

王辉, 刘丽, 于舒怡, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 SF18-3 的鉴定及对辣椒细菌性斑点病的防效评价[J]. 沈阳农业大学学报, 2024, 55(4): 417-425.

WANG Hui, LIU Li, YU Shuyi, et al. Identification and evaluation of *Bacillus subtilis* SF18-3 against bacterial spot disease of pepper[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2024, 55(4): 417-425.

贝莱斯芽孢杆菌 SF18-3 的鉴定及对辣椒细菌性斑点病的防效评价

王辉^{1a}, 刘丽^{1a}, 于舒怡^{1a}, 关天舒^{1a}, 邹春蕾^{1b}, 李柏宏^{1a}, 郑丽娇²

(1. 辽宁省农业科学院 a. 植物保护研究所, b. 蔬菜研究所, 沈阳 110161; 2. 新民市乡村振兴发展中心, 辽宁 新民 110300)

摘要: 近年辽宁地区辣椒细菌性斑点病 [*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye] 发生严重, 为挖掘新的优质高效生防资源, 以辣椒细菌性斑点病菌 BWB3 为靶标, 采用稀释平板涂布法从动物粪肥混合物中分离获得 1 株高效生防细菌 SF18-3。为进一步明确 SF18-3 的生防潜力, 利用抑菌圈法优化最佳发酵条件后, 采用双抗体夹心法测定其发酵液中 6 种胞外酶活性, 测定其室内抑菌活性并评价田间盆栽防治效果, 并通过形态特征观察、生理生化试验与 16S rDNA 序列分析确定其分类地位。结果表明: 以 NB 为基础培养基 140 r·min⁻¹ 恒温 30 °C 发酵 84 h 后 SF18-3 抑菌效果最好, 发酵液中蛋白酶活性与木聚糖酶活性较高, 分别为 536.13 U·L⁻¹ 与 564.22 U·L⁻¹; 最佳发酵条件下平板抑菌圈直径为 3.40 cm, 盆栽防治效果达 70.17%; 显微镜观察 SF18-3 菌体呈杆状、有芽孢; 革兰氏染色为阳性。16S rDNA 序列与已知贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) OK169608 及 (*B. velezensis*) OK147645 聚为一类, 结合其菌落形态与生理生化特征, 确定菌株 SF18-3 为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。

关键词: 辣椒细菌性斑点病; 贝莱斯芽孢杆菌; 胞外酶; 防治效果; 鉴定

中图分类号: S476

文章编号: 1000-1700(2024)04-0417-09

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Identification and Evaluation of *Bacillus subtilis* SF18-3 Against Bacterial Spot Disease of Pepper

WANG Hui^{1a}, LIU Li^{1a}, YU Shuyi^{1a}, GUAN Tianshu^{1a}, ZOU Chunlei^{1b}, LI Baihong^{1a}, ZHENG Lijiao²

(1. a. Institute of Plant Protection, b. Institute of Vegetable Research, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China;

2. Xinmin Rural Revitalization and Development Center, Xinmin Liaoning 110300, China)

Abstract: In recent years, bacterial spot disease of pepper [*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye] has occurred seriously in Liaoning province. In this study, a strain of biocontrol bacterium SF18-3, known for its high efficacy, was obtained from a mixture of animal manure using the dilution plate coating method. The target organism for this isolation was bacterial mottle blotch BWB3 in pepper plants. To further clarify the biocontrol effect of SF18-3, the optimal fermentation conditions were optimized by antibacterial zone method, and the 6 extracellular enzyme activities were determined by double antibody sandwich method. The antibacterial activities were determined in laboratory test and the control efficiency were evaluated in pod experiment. The taxonomic status of SF18-3 was determined by morphological characteristics observation, physiological and biochemical tests and 16S rDNA sequence analysis. The results showed that SF18-3 had the best bacterial inhibition effect after fermentation for 84 h at 30 °C with NB as the basal medium at 140 r·min⁻¹.

收稿日期: 2024-03-19

基金项目: 沈阳市中青年科技创新人才支持计划项目(RC210404); 沈阳市农村科技特派团专项项目(23-411-2-19)

第一作者: 王辉(1979-), 女, 博士, 研究员, 从事园艺作物病害生物与生态防治研究, E-mail: wanghui118000@sohu.com

The protease activity and xylanase activity in the fermentation broth were higher, which were $536.13 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$ and $564.22 \text{ U}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Under optimal fermentation conditions, the diameter of the transparent circle was 3.40 cm on the plate and a 70.17% control efficiency on potting. SF18-3 was rod-shaped, spore, Gram-positive bacterium, and 16Sr DNA sequence was clustered with *Bacillus velezensis* OK169608 and *B. velezensis* OK147645. According to colony morphology and physiological and biochemical characteristics, strain SF18-3 was identified as *B. velezensis*.

Key words: bacterial spot disease of pepper; *Bacillus velezensis*; extracellular enzymes; control efficiency; identification

辣椒细菌性斑点病(bacterial spot disease of pepper),又称细菌性疮痂病,由野油菜黄单胞菌致病变种[*Xanthomonas campestris* pv.*vesicatoria*(Doidge)Dye]引起^[1-2],是世界辣椒生产上普遍发生一种细菌性病害^[3-4]。病害主要为害植物叶片,最初病斑水渍状、黄绿色,后扩大成不规则斑块,病斑表面粗糙如疮痂状,易造成叶片穿孔、脱落。我国东北三省早在1991年就有该病害发生的报道^[5],近年调查发现辽宁省该病害苗期发生严重,造成产量损失10%~20%,严重时80%以上,导致秧苗无法销售,损失极大。生产上该病害的防治主要依赖于抗病品种及化学农药的使用,但辣椒细菌性斑点病病菌群体结构复杂^[6],导致优质抗病性品种难以获得^[1,7],而化学农药长期使用增加了病菌抗药性、污染生态环境,致使病害防治难度加大。生物防治具有适应性强、持效期长、安全等优点,成为化学杀菌剂有效可持续替代手段^[8-10]。芽孢杆菌属(*Bacillus*)作为一类重要的生防资源具有易生长、繁殖快、抗逆性强及拮抗与促生作用被广泛应用于植物病害防治中^[11-12]。其中,在防治由野油菜黄单胞菌致病变种引起的蔬菜病害方面解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)起着重要的作用^[2,13-15]。贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)是芽孢杆菌属中被发现与分类较晚的一类^[16],可防治由真菌、细菌、病毒及线虫引起的多种植物病害,有较好的应用与发展前景^[17]。本研究以辣椒细菌性斑点病菌(*Xanthomonas euvesicatoria*) BWB3为靶标,采用平板稀释法从动物粪肥混合物中分离并获得了一株对辣椒细菌性斑点病有明显抑制作用的生防细菌SF18-3。在优化SF18-3发酵条件前提下利用双抗体夹心法测定其发酵液中6种胞外酶活性,通过室内抑菌试验与盆栽防治试验评价SF18-3对病害的防治效果;结合形态特征、生理生化试验与16S rDNA序列分析结果,明确SF18-3为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)。本研究结果可为辣椒细菌性斑点病生物防治提供新的资源,并为深入开发利用菌株SF18-3提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试辣椒细菌性斑点病菌(*Xanthomonas euvesicatoria*) BWB3,由辽宁省农业科学院植物保护研究所园艺作物病害研究室分离保存。革兰氏阴性对照菌株大肠杆菌(*Escherichia coli*) EM2,由沈阳农业大学能源与环境研究室提供。盆栽甜椒品种为“early calwonder”,由辽宁省农业科学院蔬菜研究所辣椒课题组提供,采用常规方法进行育苗与管理。供试培养基为牛肉膏蛋白胨培养基(beef protein medium, BPM)、牛肉膏蛋白胨液体培养基、马丁氏培养基和高氏I号培养基^[18]。酶联免疫分析试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司。供试农药0.3%四霉素水剂,购自辽宁微科生物工程有限公司;46%氢氧化铜水分散粒剂,购自美国杜邦公司。

1.2 方法

1.2.1 BWB3菌悬液配制 将纯化的致病菌菌株BWB3于NA平板划线25℃静置培养72 h,无菌条件下用接种环刮取菌体放置无菌水中配制成浓度为 $1\times 10^7 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的菌悬液,用于含菌平板的制备。

1.2.2 生防菌株的分离 于2022年和2023年从辽宁省沈阳市采集马粪、牛粪、兔粪与猪粪等多种动物粪肥混合物,采用稀释平板涂布法分离筛选生防菌株。分别制备 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 混合物稀释液涂布于牛肉膏蛋白胨培养基分离细菌,将 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} 稀释液分别涂布于马丁氏培养基与高氏I号培养基分离真菌与放线菌。涂布后平板置于25℃恒温培养2~3 d观察细菌生长情况、5~7 d观察真菌与放线菌生长情况。每处理3次重复。挑取菌落特征不同的菌株纯化后4℃保存^[18]。

1.2.3 含菌平板的制备 将1.2.1配制好的BWB3菌悬液($1\times 10^7 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$) 5 mL倒入晾至45~50℃ 45 mL牛肉膏蛋白胨培养基中,制成浓度为 $1\times 10^6 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的含菌平板。

1.2.4 生防菌株初筛 采用抑菌圈法。将分离纯化的生防菌株于牛肉膏蛋白胨培养基25℃培养72 h后,无菌条件下挑取并放置于含菌平板中央,25℃培养4~5 d测量抑菌圈直径,3次重复。

1.2.5 发酵条件优化 以牛肉膏蛋白胨液体培养基为基础培养基,设定SF18-3不同发酵条件:发酵时间(0~96 h)、温度(10~40℃)、转速(100~200 r·min⁻¹)、初始pH值(2.0~10.0),考察不同发酵条件对SF18-3抑菌效果的影响,以无菌NB培养液为空白对照,每处理3次重复。

1.2.6 SF18-3胞外酶活性测定 采用双抗体夹心法。酶联免疫分析试剂盒测定SF18-3最佳发酵条件下获得的发酵液中溶菌酶(lysozyme)、蛋白酶(protease)、几丁质酶(chitinase)、木聚糖酶(xylanase)、纤维素酶(cellulase)及乙酰辅酶A (acetoacetyl coenzyme A)酶活性。

1.2.7 SF18-3防治效果测定

1.2.7.1 不同浓度SF18-3菌液的制备 无菌条件下用移液器吸取SF18-3菌悬液(1×10⁷ cfu·mL⁻¹),方法同1.2.1) 1 mL接种于装有150 mL牛肉膏蛋白胨液体培养基的250 mL三角瓶中以最佳发酵条件培养后即1×菌液,之后用无菌水依次稀释配制成10×、50×、100×、500×、1 000×菌液,用于室内抑菌活性测定及盆栽防治效果评价。

1.2.7.2 室内抑菌活性测定 采用牛津杯法。无菌条件下先将灭菌的牛津杯放置于1.2.3制成的含菌平板上,吸取1.2.7.1不同浓度SF18-3菌液200 μL注入牛津杯内,25℃下静置培养4~5 d后测量抑菌圈直径,3次重复。

1.2.7.3 盆栽防治试验 于辽宁省农业科学院试验基地进行。采用人工接种方法在辣椒苗8片真叶期进行。试验设8个处理:SF18-3的1×、10×、50×、100×、500×菌液及0.3%四霉素水剂57.5 mL·(667m²)⁻¹、46%氢氧化铜水分散粒剂50 g·(667m²)⁻¹与清水对照。第1天将浓度为3×10⁶ cfu·mL⁻¹ BWB3菌悬液(方法同1.2.1)均匀地喷雾至辣椒叶片的正反面^[19],翌日分别将8个处理药液均匀地喷施于叶片正反面,以不流水滴为宜。7 d后第2次施药,14 d调查接种辣椒叶片的总叶数、各病情级别的叶片数、病情级别,计算出病情指数。

病情级别划分标准^[20]:0级:全叶无病斑;1级:病斑占叶面积的5%以下;2级:病斑占叶面积的6%~10%;3级:病斑占叶面积的11%~25%;4级:病斑占叶面积26%~50%;5级:病斑占叶面积的50%以上。

按下列公式计算病指与防治效果^[21]:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级代表值} \times \text{各级叶片数})}{(\text{发病最高代表值} \times \text{调查总叶数})} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{防治效果}(\%) = \frac{(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数})}{\text{对照病情指数}} \times 100 \quad (2)$$

1.2.8 菌株SF18-3的鉴定

1.2.8.1 形态观察与生理生化试验 参照《植病研究方法》^[19]与《常见细菌系统鉴定手册》^[22]与对SF18-3进行菌落培养性状、菌体形态与生理生化特征进行描述与鉴定,以大肠杆菌(*Escherichia coli*) EM2作为革兰氏阴性对照菌株。

1.2.8.2 16S rDNA序列分析 使用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)法提取SF18-3基因组DNA,将提取产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳,并用紫外分光光度计测定OD_{260/280}值,并检测其浓度及纯度后,进行16S rDNA扩增,产物利用NEP025-1切胶回收,由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司测序。16S rDNA扩增引物为:27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';1492R:5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3'。

1.3 数据处理

使用Excel 2016及IBM SPSS Statistics 24进行数据统计与方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株SF18-3的分离与筛选

从动物粪肥混合物中分离获得有益微生物21株:细菌13株、真菌5株、放线菌3株。图1为对BWB3有抑制作用的4株菌株,均为细菌。其中SF18-3抑菌效果最好,抑菌圈边缘清晰,直径为2.95 cm。

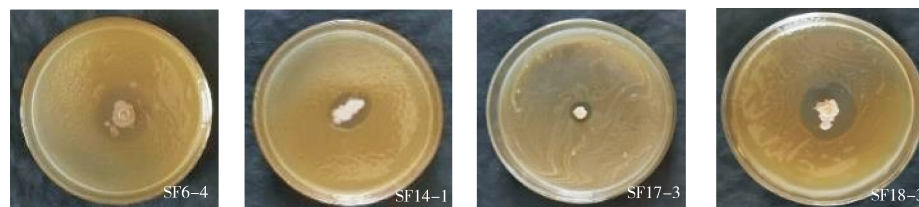


图1 生防菌株筛选

Figure 1 Screening for biocontrol strain

2.2 发酵条件优化

由图2a可知,菌株SF18-3发酵0~84 h时抑菌圈直径不断增大;84 h抑菌效果最好,抑菌圈直径为2.77 cm;84 h之后抑菌效果缓慢下降。由图2b可知,温度为10~30℃时SF18-3抑菌效果不断上升,30℃抑菌效果最好,抑菌圈直径为2.74 cm;温度高于30℃抑菌效果开始下降。由图2c可知,转速100 r·min⁻¹~140 r·min⁻¹时SF18-3抑菌效果随转速的升高而增加,140 r·min⁻¹抑菌圈直径最大,为2.92 cm;转速140~160 r·min⁻¹抑菌效果趋于稳定,大于160 r·min⁻¹抑菌效果下降。由图2d可知,初始pH值为2.0~7.0时抑菌效果逐渐升高,pH值7.0时抑菌效果最好,抑菌圈直径2.73 cm;pH值大于7后抑菌效果逐渐降低

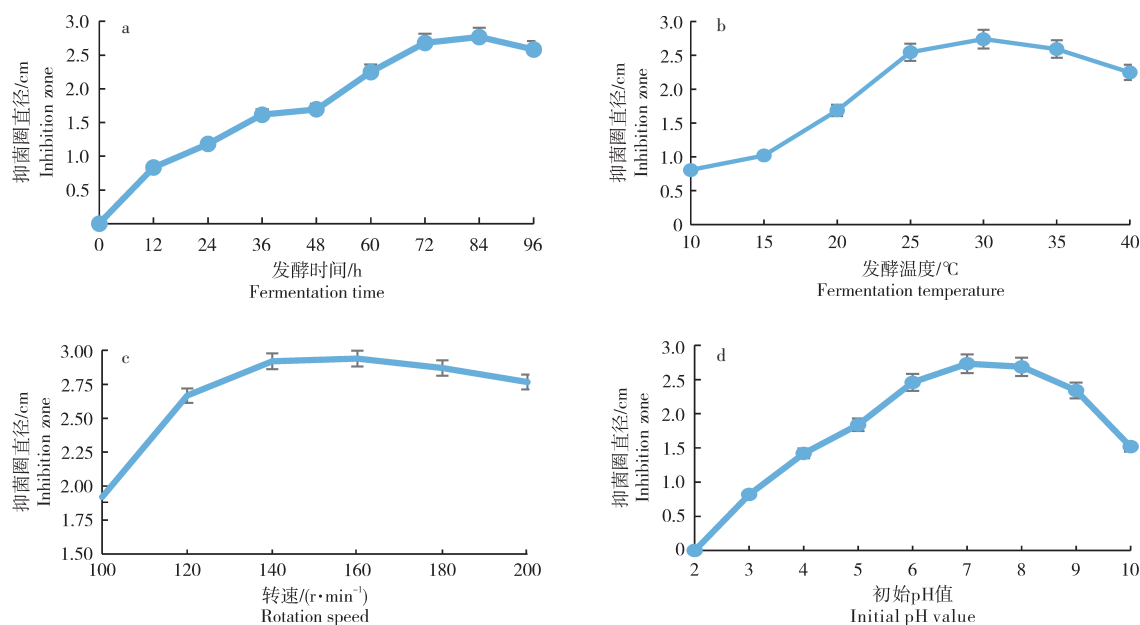


图2 生防菌株SF18-3发酵条件优化

Figure 2 Biocontrol strain SF18-3 fermentation conditions optimisation

2.3 SF18-3胞外酶活性

将1.2.7.1制备的SF18-3菌悬液以牛肉膏蛋白胨液体培养基为基础培养基(初始pH值7.0)经恒温30℃摇床140 r·min⁻¹培养84 h后,用双抗体夹心法测定发酵液中6种胞外酶活性。试验结果表明,木聚糖酶活性最高,为564.22 U·L⁻¹,其次为蛋白酶活性536.13 U·L⁻¹,其余依次为乙酰辅酶A 135.02 U·L⁻¹与几丁质酶131.77 U·L⁻¹。纤维素酶与溶菌酶活性最低,分别为64.18 U·L⁻¹与55.79 U·L⁻¹(图3)。

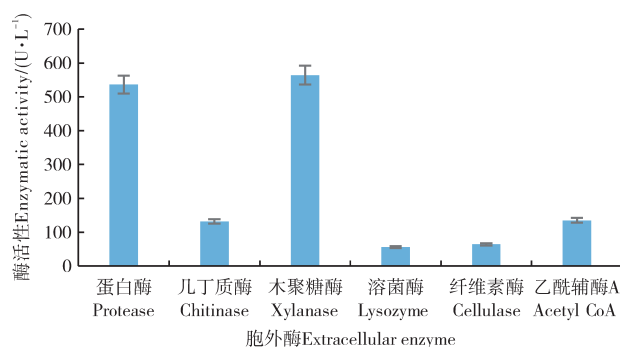


图3 SF18-3发酵液胞外酶活性

Figure 3 SF18-3 extracellular enzyme activities

2.4 SF18-3抑菌效果测定

2.4.1 室内抑菌活性 由图4和表1可知,最佳发酵条件下获得的SF18-3的1×菌液对致病菌BWB3的抑制效果最好,平均抑菌圈直径为3.40 cm,比优化前增加0.45 cm;10×、50×、100×、500×菌液抑菌圈直径分别为2.82,2.25,1.68,1.46 cm,而SF18-3的1 000×菌液对BWB3无抑制作用。0.05水平下SF18-3菌液6个剂量处理之间均呈现显著差异。

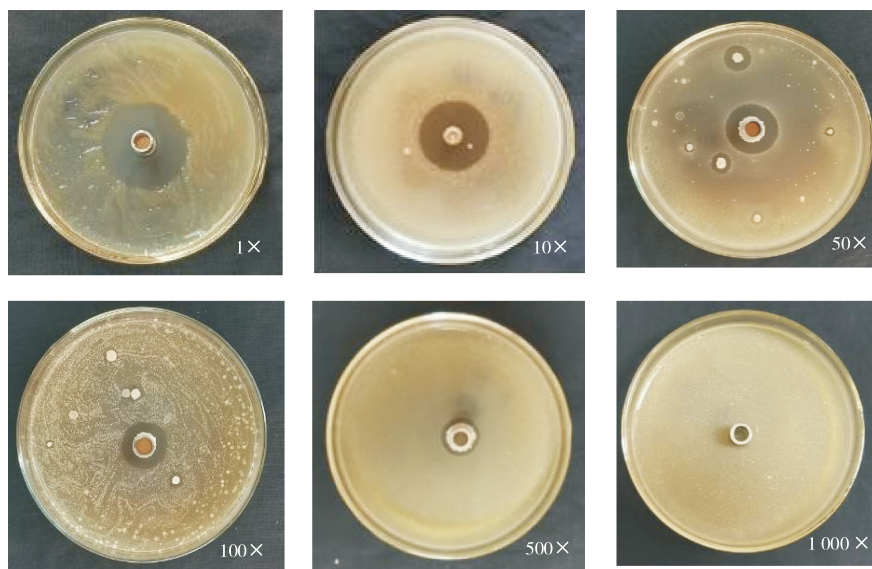


图4 不同稀释倍数的SF18-3菌液室内抑菌试验

Figure 4 Indoor antibacterial activity experiment with different dilution ratio of SF18-3 bacterial solution

表1 SF18-3室内抑菌活性测定

Table 1 Determination of indoor antibacterial activity of SF18-3

处理 Treatments	菌液稀释倍数 Dilution ratio of bacterial solution	抑菌圈直径/cm Inhibition zone
1	1	3.40±0.05 ^a
2	10	2.82±0.07 ^b
3	50	2.25±0.04 ^c
4	100	1.68±0.10 ^d
5	500	1.46±0.04 ^e
6	1 000	0.00±0.00 ^f

注:不同小写字母为0.05水平上差异显著性。下同。

Note: Different lowercase letters mean significant differences at 0.05. The same below.

2.4.2 田间盆栽防治效果 辣椒叶片接种后第14天调查结果表明(图5、表2)。随着SF18-3菌液浓度的降低病斑面积逐渐扩大。菌株SF18-3的1×菌液防治效果可达70.17%,其余依次降低,分别为:10×菌液防效为67.31%、50×菌液防效为65.47%、100×菌液防效为53.79%、500×菌液防效为41.46%;对照生物农药0.3%四霉素水剂57.5 mL·(667 m²)⁻¹防效为71.38%,对照化学农药46%氢氧化铜水分散粒剂50 g·(667 m²)⁻¹防效为75.94%。在F=0.05水平,SF18-3的1×菌液处理与3%四霉素水剂57.5 mL·(667 m²)⁻¹及46%氢氧化铜水分散粒剂50 g·(667 m²)⁻¹处理对辣椒细菌性斑点病防治效果无显著差异;SF18-3的10×菌液处理及50×菌液处理与SF18-3的1×菌液处理及3%四霉素水剂57.5 mL·(667 m²)⁻¹处理防治效果无显著差异,但与46%氢氧化铜水分散粒剂50 g·(667 m²)⁻¹处理存在显著差异;SF18-3的100×菌液处理与500×菌液处理对病害防治效果明显降低,与其余5个试验处理间均存在显著差异。

2.5 菌株SF18-3的鉴定

2.5.1 形态学特征 菌株SF18-3于NA培养基上菌落呈乳白色、干燥、无光泽、不透明、有褶皱、边缘不整齐(图6);显微镜下菌体呈杆状,有芽孢、革兰氏染色呈阳性(图7)。

2.5.2 生理生化特征 菌株SF18-3生理生化试验测定结果见表3。甲基红、过氧化氢酶、氧化酶反应



图5 SF18-3菌液防治辣椒细菌性斑点病盆栽试验

Figure 5 Pot experiment on the controlled of bacterial spot disease of pepper by SF18-3 solution

表2 SF18-3菌液对辣椒细菌性斑点病盆栽防治效果评价

Table 2 The control efficiency of SF18-3 solution on bacterial spot disease of pepper

药剂 Bactericide	浓度 Concentration	病情指数 Disease index	防治效果/% Prevention and control efficiency
SF18-3 菌液 SF18-3 bacterial solution	1×	5.93±0.21	70.17±2.00 ^{ab}
	10×	6.53±0.97	67.31±3.40 ^b
	50×	6.85±0.16	65.47±2.76 ^b
	100×	9.17±0.69	53.79±5.03 ^c
	500×	11.67±1.82	41.46±7.84 ^d
0.3% 四环素水剂 0.3% tetracycline aqueous solution	57.5 mL·(667 m ²) ⁻¹	5.69±0.42	71.38±1.61 ^{ab}
46% 氢氧化铜水分散粒剂 46% copper hydroxid water dispersed granule	50 g·(667 m ²) ⁻¹	4.77±0.21	75.94±2.56 ^a
清水对照 Control	-	19.91±1.20	-



图6 SF18-3 菌落形态特征

Figure 6 SF18-3 colony morphology

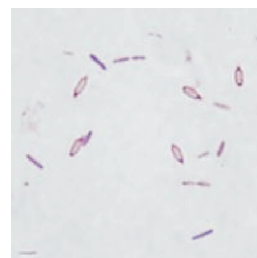


图7 SF18-3 显微形态(1 000×)

Figure 7 SF18-3 Microscopic morphology (1 000×)

与明胶液化试验为阳性, V-P反应、吲哚反应、硝酸盐还原与H₂S产生试验为阴性。

2.5.3 16S rDNA序列分析 菌株SF18-3基因组DNA经1.2%琼脂糖凝胶电泳, 得到2 000 bp的清晰均匀的条带; 16S rDNA扩增后经1.5%琼脂糖凝胶电泳并切胶回收得到1 426 bp的核苷酸序列。序列与NCBI已知序列比对并用BioEdit及MEGA 7.0进行聚类分析, 结果表明, SF18-3的16S rDNA序列与*Bacil-*

表3 菌株SF18-3生理生化特征
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of strain SF18-3

测定项目 Identification index	结果 Results		测定项目 Identification index	结果 Results	
	SF18-3	EM2		SF18-3	EM2
革兰氏染色 Gram staining	+	-	吡啉反应 Indole reaction	-	+
甲基红反应 Methyl red reaction	+	+	硝酸盐还原 Nitrate utilization	-	+
V-P反应 V-P reaction	-	-	H ₂ S产生 H ₂ S production	-	-
过氧化氢酶反应 Hydrogen peroxidase reaction	+	+	明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	-
氧化酶反应 Oxidase reaction	+	-			

注: +表示试验结果为阳性; -表示试验结果为阴性。

Note: + indicated that the experiment result was positive; - indicated that the experiment result was negative.

lus velezensis OK169608及*B. velezensis* OK147645相似率均为99.93%,结合形态学观察与生理生化试验,确定SF18-3为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) (图8)。

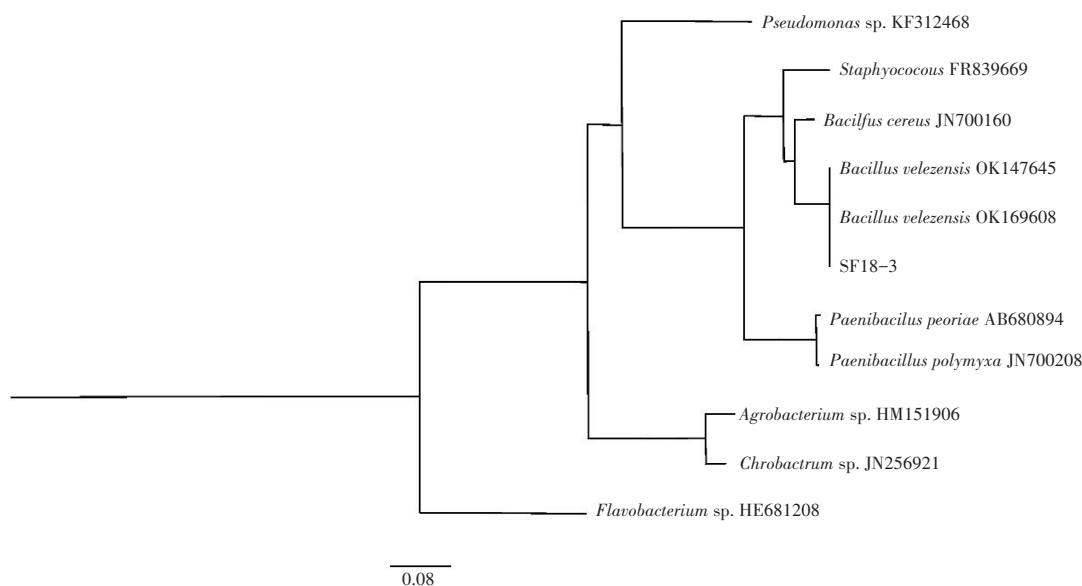


图8 菌株SF18-3 16S rDNA序列与NCBI已知序列聚类分析

Figure 8 Clustering analysis of strain SF18-3 16S rDNA sequence with known NCBI sequences

3 讨论与结论

贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)广泛分布于土壤、水体与植物组织中,有较好的土壤定殖与环境适应能力^[16]。该菌自发现以来在农业领域广泛应用^[23],特别是在植物病害防治中^[24-26],它可以通过促进植物生长^[27-31]、诱导植物系统产生抗性^[32-33]及分泌活性抑菌物质^[34-36]防治多种植物病害且效果显著。其中,产生抗菌蛋白与脂肽类抗生素等抗菌活性物质是其发挥生防作用的主要机制^[37]。研究发现,*B. velezensis* YB15代谢产物中的β-葡聚糖酶对杨树紫纹羽病(*Helicobasidium purpureum*)等多种植物真菌病害有抑制作用^[38]; *B. velezensis* ZF2代谢产物中的蛋白酶和纤维素酶可以显著抑制黄瓜棒孢叶斑病菌(*Corynespora cassiicola*)等菌丝的生长^[39]; *B. velezensis* CE100代谢产物中具有几丁质酶、蛋白酶和β-1,3-葡聚糖酶活性,可以降解核桃炭疽病(*Colletotrichum gloeosporioides*)细胞壁,抑制孢子萌发和菌丝生长^[40]。

贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) SF18-3是以辣椒细菌性斑点病为靶标从动物粪肥中分离筛选获得的一株优良生防细菌,其发酵液中代谢产物对辣椒细菌性斑点病防治效果明显,经优化后发酵液中含有较高的蛋白酶活性与木聚糖酶活性,且抑菌活性增加。该研究结果可为后续解析编码菌株SF18-3抑菌物质的基因(簇)及明析次生代谢产物中抑菌成分提供理论基础。此外,研究还发现SF18-3菌液对番茄细菌性软腐病菌(*Pectobacterium carotovorum*)与黄瓜细菌性角斑病菌(*Pseudomonas syringae*)均有较好的抑菌效果,这与许多研究发现贝莱斯芽孢杆菌具有广泛的抑菌谱一致^[39,41-44]。由此可见,贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) SF18-3在防治蔬菜病害,特别是细菌病害中具有较高的生防应用潜力和价值。

参考文献:

- [1] 陈新,刘清波,赵廷昌.辣椒细菌性疮痂病原菌分类、检测及综合防治研究进展[J].植物保护,2011,37(1):11-18.
- [2] BOUZAR H.Physiological,chemical,serological,and pathogenic analyses of a worldwide collection of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* strains[J].Phytopathology,1994,84(7):663.
- [3] JONES J B,LACY G H,BOUZAR H,et al.Reclassification of the xanthomonads associated with bacterial spot disease of tomato and pepper[J].Systematic and Applied Microbiology,2004,27(6):755-762.
- [4] ALI O,RAMSUBHAG A,JAYARAMAN J.Application of extracts from Caribbean seaweeds improves plant growth and yields and increases disease resistance in tomato and sweet pepper plants[J].Phytoparasitica,2023,51(4):727-745.
- [5] 杜志强,孙福在.辣椒、番茄细菌性斑点病国内外研究进展[J].植物检疫,1994,8(6):358-360.
- [6] 杨文才.番茄疮痂病抗性遗传研究和基因定位最新进展[J].园艺学报,2013,40(9):1731-1740.
- [7] 任建国,王俊丽,岳美云.21种杀菌剂对番茄疮痂病菌的毒力测定[J].中国蔬菜,2011(4):56-60.
- [8] CHOWDHURY S P,UHL J,GROSCH R,et al.Cyclic lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* colonizing the lettuce rhizosphere enhance plant defense responses toward the bottom rot pathogen *Rhizoctonia solani*[J].Molecular Plant-Microbe Interactions:MPMI,2015,28(9):984-995.
- [9] 王冲,李倩,肖红英,等.贝莱斯芽孢杆菌 Vel-HNGD-F2产抗菌物质发酵条件优化及抗菌特性研究[J].河南工业大学学报(自然科学版),2024,45(1):73-80.
- [10] CHIO C,SHRESTHA S,CARR G,et al.Optimization and purification of bioproducts from *Bacillus velezensis* PhCL fermentation and their potential on industrial application and bioremediation[J].The Science of the Total Environment,2023,903:166428.
- [11] 汤淑亚,李子桀,侯启华,等.转录因子 SIERF1a 调控蜡质芽孢杆菌 AR156 诱导番茄对青枯病系统抗性作用机制研究[J].南京农业大学学报,2022,45(6):1150-1161.
- [12] 王文丽,金涵,从炳成,等.复合微生物菌剂对番茄青枯病的生防效应[J].南京农业大学学报,2022,45(6):1174-1182.
- [13] 杨光伟,刘慧芹,孙丽丽,等.番茄疮痂病生物防治研究进展[J].中国蔬菜,2015(6):17-22.
- [14] 赵聪.内生解淀粉芽孢杆菌脂肽类物质的作用及 *fenA1* 基因功能研究[D].福州:福建农林大学,2014.
- [15] 张海燕,张小芳,刘雅婷,等.云南番茄细菌性疮痂病原菌鉴定及其生防研究[J].云南农业大学学报(自然科学),2016,31(2):218-225.
- [16] LIM S B Y,JUNQUEIRA A C M,UCHIDA A,et al.Genome sequence of *Bacillus velezensis* SGAir0473,isolated from tropical air collected in Singapore[J].Genome Announcements,2018,6(27):e00642-e00618.
- [17] 陈龙,吴兴利,闫晓刚,等.贝莱斯芽孢杆菌的分类、次级代谢产物及应用[J].家畜生态学报,2020,41(1):1-8.
- [18] 沈萍.微生物学实验[M].3版.北京:高等教育出版社,1999.
- [19] 方中达.植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998.
- [20] 蒲金基,曾会才.海南辣椒品种对疮痂病的抗性鉴定[J].中国种业,2003(10):49.
- [21] 杨子祥,苏银玲,麻继仙,等.4个番茄品种对细菌性斑点田间抗性评价及摘叶法防治技术初探[J].热带农业科学,2014,34(9):48-51.
- [22] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001.
- [23] HASHEM A,TABASSUM B,FATHI ABD ALLAH E.*Bacillus subtilis*:A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress[J].Saudi Journal of Biological Sciences,2019,26(6):1291-1297.

- [24] 张德锋,高艳侠,王亚军,等.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.
- [25] LIU G Q,KONG Y Y,FAN Y J,et al.Whole-genome sequencing of *Bacillus velezensis* LS69,a strain with a broad inhibitory spectrum against pathogenic bacteria[J].Journal of Biotechnology,2017,249:20-24.
- [26] SUN X L,XU Z H,XIE J Y,et al.*Bacillus velezensis* stimulates resident rhizosphere *Pseudomonas stutzeri* for plant health through metabolic interactions[J].The ISME Journal,2022,16:774-787.
- [27] 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,2021.
- [28] 迟惠荣.多花黄精叶枯病原菌鉴定及贝莱斯芽孢杆菌防病促生效果研究[D].杭州:浙江大学,2019.
- [29] 曹宇,陈鹏泽,曹秀兰,等.贝莱斯芽孢杆菌HNU24高效拮抗茄雷尔氏菌和促进植物生长活性的研究[J].海南师范大学学报(自然科学版),2022,35(1):50-56.
- [30] ABDEL-MOGHIES A H,EL-SEHRAWY M H,ZAKARIA A E,et al.*In vivo* application of potent probiotics for enhancing potato growth and controlling *Ralstonia solanacearum* and *Fusarium oxysporum* infections[J].Antonie van Leeuwenhoek,2024,117(1):33.
- [31] ABBAS M M,ISMAEL W H,MAHFOUZ A Y,et al.Efficacy of endophytic bacteria as promising inducers for enhancing the immune responses in tomato plants and managing *Rhizoctonia* root-rot disease[J].Scientific Reports, 2024,14:1331.
- [32] 刘霞,陆喆晓,马紫程,等.贝莱斯芽孢杆菌Bv-303对水稻白叶枯病菌的拮抗活性及其应用[J].生物工程学报, 2023,39(2):741-754.
- [33] 张琦,刘应敏,杨东燕,等.贝莱斯芽孢杆菌SM2对番茄灰霉病的生防效果[J].中国瓜菜,2024,37(2):66-73.
- [34] ZHOU Z C,TANG X Y,PENG L J,et al.Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* GUAL210,a potential biocontrol agent isolated from pepper rhizosphere[J].Plant Disease,2023,107(3):915-918.
- [35] 李素平,李微,韩冷,等.贝莱斯芽孢杆菌HY19挥发物对采后柑橘的防腐效果[J].园艺学报,2024,51(1):162-174.
- [36] 贺旭,韩剑,盛强,等.梨火疫病拮抗细菌FX1及其抑菌物质的防病作用[J].园艺学报,2023,50(5):1118-1129.
- [37] AIT KAKI A,KACEM CHAOUCHE N,DEHIMAT L,et al.Biocontrol and plant growth promotion characterization of *Bacillus* species isolated from *Calendula officinalis* rhizosphere[J].Indian Journal of Microbiology,2013,53(4):447-452.
- [38] 徐婷,朱天辉,李姝江,等.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.
- [39] 赵昱榕,李磊,谢学文,等.贝莱斯芽孢杆菌ZF2对多主棒孢病菌防治效果[J].中国生物防治学报,2019,35(2):217-225.
- [40] HONG S,KIM T Y,WON S J,et al.Control of fungal diseases and fruit yield improvement of strawberry using *Bacillus velezensis* CE 100[J].Microorganisms,2022,10(2):365.
- [41] MYO E M,LIU B H,MA J J,et al.Evaluation of *Bacillus velezensis* NKG-2 for bio-control activities against fungal diseases and potential plant growth promotion[J].Biological Control,2019,134:23-31.
- [42] WANG B J,PU Q,ZHANG Y H,et al.Secretion and volatile components contribute to the antagonism of *Bacillus velezensis* 1-10 against fungal pathogens[J].Biological Control,2023,187:105379.
- [43] 王飞,杨瑾,李绍建,等.丹参根腐病菌拮抗菌株贝莱斯芽孢杆菌Bv1-4的筛选及盆栽防效[J].中国生物防治学报,2023,39(6):1398-1407.
- [44] 王晓楠,冯晓晓,施斌,等.内生细菌ZN-S10的鉴定及其对番茄青枯病菌的抑菌作用[J].浙江农业学报,2023,35(11):2636-2644.

[责任编辑 李薇]