

研究报告

菌株 YN145 对稻瘟病菌黑色素合成的影响及全基因组分析

郑昕威^{1,2}, 任佐华^{1,2}, 朱华琚^{1,2}, 周瑚^{1,2,3}, 刘二明^{*1,2}

1 湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128

2 植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128

3 湖南省岳阳市检验检测中心, 湖南 岳阳 414000

郑昕威, 任佐华, 朱华琚, 周瑚, 刘二明. 菌株 YN145 对稻瘟病菌黑色素合成的影响及全基因组分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(2): 600-614.

ZHENG Xinwei, REN Zuohua, ZHU Huajun, ZHOU Hu, LIU Erming. *Bacillus subtilis* YN145: effect on melanin synthesis of *Magnaporthe oryzae* and genome-wide analysis[J]. Microbiology China, 2023, 50(2): 600-614.

摘要:【背景】枯草芽孢杆菌 YN145 是一株从湖南省桃江县的健康稻株中分离的细菌, 前期研究中该菌对稻瘟病菌拮抗效果显著, 在生物防治方面有很大的应用潜力。【目的】深入研究该菌株的生理机制并挖掘次级代谢产物基因资源。【方法】在 4 株稻瘟病菌生防菌中, 选择其胞外抗菌物质抑制稻瘟病菌黑色素合成效果最佳的菌株 YN145, 采用紫外-可见分光光度计在波长 400 nm 处测定胞外和菌丝体内黑色素液的吸光度值, 采用菌丝生长抑制平板法和分生孢子萌发抑制法测定抑菌活性。采用 PacBio 第三代测序和 Illumina HiSeq 第二代测序相结合的技术对菌株 YN145 进行全基因组测序, 并对测序数据进行组装, 注释预测基因的功能, 分析次级代谢产物合成基因簇。【结果】菌株 YN145 的胞外抗菌物质能较好地抑制稻瘟病菌黑色素合成、分生孢子萌发和菌丝生长。菌株 YN145 全基因组大小为 4 167 871 bp, GC 含量为 43.86%, 编码序列(coding sequence, CDS)数量为 4 294 个; 共找到 85 个 tRNA、30 个 rRNA 和 92 个 sRNA。同时预测到 5 个已知的次级代谢产物合成基因簇, 分别编码合成 bacillaene、bacillibactin、fengycin、subtilosin-A 和 bacilysin, 并且找到了与抑制黑色素相关的查尔酮合酶基因。【结论】在基因组层面上分析菌株 YN145 具有良好抑菌效果的内在原因并提供大量基础数据, 为深入研究枯草芽孢杆菌次级代谢提供参考, 对菌株 YN145 后续相关研究具有重大意义。

关键词: 枯草芽孢杆菌; 稻瘟病菌; 全基因组测序; 黑色素; 生物防治

资助项目: 国家重点研发计划(2016YFD0300700); 中央财政专项(2014ZX0800102B); 公益性行业(农业)科研专项(201203014); 湖南省“十二五”重点学科(0904)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0300700), the Special Project of Central Finance (2014ZX0800102B), the Public Welfare Industry (Agriculture) Scientific Research Project (201203014), and the Hunan Province “Twelfth Five-Year” Key Disciplines (0904).

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

Received: 2022-05-11; Accepted: 2022-08-11; Published online: 2022-09-22

Bacillus subtilis YN145: effect on melanin synthesis of *Magnaporthe oryzae* and genome-wide analysis

ZHENG Xinwei^{1,2}, REN Zuohua^{1,2}, ZHU Huajun^{1,2}, ZHOU Hu^{1,2,3}, LIU Erming^{*1,2}

1 College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, Hunan, China

3 Yueyang Inspection and Testing Center, Yueyang 414000, Hunan, China

Abstract: [Background] *Bacillus subtilis* YN145 is a bacterial strain isolated from healthy rice plants in Taojiang County of Hunan Province. Studies have demonstrated that YN145 has significant antagonistic effect against *Magnaporthe oryzae* and great potential in biocontrol. **[Objective]** To further study the biocontrol mechanism and screen out the gene clusters for secondary metabolite synthesis of this strain. **[Methods]** The strain YN145, whose extracellular substances had the best inhibitory effect on the melanin synthesis of *M. oryzae*, was selected from four biocontrol bacterial strains. The absorbance values of the extracellular and intramycelial melanin liquids of *M. oryzae* were measured by a UV-visible spectrophotometer at a wavelength of 400 nm. The antifungal activity of YN145 was determined by mycelial growth inhibition assay and conidial germination inhibition assay. PacBio Sequel IIe and Illumina HiSeq platforms were employed to sequence the whole genome of YN145, and the sequencing data were assembled and annotated for prediction of gene functions and analysis of the gene clusters for secondary metabolite synthesis. **[Results]** The extracellular antimicrobial substances of YN145 effectively inhibited the melanin synthesis, conidial germination, and mycelial growth of *M. oryzae*. The full-length genome of YN145 was 4 167 871 bp, with the GC content of 43.86% and coding sequence (CDS) number of 4 294. A total of 85 tRNAs, 30 rRNAs, and 92 sRNAs were identified in the genome. Meanwhile, five known gene clusters for secondary metabolite synthesis were predicted, which mainly encoded bacillaene, bacillibactin, fengycin, subtilosin-A, and baclysin. **[Conclusion]** This study analyzed the intrinsic reasons for the good antimicrobial effect of YN145 at the genome level and obtained rich basic data. It provides a reference for further in-depth research on the secondary metabolite synthetic pathway of *B. subtilis* and has great significance for the subsequent research of YN145.

Keywords: *Bacillus subtilis*; *Magnaporthe oryzae*; whole genome sequencing; melanin; biocontrol

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种具有嗜温性、好氧产芽孢的革兰氏阳性杆状细菌, 内生孢子具有耐热、耐旱、抗紫外线等属性, 其生长所需营养少、能够快速繁殖、生长周期短, 而且该细菌在大自然中大量存在, 对人和生态

环境无危害。因此, 枯草芽孢杆菌在农作物有害生物防治、医药、畜牧业等领域被广泛应用^[1]。例如, 我国新登记的防治稻瘟病的芽孢杆菌制剂有 26 种, 其中枯草芽孢杆菌占 22 种^[2]; 隋晓日从枯草芽孢杆菌的抗菌物质分

离出的脂肽化合物能够有效地抑制腐败细菌在虾肉冷藏过程中的生长繁殖^[3]；曹少谦等发现枯草芽孢杆菌发酵提取物对大肠杆菌有较好的抑制效果，并分析其主要成分含有多烯类化合物和脂肽类化合物^[4]。

近些年来，全基因组测序和比较基因组学被越来越多地应用于生防菌领域的研究，从分子生物学层面探究其生防机制和抑菌功能的基因。Zeng 等在葡萄叶片中分离出一株对葡萄霜霉病菌(*Plasmopara viticola*)有很好抑菌效果的菌株 GLB197，经过 16S rRNA 基因和 *gyrB* 序列分析，鉴定该菌株为短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)，并发现 GLB197 基因组包含一个非核糖体肽合成酶的基因簇，用于抗生素的生产。该基因簇可能是有效抑制葡萄霜霉病的原因^[5]。庄新亚通过第二代高通量测序技术测序出芽梗霉菌 PA-2 全基因组，发现其非编码 RNA 中 tRNA 最多，说明产物活跃地参与菌体细胞内的调控，在其 4 个 T1PKS 基因簇中，可能的次级代谢产物有黑色素和 1,3,6,8-四羟基萘、镰刀菌素等^[6]。

黑色素(melanin)是一种化学结构复杂、非均质的大分子酚类或吡啶类聚合物，是自然界中最丰富的色素之一，广泛存在于动物、植物和微生物中。黑色素能提高生物对环境的抗逆性和竞争能力^[7]。在稻瘟病菌侵染过程中，黑色素起到了非常关键的作用，稻瘟病菌的分生孢子在入侵植株表皮时会形成附着胞，附着胞依赖其生成的黑色素产生高膨压^[8]，让附着胞有足够的机械力去穿透表皮。黑色素在多种病原真菌发育、抗逆和致病过程中均发挥重要作用，可作为防治病害新的靶标。

本课题组前期从感稻瘟病稻丛的健康稻株中筛选出一株枯草芽孢杆菌菌株 YN145，表现出良好的抑制稻瘟病菌生长能力，初步实验发

现菌株 YN145 具有良好稳定性，其产生的抗菌物质耐高温、耐酸碱能力较强，所以推测其抗菌物质成分为脂肽类抗生素或者细菌素^[9]。在 4 株稻瘟病生防菌中，本研究选择其胞外抗菌物质抑制稻瘟病菌黑色素合成效果最佳的菌株 YN145，并检测该菌株胞外抗菌物质抑制稻瘟病菌菌丝和分生孢子的活性，以及菌丝中黑色素的合成；再采用 PacBio RS II 单分子实时测序(single molecule real-time sequencing, SMRT)和 Illumina 测序平台二者相组合的方法对枯草芽孢杆菌 YN145 进行全基因组测序，对得到的大量原始数据进行质量剪切，去除带有测序引物、接头等人工序列的低质量读长，然后进行基因功能注释，分析次级代谢产物合成基因簇，以期探索菌株 YN145 抑制稻瘟病菌机制奠定基础，为稻瘟病的生物防治提供优良的生防菌株和基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

枯草芽孢杆菌 YN145 (ZL 201610643690.1)^[9]、枯草芽孢杆菌 JN005 (ZL 201510426569.9)^[10]和特基拉芽孢杆菌 JN-369 (ZL 201610641415.6)^[11]，以及枯草芽孢杆菌 K-268^[12]和指示菌稻瘟病菌均由湖南农业大学植物病原微生物及水稻病害实验室分离获得。

1.1.2 培养基

PD 培养基(g/L)：马铃薯 200.0，葡萄糖 20.0。PDA 培养基(g/L)：马铃薯 200.0，葡萄糖 20.0，琼脂 15.0–20.0，灭菌后倒平板。LB 培养基(g/L)：胰蛋白胨 10.0，酵母提取物 5.0，NaCl 10.0。以上培养基均在 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

1.1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖、琼脂、胰蛋白胨、酵母提取物、

氢氧化钾、盐酸、无水乙醇、乙酸乙酯, 国药集团化学试剂有限公司; Wizard[®]基因组 DNA 纯化试剂盒, Promega 公司。超微量紫外分光光度计, NanoDrop 公司; 洁净工作台, 苏州净化设备有限公司; GI 系列 DS 型号高压灭菌锅, 致微仪器有限公司; 光照培养箱, 上海新苗医疗器械制造有限公司; PacBio SMRT RS II 测序平台, Pacific Biosciences 公司; TBS-380 荧光仪, Turner BioSystems 公司。

1.2 方法

1.2.1 芽孢杆菌胞外抗菌物质对稻瘟病菌产黑色素的影响

参考朱华珺等^[10]的方法提取菌株 YN145、JN005、K-268 及 JN-369 的胞外抗菌物质备用。在装有 200 mL PD 培养基的三角瓶中接入 3 片稻瘟病菌的菌饼($\phi=6$ mm), 28 °C、180 r/min 摇床培养 2 d 后分别加入 200 μ L 菌株 YN145、JN005、K-268 和 JN-369 的胞外抗菌物质粗提液, 用无菌水和 PBS 溶液作为对照, 继续培养 6 d 后观察其颜色变化, 然后将菌丝用双层纱布过滤后, 使用紫外-可见分光光度计在波长 400 nm 处测定胞外黑色素液的吸光度值, 以无菌水调零。

1.2.2 菌株 YN145 胞外抗菌物质对稻瘟病菌丝黑色素形成的影响

在装有 200 mL PD 培养基中接入 3 枚稻瘟病菌的菌饼($\phi=6$ mm), 在 28 °C、180 r/min 摇床培养 3 d 后加入 200 μ L 菌株 YN145 胞外抗菌物质粗提液。在加入 YN145 抗菌物质处理 3、5、7、9、11 d 后, 分别过滤得到菌丝并参考曹志艳^[13]的方法提取并纯化菌丝中的黑色素, 再测定其 OD_{400} 的吸光值, 以无菌水作为对照。

稻瘟病菌黑色素标准曲线的制作: 配制浓度为 0、10、20、40、60、80 μ g/mL 的稻瘟病

菌黑色素溶液, 测定各浓度的 OD_{400} 吸光值。以黑色素溶液浓度为纵坐标、 OD_{400} 值为横坐标绘制标准曲线, 根据标准曲线计算抗菌物质不同处理时间菌丝的黑色素含量。

1.2.3 菌株 YN145 胞外抗菌物质浓度对稻瘟病菌拮抗活性的影响

将稀释不同倍数的抗菌物质(1.0、2.0、4.0、8.0、32.0、64.0 倍)分别加入 PDA 培养基平板中并混匀, 以不加抗菌物质的 PDA 平板作为对照, 然后在平板中央接种稻瘟病菌菌饼($\phi=6$ mm), 每个处理 3 次重复, 28 °C 倒置培养至对照组长满稻瘟病菌菌丝, 观察并测量菌落直径, 以确定其拮抗活性。抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径) \times 100%。

1.2.4 菌株 YN145 胞外抗菌物质浓度对稻瘟病菌分生孢子萌发率的影响

将稀释不同倍数的抗菌物质(1、5、10、50、100 倍)与浓度为 1×10^5 个/mL 的孢子液各 50 μ L 混合后并滴在灭菌的载玻片上, 以无菌水作对照, 然后将载玻片放入铺有湿润滤纸的培养皿中, 放至 28 °C 培养 12 h 后, 用倒置显微镜观察孢子萌发情况(当芽管长度超过孢子自身的二分之一则视为萌发)。每个处理设 3 个重复, 每种条件下总测定约 200 个孢子并计算孢子萌发抑制率, 孢子萌发抑制率=(对照孢子萌发率-处理孢子萌发率)/对照孢子萌发率 \times 100%。

1.2.5 菌株培养与细菌 DNA 的提取

将枯草芽孢杆菌 YN145 接种于 LB 培养基中, 28 °C、180 r/min 振荡培养 8 h。然后用 1.5 mL 离心管于 8 000 r/min 离心 10 min, 去掉上清, 收集 500 mg 以上菌体。将收集到的 YN145 菌体使用 CTAB 法提取 DNA, 所得 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop 2000 检测其完整性和纯度。

1.2.6 全基因组测序与组装

基因组测序使用 PacBio RS II 单分子实时测序(SMRT)和 Illumina 测序平台相组合的方法, Illumina 测序数据被用来评估基因组的杂合度、重复度, 评估基因组大小, 以及是否存在质粒及污染, 辅助后续组装策略的选择。由于三代测序具有较高的测序错误率, 所以用二代测序数据对三代数据进行校正, 保证组装结果具有较高的准确度。菌株 YN145 的全基因组测序工作委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。

利用短序列组装软件 SOAPdenovo2^[14] (<http://soap.genomics.org.cn/>)对二代测序后的优化序列进行多个 Kmer 参数的拼接, 得到最优的 contigs 组装结果, 然后把短序列(reads)比对到重叠群(contig)上, 根据 reads 的配对端(paired-end)和重叠(overlap)关系, 对组装结果进行局部组装和优化, 形成组装序列(scaffolds)。再利用组装软件 unicycler V0.4.8^[15]进行三代序列组装, 组装过程中会借助 pilon V1.23 软件进行序列校正, 如果最终组装序列两端存在 500 bp 以上的 overlap, 则将序列成环并截去其中一端 overlap 序列, 最终可得到完整的染色体及质粒序列。然后, 对组装序列进行基因预测, 得到基因位置及序列信息。

1.2.7 基因功能预测与注释

利用 Glimmer^[16] (<http://ccb.jhu.edu/software/glimmer/index.shtml>)、GeneMarkS^[17]和 Prodigal 软件对基因组中的编码序列(coding sequence, CDS)进行预测。利用 tRNAscan-SE V2.0^[18]软件 (<http://trna.ucsc.edu/software/>)对基因组中包含的 tRNA 进行预测, 可以获得每个样本基因组中 tRNA 的核苷酸序列信息、反密码子信息及二级结构信息。利用 Barrnap 软件(<https://github.com/tseemann/barrnap>)对基因组中包含的 rRNA 进行预测, 获得每个样本基因组中所有 rRNA 的种

类、位置、序列信息。

利用 Diamond V0.8.35 将预测基因的蛋白序列与 NR、Swiss-Prot 数据库^[19]、EggNOG 数据库^[20]、KEGG^[21]进行比对。利用 BLAST2go V2.5 软件对 GO 数据库进行比对。

1.2.8 次级代谢产物合成相关基因簇分析

利用 antiSMASH^[22]网站 (<http://antismash.secondarymetabolites.org/#!/start>)对次级代谢产物合成基因簇进行快速鉴定、注释和分析, 实现微生物基因组天然产物合成基因簇的查询和预测。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌对稻瘟病菌黑色素合成的影响

将装有稻瘟病菌菌饼的 PD 培养基放入三角瓶中, 置于摇床培养 2 d 后, 再分别加入无菌水 (图 1A)、菌株 JN005 (图 1B)、菌株 YN145 (图 1C)、菌株 K-268 (图 1D)和菌株 JN-369 (图 1E)胞外抗菌物质粗提液, 以及 PBS 溶液(图 1F), 实验结果如图 1 所示。在通过紫外-可见分光光度计测量胞外黑色素液后, 在 400 nm 处无菌水和 PBS 对照组的吸光度值分别为 0.704 和 0.706, 菌株 JN-369、菌株 JN005、菌株 K-268 和菌株 YN145 处理的吸光度值分别是 0.372、0.239、0.170 和 0.147。其中菌株 YN145 的吸光度值最低, 表明该菌株对稻瘟病菌黑色素合成抑制效果相对最好。

2.2 抗菌物质对稻瘟病菌菌丝黑色素形成的影响

配制不同浓度的稻瘟病菌黑色素溶液并测定其 OD_{400} 吸光值, 制作稻瘟病菌黑色素标准曲线见图 2, 得到了稻瘟病菌黑色素浓度与 OD_{400} 呈线性回归关系, 方程为 $y=455.06x-0.4948$, 相关系数 R^2 为 0.9973。

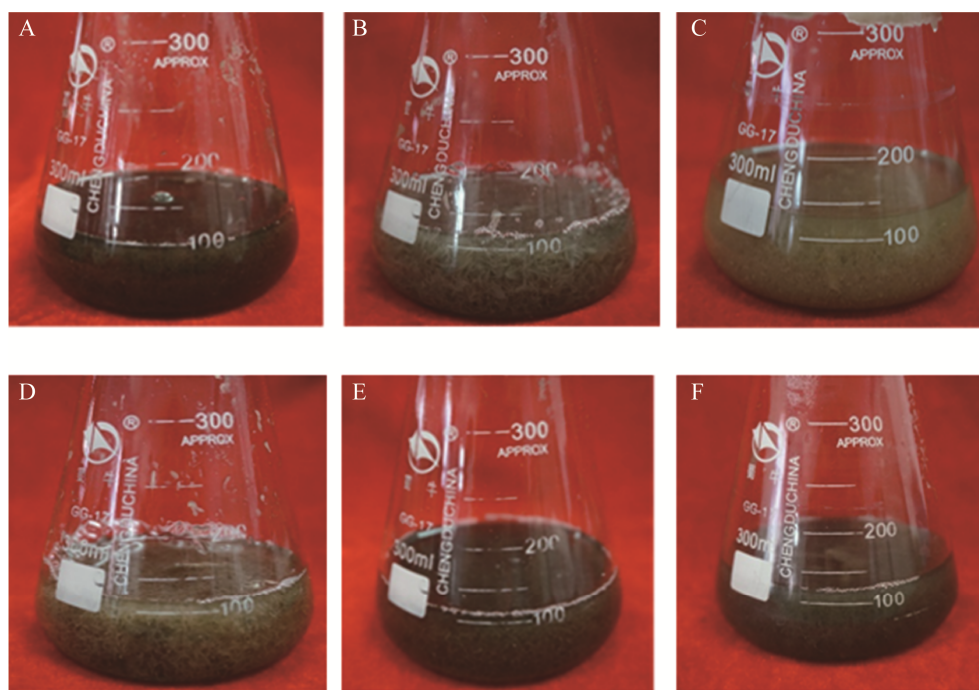


图 1 多株芽孢杆菌提取物对稻瘟病菌产黑色素的影响 A: 无菌水处理. B: 菌株 JN005 处理组. C: 菌株 YN145 处理组. D: 菌株 K-268 处理组. E: 菌株 JN-369 处理组. F: PBS 溶液处理

Figure 1 Effects of crude extracts from multiple strains on melanin production of *Magnaporthe oryzae*. A: Treated with sterile water. B: Strain JN005 treatment group. C: Strain YN145 treatment group. D: Strain K-268 treatment group. E: Strain JN-369 treatment group. F: PBS treated group.

将菌株 YN145 抗菌物质加到装有稻瘟病菌饼的培养基中, 培养 3、5、7、9、11 d 并测定稻瘟病菌每克菌丝中黑色素液的 OD_{400} 值, 结果如图 3 所示。不同培养时间每克菌丝中黑色素含量不同, YN145 抗菌物质能较好地抑制稻瘟病菌菌丝中的黑色素含量, 在抗菌物质培养第 9 天时抑制效果最好, 无菌水处理下的每克菌丝中黑色素含量达到 $1\,778.7\ \mu\text{g/g}$, 而在抗菌物质作用下每克菌丝黑色素含量仅为 $434.3\ \mu\text{g/g}$, 抑制率达 75.6%; 在第 9 天后, 抗菌物质对稻瘟病菌菌丝中的黑色素合成的抑制效果下降; 第 11 天时, 抗菌物质对每克菌丝中黑色素合成的抑制率为 63.6%。

2.3 抗菌物质对稻瘟病菌菌丝生长拮抗活性

不同稀释倍数的菌株 YN145 抗菌物质对稻瘟病菌拮抗活性影响如图 4 所示。当稀释倍数

变大时, 菌丝生长抑制率会逐渐变小, 即原浓度粗提胞外抗菌物质和稀释 2、4、8 倍的抗菌物质抑制菌丝生长率分别为 55.4%和 54.3%、43.5%、20.0%; 当稀释倍数为 32 倍和 64 倍时, 其抑菌率均约为 15.3%。

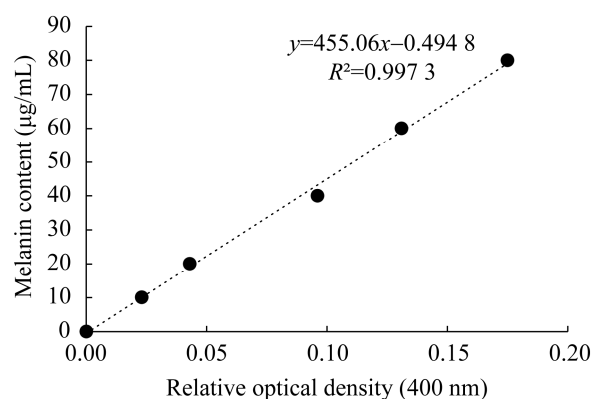


图 2 黑色素标准曲线

Figure 2 Standard curve of melanin.

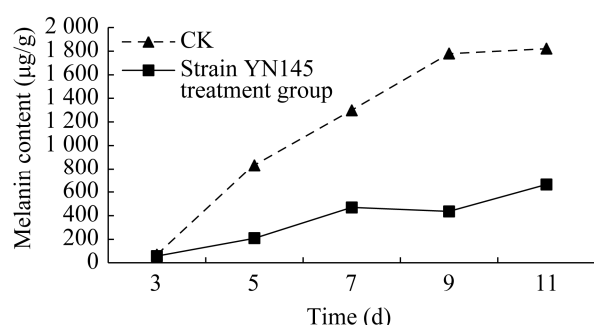


图3 菌株 YN145 的提取物对稻瘟病菌菌丝产黑色素的影响

Figure 3 Effects of extracts from strain YN145 on melanin content in mycelium of *Magnaporthe oryzae*.

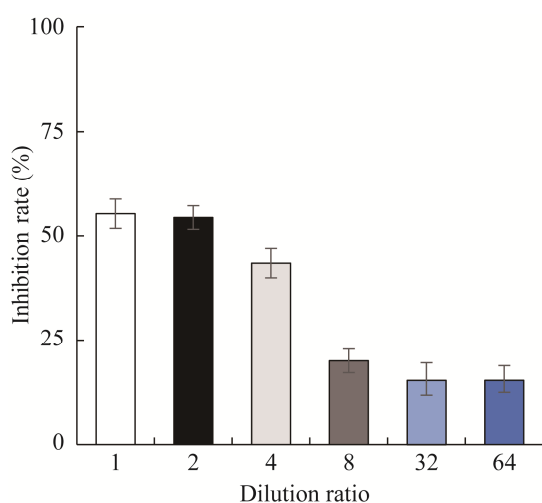


图4 不同浓度的菌株 YN145 提取物对稻瘟病菌菌丝生长的影响

Figure 4 Effects of extracts from strain YN145 with different concentrations on mycelia growth of *Magnaporthe oryzae*.

2.4 抗菌物质对稻瘟病菌分生孢子萌发的影响

不同稀释倍数的抗菌物质对稻瘟病菌分生孢子萌发的影响如表 1 所示。随着稀释倍数的增加, 抗菌物质抑制分生孢子的萌发效果逐步下降, 抗菌物质原液对稻瘟病菌分生孢子萌发抑制效果最好, 达 54.2%, 各处理浓度之间存在显著差异。

表 1 菌株 YN145 的提取物对稻瘟病菌分生孢子萌发的影响

Table 1 Effects of extracts from strain YN145 on conidium germination of *Magnaporthe oryzae*

Dilution ratio	Total spores	Number of spores germinated	Spore germination inhibition rate (%)
1	203	80	54.2a
5	215	96	47.0b
10	200	107	34.9c
50	211	106	28.9d
100	208	122	22.9e

不同小写字母表示差异显著

Different lowercase letters indicated significant difference.

2.5 基因组 DNA 的检测

实验提取的枯草芽孢杆菌 YN145 的 DNA 溶液经 NanoDrop2000 紫外分光光度计检测纯度得到 $OD_{260}/OD_{280}=1.87$, $OD_{260}/OD_{230}=2.20$, 经 picogreen 检测溶液浓度为 197.00 ng/μL, 总量为 63.04 μg。胶图主带≥23 kb (图 5), 无明显拖尾, 无 RNA、蛋白、糖类杂质等污染, 能够用于后续实验。

2.6 菌株 YN145 全基因组的概况

采用二代 Illumina HiSeq 测序平台和三代 PacBio 测序平台结合的方式, 对菌株 YN145 进行全基因组测序。菌株 YN145 组装后仅为一条

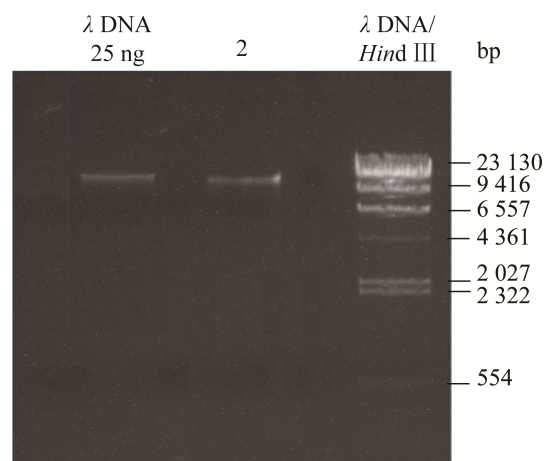


图5 枯草芽孢杆菌 YN145 DNA 电泳图谱

Figure 5 Agarose gel electrophoresis of *Bacillus subtilis* YN145 genomic DNA.

染色体, 基因组大小为 4 167 871 bp, GC 含量为 43.86%, 测序深度为 453.08。基因预测结果显示, CDS 数量为 4 294 个, 编码基因总长度达 3 681 669 bp, 平均长度为 857.40 bp。含有串联重复序列 43 个, 总长为 46 775 bp。在基因序列上共找到 85 个 tRNA、30 个 rRNA 和 92 个 sRNA。菌株 YN145 基因组测序数据提交至

GenBank, 登录号为 PRJNA818422。YN145 基因组圈图见图 6。

2.7 基因组的功能注释

对预测到的菌株 YN145 基因组中的编码基因与六大数据库(NR、Swiss-Prot、EggNOG、KEGG、Pfam 和 GO)进行功能注释。最终注释统计数据见表 2。

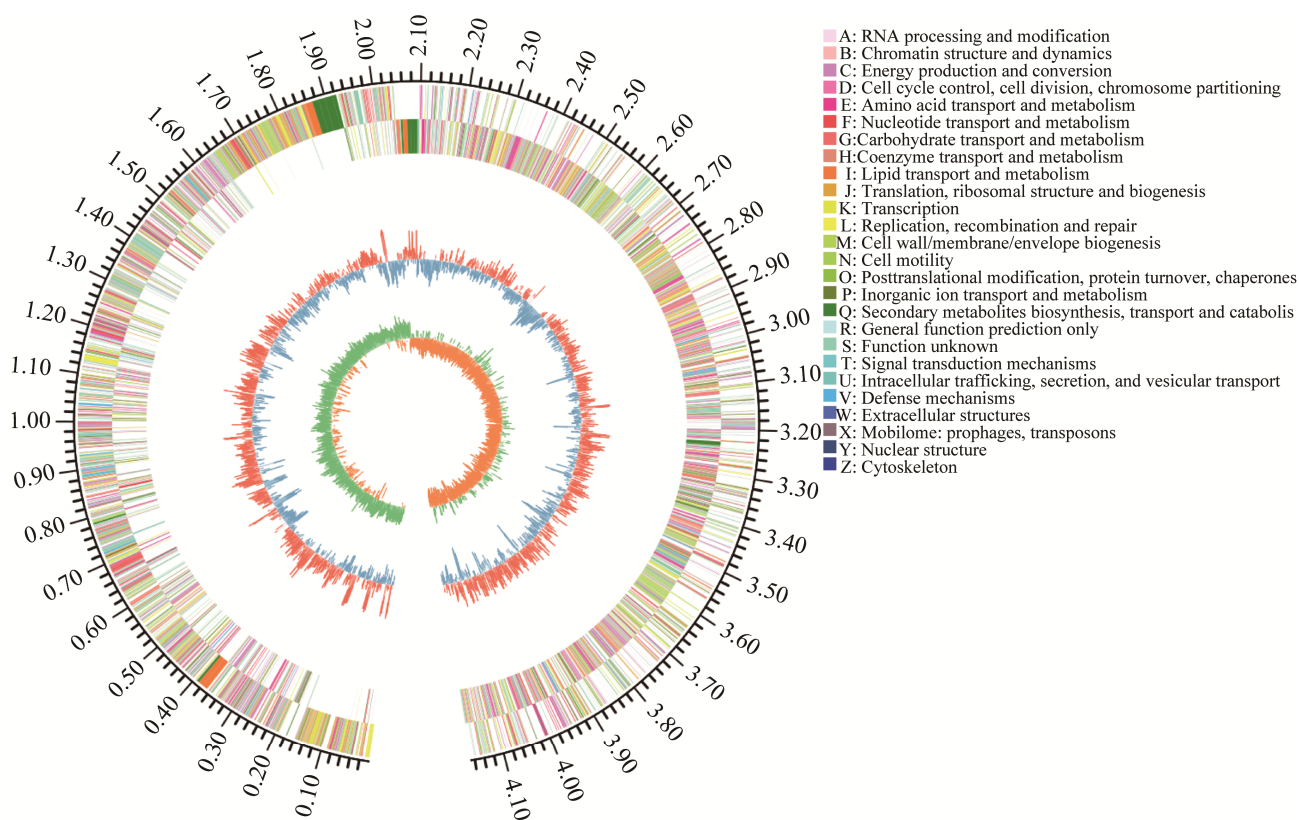


图 6 枯草芽孢杆菌 YN145 基因组图 圈图由外到内, 第 1 圈表示基因组的大小, 单位为 Mb (million bp); 第 2 圈和第 3 圈表示正链、负链上预测的 CDS, 不同的颜色表示不同的 COG 的功能分类; 第 4 圈表示 rRNA 和 tRNA; 第 5 圈表示 GC 含量, 外突出的红色部分表示该区域 GC 含量高于全基因组平均 GC 含量, 内突出的蓝色部分则表示该区域 GC 含量低于全基因组平均 GC 含量, 峰值越高表示与平均 GC 含量差值越大

Figure 6 Genomic map of *Bacillus subtilis* YN145. From the outer to inner circle, the first is the size of the genome in Mb (million bp); the second and third circles indicate the predicted CDSs on the positive and negative strands. The different colors represent the functional classification of different COGs; the fourth circle represents rRNA and tRNA; the fifth circle is the GC content. The highlighted red part indicates that the GC content in the region is higher than the average GC content of the whole genome. The blue part highlighted in the inner part indicates that the GC content in the region is lower than the average GC content of the whole genome. The higher the peak value, the greater the difference between the GC content and average GC content.

表 2 菌株 YN145 基因功能注释数据库分布情况
Table 2 Distribution of gene function annotation database of strain YN145

Type	Gene number
NR	4 294
Swiss-Prot	3 875
Pfam	3 586
EggNOG	3 249
GO	3 105
KEGG	2 312

2.7.1 GO 注释结果

菌株 YN145 全基因组的 GO 数据库注释情况如图 7 所示, YN145 共有 3 105 个基因获得注释, 其中 GO 注释分为分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular component)和生物

过程(biological process) 3 个部分。在分子功能部分中, 共有 2 428 个基因获得注释, 其中 ATP 结合(ATP binding) (364, 8.48%)和 DNA 结合(DNA binding) (298, 6.94%)次级功能类别获得注释的基因数目最多; 在生物过程中, 共有 2 397 个基因获得注释, 其中氧化还原过程(oxidation-reduction process) (324, 7.55%)与转录调节功能及 DNA 模板化(regulation of transcription, DNA-templated) (274, 6.38%), 这 3 个次级功能类别注释结果最多; 在细胞组分类别中, 共有 1 788 个基因获得注释, 其中膜的组成部分(integral component of membrane) (896, 20.87%)与细胞质膜(plasma membrane) (598, 13.93%)注释到的基因数目最多。

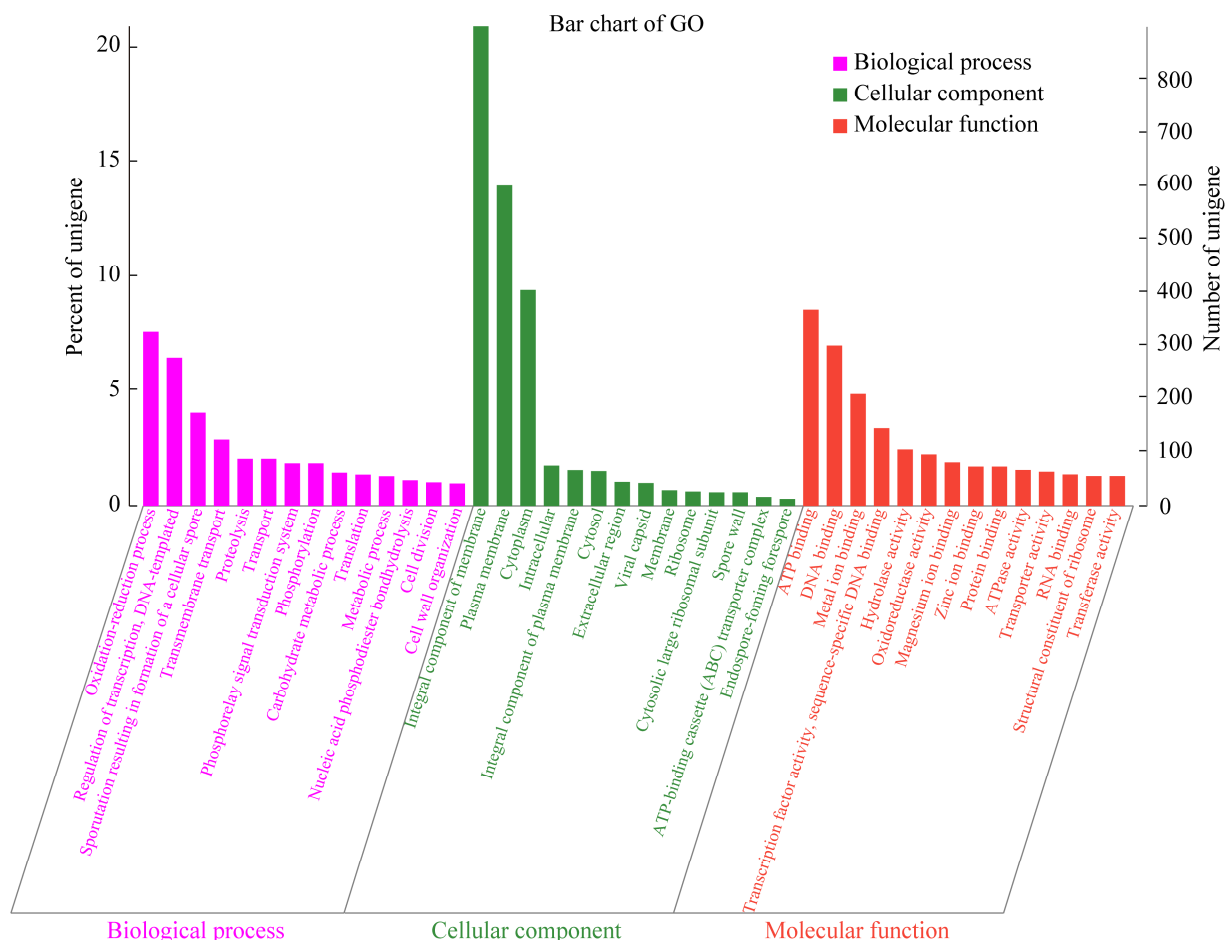


图 7 菌株 YN145 的 GO 数据库注释分类统计图

Figure 7 GO functional classification map of the strain YN145 genome.

2.7.2 COG 注释结果

将菌株 YN145 的蛋白序列注释到 EggNOG 数据库进行注释, 可以对预测蛋白进行基因家族的归类, 并给出该家族相应的功能注释信息。YN145 共有 3 249 个基因被注释到 20 个 COG 分类中, 其中未知功能基因占比最多(868, 26.72%), 其次是氨基酸转运与代谢(amino acid transport and metabolism) (304, 9.36%)、转录簇(transcription) (260, 8.00%)、糖类转运及代谢(carbohydrate transport and metabolism)。菌株 YN145 基因组 COG 注释结果见图 8。

2.7.3 KEGG 注释结果

枯草芽孢杆菌 YN145 全基因组在 KEGG 数据库的基因注释结果见图 9。菌株 YN145 全基因组共有 2 312 个编码基因在 KEGG 数据库注释到五大类别: 细胞过程(cellular processes)、新陈代谢 (metabolism)、人类疾病 (human diseases)、遗传信息处理(genetic information processing)、有机系统(organismal systems)。再进一步分类的二级功能类别中, 共有 42 条 KEGG 二级功能类别, 其中氨基酸代谢(amino

acid metabolism) (267, 11.55%)、全局和概览通路(global and overview maps) (261, 11.23%)、碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism) (250, 10.81%)是最主要的 3 种代谢通路。

2.8 次级代谢产物合成基因簇的分析

通过 antiSMASH 网站在线预测菌株 YN145 全基因组共得到 10 个基因簇, 均在染色体上(表 3), 其中有 3 个是非核糖体肽合成酶(nrps)合成基因簇, 2 个是萜类(terpene)合成基因簇, 1 个是 t3 聚酮合成酶(t3pks)合成基因簇, 2 个是 nrps-transatpks-otherks 基因簇, 1 个是塞克肽类-头到尾(sactipeptide-head-to-tail)基因簇, 还有 2 个是未知基因簇。

将菌株 YN145 的所有基因簇与已知的次级代谢产物合成基因簇进行 BLAST 比对后发现, cluster 3、cluster 4、cluster 7、cluster 9 和 cluster 10 分别与已知的 bacillaene、fengycin、bacillibactin、subtilosin-A 和 bacilysin 合成基因簇相似度达 100%。Cluster 1 与已知的 surfactin 合成基因簇相似度达 82%。Cluster 2、cluster 5、cluster 6 和 cluster 8 功能未知, 这表明菌株 YN145 可能存在新的抑菌物质合成基因簇。

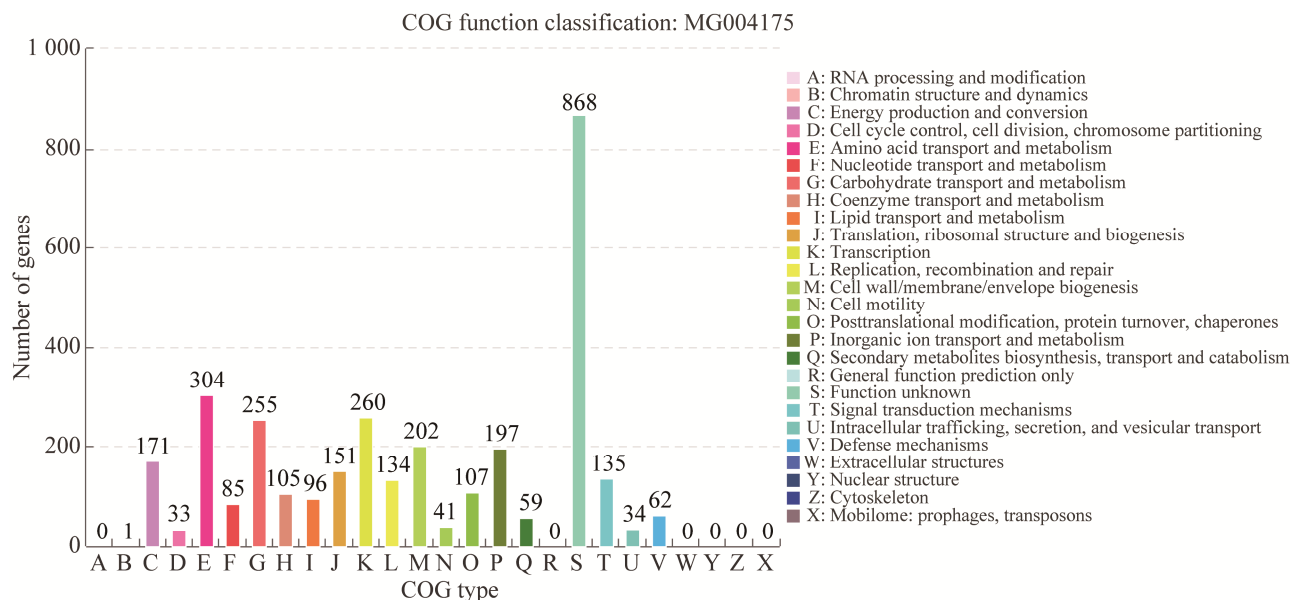


图 8 菌株 YN145 的 COG 数据库注释分类统计图

Figure 8 Diagram of COG functional classification of the strain YN145 genome.



图9 菌株 YN145 基因功能注释 KEGG 代谢通路分类统计图

Figure 9 Classification diagram of KEGG metabolic pathway of the strain YN145 genome.

表3 菌株 YN145 次级代谢产物合成基因簇

Table 3 Gene clusters of secondary metabolites of strain YN145

Cluster ID	Type	Start	End	Similar cluster	Similarity (%)	Gene No.
Cluster 1	nrps	347 887	413 278	Surfactin biosynthetic gene cluster	82	48
Cluster 2	Terpene	1 141 340	1 162 146			25
Cluster 3	nrps-transatpkpks-otherks	1 833 535	1 943 354	Bacillaene biosynthetic gene cluster	100	55
Cluster 4	nrps	2 028 723	2 112 604	Fengycin biosynthetic gene cluster	100	46
Cluster 5	Terpene	2 181 001	2 202 899			25
Cluster 6	t3pks	2 250 626	2 291 721			46
Cluster 7	nrps	3 207 209	3 256 948	Bacillibactin biosynthetic gene cluster	100	47
Cluster 8	Other	3 529 328	3 570 072			43
Cluster 9	Sactipeptide-head-to-tail	3 790 619	3 812 230	Subtilisin-A biosynthetic gene cluster	100	22
Cluster 10	Other	3 819 248	3 860 664	Bacilysin biosynthetic gene cluster	100	44

2.9 抑制稻瘟病菌黑色素合成相关基因功能分析

本实验发现菌株 YN145 对稻瘟病菌黑色素的生成有抑制效果, 通过次级代谢产物合成基因簇分析后, 在 cluster 6 (t3pks) 上找到 *bpsA* 基因, 其在菌株 YN145 基因组中的编号为 gene2359, 基因全长 1 098 bp, 合成蛋白中含有 365 个氨基酸。通过 NR 数据库查询发现该基因是查尔酮(chalcone)化合物合成相关基因。查尔酮是一种类黄酮化合物, 经前人研究其能通过酪氨酸酶竞争底物结合来抑制酪氨酸酶发挥活性^[23]。酪氨酸酶是黑色素生物合成中的一个关键酶, 目前绝大部分黑色素抑制剂都是通过抑制酪氨酸酶来发挥作用, 所以推测菌株 YN145 发挥抑制稻瘟病菌黑色素合成功能的基因为 *bpsA*。

3 讨论

通过 antiSMASH 网站在线预测菌株 YN145 的次级代谢产物基因簇, 表明菌株 YN145 可能存在新的次级代谢产物基因簇, 并且该菌可能产生 bacillaene、bacillibactin、fengycin、subtilosin-A 和 bacilysin 这 5 种抗菌物质, 这表明菌株 YN145 具有广泛的抑菌作用。bacillaene 是一种由低级脂肪酸聚合而成的聚酮化合物, 该物质具有强烈的抑菌作用^[24], 抑菌方式是通过抑制病原菌的蛋白合成。多数芽孢杆菌能分泌嗜铁素与病原微生物争夺铁元素, 抑制病原微生物的生长^[25]。Fengycin 是一种脂肽类抗菌物质, 其亲水脂的特性使它能够通过穿透病原菌的细胞膜来发挥抗菌作用^[26]。郭庆港等对枯草芽孢杆菌菌株 HMB19198 的抑菌物质进行质谱分析和全基因组序列分析, 证明菌株 HMB19198 能够产生 fengycin 来防治番茄灰霉病^[27]。Subtilosin-A 是一种核糖体合成

翻译后修饰多肽(ribosomally synthesized and posttranslationally modified peptides, RiPPs), 其抑菌谱非常广, 能作用并干扰多种细菌的磷脂双分子层^[28-29]。Bacilysin 是目前所发现的结构最简单的肽类抗生素之一, 仅由 2 个氨基酸构成, 它在 1946 年首次被发现^[30], 其作用机制主要是破坏病原菌细胞膜的完整性并且能使细胞壁结构受损^[31-32]。

此外, 菌株 YN145 存在一个查尔酮合酶基因 *bpsA*, 目前针对该基因的研究较少, Nakano 等对 *Bacillus subtilis* 168 中的 *bpsA* 进行过表达后发现该基因能够合成吡喃酮, 吡喃酮是曲酸和一些黄酮类化合物中重要组成部分^[33]。查尔酮化合物是一种黄酮类化合物, 查尔酮的结构单元可修饰位点多且易与其他各种不同结构的取代基和药效团结合形成各种查尔酮衍生物, 其衍生物抑菌谱非常广, 具有抗菌、抗氧化、抗病毒等生物活性^[34-35]。Liu 等发现异补骨脂查尔酮(isobavachalcone)对稻瘟病菌的几丁质酶具有显著的抑制作用, 并且有助于开发新型的抗稻瘟病药物^[36]。彭颖等从柑橘提取到的柚皮苷二氢查耳酮(naringin DC)其抗氧化活性和美白活性都较好^[37]。同时, 黄酮类化合物能够抑制酪氨酸酶的活性, 所以推测菌株 YN145 抑制稻瘟病菌黑色素合成的基因为 *bpsA*, 但是该基因在菌株内的表达调控还需进一步探索。

4 结论

本研究从 4 株稻瘟病生防菌中筛选出抑制稻瘟病菌黑色素合成效果最佳的菌株——枯草芽孢杆菌 YN145, 并且其抗菌物质对稻瘟病菌菌丝生长和菌丝黑色素合成、分生孢子萌发的抑制效果较好。通过全基因组测序分析发现, 菌株 YN145 编码的 bacillaene、bacillibactin、fengycin、subtilosin-A 和 bacilysin 等 5 种次级代

谢产物合成基因簇与已鉴定基因簇完全相同, surfactin 合成基因簇相似度也高达 82%, 说明菌株 YN145 具有分泌多种抗菌物质的潜力。此外, 在菌株 YN145 全基因组中发现了一个查尔酮合成相关基因 *bpsA*, 推测其与抑制稻瘟病菌黑色素合成有关。综上所述, 枯草芽孢杆菌 YN145 在干扰稻瘟病菌侵染水稻方面具有明显优势; 另外, 菌株全基因组测序的结果为解析该菌株的代谢和调控机制提供了大量生物学信息, 为进一步开发菌株 YN145 成为生物防治剂提供了一定的依据。

REFERENCES

- [1] 代玉立. 枯草芽孢杆菌菌株 RSS-1 对油菜菌核病菌的生防作用及其机制研究[D]. 合肥: 安徽农业大学博士学位论文, 2015.
DAI YL. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape using novel *Bacillus subtilis* strain RSS-1[D]. Hefei: Doctoral Dissertation of Anhui Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [2] 中国农药信息网. 农药登记数据 [DB/OL]. <http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>, 2022-03-18/2022-03-18.
China Pesticide Information Network[DB/OL]. <http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>, 2022-03-18/2022-03-18 (in Chinese).
- [3] 隋晓日. 枯草芽孢杆菌抗菌物质的制备及其在水产保鲜上的应用[D]. 烟台: 烟台大学硕士学位论文, 2021.
SUI XR. Preparation of *Bacillus subtilis* antibacterial substance and its application in the preservation of aquatic products[D]. Yantai: Master's Thesis of Yantai University, 2021 (in Chinese).
- [4] 曹少谦, 南楠, 袁勇军, 戚向阳. 枯草芽孢杆菌发酵提取物对大肠杆菌的抑制作用[J]. 食品工业科技, 2019, 40(3): 111-115, 126.
CAO SQ, NAN N, YUAN YJ, QI XY. Inhibitory effect of fermented extracts by *Bacillus subtilis* on *Escherichia coli*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(3): 111-115, 126 (in Chinese).
- [5] ZENG QC, XIE JB, ZHANG X, LI Y, WANG Q. Complete genome sequence data of *Bacillus pumilus* GLB197, an effective antagonist of grape downy mildew[J]. Data in Brief, 2020, 30: 105423.
- [6] 庄新亚. 出芽短梗霉菌 PA-2 全基因组测序及除草活性物质的分离鉴定[D]. 西宁: 青海大学硕士学位论文, 2020.
ZHUANG XY. Genome sequencing of *Aureobasidium pullulans* PA-2 and isolation and identification of herbicidal active substances[D]. Xining: Master's Thesis of Qinghai University, 2020 (in Chinese).
- [7] 陈海雁, 陈向东, 俞黎娜. 黑色素形成机理、生物学功能和应用开发的研究进展[J]. 生物资源, 2020, 42(6): 652-659.
CHEN HY, CHEN XD, YU LS. Biosynthesis, function and applications of melanin[J]. Biotic Resources, 2020, 42(6): 652-659 (in Chinese).
- [8] 竺思仪. 稻瘟病菌黑色素合成和调控相关基因的功能研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2021.
ZHU SY. The study on melanin synthesis and regulation related genes in *Magnaporthe oryzae*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2021 (in Chinese).
- [9] 邹秋霞, 任佐华, 高诗涵, 周瑚, 赵建辉, 刘二明. 枯草芽孢杆菌 YN145 分离鉴定及抑菌活性[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 421-426.
ZOU QX, REN ZH, GAO SH, ZHOU H, ZHAO JH, LIU EM. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* YN145 against *Magnaporthe oryzae* and its antimicrobial activities[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017, 33(3): 421-426 (in Chinese).
- [10] 朱华琚, 周瑚, 任佐华, 刘二明. 枯草芽孢杆菌 JN005 胞外抗菌物质及对水稻叶瘟防治效果[J]. 中国水稻科学, 2020, 34(5): 470-478.
ZHU HJ, ZHOU H, REN ZH, LIU EM. Extracellular antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* JN005 and its control efficacy on rice leaf blast[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2020, 34(5): 470-478 (in Chinese).
- [11] 周瑚, 胡玲, 余曦玥, 朱华琚, 任佐华, 刘二明. 特基拉芽孢杆菌 JN-369 抗菌粗蛋白的理化性质和抑菌效果[J]. 中国生物防治学报, 2020, 36(2): 211-219.
ZHOU H, HU L, YU XY, ZHU HJ, REN ZH, LIU EM. Physical and chemical properties and inhibitory effect of crude antifungal protein produced by *Bacillus tequilensis* JN-369[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2020, 36(2): 211-219 (in Chinese).
- [12] 祖雪, 周瑚, 朱华琚, 任佐华, 刘二明. 枯草芽孢杆菌 K-268 的分离鉴定及对水稻稻瘟病的防病效果[J]. 生物技术通报, 2022, 38(6): 136-146.
ZU X, ZHOU H, ZHU HJ, REN ZH, LIU EM. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* K-268 and its

- biological control effect on rice blast[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(6): 136-146 (in Chinese).
- [13] 曹志艳. 玉米大斑病菌黑色素性质与功能研究[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2006.
- CAO ZY. Study on the characteristics and functions of melanin in *Exserohilum turcicum*[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei Agricultural University, 2006 (in Chinese).
- [14] LUO RB, LIU BH, XIE YL, LI ZY, HUANG WH, YUAN JY, HE GZ, CHEN YX, PAN Q, LIU YJ, TANG JB, WU GX, ZHANG H, SHI YJ, LIU Y, YU C, WANG B, LU Y, HAN CL, CHEUNG DW, et al. SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read *de novo* assembler[J]. GigaScience, 2012, 1(1): 18.
- [15] WICK RR, JUDD LM, GORRIE CL, HOLT KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads[J]. PLoS Computational Biology, 2017, 13(6): e1005595.
- [16] DELCHER AL, BRATKE KA, POWERS EC, SALZBERG SL. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. Bioinformatics, 2007, 23(6): 673-679.
- [17] BESEMER J, BORODOVSKY M. GeneMark: web software for gene finding in prokaryotes, eukaryotes and viruses[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(suppl_2): W451-W454.
- [18] CHAN PP, LOWE TM. tRNAscan-SE: searching for tRNA genes in genomic sequences[J]. Methods in Molecular Biology (Clifton, N J), 2019, 1962: 1-14.
- [19] 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.
- [20] JENSEN LJ, JULIEN P, KUHN M, von MERING C, MULLER J, DOERKS T, BORK P. eggNOG: automated construction and annotation of orthologous groups of genes[J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(suppl_1): D250-D254.
- [21] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 27-30.
- [22] BLIN K, WOLF T, CHEVRETTE MG, LU XW, SCHWALEN CJ, KAUTSAR SA, SUAREZ DURAN HG, de LOS SANTOS ELC, KIM HU, NAVE M, DICKSCHAT JS, MITCHELL DA, SHELEST E, BREITLING R, TAKANO E, LEE SY, WEBER T, MEDEMA MH. antiSMASH 4.0—improvements in chemistry prediction and gene cluster boundary identification[J]. Nucleic Acids Research, 2017, 45(W1): W36-W41.
- [23] 毕云枫, 宋凤瑞, 刘志强. 天然酪氨酸酶抑制剂的种类及其对酪氨酸酶抑制作用的研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2014, 40(2): 454-459.
- BI YF, SONG FR, LIU ZQ. Research progress on types of natural tyrosinase inhibitors and their inhibitory effects on tyrosinase[J]. Journal of Jilin University (Medicine Edition), 2014, 40(2): 454-459 (in Chinese).
- [24] CHEN XH, VATER J, PIEL J, FRANKE P, SCHOLZ R, SCHNEIDER K, KOUMOUTSI A, HITZEROTH G, GRAMMEL N, STRITTMATTER AW, GOTTSCHALK G, SÜSSMUTH RD, BORRISS R. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB 42[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(11): 4024-4036.
- [25] ARGUELLES-ARIAS A, ONGENA M, HALIMI B, LARA Y, BRANS A, JORIS B, FICKERS P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens[J]. Microbial Cell Factories, 2009, 8: 63.
- [26] 宋焱. 芽孢杆菌 BU108 的抗菌性质分析及其对马铃薯疮痂病的防治[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2018.
- SONG Y. The antibacterial property analysis of *Bacillus* BU108 and biocontrol of potato scab[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [27] 郭庆港, 刘高鸽, 陈秀叶, 张晓云, 鹿秀云, 苏振贺, 及增发, 马平. 枯草芽胞杆菌 HMB19198 菌株抑菌物质的鉴定及其对番茄灰霉病的防治[J]. 植物病理学报, 2022, 52(2): 247-255.
- GUO QG, LIU GG, CHEN XY, ZHANG XY, LU XY, SU ZH, JI ZF, MA P. Identification of antifungal compounds of *Bacillus subtilis* HMB19198 and their biocontrol efficacy against tomato gray mold[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2022, 52(2): 247-255 (in Chinese).
- [28] THENNARASU S, LEE DK, POON A, KAWULKA KE, VEDERAS JC, RAMAMOORTHY A. Membrane permeabilization, orientation, and antimicrobial mechanism of subtilisin A[J]. Chemistry and Physics of Lipids, 2005, 137(1/2): 38-51.
- [29] 胡彦婷. 枯草芽胞杆菌 BSD-2 全基因组数据挖掘及抗菌物质的分离[D]. 天津: 河北工业大学硕士学位论文, 2017.
- HU YT. Genome mining and isolation of antibacterial substance from *Bacillus subtilis* BSD-2[D]. Tianjin: Master's Thesis of Hebei University of Technology, 2017

- (in Chinese).
- [30] WALKER JE, ABRAHAM EP. Isolation of bacilysin and a new amino acid from culture filtrates of *Bacillus subtilis*[J]. The Biochemical Journal, 1970, 118(4): 557-561.
- [31] 王涛. 抗真菌化合物 bacilysin 的制备、抑菌机制研究及结构改造的探索[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2016.
- WANG T. The preparation, the study on action mechanism and exploration on structural modification of bacilysin[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2016 (in Chinese).
- [32] 吴黎明, 李曦, 伍辉军, 高学文. 芽胞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.
- 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).
- [33] NAKANO C, OZAWA H, AKANUMA G, FUNA N, HORINOUCI S. Biosynthesis of aliphatic polyketides by type III polyketide synthase and methyltransferase in *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(15): 4916-4923.
- [34] 郭晴晴, 王炜健, 李娟, 彭玉美. 查尔酮类衍生物在农药活性方面的研究进展[J]. 精细化工中间体, 2018, 48(3): 1-5.
- GUO QQ, WANG WJ, LI J, PENG YM. Research advance in pesticidal activity of *Chalcone* derivatives[J]. Fine Chemical Intermediates, 2018, 48(3): 1-5 (in Chinese).
- [35] 罗杨, 易川, 李苇苇, 王亚静, 王子琛, 吴易喆, 凌海波. 查尔酮类化合物的抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌活性研究[J]. 国外医药(抗生素分册), 2021, 42(6): 352-357.
- LUO Y, YI C, LI WW, WANG YJ, WANG ZC, WU YZ, LING HB. *Chalcone* derivatives with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. World Notes on Antibiotics, 2021, 42(6): 352-357 (in Chinese).
- [36] LIU X, LI W, HU BC, WANG MX, WANG J, GUAN LJ. Identification of isobavachalcone as a potential drug for rice blast disease caused by the fungus *Magnaporthe grisea*[J]. Journal of Biomolecular Structure & Dynamics, 2019, 37(13): 3399-3409.
- [37] 彭颖, 何婉莺, 范鑫, 卢琪, 何小燕, 潘思轶. 柚皮苷二氢查尔酮的抗氧化活性研究[J]. 中国食品学报, 2021, 21(2): 45-54.
- PENG Y, HE WY, FAN X, LU Q, HE XY, PAN SY. Studies on antioxidant activity of naringin dihydrochalcone[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2021, 21(2): 45-54 (in Chinese).