



研究报告

解淀粉芽孢杆菌生防菌 BS-3 全基因组测序及生物信息分析

戴利铭 李岚岚 刘一贤 施玉萍 蔡志英*

云南省热带作物科学研究所 云南 景洪 666100

摘要:【背景】解淀粉芽孢杆菌 BS-3 是从健康橡胶树树根中分离获得的一株对真菌具有较强抗菌活性的内生细菌,有作为生物农药的潜力。【目的】解析菌株 BS-3 的基因组序列信息,以深入研究该菌株防病促生机制及挖掘次级代谢产物基因资源。【方法】采用第二代 BGISEQ 与第三代 PacBio 平台相结合的测序技术,对生防菌 BS-3 进行全基因组测序,并对测序数据进行基因组组装、基因预测与功能注释、共线性分析及次级代谢产物合成基因簇预测等。【结果】BS-3 全基因组大小为 3 870 130 bp,平均 GC 含量为 46.88%,共编码 4 161 个基因;含有 92 个 tRNA 基因、28 个 rRNA、10 个 sRNA;含有 122 个串联重复序列、98 个小卫星 DNA、2 个微卫星。在 COG、GO、KEGG、NR 和 Swiss-Prot 数据库分别注释到基因 2 875、2 620、1 885、4 040 和 3 328 个。同时,预测到 BS-3 中有 10 个次级代谢产物合成基因簇,编码表面活性素、丰原素、多烯类、儿茶酚型嗜铁素等抑菌物质。基因组测序数据提交至 NCBI 获得 GenBank 登录号为 CP060384。【结论】为基因组层面上解析菌株 BS-3 具有良好防病效果的内在原因提供基础数据,为深入了解解淀粉芽孢杆菌次级代谢合成途径提供参考信息,对菌株 BS-3 后续相关研究具有重要意义。

关键词: 解淀粉芽孢杆菌, 基因组, 基因注释, 次级代谢

Whole genome sequencing and genomics analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* BS-3 with biocontrol activity

DAI Liming LI Lanlan LIU Yixian SHI Yuping CAI Zhiying*

Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100, China

Abstract: [Background] *Bacillus amyloliquefaciens* strain BS-3 is an endophytic bacterium from healthy rubber tree roots, and shows strong antimicrobial activity *in vitro*. The strain has the potential to be used as a biological fungicide. [Objective] To analyze the genome information of *B. amyloliquefaciens* BS-3 strain, to help further study the antimicrobial mechanism and secondary metabolites biosynthetic gene clusters of BS-3 strain. [Methods] The genome was sequenced using BGISEQ II platform and PacBio RS III platform, then analyzed using relevant software for genome assembly, gene prediction and functional annotation, prediction of secondary metabolite synthetic gene clusters. [Results] The genome is 3 870 130 bp with average GC content of 46.88%, which might code the potential 4 161 genes; and the genome of strain

Foundation items: Youth Project of Yunnan Institute of Tropical Crops (QNCZ2020-8); Sci-Tech Innovation System Construction for Tropical Crops Grant of Yunnan Province (RF561-7)

*Corresponding author: E-mail: caizhiyingyn@sina.com

Received: 04-09-2020; Accepted: 26-10-2020; Published online: 24-12-2020

基金项目: 云南省热带作物科学研究所青年项目(QNCZ2020-8); 云南省财政专项(RF561-7)

*通信作者: E-mail: caizhiyingyn@sina.com

收稿日期: 2020-09-04; 接受日期: 2020-10-26; 网络首发日期: 2020-12-24

BS-3 had 92 tRNA; 28 rRNA; 10 sRNA; 122 tandem repeats, 98 minisatellites DNA and 2 microsatellites DNA. There were up to 2 875, 2 620, 1 885, 4 040 and 3 328 potential genes annotated with COG, GO, KEGG, NR and Swiss-Prot databases respectively. At the same time, 10 secondary metabolite biosynthetic gene clusters were also predicted, which might code the surfactin, fengycin, bacillaene, bacillibactin and other antibacterial substances. The sequencing data from this article are available in the GenBank database (accession No. CP060384). **[Conclusion]** This study provides basic data to analyze the internal causes of the biocontrol activity effect of strains BS-3 at the genomic level, and provides reference information for further understanding the secondary metabolic synthesis pathway of *B. amyloliquefaciens*. It is of great significance to the further study BS-3 strains.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens*, genome, gene annotation, secondary metabolism

解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)是一种与枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)亲缘性很近的细菌,其菌体生长快、易培养、抗逆性强,能够产生脂肽类、肽类、细菌素和抗菌蛋白等多种抗菌物质^[1],这些抗菌物质种类繁多、稳定性高、抑菌谱广、抑菌活性强、不易产生抗药性,对人体和动植物的细胞安全且不会造成环境污染,是近年来植物病害生物防治、动物饲料加工、生鲜农产品防腐保鲜、医药研发、污水治理等领域研究的热点^[2-3]。

近年来,有研究者采用液相色谱-质谱法分析了解淀粉芽孢杆菌纯化后的发酵产物,发现含有表面活性素(Surfactin)同系物和小分子量的抑菌肽成分^[4]。对胡椒瘟病生防菌 *B. subtilis* VD18R19 全基因组测序及比较基因组学分析发现,该菌含有6个抑菌次级代谢产物合成基因簇,编码表面活性素、大侧柏素、儿茶酚型嗜铁素、杆菌溶素、聚酮化合物、羊毛硫类细菌素等抑菌物质^[5]。Arrebola等从 *B. amyloliquefaciens* 发酵产物中分离出具有抑制病原真菌作用的 IturinA 脂肽^[6]。Wong 等报道从解淀粉芽孢杆菌发酵产物中分离出可抑制肝癌、结肠癌细胞生长的蛋白质^[7]。An 等从解淀粉芽孢杆菌的发酵产物中分离得到对食物腐败菌有抑制作用的细菌素^[8]。从解淀粉芽孢杆菌中获得次级代谢产物合成基因簇和抑菌活性成分的研究备受学者青睐。

我们项目组在健康的橡胶树树根中筛选到一株内生解淀粉芽孢杆菌(BS-3),该菌对橡胶树褐根病菌(*Phellinus noxius*)、尖孢炭疽病菌

(*Colletotrichum acutatum*)、小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*)、橡胶疫霉(*Phytophthora heveae*)多种病原真菌具有很好的抑菌效果。传统的试验分析和鉴定方法很难全面地分析生防菌中的抗性物质且耗时耗力,难以充分挖掘其全部抗菌基因和揭示生防作用机理^[9]。为了深入研究 BS-3 菌株防病功能的内在原因,本研究采用第二代 BGISEQ 平台与第三代 PacBio 平台相结合的测序技术对解淀粉芽孢杆菌 BS-3 全基因组测序,在获得 BS-3 菌株全基因组序列的基础上,借助 GO、KEGG、COG、NR 和 Swiss-Prot 数据库注释 BS-3 菌株基因功能、预测菌株 BS-3 的次级代谢产物基因簇和比较基因组学分析,以期对挖掘次级代谢产物基因资源、高效开发利用 BS-3 和对其抑菌机理的研究提供生物信息学基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

菌株解淀粉芽孢杆菌 BS-3 分离自云南省景洪市橡胶树根,对多种病原菌有抑制作用,保存于云南省热带作物科学研究所植物保护与微生物利用研究中心。

植物病原真菌:橡胶树褐根病菌(*Phellinus noxius*)、尖孢炭疽病菌(*Colletotrichum acutatum*)、小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*)、橡胶疫霉(*Phytophthora heveae*)均保存于云南省热带作物科学研究所植物保护与微生物利用研究中心。

1.1.2 主要试剂和仪器

细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 布鲁克(北京)科技有限公司; DL2000 DNA Marker, 北京天根生化科技有限公司。PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; NanoDrop 2000, 赛默飞世尔科技公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0; PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0、葡萄糖 20.0。固体培养基均添加琼脂粉 15 g/L。 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.2 方法

1.2.1 植物病原真菌拮抗试验

采用平板对峙法, 在 PDA 平板中间分别放置橡胶树褐根病菌、尖孢炭疽病菌、小孢拟盘多毛孢、橡胶疫霉 4 种植物病原菌的菌块, 菌块四周划线接种 BS-3, 以只接种病原菌的处理为对照, 重复 3 次, 28 °C 恒温箱中培养 5 d, 测量抑菌圈直径(对照组菌落生长直径-处理组菌落生长直径), 观察抑菌情况并拍照。

1.2.2 菌株总 DNA 提取

菌株 BS-3 接种于 LB 培养基中, 在 37 °C、180 r/min 条件下培养 12 h, 将培养液 $10\,000 \times g$ 离心 5 min 收集菌体, 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组, 操作步骤参照试剂盒说明书。使用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 检测 DNA 样品的浓度、纯净度和降解程度。

1.2.3 全基因组测序

本次测序委托深圳华大基因股份有限公司完成。样本质检合格后, 使用 Covaris 仪超声波打断 DNA 样品, 进行文库构建。采用第二代 BGISEQ 平台与第三代 PacBio 平台相结合的测序技术进行测序。

1.2.4 基因组组分析

使用 pb-falcon V2.2.3 软件对三代 Reads 进行组装, 并对二代数据组装结果进行 2 次 Polish (pilon V1.23 软件)。编码基因预测使用 GeneMarkS 软件(V4.17) (<http://topaz.gatech.edu/GeneMark/>)^[10];

重复序列的预测使用 RepeatMasker (Version open-4.0.5) 软件和 TRF (Tandem Repeats Finder, V4.07b)^[11-12]; tRNA 预测通过 tRNAscan-SE 软件 (V1.3.1)^[13], rRNA 预测采用 RNAmmer 软件 (V1.2)^[14], sRNA 确定采用 cmsearch 程序 (V1.1rc4)^[15-16]。基因岛预测采用 IslandPath-DIOMB 软件(V0.2)^[17], 前噬菌体预测通过 PhiSpy 软件^[18] (V2.3), CRISPR 预测利用 CRISPRdigger^[19] (V1.0)。

1.2.5 基因功能分析

(1) 基因功能注释

使用 BLAST 软件与 Gene Ontology (GO)^[20]、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)^[21-22]、Cluster of Orthologous Groups of Proteins (COG)^[23]、Non-Redundant Protein Database (NR)^[24]、Carbohydrate-Active EnZymes Database (CAZy)^[25]、Type III Secretion System Effector Protein (T3SS)^[26]、Virulence Factor Database (VFDB)^[27]、Pathogen Host Interactions (PHI)^[28]、Swiss-Prot^[29] 数据库进行比对, 获得功能注释信息。

(2) BS-3 的进化和比较基因组学分析

根据全基因组注释信息, 选择 *gyrA* 基因序列及 NCBI 数据库比对分析结果, 利用 MEGA 7.0 软件的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树; 同时将菌株 BS-3 的基因组序列与参考菌 *B. amyloliquefaciens* subsp. FZB42 (CP000560) 的基因组序列基于 Mummer 进行比对分析。

(3) 拮抗物质分析

利用 antiSMASH 3.0 (<https://fungismash.secondarymetabolites.org>) 对菌株 BS-3 中次级代谢产物合成基因簇进行预测^[30]。结合基因注释结果和 NCBI BLAST 比对分析结果, 分析菌株 BS-3 次级代谢产物中的抑菌物质及编码基因簇。

2 结果与分析

2.1 病原真菌拮抗试验

拮抗试验发现, BS-3 对尖孢炭疽病菌 (*Colletotrichum acutatum*)、橡胶树褐根病菌

(*Phellinus noxius*)、小孢拟盘多毛孢(*Pestalotiopsis microspora*)、橡胶疫霉(*Phytophthora heveae*)的生长均具有良好抑制效果,如图1所示,抑菌圈直径分别为62.96、41.36、51.49、51.49 mm。

2.2 菌株 BS-3 全基因组概况

采用第二代 BGISEQ 平台与第三代 PacBio 平台相结合的测序技术,对细菌 BS-3 的全基因组进行测序。菌株 BS-3 全基因组大小为 3 870 130 bp,平均 GC 含量为 46.88%,共编码基因 4 161 个;所有编码基因的总长度为 3 463 893 bp,编码基因的平均长度为 832 bp,含有串联重复(Tandem Repeat, TR)序列 122 个,总长为 10 580 bp,大小为 6–282 bp,其中小卫星 (Minisatellite) DNA 98 个,总长为 7 148 bp,大小为 10–60 bp,微卫星 (Microsatellite) DNA 2 个,总长为 78 bp。含有 tRNA 基因 92 个,5S rRNA 10 个,16S rRNA 和 23S rRNA 各 9 个,sRNA 10 个。BS-3 基因组测序数据提交至 GenBank,登录号为 CP060384,BS-3 基因组图见图2。将 BS-3

的全基因组信息与其他已测序的近缘芽孢杆菌比较分析^[31],如表1所示,BS-3 与 FZB42 的大小较为接近,而 GC 含量的比例也较为接近,但 BS-3 的 Protein-Coding Sequences 基因数却比 FZB42 多 468 个。

2.3 基因组的功能注释

采用 GO、KEGG、COG、NR、CAZy、T3SS、VFDB、PHI、ARDB 和 Swiss-Prot 数据库将预测基因的蛋白序列与各功能数据库进行 Diamond 比对(E value $\leq 1e-5$),选取 Score 最高的比对结果(默认 Identity $\geq 40\%$, Coverage $\geq 40\%$)进行注释。最终注释统计数据见表2,发现菌株 BS-3 基因组共有 4 161 个基因得到成功比对注释。其中,在 NR、Swiss-Prot、COG、GO 数据库中得到功能注释的基因较多,分别为 4 040、3 328、2 875、2 620 个,占基因总数的 97.09%、79.98%、69.09%、62.97%;而在 CARD 数据库中得到注释的基因最少,仅有 22 个,占基因总数的 0.53%。

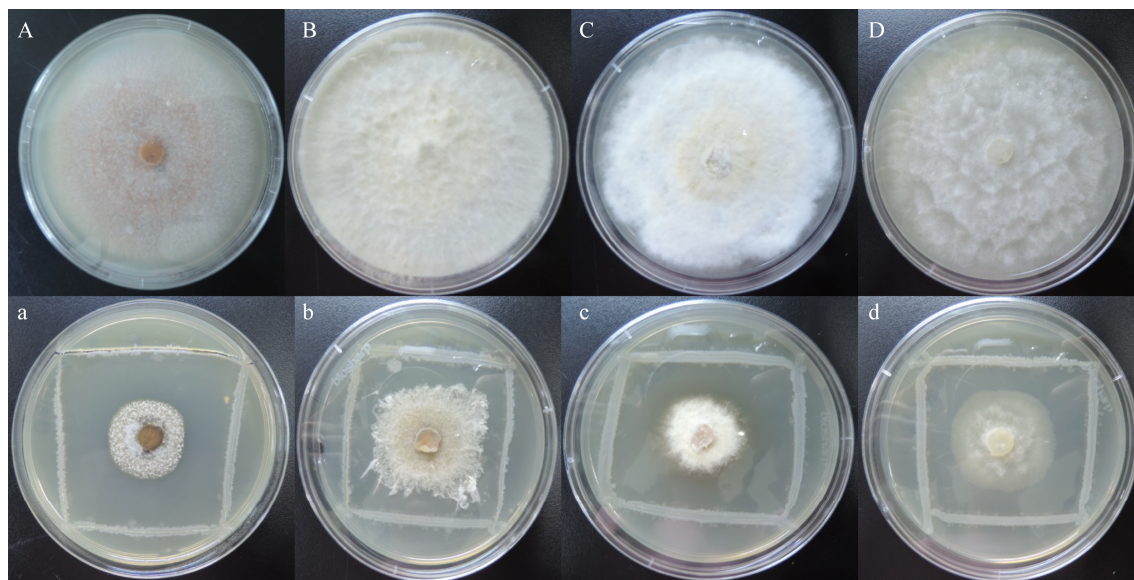


图1 菌株 BS-3 对病原菌的拮抗作用

Figure 1 The antagonism of strain BS-3 against pathogens

注: A: 尖孢炭疽病菌; B: 褐根病菌; C: 小孢拟盘多毛孢; D: 橡胶疫霉; a: 菌株 BS-3 对尖孢炭疽病菌的拮抗作用; b: 菌株 BS-3 对褐根病菌的拮抗作用; c: 菌株 BS-3 对小孢拟盘多毛孢的拮抗作用; d: 菌株 BS-3 对橡胶疫霉的拮抗作用

Note: A: *Colletotrichum acutatum*; B: *Phellinus noxius*; C: *Pestalotiopsis microspora*; D: *Phytophthora heveae*; a: The antagonism of strain BS-3 against *Colletotrichum acutatum*; b: The antagonism of strain BS-3 against *Phellinus noxius*; c: The antagonism of strain BS-3 against *Pestalotiopsis microspora*; d: The antagonism of strain BS-3 against *Phytophthora heveae*

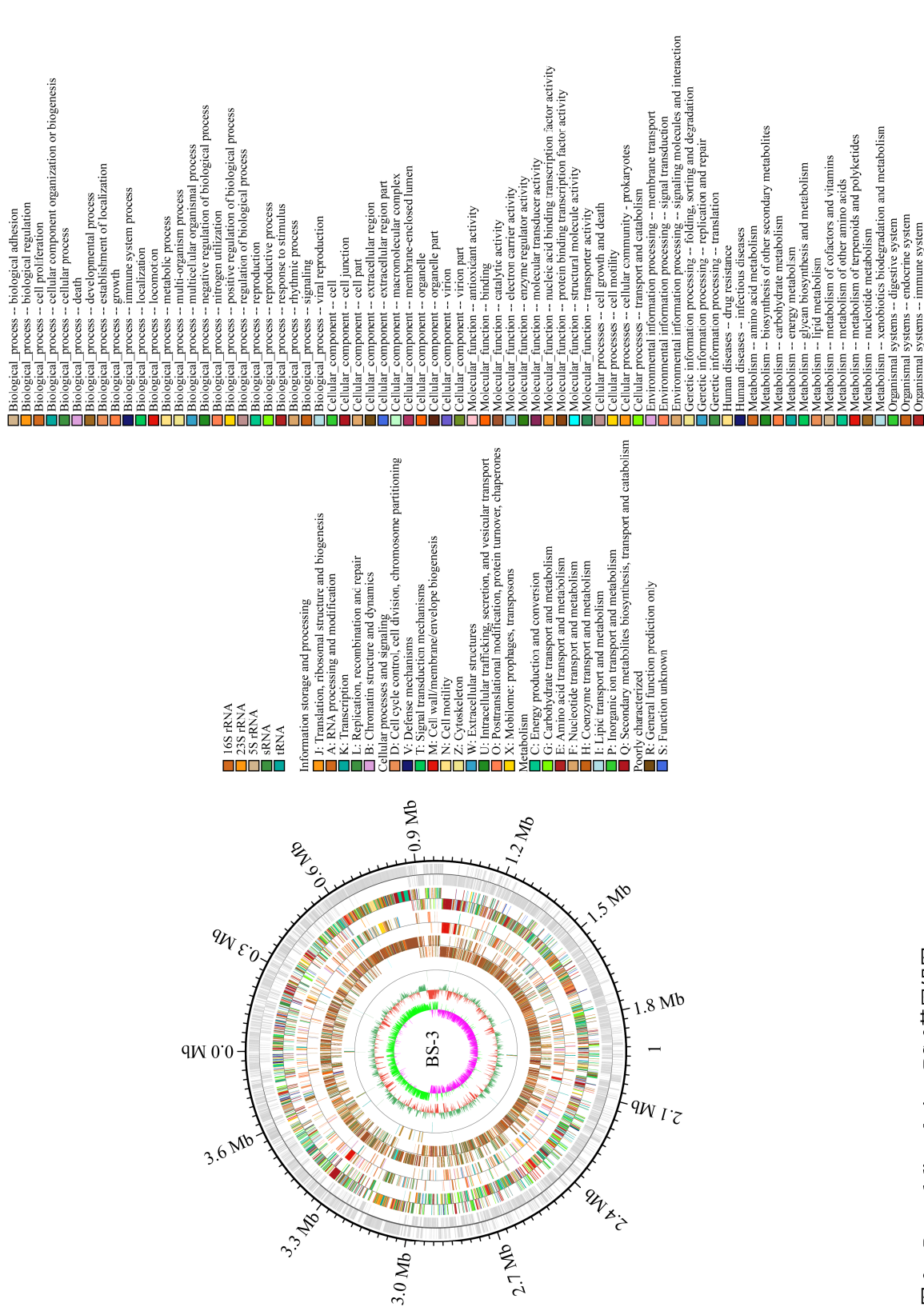


图 2 *B. amyloliquefaciens* BS-3 基因组图

Figure 2 Genomic map of the *B. amyloliquefaciens* BS-3

注：由外至内，第1圈表示编码基因的分布；第2圈表示COG注释基因的分布；第3圈表示KEGG注释基因的分布；第4圈表示KEGG注释基因的分布；第5圈表示ncRNA分布

Note: From the outer to inner circle, the first circle is the distribution of the coding genes; The second is the COG annotated genes; The third is the KEGG annotated genes; The fourth is the KEGG annotated genes; The fifth circle is the distribution of ncRNA

表 1 解淀粉芽孢杆菌 BS-3 全基因组特征及其与其他近缘芽孢杆菌比较

Table 1 Genomic features of the *B. amyloliquefaciens* BS-3 genome and comparison with other *Bacillus* relatives

Items	<i>B. amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>B. amyloliquefaciens</i> B9601-Y2	<i>B. amyloliquefaciens</i> BS-3	<i>B. subtilis</i> 168
Genome size (bp)	3 918 589	4 238 624	3 870 130	4 214 630
GC content (%)	46.4	45.8	46.9	43.5
Protein-coding sequences	3 693	4 159	4 161	4 106
Average CDS size (bp)	933	890	832	895
Number of tRNAs	89	91	92	86

2.3.1 GO 注释结果

将菌株 BS-3 氨基酸序列与 GO 数据库进行比对和统计分析,得到菌株功能基因的分布情况。共有 2 620 个基因在 GO 数据库中被注释到,GO 数据库按照细胞组分(Cellular Component)、生物学过程 (Biological Process)、分子功能 (Molecular Function) 3 个方面对蛋白进行注释(表 3),而生物学过程、细胞组分和分子功能分支各 25、11 和 10 个,共计 46 个分支。在细胞组分中,共 2 450 个基因得到注释,其中与细胞部分(Cell Part)、细胞 (Cell)、细胞器(Organelle)有关的基因表现出最高相关性,各有 914、914、198 个;生物学途径类共 5 967 个基因被注释,涉及最多的基因与细胞内过程 (Cellular Process)、代谢过程(Metabolic Process)有关,各有 1 464、1 466 个;分子功能分支共 3 271 个注释结果,其中涉及最多的基因与结合(Binding)、

催化活性(Catalytic Activity)、转运活性(Transporter Activity)有关,分别为 1 186、1 408、236 个。

2.3.2 COG 注释结果

对菌株 BS-3 基因组中具有生物学功能的蛋白编码基因进行 COG 注释,结果发现共有 2 875 个蛋白编码基因被注释到。如图 3 所示,基因功能注释结果共分为 25 类,分别有 1、1、167、58、306、89、248、184、131、221、283、123、202、63、117、173、95、301、210、171、31、87、2、31、2 个基因注释分类到 A-Z,其中氨基酸代谢及转运 (Amino Acid Transport and Metabolism)的注释结果最为丰富,共 306 个,占注释基因总数的 10.64%;其次为常规功能预测(General Function Prediction Only)基因,共 301 个基因,占注释基因总数的 10.47%,而转录(283 个基因,9.84%)、碳水化合物转运和代谢(248 个基因,9.88%)、翻译、核糖体结构和生物合成(221 个基因,7.69%)的基因也得到较多的注释,此外还有 210 个(7.3%)功能未知的基因,有待今后进一步研究。

2.3.3 KEGG 注释结果

将菌株 BS-3 与 KEGG 数据库进行比对分析,对应到 KEGG Pathway 的 1 855 个基因富集在 194 条代谢通路中,占菌株基因总数的 44.85%;基因数大于等于 20 的代谢通路有 24 个(表 4)。KEGG 富集分析显示,ABC 转运蛋白(ABC Transporters)、双组分调节系统(Two-Component System)、细菌的群体行为调控机制(Quorum Sensing)是最主要的 3 种代谢通路,分别有 120、107 和 70 个基因注释结果;此外,嘌呤代谢(Purine Metabolism)、核糖体 (Ribosome)、嘧啶代谢(Pyrimidine Metabolism)、丙

表 2 菌株 BS-3 基因功能注释数据库分布情况

Table 2 Database distribution of gene functional annotation from the strain BS-3

Type	Gene number
NR	4 040
Swiss-Prot	3 328
KEGG	1 885
COG	2 875
TCDB	459
GO	2 620
PHI	157
VFDB	62
ARDB	30
CARD	22
Secretory	80
T3SS	80
CAZY	137

表 3 菌株 BS-3 基因组 GO 功能分类

Table 3 Gene ontology classification of the genome of strain BS-3

Ontology	Class	Gene number
Biological process	Biological adhesion	16
	Biological regulation	516
	Cell proliferation	2
	Cellular component organization or biogenesis	143
	Cellular process	1 464
	Death	4
	Developmental process	68
	Establishment of localization	525
	Growth	4
	Immune system process	7
	Localization	553
	Locomotion	42
	Metabolic process	1 466
	Multi-organism process	49
	Multicellular organismal process	23
	Negative regulation of biological process	26
	Nitrogen utilization	1
	Positive regulation of biological process	15
	Regulation of biological process	488
	Reproduction	57
	Reproductive process	38
	Response to stimulus	275
	Rhythmic process	1
	Signaling	150
	Viral reproduction	34
Cellular component	Cell	914
	Cell junction	1
	Cell part	914
	Extracellular region	23
	Extracellular region part	23
	Macromolecular complex	179
	Membrane-enclosed lumen	35
	Organelle	198
	Organelle part	95
	Virion	34
	Virion part	34
Molecular function	Antioxidant activity	11
	Binding	1 186
	Catalytic activity	1 408
	Electron carrier activity	1
	Enzyme regulator activity	13
	Molecular transducer activity	90
	Nucleic acid binding transcription factor activity	203
	Protein binding transcription factor activity	62
	Structural molecule activity	61
	Transporter activity	236

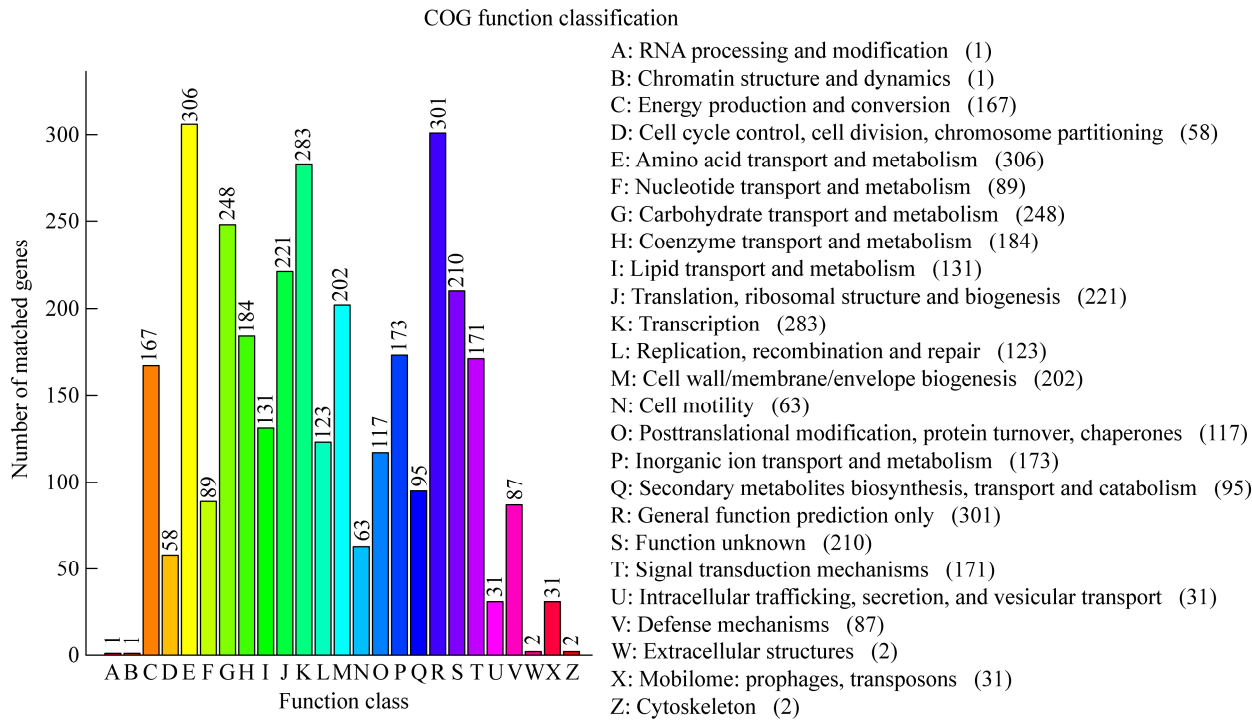


图 3 菌株 BS-3 基因组 COG 数据库比对分析结果
Figure 3 COG functional classification of the strain BS-3

表 4 菌株 BS-3 基因组 KEGG 数据库主要代谢通路分析
Table 4 Main metabolic pathways of the strain BS-3 from KEGG database

Map number	Map name	Gene number (≥20)
Map02010	ABC transporters	120
Map02020	Two-component system	107
Map02024	Quorum sensing	70
Map00230	Purine metabolism	59
Map03010	Ribosome	53
Map00240	Pyrimidine metabolism	44
Map00620	Pyruvate metabolism	33
Map02040	Flagellar assembly	33
Map00190	Oxidative phosphorylation	31
Map00250	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	30
Map00500	Starch and sucrose metabolism	30
Map00270	Cysteine and methionine metabolism	29
Map00520	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	29
Map00550	Peptidoglycan biosynthesis	28
Map00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	27
Map00010	Glycolysis / Gluconeogenesis	23
Map00260	Glycine, serine and threonine metabolism	23
Map02030	Bacterial chemotaxis	22
Map02060	Phosphotransferase system (PTS)	22
Map00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	21
Map00640	Propanoate metabolism	21
Map00564	Glycerophospholipid metabolism	20
Map00730	Thiamine metabolism	20
Map00860	Porphyrin and chlorophyll metabolism	20

酮酸代谢(Pyruvate Metabolism)、氧化磷酸化(Oxidative Phosphorylation)通路与菌株基因组相比具有较高的相关度。

2.3.4 CAZy 功能分析

将基因组序列与 CAZy 数据库进行比对,发现菌株 BS-3 的基因组中共有 140 个基因编码的蛋白质结构域属于 CAZy 家族, 包括 20 类糖苷水解酶(Glycoside Hydrolases, GHs)家族的蛋白 49 个、9 类糖苷转移酶家族的蛋白(Glycosyl Transferases, GTs) 36 个、6 类碳水化合物酯酶(Carbohydrate Esterases, CEs) 17 个、2 类多糖裂解酶(Polysaccharide Lyases, PLs) 3 个、辅助酶 4 个、3 类碳水化合物结合组件(Carbohydrate-Binding Modules, CBMs) 31 个。土壤中存在植物病残体, 这些病残体物质的主要组分是糖类和蛋白质类, 而菌株 BS-3 中含有编码内切葡聚糖酶(endo-1, 4-β-D-glucanase, EC3.2.1.4)、β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase, EC3.2.1.21)、α-淀粉酶(amyE, EC3.2.1.1)等酶的基因, 从基因角度分析进一步了解菌株 BS-3 的生防

作用机理。

2.3.5 NR 数据库和 Swiss-Prot 数据库的注释

将菌株 BS-3 的基因序列翻译为相应的氨基酸序列, 并与 NR 数据库进行比对, 基因组中有 4 040 个基因在 NR 数据库上得到注释, 得到 *B. amyloliquefaciens*、*B. subtilis*、*B. velezensis*、*B. nakamurai*、*B. paralicheniformis*、*Streptococcus pneumoniae* 和 *Paenibacillus* sp.这 7 类物种, 数量分别为 3 237、1 599、342、36、1、70 和 3 个。Swiss-Prot 是一个精选的蛋白质序列数据库, 包括蛋白质功能、结构、翻译后修饰、变异等描述, 菌株 BS-3 中有 3 328 个基因的蛋白序列功能在该数据库中得到有意义的注释。

2.3.6 毒力因子分析

将菌株 BS-3 的基因组与 VFDB 数据库进行比对分析, 在菌株 BS-3 的基因组发现 62 个毒力因子基因, 其中最大基因为 1 168 bp, 最小基因为 56 bp, 具体结果如表 5 所示。这说明菌株 BS-3 有可能释放毒力因子来抑制病原菌的生长。

表 5 菌株 BS-3 基因组 VFDB 数据库注释结果

Table 5 The annotation results of the strain BS-3 from VFDB database

Gene_id	Align length (bp)	Gene_id	Align length (bp)	Gene_id	Align length (bp)
BS3_GM000167	331	BS3_GM001595	303	BS3_GM002704	388
BS3_GM000364	156	BS3_GM001721	730	BS3_GM002705	148
BS3_GM000444	305	BS3_GM001965	233	BS3_GM002706	389
BS3_GM000527	688	BS3_GM002234	65	BS3_GM002746	251
BS3_GM000632	493	BS3_GM002235	1 154	BS3_GM002747	215
BS3_GM000664	147	BS3_GM002236	293	BS3_GM002785	569
BS3_GM000708	149	BS3_GM002237	529	BS3_GM002786	116
BS3_GM000730	571	BS3_GM002239	253	BS3_GM002787	105
BS3_GM000788	70	BS3_GM002390	253	BS3_GM002852	221
BS3_GM000792	420	BS3_GM002427	250	BS3_GM002854	490
BS3_GM000797	199	BS3_GM002509	384	BS3_GM002855	1 168
BS3_GM000804	217	BS3_GM002543	200	BS3_GM002919	396
BS3_GM000805	78	BS3_GM002552	553	BS3_GM003021	336
BS3_GM000807	346	BS3_GM002553	170	BS3_GM003162	330
BS3_GM000808	652	BS3_GM002575	190	BS3_GM003166	221
BS3_GM001060	301	BS3_GM002599	220	BS3_GM003174	231
BS3_GM001153	197	BS3_GM002649	252	BS3_GM003336	805
BS3_GM001300	119	BS3_GM002651	56	BS3_GM003832	548
BS3_GM001301	265	BS3_GM002675	184	BS3_GM004007	257
BS3_GM001552	274	BS3_GM002680	357	BS3_GM004103	284
BS3_GM001578	192	BS3_GM002681	284		

2.3.7 耐药基因分析

通过 ARDB 数据库注释, 找到菌株 BS-3 的基因组有耐药基因 30 个, 耐受药物林可霉素 (Lincomycin)、氯霉素 (Chloramphenicol)、磷霉素 (Fosfomycin)、青霉素 (Penicillin)、抗菌物 (na_Antimicrobials)、喹啉 (qa_Compound)、氨基糖苷 (Aminoglycoside)、万古霉素 (Vancomycin)、甲氧苄啶 (Trimethoprim)、四环素 (Tetracycline)、杆菌肽 (Bacitracin)、脱氧胆酸盐 (Deoxycholate)、大环内酯 (Macrolide)、链霉素 (Streptomycin)、磷胺霉素

(Fosmidomycin) 共 15 种, 具体结果如表 6 所示。

2.4 菌株 BS-3 的进化和比较基因组学分析

因芽孢杆菌属内的种间亲缘关系较近, 不能采用 16S rRNA 基因来分析芽孢杆菌属物种间的进化关系。近年来报道可以用 *gyrA* 基因区分枯草芽孢杆菌种间的差异, 将菌株 BS-3 与 9 株 *Bacillus* sp. 来源的 GyrA 蛋白序列构建进化树, 发现菌株 BS-3 与 FZB42、UCMB5113、Y2 来源的 GyrA 蛋白聚在一起 (图 4), 说明其亲缘关系非常相近, 同属于解淀粉芽孢杆菌。

表 6 菌株 BS-3 基因组 ARDB 数据库注释结果

Table 6 The annotation results of the strain BS-3 from ARDB database

Gene_id	Resistance type	Antibiotic resistance
BS3_GM000038	lmrb	Lincomycin
BS3_GM000196	blt	Chloramphenicol, doxorubicin, fluoroquinolone, puromycin
BS3_GM000246	fosb	Fosfomycin
BS3_GM000318	bl2a_1	Penicillin
BS3_GM000350	bl2a_iii	Penicillin
BS3_GM000461	ykke	na_antimicrobials
BS3_GM000462	ykkd	na_antimicrobials
BS3_GM000899	qac	qa_compound
BS3_GM000900	emre	Aminoglycoside
BS3_GM001037	vanrc	Vancomycin
BS3_GM001235	dfra20	Trimethoprim
BS3_GM001373	vanrg	Vancomycin
BS3_GM001660	tetl	Tetracycline
BS3_GM001965	vanrg	Vancomycin
BS3_GM002153	baca	Bacitracin
BS3_GM002189	mdtg	Deoxycholate, fosfomycin
BS3_GM002337	blt	Chloramphenicol, doxorubicin, fluoroquinolone, puromycin
BS3_GM002486	bcra	Bacitracin
BS3_GM002599	vanrg	Vancomycin
BS3_GM002884	bcra	Bacitracin
BS3_GM003174	vanra	Vancomycin, teicoplanin
BS3_GM003488	mphb	Macrolide
BS3_GM003507	lmrb	Lincomycin
BS3_GM003543	mdr	—
BS3_GM003613	vanrg	Vancomycin
BS3_GM003625	lmrb	Lincomycin
BS3_GM003690	qac	qa_compound
BS3_GM003809	ykke	na_antimicrobials
BS3_GM003986	ant6ia	Streptomycin
BS3_GM004012	rosa	Fosmidomycin

注: —: 无

Note: —: None

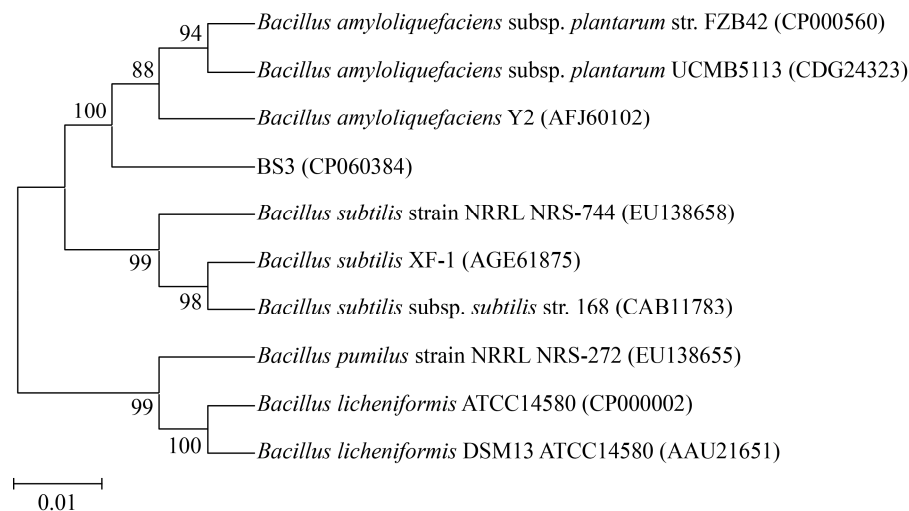


图4 基于 BS-3 及近缘种 GyrA 蛋白氨基酸序列构建进化树

Figure 4 Phylogenetic tree reconstructed based on GyrA protein sequence to analyse the relationship between BS-3 and its related bacterial species

注: 括号中的序号为相关菌株 GenBank 的登录号; 分支点上的数字表示 Bootstrap 支持率; 标尺表示 1% 的序列进化差异

Note: The numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank; The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap; The scale presents 1% sequence variance

将 BS-3 与 *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* str. FZB42 的全基因组进行共线性分析, 观察两者基因组之间序列的插入、缺失等信息(图 5)。从图 5 中可以看出, 2 株基因组高度相似, 但也存在翻转、易位等基因组重排。

2.5 拮抗物质

2.5.1 次级代谢产物合成基因簇分析

次级代谢产物是微生物在一定的生长时期, 以初级代谢产物为前体合成的一系列大分子生长非必需物质, 用 anti-SMASH 对菌株 BS-3 基因组进行次级代谢产物分析, 预测得到 10 个次级代谢产物基因簇(表 7), 并从中发现 4 类具有抗菌活性的物质: 多烯类(Bacillaene)、丰原素(Fengycin)、儿茶酚型嗜铁素(Bacillibactin)和表面活性肽(Surfactin)。其中, Cluster 3 与 BGC0001089 c1 来源的 Bacillaene 合成基因簇相似性为 100%; Cluster 4 与 BGC0001095 c1 来源的 Fengycin 合成基因簇相似性为 93%; Cluster 7 与 BGC0000309 c1 来源的 Bacillibactin 合成基因簇相似性为 100%; Cluster 10 与 BGC0000433 c1 来源的 Surfactin 合成基因簇

相似性为 86%; Cluster 8 与 BGC0001184 c1 来源的杆菌溶素(Bacilysin)合成基因簇相似性为 100%。比对发现菌株 BS-3 基因组中还存在 4 种功能未知的基因簇(Cluster 2、5、6、10), 其中 Lantipeptide 1 种、T3PKS (Type III PKS)类 1 种、萜类(Terpene) 2 种, 这表明菌株 BS-3 中可能存在合成新抑菌物质的基因簇, 具有较大的农业和药业应用潜力。

从 2.4 中选择 3 株参与 gryA 分析的芽孢杆菌近缘种, 对基因组中已知功能的基因簇进行统计, 统计结果如表 8 所示, 除丁酰菌素(Butirosin)外, 其他近缘菌种基因组中均有 BS-3 中含有的化合物, 而 Butirosin 与菌株 BGC0000693 c1 来源的基因簇相似性仅为 7%, 说明该基因簇可能合成新的抑菌物质, 有待今后进一步研究。

2.5.2 其他抑菌物质

据报道芽孢杆菌中的碱性丝氨酸蛋白(Alkaline Serine Protease)能够有效地杀死线虫, 同时解淀粉芽孢杆菌 FZB42 和解淀粉芽孢杆菌 Y2 具有减少植物根部的根结线虫的能力, 基因分析菌株 BS-3 中的碱性丝氨酸蛋白酶(BS3_GM000172)

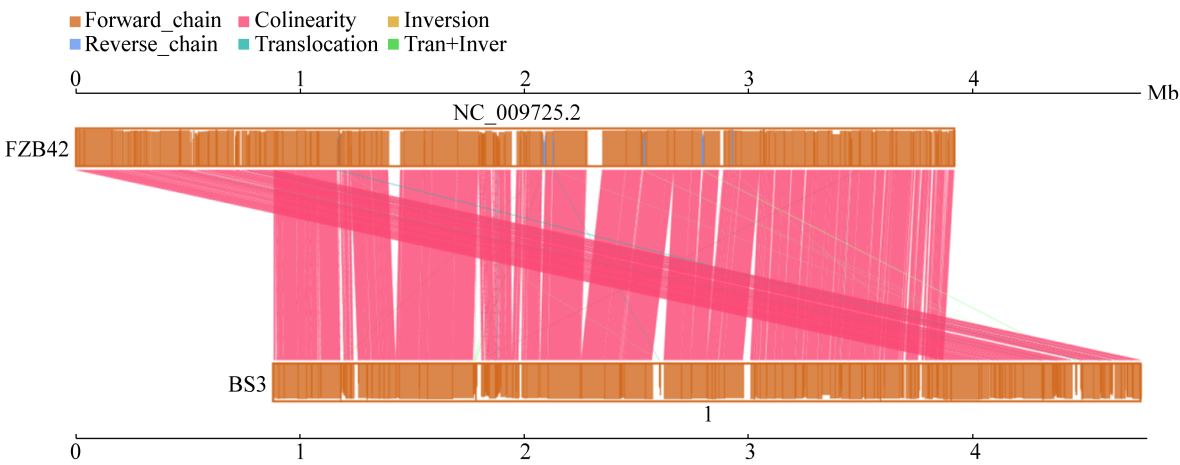


图 5 *B. amyloliquefaciens* BS-3 与 FZB42 的共线性分析
Figure 5 Synteny analysis of *B. amyloliquefaciens* BS-3 and FZB42

表 7 菌株 BS-3 次级代谢产物合成基因簇

Table 7 Gene clusters of secondary metabolite of *B. amyloliquefaciens* BS-3

Cluster ID	Nucleotide length (bp)	Gene number	Cluster type	Ratio of genes show similarity (%)	Most similar known cluster
Cluster1	41 245	48	Otherks	BGC0000693 c1(7%)	Butirosin
Cluster2	20 744	27	Terpene	—	—
Cluster3	102 705	52	Transatpks-NRPS	BGC0001089 c1(100%)	Bacillaene
Cluster4	110 379	76	Transatpks-NRPS	BGC0001095 c1(93%)	Fengycin
Cluster5	21 884	24	Terpene	—	—
Cluster6	41 107	55	T3PKS	—	—
Cluster7	66 776	70	Bacteriocin-NRPS	BGC0000309 c1(100%)	Bacillibactin
Cluster8	41 419	47	Other	BGC0001184 c1(100%)	Bacilysin
Cluster9	65 411	49	NRPS	BGC0000433 c1(86%)	Surfactin
Cluster10	22 598	20	Lantipeptide	—	—

注：—：无

Note: —: None

表 8 次级代谢产物基因簇对比表

Table 8 The comparison of secondary metabolite gene clusters

Compound	Enzyme	Y2	BS-3	FZB42	<i>B. subtilis</i> 168
Surfactin	NRPS	1	1	1	1
BacillomycinD	NRPS/PKS	1	—	1	—
Fengycin	NRPS	1	1	1	1
Putative peptide	NRPS	—	—	1	—
Bacillibactin	NRPS	1	1	1	1
Bacilysin/anticapsin	NRPS	1	1	1	1
Macrolactin	PKS	1	—	1	—
Bacillaene	NRPS/PKS	1	1	1	1
Difficidin	PKS	1	—	1	—
Amylocyclicin	RPS	1	—	1	—
Mersacidin	RPS	1	—	1	—
Butirosin	Otherks	—	1	—	—

注：—：无

Note: —: None

与解淀粉芽孢杆菌 FZB42 在氨基酸水平上相似性很高，这说明菌株 BS-3 可能有具有减少根部线虫的能力。

3 讨论

随着农业的快速发展，农药用量不断增加，使用化学农药所带来的高残留、高污染及对人畜的危害等问题逐渐突显。兼具安全、绿色、高效特性的绿色防控技术成为当下研究热点，其中应用生物拮抗菌来防治各种病害被证实为一种安全有效的新方法。芽孢杆菌在生物防治领域对农作物病害有很好的防治效果，同时其在促进植物生长^[32]、降解除草剂、治理水污染等方面也具有较好的作用，因

而备受科研工作者关注^[33]。

本团队从橡胶根部分离到了一株内生细菌 BS-3, 经过拮抗试验发现菌株 BS-3 对橡胶树褐根病菌、尖孢炭疽病菌、小孢拟盘多毛孢、橡胶疫霉病菌的生长均具有良好的抑制效果。传统的实验和鉴定方法很难全面地分析芽孢杆菌抗菌物质, 也不能充分挖掘其全部抗菌基因。为了深入研究该菌, 本研究利用全基因组测序和生物信息学分析技术得到了菌株 BS-3 的基因组序列, 确定菌株基因组大小为 3 870 130 bp, 共编码基因 4 161 个, 同时将基因组数据与 GO、COG、KEGG、NR 等数据库进行比对分析, 完成菌株 BS-3 基因组功能注释及数据统计工作, 并采用 *gryA* 基因确定了 BS-3 的分类地位, 并从分子生物学的角度探究其抑菌作用中可能发挥作用的基因簇。

16S rRNA 基因序列是种属鉴定和细菌系统发育的分类工具, 但解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌亲缘关系很近, 是形态特征相似的芽孢杆菌属, 采用 16S rRNA 基因序列无法准确区分^[34]。在基因组测序之后, 解旋酶 A 亚基编码基因以及组氨酸激酶基因分子标记基因可以进一步确定两者的分类^[35]。对菌株 BS-3 的全基因组信息进行分析, 并与其他已测序的近缘解淀粉芽孢杆菌比较, 发现菌株 BS-3 基因组大小与其他已测序的近缘解淀粉芽孢杆菌较为接近, GC 含量也较为相似; 菌株 BS-3 解旋酶 A 亚基编码基因的蛋白序列与相似物种构建进化树, 发现其与解淀粉芽孢杆菌 FZB42 和解淀粉芽孢杆菌 Y2 亲缘关系非常相近, 同属于解淀粉芽孢杆菌。

大多数病原真菌细胞壁的主要成分是几丁质, 几丁质酶能催化几丁质水解生成 N-乙酰氨基葡萄糖, 破坏真菌细胞壁的结构完整性, 从而抑制一些真菌孢子萌发和菌丝生长^[36]。在生物防治过程中, 除几丁质酶外, 还有葡聚糖酶、纤维素酶、蛋白酶等能够与几丁质酶协同作用, 使抑菌效果更加显

著^[37]。本研究从菌株 BS-3 基因组中共获得 CAZy 家族的编码基因 140 个, 包括糖苷水解酶家族的 49 个、糖苷转移酶家族的蛋白 36 个、碳水化合物酯酶 17 个、多糖裂解酶 3 个、辅助酶 4 个、碳水化合物结合组件 31 个。这些 CAZy 家族包含了 β -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶等细胞壁降解酶的相关基因, 推测菌株 BS-3 降解病原真菌的细胞壁为其抑菌机理之一。

采用 antiSMASH 工具预测菌株 BS-3 的次级代谢产物基因簇, 得到脂肽类和聚酮类抗生素基因簇 10 个, 包括 4 个未知功能的基因簇、5 个相似度较高的抗生素合成基因簇 (Bacillaene、Fengycin、Bacillibactin、Bacilysin、Surfactin) 和 1 个相似度仅为 7% 的抗生素基因簇 (Butirosin)。Bacillaene 是一种对细菌和真菌均有抑制作用的多聚烯类抗生素, 能抑制蛋白合成; Fengycin 对植物病原真菌、细菌和线虫都有抗性, 主要由肽链以内酯键与 β -羟基脂肪酸结合而成^[34]。Bacillibactin 能竞争性结合环境中对病原菌生长和发挥活性必需的可溶性铁离子, 是一种对铁离子具有高亲和性的螯合剂^[35]。Bacilysin 是目前已知芽孢杆菌合成结构最简单的肽类抗菌物质之一, 由 L-氨基酸抗萘膜菌素残基和 L-丙氨酸残基组成^[38]。Wu 等报道菌株 *B. velezensis* FZB42 产生的杆菌溶素能杀死铜绿微囊藻, 抑藻率达 98.78%^[39]。Surfactin 是一种广谱抗菌物质, 有很强的表面活性, 而且能抗病毒和支原体^[35]; López 等研究报道 Surfactin 与 Fengycin 同时作用于菜豆和番茄叶子部位, 可显著降低灰霉病的发病率^[40]。Butirosin 是一种氨基糖苷类抗生素, 对革兰氏阴性菌特别有效, 本研究中发现的 Butirosin 抗生素基因簇与 BGC0000693 c1 来源的最高相似度仅为 7%, 说明该基因簇可能合成新的抑菌物质, 有待今后进一步研究。此外, 菌株 BS-3 中存在碱性丝氨酸蛋白酶基因, 而有报道证明芽孢杆菌中的碱性丝氨酸蛋白能够有效杀死线虫^[41], 推测菌株 BS-3 分泌抑菌物质为其抑菌机理之一。

4 结论

本文采用第二代 Illumina 与第三代 PacBio 平台相结合的测序技术,对生防菌 BS-3 进行全基因组测序,得到了菌株 BS-3 的基因组序列信息。通过比较全基因组和其中的 GyrA 蛋白序列,确定芽孢杆菌 BS-3 的分类地位为解淀粉芽孢杆菌;发现 BS-3 基因组中存在 5 种重要的次级代谢产物基因簇和一种新的抗生素基因簇(Butirosin),同时从 BS-3 基因组中发现能够降解病原菌细胞壁的 β -1,3-葡聚糖酶、几丁质酶和抑菌蛋白(碱性丝氨酸蛋白)的相关基因,预测菌株 BS-3 能够通过产生多种拮抗活性化合物、细胞壁水解酶类以及抑菌蛋白实现防病效果,在农业方面具有很大的应用潜力。

REFERENCES

- [1] Yang SY, Wei J, Zheng XR. Optimization of fermentation medium for the production of antimicrobial substances by *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Food Science, 2015, 36(11): 150-156 (in Chinese)
杨胜远, 韦锦, 郑燮茹. 解淀粉芽孢杆菌抗菌物质发酵培养基的优化[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 150-156
- [2] Jin Q, Xiao M. Novel antimicrobial peptides: surfactin, iturin and fengycin[J]. Journal of Microbes and Infections, 2018, 13(1): 56-64 (in Chinese)
金清, 肖明. 新型抗菌肽: 表面活性素、伊枯草菌素和丰原素[J]. 微生物与感染, 2018, 13(1): 56-64
- [3] Zhou JW, McClean S, Thompson A, Zhang Y, Shaw C, Rao PF, Bjourson AJ. Purification and characterization of novel antimicrobial peptides from the skin secretion of *Hylarana guentheri*[J]. Peptides, 2006, 27(12): 3077-3084
- [4] Yao JM, Tian YP. Isolation and identification of antimicrobial peptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* and characterization of their antibacterial spectra[J]. Food Science, 2020, 41(16): 126-131 (in Chinese)
姚佳明, 田亚平. 解淀粉芽孢杆菌抑菌肽的分离鉴定及其抑菌谱表征[J]. 食品科学, 2020, 41(16): 126-131
- [5] Gao SF, Liu AQ, Sang LW, Sun SW, Gou YF, Wang Z, Meng QQ. Whole genome sequencing and comparative genomics analysis of *Bacillus subtilis* VD18R19 with biocontrol activity against pepper phytophthora rot disease[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(10): 2021-2027 (in Chinese)
高圣风, 刘爱勤, 桑利伟, 孙世伟, 苟亚峰, 王政, 孟倩倩. 胡椒瘟病生防菌 *Bacillus subtilis* VD18R19 全基因组测序及比较基因组学分析[J]. 热带作物学报, 2018, 39(10): 2021-2027
- [6] Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens[J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2): 386-395
- [7] Wong JH, Hao J, Cao Z, Qiao M, Xu H, Bai Y, Ng TB. An antifungal protein from *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 105(6): 1888-1898
- [8] An JY, Zhu WJ, Liu Y, Zhang XM, Sun LJ, Hong PZ, Wang YL, Xu CH, Xu DF, Liu HM. Purification and characterization of a novel bacteriocin CAMT2 produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from marine fish *Epinephelus areolatus*[J]. Food Control, 2015, 51: 278-282
- [9] Zhang BY, Zhu TH, Han S, Wang Y, Li SJ, Qiao TM. Whole-genome sequencing and analysis of *Streptomyces sampsonii* KJ40[J]. Microbiology China, 2018, 45(4): 805-818 (in Chinese)
张博阳, 朱天辉, 韩珊, 王莹, 李姝江, 譙天敏. 桑氏链霉菌 KJ40 全基因组测序及分析[J]. 微生物学通报, 2018, 45(4): 805-818
- [10] Besemer J, Lomsadze A, Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. implications for finding sequence motifs in regulatory regions[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(12): 2607-2618
- [11] Saha S, Bridges S, Magbanua ZV, Peterson DG. Empirical comparison of *ab initio* repeat finding programs[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(7): 2284-2294
- [12] Benson G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(2): 573-580
- [13] Lowe TM, Eddy SR. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955-964
- [14] Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Stærfeldt HH, Rognes T, Ussery DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(9): 3100-3108
- [15] Gardner PP, Daub J, Tate JG, Nawrocki EP, Kolbe DL, Lindgreen S, Wilkinson AC, Finn RD, Griffiths-Jones S, Eddy SR, et al. Rfam: updates to the RNA families database[J]. Nucleic Acids Research, 2009, 37(Database issue): D136-D140
- [16] Nawrocki EP, Kolbe DL, Eddy SR. Infernal 1.0: inference of RNA alignments[J]. Bioinformatics, 2009, 25(10): 1335-1337

- 1335-1337
- [17] Hsiao W, Wan I, Jones SJ, Brinkman FSL. IslandPath: aiding detection of genomic islands in prokaryotes[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19(3): 418-420
- [18] Akhter S, Aziz RK, Edwards RA. PhiSpy: a novel algorithm for finding prophages in bacterial genomes that combines similarity- and composition-based strategies[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(16): e126
- [19] Ge RQ, Mai GQ, Wang P, Zhou ML, Luo YX, Cai YP, Zhou FF. CRISPRdigger: detecting CRISPRs with better direct repeat annotations[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 1-10
- [20] Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology[J]. *Nature Genetics*, 2000, 25(1): 25-29
- [21] Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(Database issue): D277-D280
- [22] Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG[J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(Database issue): D354-D357
- [23] Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, et al. The COG database: an updated version includes eukaryotes[J]. *BMC Bioinformatics*, 2003, 4(1): 41
- [24] Li WZ, Jaroszewski L, Godzik A. Tolerating some redundancy significantly speeds up clustering of large protein databases[J]. *Bioinformatics*, 2002, 18(1): 77-82
- [25] Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The carbohydrate-active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, 37(Database issue): D233-D238
- [26] Eichinger V, Nussbaumer T, Platzer A, Jehl MA, Arnold R, Rattei T. Effective DB-updates and novel features for a better annotation of bacterial secreted proteins and Type III, IV, VI secretion systems[J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(Database issue): D669-D674
- [27] Chen LH, Xiong ZH, Sun LL, Yang J, Jin Q. VFDB 2012 update: toward the genetic diversity and molecular evolution of bacterial virulence factors[J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(Database issue): D641-D645
- [28] Urban M, Pant R, Raghunath A, Irvine AG, Pedro H, Hammond-Kosack KE. The Pathogen-Host Interactions database (PHI-base): additions and future developments[J]. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43(Database issue): D645-D655
- [29] Bairoch A, Apweiler R. The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 45-48
- [30] Medema MH, Blin K, Cimermanic P, De Jager, Zakrzewski P, Fischbach MA, Weber T, Takano E, Breitling R. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(Web Server issue): W339-W346
- [31] Yan YC. Genomic sequence analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* PEBA20 and characteristics of the *sfp* gene[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2016 (in Chinese)
闫永才. 解淀粉芽孢杆菌 PEBA20 基因组序列分析及 *sfp* 基因相关特性研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2016
- [32] Jiang W, Wu QL, Dou X, Guan ZB, Cai YJ, Liao XR. Characterization of a phosphorus-solubilizing alkaline phosphatase AP3 cloned from *Bacillus amyloliquefaciens* YP6[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(7): 1408-1415 (in Chinese)
江威, 吴秋兰, 窦欣, 管政兵, 蔡宇杰, 廖祥儒. 解淀粉芽孢杆菌 YP6 中碱性磷酸酯酶 AP3 的酶学性质及其溶磷作用[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(7): 1408-1415
- [33] Su ZC, Xiong RK, Luo XY. Function and product development of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Pesticide Science and Administration*, 2019, 40(6): 21-30 (in Chinese)
苏正川, 熊仁科, 罗小艳. 解淀粉芽孢杆菌的作用及其产品开发[J]. *农药科学与管理*, 2019, 40(6): 21-30
- [34] Jin ZX, Qin Y, Wang JL, Du NN, Li ZF, Chen WM. Classification and identification of *Bacillus* sp. SK007 with biocontrol activity[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2591-2600 (in Chinese)
靳泽星, 秦娅, 王洁丽, 杜妮妮, 李哲斐, 陈卫民. 芽孢杆菌 SK007 的分类鉴定及其拮抗植物病原菌的功能分析[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2591-2600
- [35] Qi JM, Sun SS, Zhang DX, Xu ZW, Xu YP. Identification and biocontrol activity analysis of *Bacillus* sp. BS-6 based on genome-wide data[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2019, 35(10): 111-118 (in Chinese)
戚家明, 孙杉杉, 张东旭, 徐志文, 徐延平. 芽孢杆菌 BS-6 基于全基因组数据的分类鉴定及拮抗能力分析[J]. *生物技术通报*, 2019, 35(10): 111-118
- [36] Zhang BY, Zhu TH, Han S, Wang Y, Li SJ, Qiao TM.

- Cloning, expression and antibacterial functions of ChiKJ40, a chitinase gene from *Streptomyces sampsonii*[J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 1016-1026 (in Chinese)
张博阳, 朱天辉, 韩珊, 王莹, 李姝江, 譙天敏. 桑氏链霉菌几丁质酶 ChiKJ40 基因的克隆表达及其抑菌作用[J]. 微生物学通报, 2018, 45(5): 1016-1026
- [37] Chen XY, Li JB, Lin Y, Li K, Yu L. Application of β -1,3-glucanase and chitinase to the preservation of tropical fruit[J]. Science and Technology of Food Industry, 2008, 29(5): 294-296 (in Chinese)
陈小云, 李坚斌, 林莹, 李凯, 于兰. β -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶在热带水果保鲜中的应用[J]. 食品工业科技, 2008, 29(5): 294-296
- [38] Wu LM, Li X, Wu HJ, Gao XW. Research advances on bacilysin from *Bacillus*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2018, 41(5): 778-783 (in Chinese)
吴黎明, 李曦, 伍辉军, 高学文. 芽孢杆菌抗菌二肽溶杆菌素的研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2018, 41(5): 778-783
- [39] Wu LM, Wu HJ, Chen LN, Xie SS, Zang HY, Borriess R, Gao XW. Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7512-7520
- [40] López G, Diaz-Cárdenas C, Shapiro N, Woyke T, Kyrpides NC, Alzate JD, González LN, Restrepo S, Baena S. Draft genome sequence of *Pseudomonas extremaustralis* strain USBA-GBX 515 isolated from Superparamo soil samples in Colombian Andes[J]. Standards in Genomic Sciences, 2017, 12: 78
- [41] Xu MZ. Comparative genomics analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* TJ and LJ1[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin Agricultural University, 2015 (in Chinese)
徐明珠. 解淀粉芽孢杆菌 TJ 与 LJ1 比较基因组学分析[D]. 天津: 天津农学院硕士学位论文, 2015

~~~~~  
(上接 p.1861)

## 征 稿 简 则

3.5 参考文献: 参考文献按文内引用的先后顺序排序编码, 未公开发表的资料请勿引用。我刊参考文献需要注明著者(文献作者不超过 10 人时全部列出, 多于 10 人时列出前 10 人, 后加“等”或“et al.”, 作者姓前名后, 名字之间用逗号隔开)、文献名、刊名、年卷期及页码。国外期刊名必须写完整, 不用缩写, 不用斜体。参考文献数量不限。

参考文献格式举例:

- [1] Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model[J]. Cell, 1999, 96(1): 47-56
- [2] Cheng XY, Liu WW, Xu Y, Zhou NY. Screening and characterization of culturable hydrocarbon-degrading strains from the South and East China Seas[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 975-985 (in Chinese)  
程晓宇, 刘伟伟, 许楹, 周宁一. 中国东海和南海海域可培养烃类降解细菌的筛选及功能[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 975-985
- [3] Shen T, Wang JY. Biochemistry[M]. Beijing: Higher Education Press, 1990: 87 (in Chinese)  
沈同, 王镜岩. 生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 87
- [4] Liu X. Diversity and temporal-spatial variability of sediment bacterial communities in Jiaozhou Bay[D]. Qingdao: Doctoral Dissertation of Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2010 (in Chinese)  
刘欣. 胶州湾沉积物细菌多样性及菌群时空分布规律[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所博士学位论文, 2010

(下转 p.2142)