

贝莱斯芽孢杆菌Mr12预防苹果轮纹病等病害的潜力及其全基因组分析

李永丽¹, 周洲^{1*}, 尹新明^{2*}

(¹信阳农林学院农学院,河南信阳 464006; ²河南农业大学植物保护学院,郑州 450002)

摘要:【目的】探究新疆野苹果内生贝莱斯芽孢杆菌Mr12对多种植物病害的生防潜力,明确其抑菌活性物质稳定性、抑菌作用表现和抑菌物质遗传基础,为生防制剂开发利用提供依据。【方法】采用平板对峙法测定菌株Mr12对6种供试植物病原菌的抑制作用。以苹果轮纹病菌(*Botryosphaeria dothidea*)为供试病原菌,测定Mr12无菌滤液抑菌稳定性及无菌滤液对苹果轮纹病菌孢子萌发和菌丝生长的影响;利用3代测序平台Nanopore测定Mr12的全基因序列,通过BLASTX比对注释所含基因,预测分析菌株Mr12抑菌作用的遗传基础。【结果】菌株Mr12对6种供试植物病原菌均具有抑制作用,抑制率在55%~91%。该菌株无菌滤液在pH 4~10范围内抑菌活性稳定,对酸碱的耐受范围广;对紫外线照射和蛋白酶K不敏感,80 °C以内具有较强的热稳定性。Mr12无菌滤液可使苹果轮纹病菌菌丝膨大畸形,抑制菌丝生长和孢子萌发。通过全基因序列信息分析,发现Mr12含有合成difficidin, fengycin, bacillibactin, surfactin等多种肽聚糖和聚酮糖类抗性化合物的基因簇,以及能够降解病原菌细胞壁的β-1,3-葡聚糖酶和几丁质酶相关的基因。【结论】菌株Mr12对多种植物病原物具有广谱拮抗作用,抑菌物质稳定性高,具有产生多种肽聚糖和聚酮糖类抗性化合物和细胞壁水解酶的能力。

关键词:苹果;内生细菌;抑菌广谱性;贝莱斯芽孢杆菌;全基因组分析;抑菌稳定性;抗菌机制

中图分类号:S661.1 S436.611

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2021)09-1459-09

Potential and genome-wide analysis of *Bacillus velezensis* Mr12 in preventing apple ring rot and other diseases

LI Yongli¹, ZHOU Zhou^{1*}, YIN Xinming^{2*}

(¹College of Agriculture, Xinyang Agriculture and Forestry University, Xinyang 464006, Henan, China; ²College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan, China)

Abstract:【Objective】*Malus sieversii* is not only an important wild life resource in China, but also a good germplasm resource for resistances to disease, insect, and drought. The endophytic bacteria in *M. sieversii* have high potential application value for biological control of apple diseases. To explore biocontrol potential of endophytic *Bacillus velezensis* Mr12 isolated from *M. sieversii*, the antibacterial broad-spectrum, antibacterial mechanism and the stability of antibacterial active substances of strain Mr12 under high temperature, ultraviolet radiation and other conditions were determined and analyzed. The molecular mechanism underlying the biocontrol processes were studied.【Methods】The antagonistic effect of strain Mr12 against six pathogenic fungi (*Fusarium graminearum*, *Gaeumannomyces graminis*, *Rizoctonia cerealis*, *Fusarium proliferatum*, *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum karstii*) was evaluated by confrontation culture method. The stability of antifungal metabolite of its sterile supernatant against *B. dothidea* was determined. After the sterile filtrate of Mr12 heat treatment, acid-base treatment, proteinase K treatment and ultraviolet treatment, the antibacterial rates of the sterile filtrate were

收稿日期:2021-03-25 接受日期:2021-06-18

基金项目:国家自然科学基金(31870638);国家现代农业产业技术体系(CARS-27)

作者简介:李永丽,女,高级实验师,博士,研究方向为植物保护。Tel:15896527376,E-mail:yonglili1978@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:13849943528,E-mail:zhouzhouhaust@163.com;xmyin@henau.edu.cn

tested. The effect of the sterile filtrate on the spore germination and mycelial growth of *B. dothidea* was studied. Potential biocontrol molecular foundation of strain Mr12 was analyzed by the complete genome sequencing. 【Results】 The strain Mr12 exhibited antagonistic abilities to the six plant pathogens, and the inhibition rate was between 55% and 91%. In addition, it still maintained the antifungal activity after treatment of acidic, alkaline, heat (< 80 °C), proteinase K and ultraviolet radiation. It could cause the abnormal growth of mycelium and inhibit spore germination. It was sequenced and assembled. The genome length was 4 001 152 bp, including a complete circular chromosome and a plasmid; the chromosome length was 3 920 120 bp (GenBank accession number is CP066337), and the plasmid length was 81 032 bp (The accession number of GenBank is CP066338). The GC content of the genome was 46.50%. It was predicted to encode 3953 genes with an average length of 872 bp. The coding sequence accounts for 86.12% of the entire genome sequence. Complete genome sequence analysis showed that the strain Mr12 contained gene clusters related to the biosynthesis of a variety of polypeptide and polyketide compounds, such as difficidin, fengycin, bacillibactin and surfactin. And the genes encoding enzymes like β -1,3-glucase and chitinase could hydrolyze the pathogen cell wall. The results of biochemical analysis further proved the ability of this strain to produce casein and cellulase. 【Conclusion】 The strain Mr12 had an antagonistic effect on *B. dothidea*, *Phomopsis mali* and *Colletotrichum gloeosporioides*. This study further clarified that the strain had an effect on *F. graminearum*, *G. graminis*, *R. cerealis*, *F. proliferatum*, *B. cinerea* and *C. karstii*. It had strong inhibitory activity against fungal pathogens in fruit trees, wheat, vegetable, and so on. The inhibitory activity was stable. The antibacterial rate of the fermentation filtrate of the strain Mr12 was still high even with ultraviolet irradiation and acid-base treatments. Genome analysis revealed that the disease prevention effect of the strain Mr12 could be achieved by producing lipopeptides, hydrolase enzymes and inducing plant disease resistance, etc. In addition, the whole genome analysis results also showed that the strain Mr12 contained lipopolysaccharide, salicylic acid, acetolactate decarboxylase and acetolactate synthase and other genes related to the induction of plant resistance. It would be valuable to further evaluate the strain Mr12 as potential bio-controlling strains to plant diseases.

Key words: Apple; Endophytic bacteria; Antifungal broad-spectrum; *Bacillus velezensis*; Complete genome analysis; Antibacterial stability; Antibacterial mechanism

生物防治是利用有益生物及其产物控制有害生物种群数量的防治技术,常用于植物病虫害的治理。近年来,芽孢杆菌在农作物病虫害防治方面起了重要作用。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)是芽孢杆菌中新发现的1个种,普遍存在于自然界植物组织、土壤、河水和海洋中^[1]。研究发现贝莱斯芽孢杆菌中部分菌株抑菌谱广,具有防治多种植物病害的潜力^[2-3],并且可以对植物产生促生、固氮和抗逆境等多种作用,是重要的生防资源,其中部分菌株已成功用于植物病害生物防治^[4-5]。信阳农林学院生物防治研究室成员从我国特有的树种新疆野苹果(*Malus sieversii*)枝干中分离到1株内生贝莱斯芽孢杆菌菌株Mr12,该菌株不仅可以抑制葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)的生长,而且对

苹果树的另外2种病原菌胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和苹果拟茎点霉(*Phomopsis mali*)也具有很强的拮抗作用,并且对苹果枝干无致病性,具有作为生防菌的应用价值^[6]。

由葡萄座腔菌引起的苹果轮纹病,不仅造成枝干枯死,严重削弱树势,还会导致烂果,造成较大的经济损失。苹果轮纹病在我国各苹果产区都有发生,且近年来病情逐渐加重^[7]。葡萄座腔菌寄主范围广泛,除苹果外还会危害杨树等十多种树木^[2]。目前,化学防治是防治苹果轮纹病最主要的方法,但是化学农药的使用存在不合理现象,易使病原菌产生抗药性,同时农药残留超标造成的环境污染也会威胁人类健康^[8-9]。创建安全有效的苹果轮纹病防治方法具有重要的现实意义。将菌株Mr12开发

成为以防治苹果轮纹病为主同时具有广谱抑菌作用的生防菌剂,需要明确该菌株的生防利用潜力。笔者对菌株Mr12的抑菌广谱性、抑菌机制及抑菌活性物质在高温、紫外线照射等条件下的稳定性进行测定与分析,并以葡萄座腔菌为靶标菌,明确菌株Mr12对菌丝生长和孢子萌发的影响,同时对该菌株基因组进行测序,分析其生防作用的遗传基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试菌株:新疆野苹果内生贝莱斯芽孢杆菌株Mr12、葡萄座腔菌、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*)、小麦纹枯病菌(*Rizoctonia cerealis*)、君子兰茎基腐病菌(*Fusarium proliferatum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和南天竹炭疽病菌(*Colletotrichum karstii*)均由信阳农林学院生物防治实验室保存。

供试培养基:NA培养基、PDA培养基、酪蛋白培养基^[10];纤维素刚果红培养基^[2]。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株Mr12种子液制备 将菌株Mr12单菌落接种于20 mL NA液体培养基中,于28 °C、180 r·min⁻¹条件下培养24 h备用。

1.2.2 菌株Mr12对6种病原真菌的抑菌活性 将菌株Mr12种子液按质量分数5%的接种量分别接种至NA液体培养基中,28 °C、180 r·min⁻¹培养48 h,得到发酵液备用。供试病原菌为小麦赤霉病菌、小麦全蚀病菌、小麦纹枯病菌、君子兰茎基腐病菌、番茄灰霉病菌和南天竹炭疽病菌。每组抑菌试验设置3次重复,平板对峙和抑菌率计算参照文献[6]。

1.2.3 菌株Mr12无菌滤液抑菌物质稳定性试验 将菌株Mr12按1.2.2步骤中获得发酵液经12 000 r·min⁻¹离心20 min后,上清液用细菌过滤器(滤膜孔径0.22 μm)过滤,即得无菌滤液。无菌滤液经以下4种方法处理。热处理:内生细菌Mr12无菌滤液于60、80、100、121 °C处理30 min后,自然冷却。酸碱处理:10 mL无菌滤液,用1 mol·L⁻¹ HCl和1 mol·L⁻¹ NaOH将无菌滤液pH值调为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12,4 °C静置12 h后调至pH值为7。蛋白酶K处理:在无菌滤液中加入蛋白酶K,至终质量浓度为

100 mg·L⁻¹,37 °C水浴1 h。紫外线处理:将无菌滤液置于紫外灯(PHILIPS TUV 15 W)下30 cm处,照射15、30、45、60、120 min。分别取5 mL上述不同处理过后的无菌滤液与45 mL PDA培养基混匀后制成平板,以葡萄座腔菌为待测试菌,每组抑菌试验设置3次重复,按照文献[6]的方法计算抑菌率。

1.2.4 菌株Mr12无菌滤液对葡萄座腔菌孢子萌发及菌丝生长的影响 将葡萄座腔菌分生孢子加入菌株Mr12无菌滤液与等体积质量分数2%葡萄糖混合溶液中,制成孢子悬浮液,将孢子悬浮液滴于凹玻片中,对照组为含质量分数1%葡萄糖的孢子悬浮液,在28 °C、培养12 h后观察孢子萌发情况,每处理3次重复。菌株Mr12无菌滤液对葡萄座腔菌菌丝生长影响试验方法同1.2.2,分别挑取含有无菌滤液平板和对照平板中的菌丝,制成临时玻片,观察菌丝形态(蔡司,Primostar 3)。

1.2.5 菌株Mr12全基因组测定 按照试剂盒(TaKaRa,Code No. 9763)方法提取纯化菌株Mr12基因组DNA,通过3代测序平台Nanopore进行全基因组测序(北京百迈克生物科技有限公司)。采用Prodigal软件进行编码基因预测,利用预测得到的基因序列与COG (clusters of orthologous groups)、KEGG (kyoto encyclopedia of genes and genomes)、Swiss-Prot、TrEMBL、Nr等功能数据库作BLASTX比对,应用软件Blast2 GO进行基因功能分析注释。

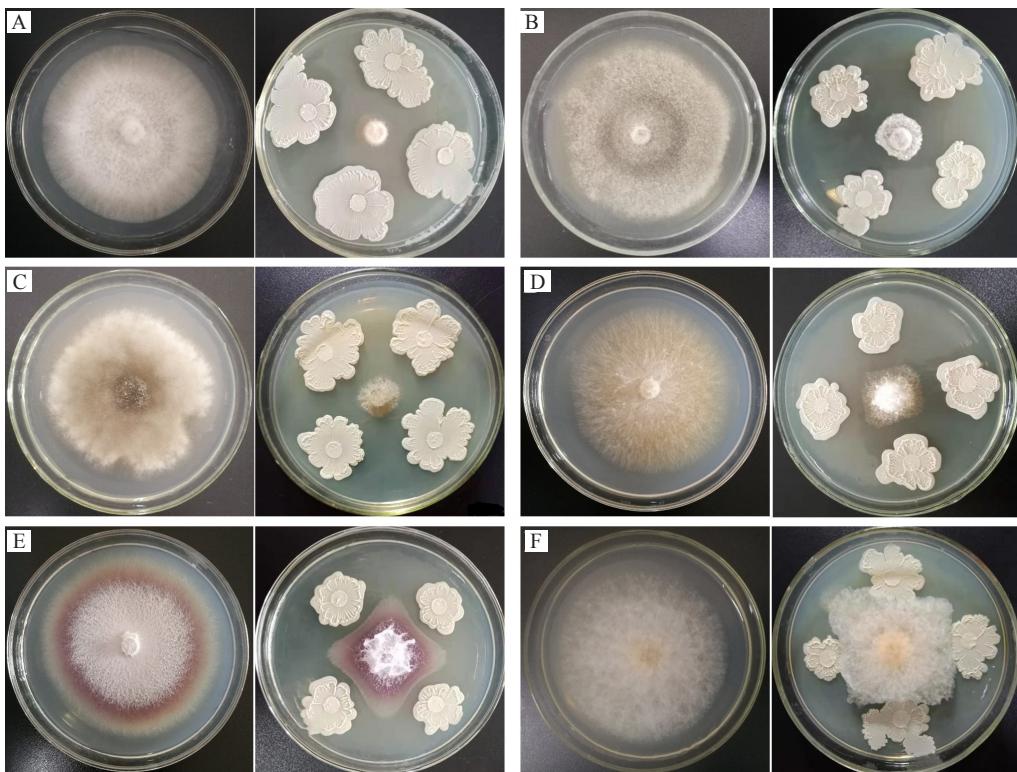
1.2.6 菌株Mr12产酪蛋白酶和纤维素酶验证 鉴定拮抗酶培养基上放置3枚直径为6 mm无菌滤纸片,取3 μL菌株Mr12发酵液滴于滤纸片上,28 °C培养3~5 d,观察纤维素刚果红培养基,酪蛋白培养基是否产生水解圈。对照滴加等量NA培养液,每个处理3次重复。

1.2.7 数据统计与分析 应用软件SPSS 24.0对数据进行单因素方差分析和多重比较(LSD)、邓肯(Duncan)法进行样本间差异显著性分析,用Microsoft Excel 2010软件作图。

2 结果与分析

2.1 菌株Mr12对6种病原真菌的拮抗作用

菌株Mr12对6种病原菌均表现出拮抗作用,其中1组对峙试验如图1所示,抑菌率均在60.00%以上。菌株Mr12对南天竹炭疽病菌的拮抗作用最强,抑菌率为(91.17±0.10)%;对小麦全蚀病菌、番茄灰



A. 南天竹炭疽病菌; B. 小麦全蚀病菌; C. 番茄灰霉病菌; D. 小麦纹枯病菌; E. 君子兰茎腐病菌; F. 小麦赤霉病菌。每幅图左培养皿为空白平板对照,右培养皿为添加有发酵滤液平板。

A. *Colletotrichum karstii*; B. *Gaeumannomyces graminis*; C. *Botrytis cinerea*; D. *Rizoctonia cerealis*; E. *Fusarium oxysporum*; F. *Fusarium graminearum*. Each petri dish on the left is a blank plate control, and the right petri dish is a plate with a fermentation filtrate added.

图1 菌株Mr12对6种植物病原菌平板对峙

Fig. 1 The antagonism of the strain Mr12 to 6 plant diseases

霉病菌、小麦纹枯病菌和君子兰茎基腐病菌的抑菌率分别为 $(90.27\pm2.43)\%$ 、 $(78.27\pm1.25)\%$ 、 $(77.88\pm2.05)\%$ 和 $(64.79\pm1.13)\%$;对小麦赤霉病菌拮抗作用较弱,抑菌率为 $(61.87\pm1.20)\%$ 。

2.2 菌株Mr12无菌滤液中抑菌物质稳定性

2.2.1 热稳定性 菌株Mr12无菌滤液在60℃处理后,抑菌活性稍微降低,但抑菌率仍高于80.00%,温度升至80℃和100℃时,抑菌率分别为 $(84.08\pm1.85)\%$ 和 $(85.22\pm2.13)\%$ (图2-A),抑菌活性没有显著变化。菌株Mr12抑菌物质在100℃以下时具有较好的稳定性。

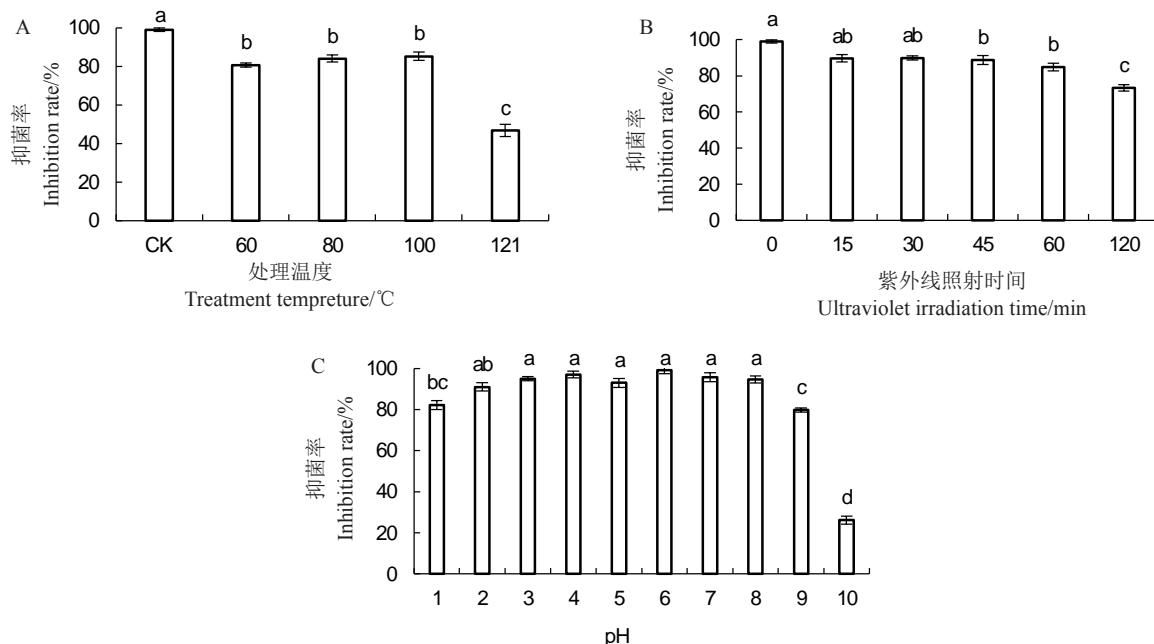
2.2.2 对紫外线的稳定性 紫外线辐射对菌株Mr12抑菌活性物质影响较小,在照射30 min后,抑菌活性没有改变;照射时长达到45 min,抑菌活性开始下降,但抑菌率仍高达 $(88.73\pm2.53)\%$;照射120 min时,抑菌率为 $(73.30\pm1.75)\%$,可见菌株Mr12抑菌活性物质对紫外线辐射有较好的稳定性(图2-B)。

2.2.3 酸碱稳定性 菌株Mr12无菌滤液抑菌物质在pH 4~10范围内具有较高的稳定性。菌株无菌滤液经不同pH条件处理后,抑菌率见图2-C。pH在4~10时,菌株Mr12无菌滤液菌保持了原有的抑菌活性,抑制率均在90.00%以上;当pH为3和11时,抑制率仍可达到 $(82.10\pm2.18)\%$ 和 $(79.79\pm0.95)\%$;当pH为12时,抑制率显著下降。

2.2.4 蛋白酶K处理稳定性 菌株Mr12无菌滤液经蛋白酶K水浴处理1 h后抑菌活性未发生变化,抑制率与对照无差异,均在90.00%以上,说明抑菌活性物质不是蛋白质。

2.3 菌株Mr12无菌滤液对葡萄座腔菌孢子萌发及菌丝生长的作用

葡萄座腔菌分生孢子培养12 h后正常萌发(图3-A),菌株Mr12无菌滤液能够抑制其孢子的萌发,部分孢子一端产生泡囊(图3-B),未见芽管生长,分生孢子萌发抑制率达100%。葡萄座腔菌正常条件下菌丝是线性的(图3-C),当培养基中添加无菌滤



不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 差异显著。下同。

Different small letters indicate significant difference at $p < 0.05$. The same below.

图 2 温度、紫外线和酸碱处理对菌株 Mr12 无菌滤液抑菌活性的影响

Fig. 2 Effect of different temperature treatment, ultraviolet light and pH treatment on the antifungal activity of fermentation broth of strain Mr12

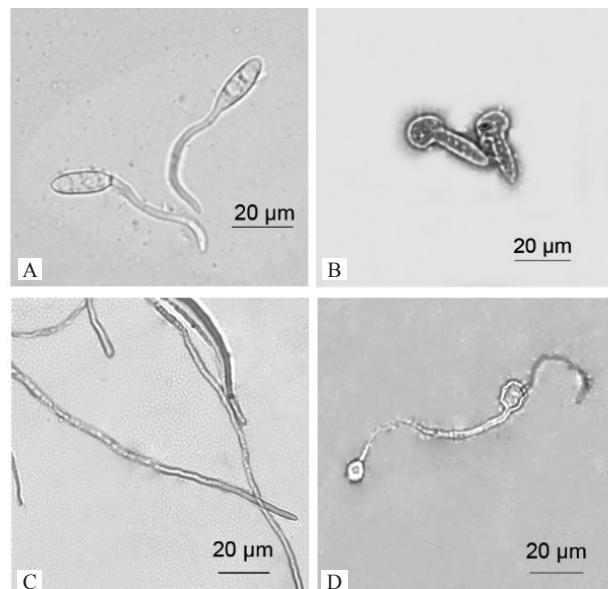
液后,菌丝生长受到抑制,观察菌丝形态发现扭曲变形,产生泡囊结构(图3-D)。

2.4 菌株 Mr12 全基因组分析

菌株 Mr12 经测序组装,基因组全长为 4 001 152 bp,包含 1 个完整环状染色体和 1 个质粒;染色体全长为 3 920 120 bp (GenBank 的登录号为 CP066337),质粒全长为 81 032 bp (GenBank 的登录号为 CP066338)。基因组 GC 含量为 46.50%,预测编码 3953 个基因,平均长度为 872 bp,编码序列占整个基因组序列的 86.12%。

统计 COG 注释分类结果(图 4),菌株 Mr12 共有 2913 个基因获得注释。其中,参与氨基酸转运与代谢(N)的有 346 个,转录(B)的有 292 个,碳水化合物转运和代谢(M)的有 253 个,无机离子转运和代谢(R)的有 210 个,次生代谢产物生物合成,运输和分解代谢(S)的有 167 个,能量产生与转换(L)的有 178 个,细胞壁/细胞膜/胞外被膜生物合成(H)的有 178 个,翻译、核糖体结构和生物合成(A)的有 161 个。

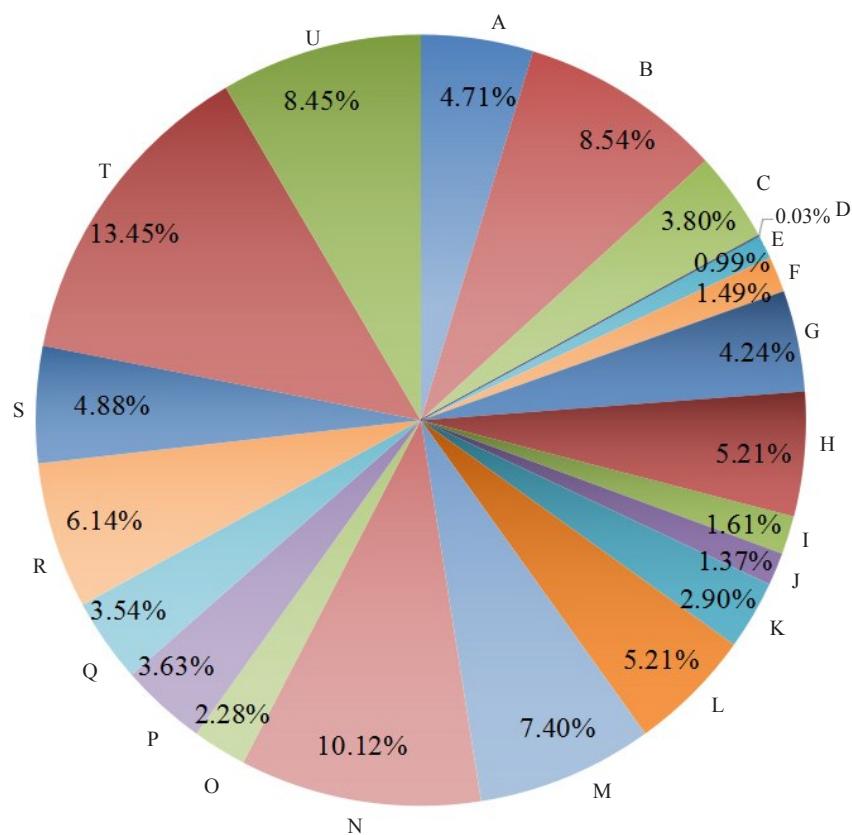
进一步经 COG 功能富集分析、KEGG 代谢通路富集分析、GO 功能富集分析等数据库作 BLASTX 比对后,有 98.25% 的基因得到功能注释。菌株 Mr12 具有合成 subtilin、bacillibactin、fengycin、itu-



A. Normal spores germination in a control; B. The effect of fermentation broth of strain Mr12 on spores; C. Normal hyphal growth in a control; D. The effect of fermentation broth of strain Mr12 on hyphal morphology.

图 3 菌株 Mr12 无菌滤液对葡萄座腔菌孢子萌发和菌丝生长的影响

Fig. 3 Effect of strain Mr12 on spore germination and mycelial morphology of *B. dothidea*



A. 翻译、核糖体结构和生物合成；B. 转录；C. 复制、重组和修复；D. 染色质结构和动力学；E. 细胞周期调控、细胞分裂、染色体分配；F. 防御机制；G. 信号转导机制；H. 细胞壁 / 细胞膜 / 胞外被膜生物合成；I. 细胞运动；J. 胞内运输、分泌和囊泡运输；K. 翻译后修饰、蛋白质转换、伴侣；L. 能量生产和转换；M. 碳水化合物转运和代谢；N. 氨基酸转运和代谢；O. 核苷酸转运和代谢；P. 辅酶转运和代谢；Q. 脂质转运和代谢；R. 无机离子转运和代谢；S. 次生代谢产物生物合成、转运和代谢；T. 一般功能预测；U. 功能未知。

A. Translation, ribosomal structure and biogenesis; B. Transcription; C. Replication, recombination and repair; D. Chromatin structure and dynamics; E. Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; F. Defense mechanisms; G. Signal transduction mechanisms; H. Cell wall/membrane/envelope biogenesis; I. Cell motility; J. Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; K. Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; L. Energy production and conversion; M. Carbohydrate transport and metabolism; N. Amino acid transport and metabolism; O. Nucleotide transport and metabolism; P. Coenzyme transport and metabolism; Q. Lipid transport and metabolism; R. Inorganic ion transport and metabolism; S. Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; T. General function prediction only; U. Function unknown.

图 4 COG 功能注释分类统计

Fig. 4 Function classification and percentage (A-U) of strain Mr12 genome genes according to COG database

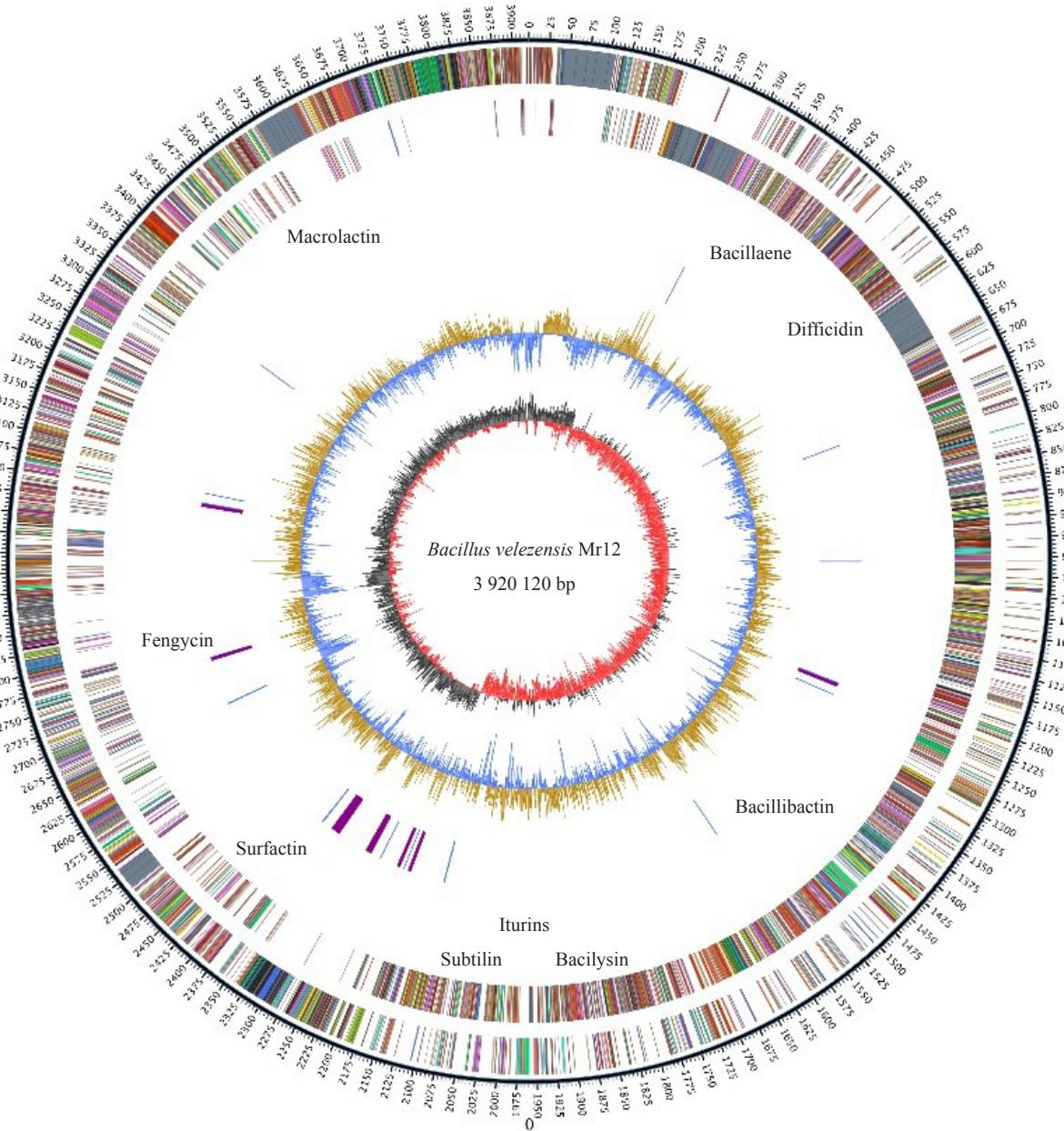
rins、bacillaene、surfactin、macrolactin、difficidin、bacilysin等多种肽聚糖和聚酮糖类化合物基因，染色体上的存在位置见图5所示，这些代谢产物是病害防治的主要物质基础。

GO注释分类统计结果显示，菌株Mr12可产生分解病原菌细胞壁的纤维素酶(GE00959, GE01913, GE03108)、 β -1,3-葡聚糖酶(GE01940, GE00161)和几丁质酶(GE03391, GE00110, GE02130)基因；诱导抗病性相关的脂多糖(GE01503, GE01681, GE01620, GE01887)、水杨酸(GE00572, GE00573, GE00068)、乙酰乳酸脱羧酶

(GE01655)和乙酰乳酸合酶(GE00907, GE00910, GE01656)基因；也可产生抗逆性相关的亚精胺合成酶基因(GE01796)和海藻糖运输蛋白(GE02875, GE02876, GE02877)基因。这些基因产物对保护自身机体、抑制病原菌菌丝生长、诱导和增加植物抗病性方面具有作用。

2.5 菌株Mr12产酪蛋白酶和纤维素酶

生化分析结果进一步证明了该菌株具有产生酪蛋白酶和纤维素酶的能力，菌株Mr12可使酪蛋白培养基产生水解圈，显色反应中使纤维素刚果红培养基红色消失(图6)。



从外向内分别代表:基因组正链的 gene,基因组负链上的 gene(不同颜色代表不同的 COG 功能分类);预测次生代谢产物的位置;tRNA 和 rRNA(蓝色为 tRNA,紫色为 rRNA);GC 含量;GC-skew。

From outer circle to the center: CDS on forward strand (colored according to COG categories), CDS on reverse strand, locations of predictive secondary metabolite, tRNA and rRNA (tRNA in blue, rRNA in purple), GC content and GC skew.

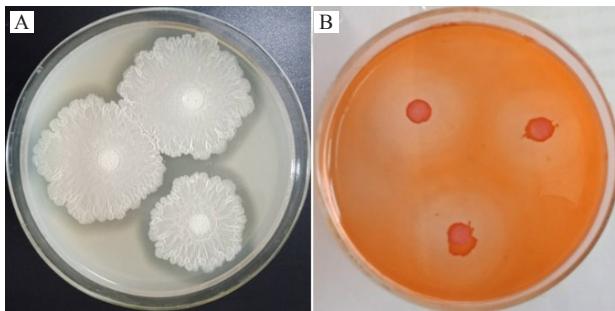
图 5 菌株 Mr12 基因组环形图

Fig. 5 Circular map of *Bacillus velezensis* strain Mr12 genome

3 讨 论

沙月霞等^[3]研究报道分离自水稻的内生贝莱斯芽孢杆菌对多种植物病原菌具有较强的抑制作用。获得对多种植物病害具有防治作用的内生芽孢杆菌,并进一步用作生防制剂,这对植物病害生物防治具有重要的现实意义。本试验中的贝莱斯芽孢杆菌

Mr12 来自我国特有树种新疆野苹果,该菌株对苹果轮纹病菌具有较强的拮抗作用,且对苹果炭疽病菌、苹果拟茎点霉、小麦赤霉病菌、小麦纹枯病菌、小麦全蚀病菌、番茄灰霉病菌、南天竹炭疽病菌以及君子兰茎基腐病菌等植物病原菌具有较好的抑制作用,证实了菌株 Mr12 的抗菌广谱性,拓展了其未来潜在的应用范围。



A. 刚果红培养基;B. 酪蛋白培养基。

A. Congo red medium; B. Casein medium.

图 6 菌株 Mr12 产酪蛋白酶和纤维素酶能力

Fig. 6 Ability to produce casease and cellulase of strain Mr12

菌株 Mr12 发酵滤液经紫外线、不同温度、pH 处理后的抑菌活性发生变化,说明该菌株抑菌活性会受到外界环境条件的影响。赵雅等^[11]报道贝莱斯芽孢杆菌 HN-Q-8 菌株经紫外线照射 35 min, 抑菌率下降到 74%, 抑菌活性物质不耐强酸强碱, 适宜 pH 为 4~10。本试验中菌株 Mr12 发酵滤液经紫外线照射 60 min 抑菌率依然维持在 80% 以上; 经 pH 为 3 和 11 酸碱处理后, 抑菌率仍可达 75.05% 和 70.20%, 这表明菌株 Mr12 活性成分耐紫外线照射和酸碱的能力强, 具有较强的适应性。

不同的贝莱斯芽孢杆菌菌株基因组组成有一定差异, 本试验中发现菌株 Mr12 有质粒存在, 全基因组分析发现生物防治相关基因存在于染色体基因组上。菌株 Mr12 含有亚精胺合成酶和海藻糖运输蛋白基因。亚精胺具有保护机体耐受高盐、低温和低湿的功能^[12], 海藻糖具有极强的防紫外线、耐热性和耐酸性等优良特性^[13]。菌株 Mr12 还具有合成多种抗菌脂肽类物质 (fengycin, iturins, surfactin) 的能力, 这些抗菌物质具有良好的热稳定性, 对紫外照射不敏感, 对蛋白酶 K 等多种蛋白酶不敏感。这些结果从遗传学角度一定程度上解释了菌株 Mr12 抑菌物质活性稳定性高的原因。

贝莱斯芽孢杆菌产生的抑菌物质主要有葡聚糖酶^[14]、脂肽类物质^[15-16]等。菌株 Mr12 全基因组序列中含有可产生多种抗菌脂肽类物质的基因簇, 以及纤维素酶、 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶合成相关的基因。脂肽类物质 iturin 主要通过影响真菌细胞膜的表面张力, 导致微孔的形成、促使电解质及其他重要离子的渗漏而表现出强的抗真菌活性。纤维素酶、 β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶是分解病原菌细胞壁的

酶类, 并且 β -1,3-葡聚糖酶对真菌的菌丝生长和孢子萌发具有抑制作用^[17], 以上研究结果不仅解析了菌株 Mr12 可抑制多种植物病原菌菌丝生长和葡萄座腔菌孢子萌发, 而且说明菌株 Mr12 可能主要通过产生抗生物质和水解酶类来实现病害的防治。此外, 全基因组分析结果显示菌株 Mr12 含有脂多糖、水杨酸、乙酰乳酸脱羧酶和乙酰乳酸合酶等与诱导植物抗性相关的基因, 说明菌株 Mr12 也具有通过诱导植物抗性, 从而可提高抵御植物病原的能力。未来对菌株 Mr12 的潜在能力可以展开进一步的验证分析, 为其在生产中的应用奠定基础。

4 结 论

在了解贝莱斯芽孢杆菌菌株 Mr12 对苹果轮纹病菌、苹果炭疽病菌、苹果拟茎点霉具有拮抗作用的基础上, 本试验中笔者进一步明确了该菌株对小麦赤霉病菌、小麦纹枯病菌、小麦全蚀病菌、番茄灰霉病菌、南天竹炭疽病菌和君子兰茎腐病菌等供试病原表现出抑菌广谱作用, 证明了该菌株防治多种植物病害的潜力。测试表明该菌株抑菌活性成分稳定性高, 对病原菌丝生长和孢子萌发表现出抑制作用, 为其在植物病害生物防治上的应用研究奠定了良好的基础。全基因组分析阐释了菌株 Mr12 的防病作用可能通过产生脂肽类物质、水解酶类和诱导植物抗病性等得以实现, 同时还阐释了菌株 Mr12 抑菌活性物质耐受环境因子宽泛的遗传基础。

参考文献 References:

- [1] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634-3649.
ZHANG Defeng, GAO Yanxia, WANG Yajun, LIU Chun, SHI Cunbin. Research progress on the classification, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. Microbiology Bulletin, 2020, 47(11):3634-3649.
- [2] 杨蕾, 周国英, 梁军. 2 种生防菌株对杨树溃疡病原葡萄座腔菌的抑制作用[J]. 林业科学, 2015, 51(8):67-73.
YANG Lei, ZHOU Guoying, LIANG Jun. Inhibitory effects of two biocontrol fungous strains on poplar canker *Botryosphaeria dothidea*[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2015, 51(8):67-73.
- [3] 沙月霞, 隋书婷, 曾庆超, 沈瑞清. 贝莱斯芽孢杆菌 E69 预防稻瘟病等多种真菌病害的潜力[J]. 中国农业科学, 2019, 52(11):1908-1917.
SHE Yuexia, SUI Shuteng, ZENG Qingchao, SHEN Ruiqing.

- Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* strain E69 against rice blast and other fungal diseases[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(11): 1908-1917.
- [4] 程欢欢,余水,姚伟伟,李忠,彭丽娟,丁海霞. 辣椒炭疽病生防芽孢杆菌的筛选及田间防效[J]. 河南农业大学学报, 2019, 53(4): 568-573.
CHENG Huanhuan, YU Shui, YAO Weiwei, LI Zhong, PENG Lijuan, DING Haixia. Screening of antagonistic *Bacillus* strains and control effect against pepper anthracnose in field trial[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2019, 53(4): 568-573.
- [5] 赵玉华,李俊州,冯慧静,文才艺. 内生细菌EBS05对番茄植物的促生和诱导抗病性信号转导途径的研究[J]. 河南农业大学学报, 2018, 52(1): 59-65.
ZHAO Yuhua, LI Junzhou, FENG Huijing, WEN Caiyi. Study on growth promotion and signaling pathway of induced systemic resistance elicitation mediated by endophytic bacteria strain EBS05 in tomato plant[J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2018, 52(1): 59-65.
- [6] 李永丽,王亚红,常乐,余海如,周洲,赵文霞,曲良建. 新疆野苹果树内生细菌分离与鉴定及其对三种苹果病原菌的抑制作用[J]. 林业科学, 2020, 56(5): 97-104.
LI Yongli, WANG Yahong, CHANG Le, YU Hairu, ZHOU Zhou, ZHAO Wenxia, QU Liangjian. Isolation and identification of endophytic bacteria with antagonism against three pathogens of apple from the branches of *Malus sieversii*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56(5): 97-104.
- [7] 胡清玉,胡同乐,王亚南,王树桐,曹克强. 中国苹果病害发生与分布现状调查[J]. 植物保护, 2016, 42(1): 175-179.
HU Qingyu, HU Tongle, WANG Yanan, WANG Shutong, CAO Keqiang. Survey on the occurrence and distribution of apple diseases in China[J]. *Plant Protection*, 2016, 42(1): 175-179.
- [8] 李晓军,范昆,曲健禄,张勇,王涛,亓彬. 苹果轮纹病菌对多菌灵的敏感性测定[J]. 果树学报, 2009, 26(4): 516-519.
LI Xiaojun, FAN Kun, QU Jianlu, ZHANG Yong, WANG Tao, QI Bin. Determination of the sensitivity of *Botryosphaeria berengriana* to carbendazim fungicide[J]. *Journal of Fruit Science*, 2009, 26(4): 516-519.
- [9] 杨伟华,刘开启. 苹果轮纹病菌对多菌灵、甲基硫菌灵的抗药性测定[J]. 植物保护学报, 2002, 29(2): 191-192.
YANG Weihua, LIU Kaiqi. Resistance detection of *Botryosphaeria berengriana* f. sp. *piricola* to carbendazim and thiophanate-methyl[J]. *Journal of Plant Protection*, 2002, 29(2): 191-192.
- [10] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社. 1998.
FANG Zhongda. Research methods of plant diseases[M]. Third Edition. Beijing: China Agriculture Press. 1998.
- [11] 赵雅,张岱,杨志辉,朱杰华,赵冬梅,薛雪. 贝莱斯芽孢杆菌HN-Q-8菌株发酵液稳定性测定及抑菌活性成分分析[J]. 微生物学通报, 2020, 47(2): 490-499.
ZHAO Ya, ZHANG Dai, YANG Zhihui, ZHU Jiehua, ZHAO Dongmei, XUE Xue. Determination of the stability of fermentation broth and analysis of active components of *Bacillus velezensis* HN-Q-8[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(2): 490-499.
- [12] 孙平平,崔建潮,贾晓辉,王文辉. 贝莱斯芽孢杆菌L-1对梨灰霉和青霉病菌的抑制作用评价及全基因组分析[J]. 微生物学报, 2018, 58(9): 1637-1646.
SUN Pingping, CUI Jianchao, JIA Xiaohui, WANG Wenhui. Complete genome analysis of *Bacillus velezensis* L-1 and its inhibitory effect on pear gray and blue mold[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2018, 58(9): 1637-1646.
- [13] 贾慧慧,李克文,栾庆民,吴敬,陈晨. 海藻糖对生物活性物质的保护机理及应用研究[J]. 精细与专用化学品, 2017, 25(11): 51-53.
JIA Huihui, LI Kewen, LUAN Qingming, WU Jing, CHEN Sheng. The application and protection mechanism of trehalose on biomaterials[J]. *Fine and Specialty Chemicals*, 2017, 25(11): 51-53.
- [14] 徐婷,朱天辉,李姝江,谯天敏. 贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* YB15 β -葡聚糖酶的抑菌作用与基因克隆[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(2): 276-281.
XU Ting, ZHU Tianhui, LI Shujiang, QIAO Tianmin. Fungus-inhibitory activity and gene cloning of β -glucanase from *Bacillus velezensis* YB15[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2014, 30(2): 276-281.
- [15] 刘雪娇,李红亚,李术娜,朱宝成,高同国. 贝莱斯芽孢杆菌3A3-15生防和促生机制[J]. 河北大学学报(自然科学版), 2019, 39(3): 302-310.
LIU Xuejiao, LI Hongya, LI Shuna, ZHU Baocheng, GAO Tongguo. Biocontrol and growth promotion mechanisms of *Bacillus velezensis* 3A3-15[J]. *Journal of Hebei University (Natural Science Edition)*, 2019, 39(3): 302-310.
- [16] JIANG C H, LIAO M J, WANG H K, ZHENG M Z, XU J J, GUO J H. *Bacillus velezensis*, a potential and efficient biocontrol agent in control of pepper gray mold caused by *Botryotinia cinerea*[J]. *Biological Control*, 2018, 126(11): 147-157.
- [17] 孙斌,李多川,慈晓燕,郭润芳,王颖. 小麦叶片 β -1,3-葡聚糖酶的诱导、纯化与抗菌活性[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004, 30(4): 399-404.
SUN Bin, LI Duoquan, CI Xiaoyan, GUO Runfang, WANG Ying. Induction, purification and antifungal activity of β -1,3-glucanase from wheat leaves[J]. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 2004, 30(4): 399-404.