取 2 mL 上清液并加入 2 mL 0.6%硫代巴比妥酸溶液,对照加蒸馏水 2 mL,混匀后于沸水浴上反应 15 min,迅速冷却后再离心,取上清液测定 OD_{532} 、 OD_{600} 和 OD_{450} 值,并计算小麦幼苗组织中 MDA 的含量。

过氧化氢(H_2O_2)含量的测定参考《植物生理学实验指导》^[25]。称取 0.5 g 小麦幼苗叶片放入研钵中,加入 5 mL 0.1%的三氯乙酸(trichloroacetic acid, TCA)溶液磨成匀浆;以 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min,取 2 mL 上层酶液加入 5 mL 提前预冷的 10 mmol/L 磷酸钾缓冲液和 1 mL 1 mmol/L 的 KI 溶液;3 000 r/min 离心 10 min,弃去上清液后用丙酮洗涤 2~5 次;再加入 2 mmol/L 硫酸 5 mL,待沉淀完全溶解后测定 OD_{390} 值,并按照公式计算小麦幼苗组织中 H_2O_2 含量。

1.5.3 氧化酶活性

SOD 活性测定参考《植物生理学实验指导》^[25]。称取小麦叶片 2.5 g,加入少量 pH 7.8 的磷酸缓冲液,研磨成匀浆,转移至 25 mL 容量瓶中,用同一缓冲液定容;在 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min 上清液即为酶粗提取液;取 5 mL 指形管 4 支(2 支为测定管,2 支为对照管),加入反应试剂后混匀;给 1 支对照管进行遮光处理,与其他各管同时置于 4 000 lx 日光灯下反应,温度设为 35 °C;30 min 后测定 OD_{560} 值,按照公式计算 SOD 活性。

POD 活性测定参考《植物生理学实验指导》^[25]。称取小麦叶片 1 g 于研钵中,加入磷酸缓冲液磨至匀浆以 4 000 r/min 离心 5 min、上清液用磷酸缓冲液定容于 100 mL 容量瓶中作酶液;取 3 支试管,1 支加入 3 mL 混合液(PBS+愈创木酚)和 1 mL 磷酸缓冲液作为对照,2 支加入 3 mL 混合液和 1 mL 酶液,立即计时,每隔 3 s 读一次 OD_{470} 值,按照公式计算 POD 活性。

CAT 活性测定参考《植物生理学实验指导》^[25]。称取小麦叶片 0.5 g,加入 pH 7.0 的磷酸缓冲液

研磨成匀浆,定容至 25 mL 容量瓶中;在 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶提取液。取 10 mL 试管 3 支(2 支为测定管,1 支为对照管),加入酶液;25 °C 预热后逐管加入 0.3 mmol/L 的 H_2O_2 ,每加完一管立即计时,并迅速倒入比色杯中,测定 OD_{240} 值,每隔 1 min 读一次,共测 4 min,按照公式计算 CAT 活性。

1.6 菌株 WL911 的基因组测序

菌株活化与纯化:将已纯化的菌株 WL911 接种于 LB 液体培养基,以 37 °C、120 r/min 条件振荡培养至 OD_{600} 约为 1.0,菌液转至 50 mL 旋盖离心管以 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,所得菌体连同离心管浸没在液氮中并彻底冷冻 1 h,加干冰封存,送至上海美吉生物医药科技有限公司进行全基因组测序。

基因组组装与预测:菌株 WL911 的测序序列利用组装软件 Unicycler 进行三代序列组装,组装过程中借助 Pilonjin 软件进行序列校正,最终得到完整的染色体序列。利用 Glimmer、GeneMarkS 和 Prodigal 软件对基因组中的编码序列进行预测;非编码基因如 tRNA 和 rRNA 分别使用 tRNAscan-SEv2.0 和 Barrnap 软件进行预测,利用 Infernal 软件基于 Rfam 数据库对菌株基因组上可能存在的 sRNA 进行预测注释;利用预测得到的基因序列与 gene ontology (GO)数据库进行 BLAST 比对,基于获得的基因功能注释结果对 GO 功能进行分析^[26]。

2 结果与分析

2.1 菌株 WL911 的分子鉴定结果

将菌株 WL911 的 16S rRNA 基因序列和 *gyrB* 基因序列在 NCBI 核酸序列数据库内进行 BLAST 同源性序列比对并制作系统发育树。16S rRNA 基因比对结果显示:菌株 WL911 与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) FZB42 (GenBank

登录号为 NR075005)具有 100%的相似性(图 1A); *gyrB* 基因比对结果显示, 菌株 WL911 与 *Bacillus velezensis* JK-XZ8(GenBank 登录号: MK192100)具有 98%的相似性(图 1B)。因此将菌株 WL911 (GenBank 登录号为 OP874802)鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。

2.2 菌株 WL911 的低温适生性

将接有 WL911 的固体培养基置于不同温度

下培养观察, 结果表明菌株 WL911 在 18、12、8 和 4 °C 低温条件均可正常生长, 但不同温度下菌株生长速度不同。18 °C 条件下培养 2 d 即可形成明显菌落; 12 °C 和 8 °C 低温下, 培养 3 d 后均形成明显的菌落; 4 °C 低温下虽生长缓慢, 但在培养 5 d 后也可长出菌落(图 2)。由此可见, 菌株 WL911 具有一定的低温适生性, 能够在 4 °C 低温环境中生长繁殖。

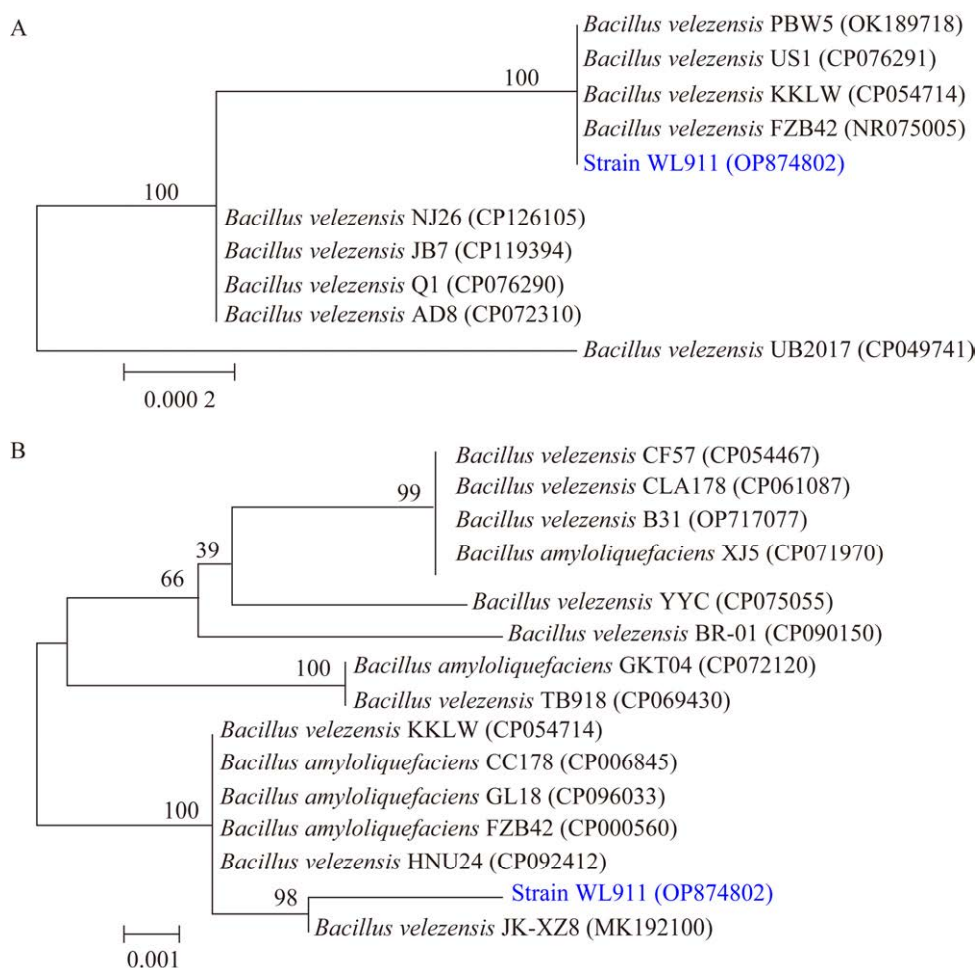


图 1 基于 16S rRNA 基因(A)及 *gyrB* 基因序列(B)构建的系统发育树 括号中的序号表示菌株相关基因的 GenBank 登录号; 分支点上的数字为 bootstrap 值(百分值); 标尺表示序列之间差异的数字尺度

Figure 1 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene (A) and *gyrB* gene sequences (B). The serial number in brackets indicates the GenBank accession number of the strain-related gene; The number showed in branches are bootstrap percentages; The scale represents the digital scale of the difference between sequences.

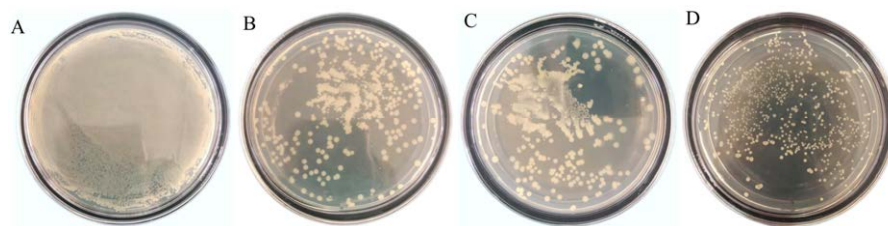


图 2 菌株 WL911 的低温适生性

Figure 2 Low temperature adapting of strain WL911. A: Growth at 18 °C. B: Growth at 12 °C. C: Growth at 8 °C. D: Growth at 4 °C.

2.3 低温下菌株 WL911 对小麦生长的影响

叶片是植物进行生理和代谢活动的主要器官，低温胁迫会使叶片萎蔫或皱缩，而叶片皱缩程度可直观反映植物的耐冷性^[27]。为了评估菌株在正常或低温下促进小麦生长的能力，对小麦幼苗进行低温及菌悬液灌根处理，分别从 4 个处理组中随机取 20 株植株进行洗根，测定生物量的变化。结果表明：低温无菌水灌根(L)下叶片出现轻微卷曲，与对照(CK)相比长势矮小(图 3)。灌根处理(CK+B)后小麦幼苗的株高、根长和鲜重分别达到 24.68 cm、18.82 cm 和 0.52 g，与对照组(CK)相比，分别提高 12.22%、50.12%和 70.99%；与低温无菌水灌根(L)相比，灌根处理(L+B)后小麦幼苗的株高、根长和鲜重分别提高 38.60%、65.04%和 83.55% (图 4)；表明菌株 WL911 在低温胁迫下对小麦幼苗的生长及生物量积累有明显的促进作用，且菌悬液灌根后可有效缓解小麦幼苗的叶片皱缩现象。

2.4 低温下菌株 WL911 对小麦叶绿素含量的影响

低温胁迫会直接破坏光合机构的结构和活性，导致类囊体膜的选择性功能丧失、叶绿素总量降低，从而影响光合作用^[28]。测定小麦幼苗的叶绿素含量，结果表明，与对照组相比，菌液灌根处理(CK+B)后小麦幼苗叶绿素含量呈组间

峰值 12.26 mg/g，较对照组提高 14.73%；低温下灌根处理(L+B)后叶绿素含量达到 9.82 mg/g，较低温无菌水灌根组提高 19.72% (图 5)。可知，菌液灌根处理可提高小麦幼苗体内叶绿素的积累，从而使植株维持一定的光合作用，菌株 WL911 对低温胁迫下小麦幼苗的叶绿素含量具有显著促进作用。

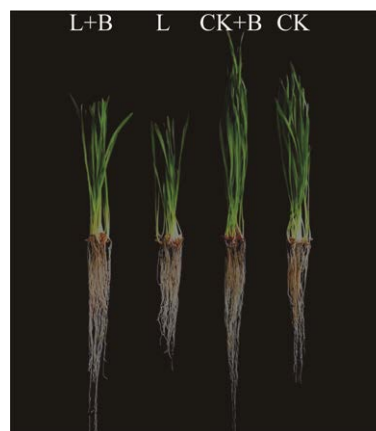


图 3 菌株 WL911 对低温胁迫下小麦幼苗生长的影响 CK: 26 °C、无菌水灌根；CK+B: 26 °C、菌悬液灌根；L: 4 °C、无菌水灌根；L+B: 4 °C、菌悬液灌根

Figure 3 The effects of WL911 on *Triticum aestivum* seedlings under low temperature stress. CK: 26 °C, sterile water irrigation root; CK+B: 26 °C, bacterial suspension irrigation root; L: 4 °C, sterile water irrigation root; L+B: 4 °C, bacterial suspension irrigation root.

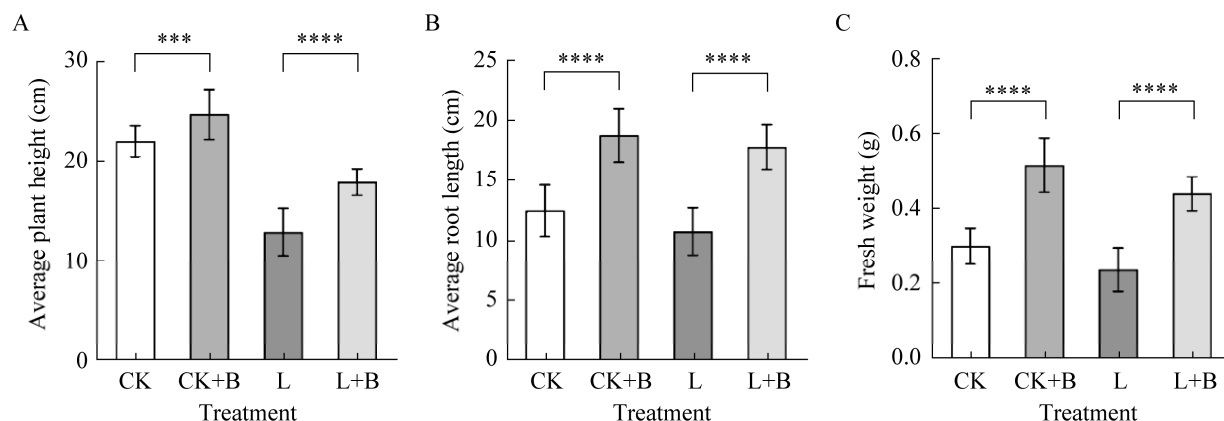


图4 菌株 WL911 对小麦幼苗生物量的影响 A: 菌株 WL911 对幼苗株高的影响. B: 菌株 WL911 对幼苗根长的影响. C: 菌株 WL911 对幼苗鲜重的影响

Figure 4 Effect of strain WL911 on biomass of *Triticum aestivum* seedlings. A: Effects of strain WL911 on plant height of seedlings. B: Effects of strain WL911 on root length of seedlings. C: Effects of strain WL911 on fresh weight of seedlings. ***: $P \leq 0.001$; ****: $P \leq 0.0001$.

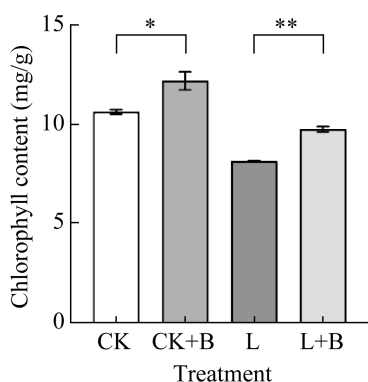


图5 菌株 WL911 对小麦幼苗叶绿素含量的影响

Figure 5 Effect of strain WL911 on chlorophyll content of *Triticum aestivum* seedlings. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

2.5 低温下菌株 WL911 对小麦膜质过氧化的影响

2.5.1 H_2O_2 含量

植物受胁迫时超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)会被 SOD 歧化, 生成 H_2O 和 O_2 , 避免或减少 $O_2^{\cdot-}$ 对细胞膜的损伤, 但歧化反应会生成 H_2O_2 中间产物, 损伤植物细胞膜, 加快植物的衰老^[28]。测定不同处理下小麦幼苗 H_2O_2 的含量, 结果表明,

与对照组相比, 菌液灌根处理(CK+B)后 H_2O_2 含量为 $26.80 \mu\text{mol/g-FW}$, 较对照组降低 26.17%; 低温下灌根处理(L+B)小麦幼苗 H_2O_2 含量为 $47.20 \mu\text{mol/g-FW}$, 较低温组无菌水灌根降低 23.50% (图 6A)。低温处理植株体内 H_2O_2 含量显著变高, 经 WL911 菌悬液灌根后植株体内 H_2O_2 的积累受到显著抑制; 从而有助于减少植物细胞膜损伤、延缓植株衰老。

2.5.2 MDA 含量

逆境胁迫导致植物体内的活性氧(ROS)大量积累, ROS 将细胞膜中不饱和脂肪酸降解生成 MDA, MDA 含量越高, 膜脂过氧化程度越高^[29]。测定小麦幼苗的 MDA 含量, 结果显示, 与对照组相比, 菌液灌根处理(CK+B) MDA 含量降低 39.71%; 低温下灌根处理(L+B)小麦幼苗 MDA 含量为 $0.22 \mu\text{mol/g-FW}$, 较低温组无菌水灌根降低 40.68% (图 6B)。可知, WL911 菌悬液灌根对丙二醛的积累具有显著抑制作用, 可缓解植株膜脂过氧化, 从而降低细胞膜损伤程度。

2.6 低温下菌株 WL911 对小麦氧化酶活性的影响

2.6.1 SOD 活性

为抵御活性氧带来的损伤,植物自身体内存在抗氧化机制,酶促 ROS 清除系统可保证植物体内 ROS 的动态平衡^[29]。测定小麦幼苗的 SOD 活性,结果表明,菌液灌根(CK+B)后小麦幼苗内 SOD 活性达到 86.61 U/g-FW,较对照组 CK 提高 45.88%;低温下灌根处理(L+B)小麦幼苗 SOD 活性在组间呈峰值 104.02 U/g-FW,较低温组无菌水灌根提高了 45.82% (图 7A)。可知,经 WL911 菌悬液灌根可提高植株的 SOD 活性,在一定程度减少活性氧的积累,从而有效维持植株

体内 ROS 的平衡。

2.6.2 POD 活性

测定不同处理下小麦幼苗的 POD 活性,结果表明:菌液灌根(CK+B)后小麦幼苗内 POD 活性为 89.20 U/g-FW,与 CK 相比增加 40.29%;低温下灌根处理(L+B)小麦幼苗 POD 活性为 135.04 U/g-FW,相较于无菌水灌根(L)提高 17.35% (图 7B)。经 WL911 菌悬液灌根可在一定程度上降低低温胁迫下小麦幼苗的膜脂过氧化,增强其抗冷能力,从而保证植株正常的生长发育。

2.6.3 CAT 活性

由图 7C 可知,经菌液灌根(CK+B)后小麦幼苗的 CAT 活性达到 116.47 U/g-FW,而无菌水灌

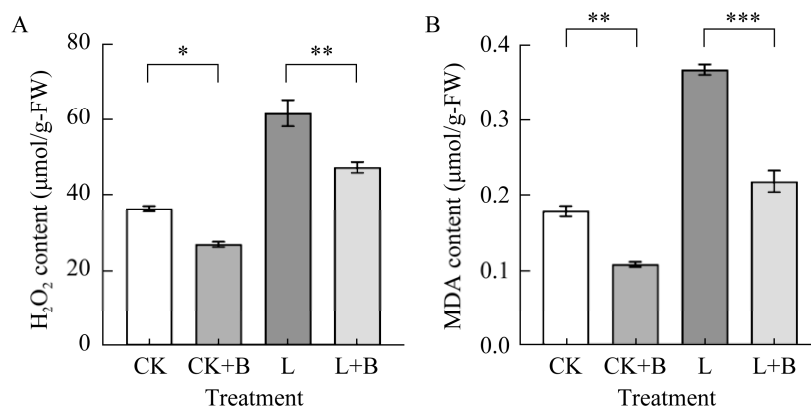


图 6 菌株 WL911 对小麦幼苗过氧化氢(A)和丙二醛含量(B)的影响

Figure 6 Effect of strain WL911 on H₂O₂ (A) and MDA content (B) of *Triticum aestivum* seedlings. *: $P \leq 0.05$; **: $P \leq 0.01$; ***: $P \leq 0.001$.

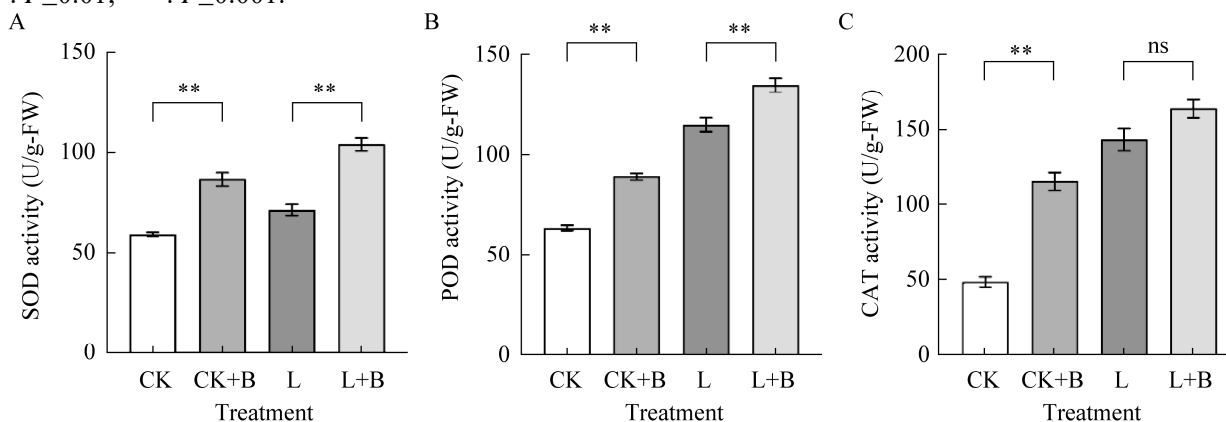


图 7 WL911 对小麦幼苗氧化酶活性的影响 A: 超氧化物歧化酶活性. B: 过氧化物酶活性. C: 过氧化氢酶活性

Figure 7 Effect of WL911 on oxidase activity of *Triticum aestivum* seedlings. A: SOD activity. B: POD activity. C: CAT activity. ns: $P > 0.05$; **: $P \leq 0.01$.

根(CK)小麦幼苗的 CAT 活性仅为 49.28 U/g-FW; 在低温下, 菌液灌根后(L+B)幼苗的 CAT 活性较 L 组提高 14.18% (图 7C)。可知, 经 WL911 菌悬液灌根可在一定程度提高低温胁迫下小麦体内的 CAT 活性, 从而清除过量的 H_2O_2 , 对小麦在低温环境中的正常生长具有积极影响。

2.7 菌株 WL911 基因组和功能基因分析

采用二代测序平台 Illumina HiSeq×10 对菌株 WL911 的全基因组进行测序, 对测序结果进行组装, 获得了菌株 WL911 的完整基因组序列, 长度为 3 915 549 bp, G+C 含量为 46.47%, 共编码 3 727 个基因, 鉴定出 86 个 tRNA 基因, 27 个 rRNA 基因, 86 个 sRNA 基因。

2.7.1 GO 基因组功能注释

将菌株 WL911 的基因序列与 GO 数据库比对, GO 注释到的功能基因数占基因总量的

75.74%, 其中, 与生物过程(biological process, BP)相关基因有 1 488 个, 主要与转录调控、DNA 模板、翻译、碳水化合物代谢过程和跨膜转运等过程相关, 同时也参与脂肪酸生物合成过程, 氨基酸转运等过程, 胁迫响应、包含低温胁迫抗性相关抗氧化活性和信号传感器活性相关基因; 与细胞组成(cellular component, CC)相关功能基因有 1 377 个, 其与膜的组成部分、质膜、细胞质和核糖体密切相关; 与分子功能(molecular function, MF)相关的基因有 2 296 个, 主要与 ATP 结合、DNA 结合、金属离子结合、水解酶活性和跨膜转运蛋白活性等相关(图 8)。其中, 与催化活性和代谢过程等相关的基因在菌株 WL911 基因组中占较大比例, 并且催化代谢过程多参与跨膜转运、碳水化合物代谢、氨基酸代谢、酶催化和代谢产物合成等功能方面, 这与根际促生菌促生特性相吻合。

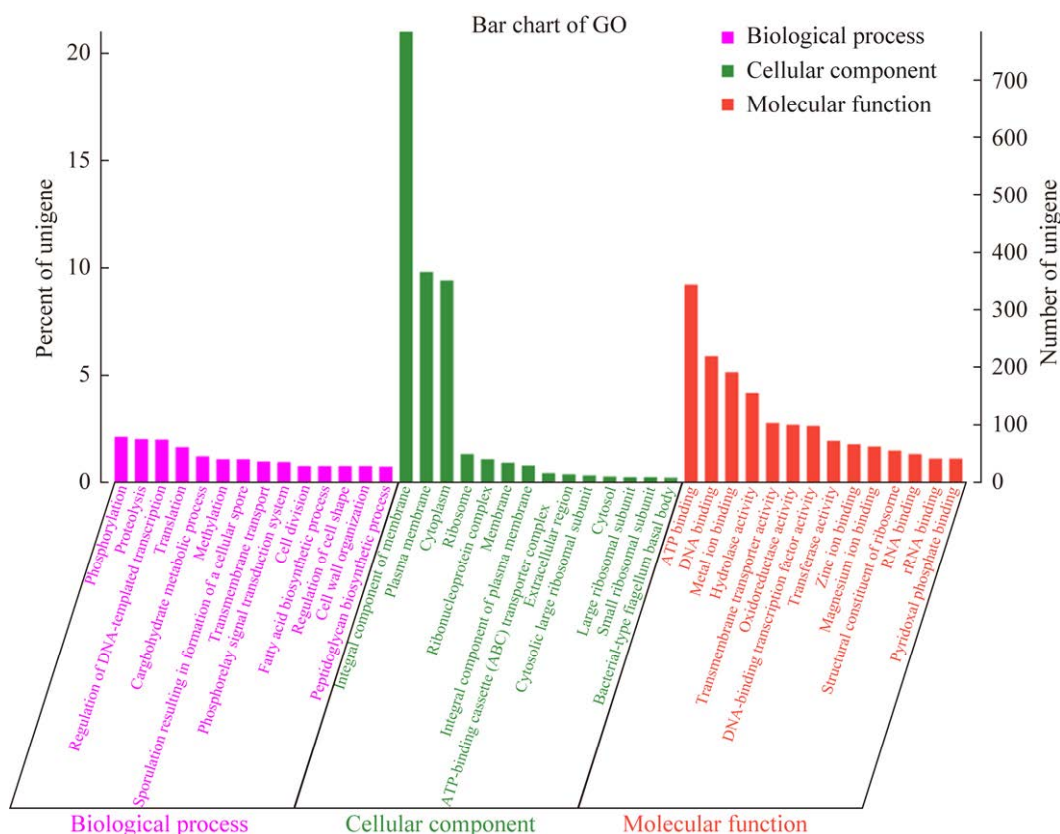


图 8 菌株 WL911 的全基因组 GO 注释

Figure 8 GO annotation results of strain WL911.

2.7.2 促生相关功能基因

菌株 WL911 基因组中存在编码吲哚乙酸和赤霉素等萜类化合物生物合成的基因 *trpA*、*trpB* 和 *trpC*^[30], 参与植物激素的合成途径, 推测菌株 WL911 可通过合成吲哚乙酸和赤霉素直接促进植物生长发育; 存在与肽基脯氨酰异构酶 (peptidylprolyl cis-trans isomerase, PPIase) 合成相关的功能基因 *acuA*、*acuB* 和 *acuC*^[31], 可以具有一定范围的酶功能, 包括对抗生素的抗性, PPIase 还可调节转录因子的活性, 提高植物对非

生物胁迫的耐受性。此外, 还发现菌株 WL911 中存在多种编码芽孢杆菌直接促生作用相关的功能基因, 如编码与植物生长发育所需营养元素氮、磷等合成的功能基因 *glnB*、*trkH* 和 *trkA*^[32], 推测菌株 WL911 可通过固氮、解磷等机制改善土壤环境, 从而促进植物生长; 具有编码与铁载体合成及转运的相关功能基因 *yclQ* 和 *fetB*^[33], 可通过螯合铁元素提高植物体内铁元素含量。菌株 WL911 基因组中的促生相关基因(表1)可能直接或间接促进植物生长。

表 1 菌株 WL911 的相关功能基因

Table 1 Related function genes of strain WL911

Gene name	Location	Length (bp)	Function
<i>trpA</i>	Chromosome	798	Tryptophan synthase subunit alpha
<i>trpB</i>	Chromosome	1 203	Tryptophan synthase subunit beta
<i>trpC</i>	Chromosome	753	Indole-3-glycerol phosphate synthase TrpC
<i>acuA</i>	Chromosome	633	GNAT family N-acetyltransferase
<i>acuB</i>	Chromosome	645	Acetoin utilization AcuB family protein
<i>acuC</i>	Chromosome	1 167	Acetoin utilization protein AcuC
<i>glnB</i>	Chromosome	351	P-II family nitrogen regulator
<i>trkH</i>	Chromosome	1 353	TrkH family potassium uptake protein
<i>trkA</i>	Chromosome	666	Ktr system potassium transporter KtrC
<i>yclQ</i>	Chromosome	945	Siderophore ABC transporter substrate-binding protein
<i>fetB</i>	Chromosome	762	Iron export ABC transporter permease subunit FetB
<i>lytE</i>	Chromosome	825	C40 family peptidase
<i>ykfC</i>	Chromosome	900	C40 family peptidase
<i>cwlO</i>	Chromosome	1 413	ABA biosynthesis, induced stress resistance
<i>pheT</i>	Chromosome	2 415	Phenylalanine-tRNA ligase subunit beta
<i>pheS</i>	Chromosome	1 035	Phenylalanine-tRNA ligase subunit alpha
<i>mnhA</i>	Chromosome	2 403	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit A
<i>mnhB</i>	Chromosome	432	Na(+)/H(+) antiporter subunit B
<i>mnhC</i>	Chromosome	342	Na(+)/H(+) antiporter subunit C
<i>mnhD</i>	Chromosome	1 491	Monovalent cation/H ⁺ antiporter subunit D
<i>mnhE</i>	Chromosome	477	Na ⁺ /H ⁺ antiporter subunit E
<i>mnhF</i>	Chromosome	285	Na(+)/H(+) antiporter subunit F1
<i>mnhG</i>	Chromosome	375	Monovalent cation/H(+) antiporter subunit G
<i>proV</i>	Chromosome	1 257	Glycine/proline betaine ABC transporter ATP-binding protein OpuAA
<i>proW</i>	Chromosome	849	Glycine/proline betaine ABC transporter permease subunit OpuAB
<i>opuA</i>	Chromosome	1 140	Osmoprotectant ABC transporter ATP-binding protein OpuCA
<i>cspA</i>	Chromosome	204	Cold shock protein CspC
<i>cspA</i>	Chromosome	201	Cold shock-like protein CspB
<i>cspA</i>	Chromosome	201	Cold-shock protein CspD

2.7.3 耐逆相关功能基因

菌株 WL911 基因组中存在编码与诱导植物抗性相关的关键基因(表 1)。其中,具有参与编码 ABA 生物合成的相关功能基因 *lytE*、*ykfC* 和 *cwlO*^[34],在逆境胁迫过程中,ABA 可诱导植物抗性,参与调节植物非生物胁迫适应生理过程;也具有编码植物体内重要的酚类化合物水杨酸的关键基因 *pheT*、*pheS*^[30],在植物应对胁迫过程中发挥信号分子作用,可以参与并调控植物体内重要的生理代谢活动,强化植物抗氧化防御系统,提高植物对胁迫的抗性。同时,菌株 WL911 具有编码参与应答非生物胁迫的渗透调节物质相关的功能基因,其中,具有编码与 Na⁺ 外排机制、相容性溶质的合成和转运机制等耐盐机制相关的基因簇,该基因簇包含 *mnhA*、*mnhB*、*mnhC*、*mnhD*、*mnhE*、*mnhF* 和 *mnhG*^[35],可调节细胞内 pH、维持离子稳态,保证细胞在胁迫下的生长;也具有编码脯氨酸、甜菜碱渗透蛋白合成的基因 *proV*、*proW* 和 *opuA*^[36],可增加对渗透胁迫的耐性,提高宿主菌的抗高渗能力,同时 *proV* 基因可提高细菌对细胞的侵袭与黏附能力;此外,菌株 WL911 还具有编码冷休克蛋白 CspC、CspB 和 CspD 的关键基因 *cspA*^[32],参与低温应答反应,维持细胞的正常生长代谢,增强细胞对低温的抵抗能力。

3 讨论与结论

植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)是一类生活在土壤中或附着在植物根部的微生物,可促进植物生长发育并增强植物耐逆性^[37]。利用分离自高原特殊生境的 PGPR 可直接或间接促进农作物生长发育,缓解非生物胁迫对高原优质作物的伤害。FZB42 作为革兰氏阳性根围促生菌 PGPR 的模式菌株,其防病促生的田间试验已应用于多种经济农作

物^[38];可产生抗逆性强的椭圆状芽孢;在干旱、盐渍和低温等不利环境下存活,在自然界中分布广泛^[39]。IHBT-705 是一株耐逆境的 PGPR 菌株,它能在 4–50 °C 的温度范围内生存和繁殖,提高水稻(*Oryza sativa*)芽的长度及根的数量,使其增产^[40]。本文中在低温下以菌株 WL911 灌根显著提高小麦幼苗的株高、根长和鲜重,促进其生物量的积累;具有应用于微肥的潜力,以期增强植物的耐低温性,从而提高作物产量。经全基因组测序及功能基因分析,发现该菌株具有 *trpC*、*glnB*、*yclQ*、*fetB*、*pheT* 和 *mnhG* 等关键基因,推测这些基因可能参与 WL911 生长激素合成^[30]、营养元素^[33]和编码脯氨酸^[35]等途径,从而可能间接或直接促进植物生长;编码冷休克蛋白的关键基因 *cspA*^[32]也可能在冷胁迫下发挥作用,这与以上 WL911 耐低温及促小麦生长的结果相对应。

本文中贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) WL911 不仅提高了低温下小麦的生物量,还使叶片叶绿素含量、POD、CAT 和 SOD 的活性增高,从而可清除植物体内多余的 ROS,而使植株 MDA 和 H₂O₂ 含量降低,增强植物的抗冷性。研究表明,SOD 可减轻细胞膜损伤、POD 可维持植物体内活性氧平衡、CAT 可减轻 ROS 对细胞损伤^[41–43],从而缓解非生物胁迫对植物造成的压力,维持植物正常的生长发育。据报道枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) QM3 可提高拟南芥对干旱和盐胁迫的耐受性,提高叶绿素含量及生物量^[44];苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*) IAGS 199 可通过提高 POD、CAT 和 SOD 的活性减少 H₂O₂ 和 MDA 的积累量^[45]。本文中低温下经菌株 WL911 菌悬液灌根后对小麦体内叶绿素的增加具有正效应,从而可增强植物的光合作用;植物生长过程中会产生活性氧,当植物受到逆境胁迫时,植物体内会暴发过多的活性氧引起

脂质的过氧化,使细胞膜的完整性遭到破坏,最终导致植物受到损伤而死亡;而菌株 WL911 可降低小麦体内的 H_2O_2 和 MDA 积累量,减轻小麦幼苗细胞膜脂过氧化,从而保护生物膜结构的完整性。低温胁迫下以菌株 WL911 菌液灌根处理,小麦体内的抗氧化酶活性显著增加,结合前人的研究结果,可以推断该菌株可诱导小麦体内抗氧化酶活性的变化,在低温胁迫条件下可显著减少 ROS 造成的损伤,从而提高小麦的耐逆性。

贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) WL911 具有低温适生性,是一株具有耐逆性的生防菌株。以 WL911 菌悬液对低温胁迫下小麦幼苗进行灌根处理后,植株体内叶绿素含量增加、SOD、POD 和 CAT 活性提高、MDA、 H_2O_2 的积累量减少,增强了小麦幼苗的逆境耐受力,维持了其在低温胁迫下的正常生长。同时全基因组测序及注释、发现了促生及耐逆相关基因,提供了菌株 WL911 基因组数据支持;为增强高原农作物对逆境的适应性及促生研究提供了理论基础及优异的芽孢杆菌资源。

REFERENCES

- [1] 刘玉凤,王珍琪,宁晓峰,倪洋,李天来. 夜间低温对番茄幼苗磷素吸收及转运的影响[J]. 西北植物学报, 2017, 37(1): 97-104.
LIU YF, WANG ZQ, NING XF, NI Y, LI TL. Effects of low temperature on phosphorus absorption and transport of tomato seedlings[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2017, 37(1): 97-104 (in Chinese).
- [2] 孙玉珺,秦东玲,伊凡,宫磊,刘哲,吕金莹,杨慧,张平,徐密林,张倩,杨德光. 外源水杨酸对低温胁迫下玉米幼苗生长及生理特性的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(4): 726-734.
SUN YJ, QIN DL, YI F, GONG L, LIU Z, LYU JY, YANG H, ZHANG P, XU ML, ZHANG Q, YANG DG. Effects of salicylic acid on growth and physiological property of maize seedling under low temperature stress[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2018, 34(4): 726-734 (in Chinese).
- [3] 郭扬. 低温胁迫对玉米生理生化指标的影响[J]. 广东蚕业, 2022, 56(1): 16-18.
GUO Y. Effects of low temperature on physiological and biochemical indexes of maize[J]. Guangdong Sericulture, 2022, 56(1): 16-18 (in Chinese).
- [4] WEI YL, CHEN HZ, WANG L, ZHAO Q, WANG D, ZHANG TG. Cold acclimation alleviates cold stress-induced PSII inhibition and oxidative damage in tobacco leaves[J]. Plant Signaling & Behavior, 2022, 17(1): 2013638.
- [5] 杨华,胡展,郭照辉,肖蓉,罗容珺,付祖姣,魏小武,蔡长平,王玉双. 水稻促生菌的筛选、鉴定及其促生效果[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2088-2099.
YANG H, HU Z, GUO ZH, XIAO R, LUO RJ, FU ZJ, WEI XW, CAI CP, WANG YS. Screening and identification of rice growth-promoting strains and their effects on rice growth[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2088-2099 (in Chinese).
- [6] 朱海峰,郑永宏,邵雪梅,刘晓宏,徐岩,梁尔源. 树木年轮记录的青海乌兰地区近千年温度变化[J]. 科学通报, 2008(15): 1835-1841.
ZHU HF, ZHENG YH, SHAO XM, LIU XH, XU Y, LIANG EY. Changes of temperature in Wulan area of Qinghai in recent thousand years recorded by tree rings[J]. Chinese Science Bulletin, 2008(15): 1835-1841 (in Chinese).
- [7] HOSSEINI A, HOSSEINI M, SCHAUSBERGER P. Plant growth-promoting rhizobacteria enhance defense of strawberry plants against spider mites[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 12: 783578.
- [8] ADEDAYO AA, BABALOLA OO, PRIGENT-COMBARET C, CRUZ C, STEFAN M, KUTU F, GLICK BR. The application of plant growth-promoting rhizobacteria in *Solanum lycopersicum* production in the agricultural system: a review[J]. PeerJ, 2022, 10: e13405.
- [9] JI C, TIAN HM, WANG XH, SONG X, JU RC, LI HY, GAO QX, LI CH, ZHANG PC, LI JT, HAO LP, WANG CD, ZHOU YY, XU RP, LIU Y, DU JF, LIU XL. *Bacillus subtilis* HG-15, a halotolerant rhizoplane bacterium, promotes growth and salinity tolerance in wheat (*Triticum aestivum*)[J]. BioMed Research International, 2022, 2022: 9506227.
- [10] CHEN L, HAO ZH, LI KK, SHA Y, WANG ET, SUI XH, MI GH, TIAN CF, CHEN WX. Effects of growth-promoting rhizobacteria on maize growth and rhizosphere microbial community under conservation tillage in Northeast China[J]. Microbial Biotechnology, 2021, 14(2): 535-550.

- [11] SHARMA P, CHOUHAN R, BAKSHI P, GANDHI SG, KAUR R, SHARMA A, BHARDWAJ R. Amelioration of chromium-induced oxidative stress by combined treatment of selected plant-growth-promoting rhizobacteria and earthworms via modulating the expression of genes related to reactive oxygen species metabolism in *Brassica juncea*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 802512.
- [12] 曹秀兰, 叶雨婷, 马天浩, 胡安娜, 曹宇, 陈鹏泽, 伍壮生, 李鹏. 生防菌株贝莱斯芽孢杆菌 HNU24 全基因组测序及分析[J]. *热带作物学报*, 2023, 44(5): 905-913.
- CAO XL, YE YT, MA TH, HU AN, CAO Y, CHEN PZ, WU ZS, LI P. Analysis of the whole genome sequence of biocontrol strain *Bacillus velezensis* HNU24[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2023, 44(5): 905-913 (in Chinese).
- [13] WANG YJ, TAO ZQ, WANG DM, WANG YJ, YANG YS, ZHAO GC, SHI SB, CHANG XH. An economic and viable approach to improve wheat quality in Qinghai-Tibetan Plateau, China[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(8): 2227-2240.
- [14] KULDEEP S, PARVEEN C. Shifting the limits in *Triticum aestivum* research and breeding using a fully annotated reference genome[J]. *Science*, 2018, 24(7): 361-362.
- [15] 陈兰, 谢永丽, 杨雪, 高英, 武玲玲, 王添, 许梦茹. 干旱沙地白刺根际 *Bacillus halotolerans* DGL6 对“青麦 7 号”的促生及防病效果[J]. *微生物学通报*, 2023, 50(9): 3899-3911.
- CHEN L, XIE YL, YANG X, GAO Y, WU LL, WANG T, XU MR. Effects of *Bacillus halotolerans* DGL6 on growth promotion and disease prevention of ‘Qingmai 7’ in arid sandy land [J]. *Microbiology China*, 2023, 50(9): 3899-3911 (in Chinese).
- [16] 王丽, 权有娟, 李想, 刘德梅, 陈志国. 青海不同海拔地区小麦种子萌发过程中 α -淀粉酶活性差异比较[J]. *农学学报*, 2020, 10(7): 19-23, 34.
- WANG L, QUAN YJ, LI X, LIU DM, CHEN ZG. Activity of α -amylase in wheat seed germination at different altitudes in Qinghai: comparison[J]. *Journal of Agriculture*, 2020, 10(7): 19-23, 34 (in Chinese).
- [17] 柯媛媛, 陈翔, 倪芊芊, 张乐乐, 刘绿洲, 许辉, 魏凤珍, 李金才. 低温逆境胁迫下小麦 ROS 代谢及调控机制研究进展[J]. *大麦与谷类科学*, 2021, 38(1): 1-6, 21.
- KE YY, CHEN X, NI QQ, ZHANG LL, LIU LZ, XU H, WEI FZ, LI JC. Research progress of the metabolism of reactive oxygen species and its regulation mechanisms in wheat under low temperature stress[J]. *Barley and Cereal Sciences*, 2021, 38(1): 1-6, 21 (in Chinese).
- [18] 陈云云, 李惠霞, 张海英, 徐生军, 刘永刚. 萎缩芽孢杆菌 MQ19ST15 鉴定及对甘蓝枯萎病的盆栽防效[J]. *植物保护*, 2021, 47(5): 64-71.
- CHEN YY, LI HX, ZHANG HY, XU SJ, LIU YG. Identification of *Bacillus atrophaeus* MQ19ST15 and its control efficacy against Fusarium wilt on potted cabbage plants[J]. *Plant Protection*, 2021, 47(5): 64-71 (in Chinese).
- [19] 陈兰, 谢永丽, 吴晓晖, 杨雪, 王添, 武玲玲. 萎缩芽孢杆菌 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 L, XIE YL, WU XH, YANG X, WANG T, WU LL. *Avena sativa* growth-promoting activity of *Bacillus atrophaeus* CKL1 under salt stress and the functional genes[J]. *Microbiology China*, 2022, 49(8): 3150-3164 (in Chinese).
- [20] 姜喜铃, 丁万隆, 邢晓科. 不同培养基对兰科药用植物手参原球茎共生真菌的分离效果[J]. *菌物学报*, 2022, 41(6): 952-961.
- JIANG XL, DING WL, XING XK. Effects of different media on the isolation of symbiotic fungi from protocorm of medicinal orchid *Gymnadenia conopsea*[J]. *Mycosystema*, 2022, 41(6): 952-961 (in Chinese).
- [21] 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 株萎缩芽孢杆菌的生物活性[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 JM. 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).
- [22] WU XH, WU HJ, WANG RY, WANG ZQ, ZHANG YM, GU Q, FARZAND A, YANG X, SEMENOV M, BORRIS R, XIE YL, GAO XW. Genomic features and molecular function of a novel stress-tolerant *Bacillus halotolerans* strain isolated from an extreme environment[J]. *Biology*, 2021, 10(10): 1030.
- [23] 王田田. 盐胁迫下弯曲芽孢杆菌 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 curvatus* KLBMP 4941 on *Limonium sinense* under salt stress and its rhizosphere interaction mechanism[D]. Xuzhou: Master's Thesis of Jiangsu Normal University, 2018 (in Chinese).
- [24] AYZAZ M, ALI Q, FARZAND A, KHAN AR, LING HL,

- GAO XW. Nematicidal volatiles from *Bacillus atrophaeus* GBSC56 promote growth and stimulate induced systemic resistance in tomato against *Meloidogyne incognita*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(9): 5049.
- [25] 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 Instruction of Plant Physiology[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000 (in Chinese).
- [26] 李虹梅, 何明川, 高熹, 兰明先, 刘全俊, 施春兰, 杨蕊, 李金梁, 唐萍, 吴国星. 生防菌贝莱斯芽孢杆菌 MC2-1 全基因组测序分析[J]. 南方农业学报, 2022, 53(12): 3420-3432.
- LI HM, HE MC, GAO X, LAN MX, LIU QJ, SHI CL, YANG R, LI JL, TANG P, WU GX. Whole genome sequencing analysis of a biocontrol bacterium *Bacillus velezensis* MC2-1[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(12): 3420-3432 (in Chinese).
- [27] 杨志桃. 外源腐殖酸对低温胁迫下厚皮甜瓜幼苗生长及生理特性的影响[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2022.
- YANG ZT. Effects of exogenous humic acid on growth and physiological characteristics of muskmelon seedlings under low temperature stress[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [28] 刘炫杉. HSL3 通过调节胞内过氧化氢稳态来影响气孔关闭和干旱胁迫响应[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2021.
- LIU XS. HSL3 affects stomatal closure and drought stress response by regulating intracellular hydrogen peroxide homeostasis[D]. Jinan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2021 (in Chinese).
- [29] 李欠敏. 温度胁迫下外源褪黑素对大白菜幼苗生长及生理特性的影响[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2022.
- LI QM. Effects of exogenous melatonin on growth and physiological characteristics of Chinese cabbage seedlings under temperature stress[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [30] 杨威. 温室番茄施用胶质类芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌的生物效应及其机制[D]. 保定: 河北农业大学博士学位论文, 2020.
- YANG W. Biological effects and mechanism of applying *Bacteroides mucilaginosus* and *Bacillus megaterium* to tomato in greenhouse[D]. Baoding: Doctoral Dissertation of Hebei Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [31] 尤迪. 红霉菌多孢菌氮调控因子 GlnR 介导蛋白质乙酰化机制研究[D]. 上海: 华东理工大学博士学位论文, 2016.
- YOU D. Study on the mechanism of protein acetylation mediated by nitrogen regulator GlnR of *Saccharopolyspora erythraea*[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of East China University of Science and Technology, 2016 (in Chinese).
- [32] 苗朝华. 中度嗜盐新种黄河盐单胞菌盐胁迫的适应机制研究[D]. 北京: 中国农业大学博士学位论文, 2016.
- MIAO CH. Study on adaptive mechanism of a new moderately halophilic species *Halomonas* Huanghe under salt stress[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [33] 王执. 致病微生物铁代谢途径关键蛋白质 SirR 与 VctP 结构与功能的研究[D]. 济南: 山东大学硕士学位论文, 2012.
- WANG Z. Study on the structure and function of protein SirR and VctP, the key to iron metabolism pathway of pathogenic microorganisms[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong University, 2012 (in Chinese).
- [34] 王轶. 通过自溶相关基因的敲除提高枯草芽孢杆菌的产量[D]. 武汉: 武汉大学博士学位论文, 2014.
- WANG Y. Increasing the yield of *Bacillus subtilis* by knocking out autolysis-related genes[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Wuhan University, 2014 (in Chinese).
- [35] 陈欣. 中度嗜盐菌 *Marteella* sp. AD-3 的 3-羟基苯甲酸-6-羟化酶表达、纯化及功能研究[D]. 上海: 华东理工大学硕士学位论文, 2018.
- CHEN X. Expression, purification and function of 3-hydroxybenzoic acid-6-hydroxylase from moderately halophilic bacterium *Martellella* sp. AD-3[D]. Shanghai: Master's Thesis of East China University of Science and Technology, 2018 (in Chinese).
- [36] 姜珊. 前噬菌体片段 phiv205-3 对禽致病性大肠杆菌 DE205B 环境适应性的影响[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2020.
- JIANG S. Effect of phiv205-3, a pre-phage fragment, on the environmental adaptability of avian pathogenic *Escherichia coli* DE205B[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [37] 韩学东, 杜春梅, 董锡文. 植物根际促生菌研究综述[J]. 乡村科技, 2023, 14(5): 87-90.
- HAN XD, DU CM, DONG XW. A summary of plant growth promoting rhizobacteria studies[J]. Rural Science and Technology, 2023, 14(5): 87-90 (in Chinese).

- [38] 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).
- [39] 安婉宁. 海洋生境贝莱斯芽孢杆菌 CT2628 的促生长抗逆作用研究[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2021.
- AN WN. Study on the growth-promoting and stress-resistant effects of *Bacillus velezensis* CT2628 in marine habitat [D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Agriculture and Forestry University, 2021 (in Chinese).
- [40] ALI N, SWARNKAR MK, VEER R, KAUSHAL P, PATI AM. Temperature-induced modulation of stress-tolerant *PGP* genes bioprospected from *Bacillus* sp. IHBT-705 associated with saffron (*Crocus sativus*) rhizosphere: a natural-treasure trove of microbial biostimulants[J]. Frontiers in Plant Science, 2023, 14: 1141538.
- [41] 魏航, 郑言, 郭森. APX 和 SOD 对佛手瓜和南瓜耐水涝和耐低温的影响[J]. 分子植物育种, 2023, 21(14): 4762-4769.
- HANG W, YAN Z, MIAO G. Effects of APX and SOD on waterlogging and low temperature tolerance of *Sechium edule* and *Cucurbita moschata*[J]. Molecular Plant Breeding, 2023, 21(14): 4762-4769 (in Chinese).
- [42] 王晓晓. 低温胁迫下外源 SOD 对矮牵牛生理特性的影响[J]. 种子, 2021, 40(9): 108-111, 117.
- WANG XX. Effects of exogenous SOD on physiological characteristics of *Petunia hybrida* under low temperature stress[J]. Seed, 2021, 40(9): 108-111, 117 (in Chinese).
- [43] 李甜子, 郑殿峰, 冯乃杰, 赵黎明, 母德伟, 刘玲, 陈观杰, 周行. 植物生长调节剂对低温胁迫下荔枝生理特性及产量的影响[J]. 热带作物学报, 2022, 43(3): 509-519.
- LI TZ, ZHENG DF, FENG NJ, ZHAO LM, MU DW, LIU L, CHEN GJ, ZHOU H. Effects of plant growth regulators on physiological characteristics and yield of litchi plants under low temperature stress[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(3): 509-519 (in Chinese).
- [44] 苏迅帆. 枯草芽孢杆菌对拟南芥的干旱和盐胁迫耐受性的影响[J]. 分子植物育种, 2022, 20(2): 536-543.
- SU XF. Effects of *Bacillus subtilis* on drought and salt stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(2): 536-543 (in Chinese).
- [45] ALI SHAH A, BIBI F, HUSSAIN I, AHMAD YASIN N, AKRAM W, TAHIR MS, ALI HM, SALEM MZM, SIDDIQUI MH, DANISH S, FAHAD S, DATTA R. Synergistic effect of *Bacillus thuringiensis* IAGS 199 and putrescine on alleviating cadmium-induced phytotoxicity in *Capsicum annum*[J]. Plants, 2020, 9(11): 1512.