



# 茎瘤芥根际一株产紫色杆菌素杜擗氏菌的分离鉴定及其基因组分析

邹莹<sup>1#</sup>, 吴嘉炳<sup>2,3#</sup>, 张雨欣<sup>1</sup>, 李殿怡<sup>1</sup>, 牛国清<sup>1\*</sup>, 司军<sup>2,3\*</sup>

1 西南大学农业科学研究院, 生物技术中心, 重庆 400715

2 西南大学园艺园林学院, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715

3 西南大学园艺园林学院, 南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715

邹莹, 吴嘉炳, 张雨欣, 李殿怡, 牛国清, 司军. 茎瘤芥根际一株产紫色杆菌素杜擗氏菌的分离鉴定及其基因组分析. 微生物学报, 2022, 62(11): 4122–4140.

Zou Ying, Wu Jiabing, Zhang Yuxin, Li Dianyi, Niu Guoqing, Si Jun. Identification and genome analysis of the violacein-producing *Duganella* sp. isolated from *Brassica juncea* var. *tumida* rhizosphere. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(11): 4122–4140.

**摘要:**【目的】对茎瘤芥根际微生物进行分离鉴定, 分析微生物菌群构成, 选择具有优良特性的菌株, 评估其次级代谢产物合成能力, 为茎瘤芥根际微生物多样性和菌种资源的挖掘利用奠定基础。【方法】采集重庆市涪陵区二渡村和邓家村的茎瘤芥根, 分离培养根际微生物菌株, 通过菌株形态观察和看家基因的序列分析, 对菌株进行初步鉴定、归类和保存。选择具有优良性状的菌株, 利用 Pacbio RS II 和 Illumina HiSeq 平台完成全基因组测序, 通过 antiSMASH 分析评估其次级代谢产物合成潜力, 克隆目的基因簇并进行异源表达和产物鉴定。【结果】分离得到 256 株微生物, 初步鉴定 120 株; 从中鉴定了一株产紫色杆菌素的杜擗氏菌 BjR8, 完成了基因组测序及分析, 发现该菌基因组为一条环状染色体, 全长 7 205 593 bp, GC 含量为 64.67%, 含有 6 241 个编码基因。生物信息学分析发现基因组含有 9 个次级代谢产物生物合成基因簇, 其中 7 个基因簇与已知化合物编码基因簇同源性较低, 说明该菌具有产生多种新型次级代谢产物的潜力; 克隆得到紫色杆菌素生物合成基因簇, 并在变铅青链霉菌 TK23 中完成了异源表达。【结论】从茎瘤芥根际分离得到 256 株微生物, 初步分析了茎瘤芥根际的微生物菌群构成; 完成了一株产紫色杆

**基金项目:** 重庆市技术创新与应用发展专项项目(cstc2021jcsx-cylhX0001); 西南大学“聚贤工程”启动项目(SWU117015)  
Supported by the Technology Innovation and Application Development Program of Chongqing (cstc2021jcsx-cylhX0001) and by the Southwest University (SWU117015)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding authors. Tel: +86-23-68251883, +86-23-68251274; E-mail: niu062376@swu.edu.cn, sijun@swu.edu.cn

Received: 20 April 2022; Revised: 19 May 2022; Published online: 26 July 2022

菌素杜榭氏菌的基因组测定与分析, 从中克隆了紫色杆菌素基因簇, 并成功在链霉菌中实现异源表达。

关键词: 根际微生物; 杜榭氏菌; 紫色杆菌素; 基因组测序; 生物合成基因簇; 异源表达

## Identification and genome analysis of the violacein-producing *Duganella* sp. isolated from *Brassica juncea* var. *tumida* rhizosphere

ZOU Ying<sup>1#</sup>, WU Jiabing<sup>2,3#</sup>, ZHANG Yuxin<sup>1</sup>, LI Dianyì<sup>1</sup>, NIU Guoqing<sup>1\*</sup>, SI Jun<sup>2,3\*</sup>

1 Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China

2 Chongqing Key Laboratory of Olericulture, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

3 Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education, College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

**Abstract:** [Objective] Rhizosphere contains a phylogenetically diverse array of microorganisms affecting the growth and health of plants. This study aims to examine the diversity and structure of the microbial community in *Brassica juncea* var. *tumida* rhizosphere. The isolated microbial strains can be explored to unleash their chemical potential. [Methods] Roots of *B. juncea* var. *tumida* were collected from two villages in Fuling District of Chongqing. Microbial isolates were then obtained after cultivation on different media. One strain was selected for genome sequencing (Pacbio RS II and Illumina HiSeq) and subsequent bioinformatic analysis. The antiSMASH 6.0 was used for the detection and comparison of biosynthetic gene clusters (BGCs) encoding secondary metabolites. A multiplex amplification-and-ligation strategy was employed to clone the gene cluster responsible for violacein biosynthesis. The gene cluster was then transferred into *Streptomyces lividans* TK23 by intergeneric conjugation. [Results] A total of 256 microbial isolates were obtained, of which 120 were identified. *Duganella* sp. BJR8, which produced violacein, was detected. Sequencing of the genome of BJR8 revealed a single circular chromosome of 7 205 593 bp in length with 64.67% G+C content and 6 421 coding sequences. Bioinformatic analysis showed that the strain contained 9 putative secondary metabolite BGCs, of which 7 had low similarities to BGCs encoding known compounds. Heterologous expression of the violacein gene cluster in *S. lividans* TK23 resulted in the production of deoxyviolacein. [Conclusion] The diversity and structure of the microbial community was examined by phylogenetic analysis of microorganisms isolated from *B. juncea* var. *tumida* rhizosphere. Bioinformatic analysis revealed that BJR8 had great biosynthetic potential for novel compounds. The *vio* gene cluster was cloned from BJR8 and expressed successfully in the surrogate host *S. lividans* TK23.

**Keywords:** rhizosphere microorganisms; *Duganella*; violacein; genome sequencing; biosynthetic gene cluster; heterologous expression

茎瘤芥(*Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee), 俗称青菜头或菜头, 是十字花科芸薹属的一种重要蔬菜, 既可鲜食又可加工成榨菜食用。重庆是中国榨菜生产的发祥地, 是国内规模最大、加工原料生产最集中的优势产区<sup>[1]</sup>。2021年, 重庆市种植面积约  $12.0 \times 10^4$  hm<sup>2</sup>, 占全国种植面积56%左右, 主要分布在涪陵、武隆、万州等13个区县。其中, 核心种植区涪陵区种植面积  $4.9 \times 10^4$  hm<sup>2</sup>, 年产量达到162.6万t, 总产值达到130亿元, 成为当地农村经济优势特色支柱产业<sup>[2]</sup>。

涪陵地处重庆市中部、三峡库区腹地, 位于长江、乌江交汇的河谷地带, 其独特的气候条件和土壤环境不仅为茎瘤芥种植提供了最佳的地理要素, 而且塑造了当地特有的微生物群落。植物根际存在大量种类丰富、功能多样的微生物, 这些微生物群落在促进植物生长、营养吸收、胁迫耐受和病原抵御等方面发挥着重要的作用<sup>[3]</sup>。涪陵茎瘤芥种植区域微生物群落, 特别是根际微

生物, 在茎瘤芥的生长发育和病原抵御方面发挥着重要的作用<sup>[4-5]</sup>。同时, 茎瘤芥根际微生物是一个重要的微生物资源库, 但相关资源的挖掘和利用方面的研究却鲜有报道。

紫色杆菌素(violacein)是微生物产生的吲哚类次级代谢产物, 已报道的产生菌包括紫色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)<sup>[6]</sup>、蓝黑紫色杆菌(*Janthinobacterium lividum*)<sup>[7]</sup>、交替假单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp. 520P1)<sup>[8]</sup>和杜辮氏菌(*Duganella* spp.)<sup>[9-11]</sup>等。紫色杆菌素具有广泛的生物活性, 如抗肿瘤<sup>[12]</sup>、抗真菌<sup>[13]</sup>、抗病毒<sup>[12]</sup>和抗细菌<sup>[14-15]</sup>等, 具有一定的药物开发价值。此外, 紫色杆菌素对天然原料(如丝绸、棉、毛)及合成原料(如尼龙)都有很好的着色效果, 在生物染料领域具有广阔的应用前景<sup>[16]</sup>。目前, 已在多种紫色杆菌素产生菌中鉴定了其生物合成基因簇, 由5个基因组成一个转录单元 *vioABCDE* (图 1A), 通过各基因的功能解析, 已阐明了紫

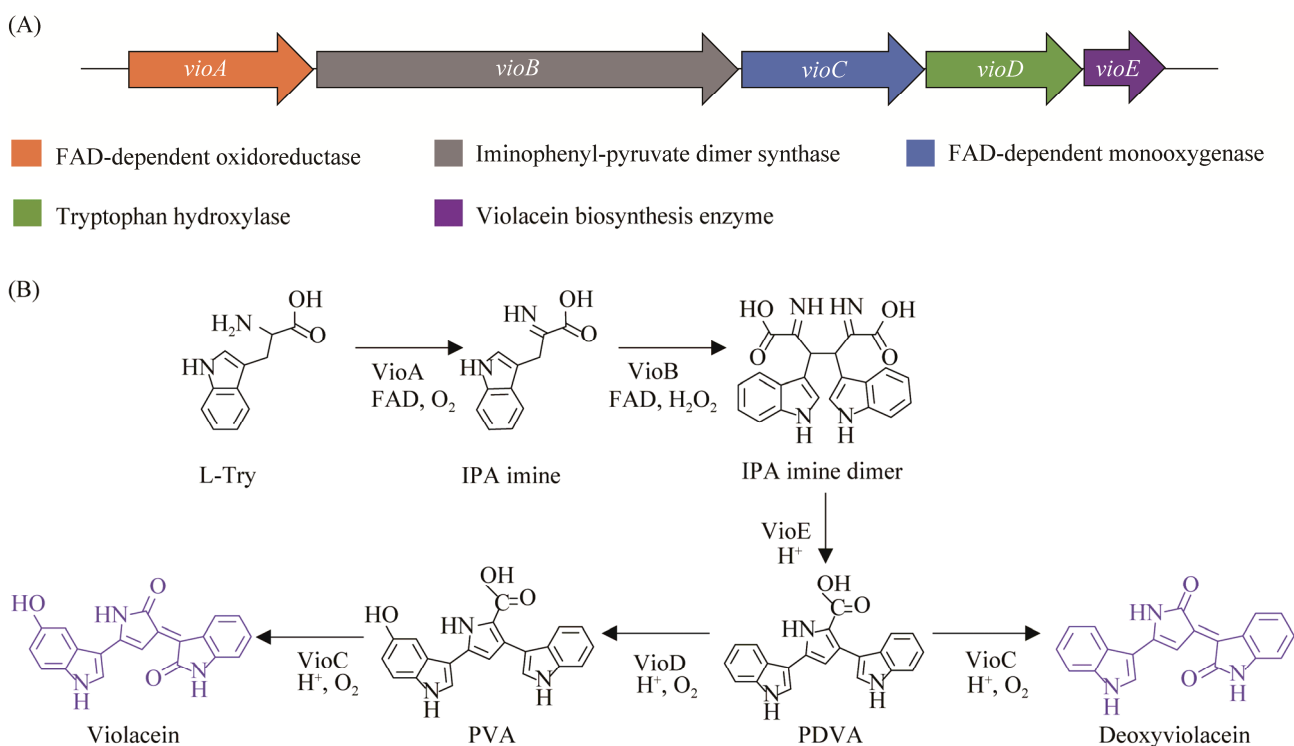


图 1 紫色杆菌素生物合成基因簇(A)及其合成途径(B)

Figure 1 Genetic organization of violacein biosynthetic gene cluster (A) and biosynthetic pathway of violacein (B).

色杆菌素的生物合成途径<sup>[16]</sup>。L-色氨酸经 VioA (FAD 依赖氧化还原酶)氧化形成吲哚-3-丙酮酸亚胺(indole-3-pyruvic acid imine, IPA imine), 后者经 VioB (亚胺苯基丙酮酸二聚体合成酶)催化缩合形成 IPA imine dimer。IPA imine dimer 在 VioE (紫色杆菌素生物合成酶)的作用下形成脱氧紫色杆菌素前体(protodeoxyviolaceinic acid, PDVA), PDVA 在 VioD (色氨酸羟化酶)和 VioC (FAD 依赖单加氧酶)的作用下生成紫色杆菌素。此外, PDVA 可以直接经 VioC 催化形成 DVA, 后者经自发反应形成脱氧紫色杆菌素(图 1B)。

杜擗氏菌是常见于土壤和水等自然环境的革兰氏阴性细菌, 属于变形菌门、 $\beta$  变形菌纲、伯克氏菌目、草酸杆菌科。杜擗氏菌是一类嗜温、好氧、可游动、不产孢的杆状细菌<sup>[17]</sup>。该属的第一个种于 1968 年分离自污水, 并于 1977 年命名为类动胶杜擗氏菌(*Duganella zoogloeoides*)<sup>[18]</sup>。随后, 科研人员陆续从森林土壤、植物叶表、甘蔗根际和河流等环境中分离到了不同的杜擗氏菌<sup>[19-22]</sup>。目前, 对杜擗氏菌在自然生境中的功能知之甚少, 且仅有少数菌株完成了基因组测序<sup>[23]</sup>, 但已有研究表明杜擗氏菌属的部分菌株可以产生紫色杆菌素<sup>[9-11]</sup>。

本研究从茎瘤芥根际分离得到 256 株微生物, 初步鉴定了 120 株, 从中选择一株杜擗氏菌进行了全基因组测序和生物信息分析, 发现该菌含有 9 个次级代谢产物生物合成基因簇(biosynthetic gene clusters, BGCs), 其中 7 个基因簇与已知化合物编码基因簇同源性很低。同时, 我们发现该菌含有紫色杆菌素合成基因簇, 并在其发酵液中分离得到了紫色杆菌素和脱氧紫色杆菌素。此外, 通过分段酶切连接的方法, 克隆得到了紫色杆菌素生物合成基因簇, 并在变铅青链霉菌 TK23 中进行了异源表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品采集

采样地点位于重庆市涪陵区二渡村和邓家村(29°72'N, 107°40'E), 田间随机采取茎瘤芥, 除去泥土后将截取的茎瘤芥根装入洁净的样品袋中, 取回后置于冰箱中保存备用。

#### 1.1.2 培养基

选择 10 种常用的微生物培养基, 用于微生物的分离和纯培养。这些培养基包括: LB (g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 琼脂 12.0; 1/10 LB (g/L): 胰蛋白胨 1.0, 酵母提取物 0.5, NaCl 1.0, 琼脂 12.0; ISP2 (g/L): 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 10.0, 葡萄糖 4.0, 琼脂 20.0, 调节 pH 值至 7.0; ISP3 (g/L): 燕麦片 20.0, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, 琼脂 20.0; ISP4 (g/L): 可溶性淀粉 10.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, NaCl 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0, CaCO<sub>3</sub> 2.0, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, MnCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001, 琼脂 20.0; NA (g/L): 牛肉膏 3.0, 蛋白胨 5.0, 琼脂 12.0; TSA (g/L): TSB 30.0, 琼脂 20.0; Gauze's Synthetic Medium No.1 (g/L): K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, NaCl 0.5, KNO<sub>3</sub> 1.0, 可溶性淀粉 20.0, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 琼脂 20.0; PDA (g/L): 土豆 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0; YEPDA (g/L): 蛋白胨 20.0, 葡萄糖 20.0, 酵母提取物 10.0, 琼脂 12.0。链霉菌培养基包括: MS (g/L): 豆粉 20.0, 甘露醇 20.0, 琼脂 20.0; R5MS (g/L): 葡萄糖 10.0, 酵母提取物 5.0, 酪氨酸 0.1, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.25, MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10.12, TES buffer 5.73, 微量元素 2.0 mL, 琼脂 20.0, 调节 pH 值至 7.2; SCM3 (g/L): 可溶性淀粉 30.0, 黄豆饼粉 10.0, 酵母提取物 2.5, CaCO<sub>3</sub> 5.0。

### 1.1.3 菌株

本研究所用菌株见表 1, 所用质粒见表 2。

本研究所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 引物序列见表 3。

表 1 本研究所用菌株

Table 1 Strains in the study

Strains	Genotype/description	Reference/source
<i>Duganella</i> sp. BjR8	Wild-type, violacein producer	This work
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>relA1, supE44, Δ(lac-proAB)</i> , [F' <i>traD36, proAB, lacI<sup>q</sup>ΔM15</i> ]	Promega
BW25113/pIJ790	K-12 derivative, <i>ΔaraBAD, ΔrhaBAD</i> /pIJ790	[24]
ET12567/pUZ8002	<i>dam dcm hsdS cat tet</i> /pUZ8002	[25]
<i>Streptomyces</i>		
<i>S. lividans</i> TK23	<i>spc-l, SLP2<sup>-</sup>, SLP3<sup>-</sup></i>	[26]
TK23-pSET152	<i>S. lividans</i> TK23 containing pSET152	This work
TK23- <i>vio</i>	<i>S. lividans</i> TK23 containing pSET152:: <i>vio</i>	This work

表 2 本研究所用质粒

Table 2 Plasmids in the study

Plasmids	Relevant characteristics	Reference/source
pBluescript II KS(+)	Routine cloning and subcloning vector, Amp <sup>R</sup>	Stratagene
pSET152	Integrative vector, Apr <sup>R</sup>	[27]
pSET152:: <i>P<sub>hrdB</sub>-neo</i>	pSET152 containing <i>neo</i> driven by <i>hrdB</i> promoter	[28]
pBS:: <i>vio</i>	A derivative of pBluescript II KS(+) containing the violacein biosynthetic gene cluster, Amp <sup>R</sup>	This work
pSET152:: <i>P<sub>hrdB</sub></i>	pSET152 containing the constitutive <i>hrdB</i> promoter, Apr <sup>R</sup>	This work
pSET152:: <i>vio</i> UpDn	pSET152 containing <i>hrdB</i> promoter, 503 bp of <i>vioA</i> and 500 bp <i>orf0372-0373</i> , Apr <sup>R</sup>	This work
pSET152:: <i>vio</i>	A derivative of pSET152 containing the violacein biosynthetic gene cluster with <i>vioA</i> driven by the <i>hrdB</i> promoter, Apr <sup>R</sup>	This work

表 3 本研究所用引物

Table 3 Primers in the study

Primers	Sequences (5'→3')	Purpose
vio 1-F	AATTTCTAGAGGCCCGCCCCGCTCCGTGCAC	PCR 1 620 bp of F1
vio 1-R	AATTGAATTCGGATCCGTGTAGAACTCGACCCCGTGCGG	PCR 1 620 bp of F1
vio 2-F	AATTTCTAGAGGATCCGCAAAGCGCGCATC	PCR 4 121 bp of F2
vio 2-R	AATTCGAGCGCCATGTTTCATGCC	PCR 4 121 bp of F2
vio 3-F	AATTTCTAGACTCGAGGATGTGTACGTCTTCATCACG	PCR of 2 038 bp of F3
vio 3-R	AATTGGTACCCCGGGTTGGATGCGCCGCCG	PCR of 2 038 bp of F3
vio 4-F	AATTTCTAGACCCGGGCGCGGCCGCATCG	PCR of 3 213 bp of F4
vio 4-R	AATTGGTACCACAATGAACGATGCTGAACC	PCR of 3 213 bp of F4
hrdB-F	AATTTCTAGACCGCCTTCCGCCGGAACG	PCR 428 bp of <i>hrdB</i>
hrdB-R	AATTGGATCCGAACAACCTCTCGGAACGTTG	PCR 428 bp of <i>hrdB</i>
vio Up-F	tccgagaggtgttcATGACACAGTATCCGACATTTG	PCR 503 bp of <i>vioA</i>
vio Up-R	AAGCTTTGCGTTTCCGGATGC	PCR 503 bp of <i>vioA</i>
vio Dn-F	tccgaaacgcaaagcttGGATCCGGGCTGCGGAACCAGCTGTG	PCR 500 bp of <i>orf0374</i>
vio Dn-R	ctatgacatgattacgaattcGGTACCACAATGAACGATGCTG	PCR 500 bp of <i>orf0374</i>

Underlined sequences for restriction enzyme recognition sites, and lower case letters for overlapping between DNA sequences.

### 1.1.4 主要试剂和仪器

甲醇和乙腈为国产 HPLC 级; 氨苄青霉素、卡那霉素、安普霉素购自上海生物工程股份有限公司; KOD Plus Neo 购自 TOYOBO 公司; 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司; 电穿孔系统(Bio-Rad Gene Pulser Xcell); PCR 仪(Bio-Rad T100); 恒温培养箱(上海博讯 BXS-250; 上海博讯 BPX-52); 震荡培养箱(上海知楚 ZQZY-85BNA); 溶剂蒸发工作站(GeneVac EZ-2); 全自动凝胶成像分析系统(上海蓝梦 ZF-288); 高效液相色谱仪(岛津 LC-20AR); 高分辨质谱系统(安捷伦 6230); 荧光正置显微镜(Zeiss Axio Imager Z2)。

## 1.2 样品处理与菌株分离及鉴定

首先, 用 75% 的酒精清洗破壁机内腔, 置于紫外下照射 10 min 取出保存的茎瘤芥根, 用无菌的去离子水清洗去除表面的污泥, 用剪刀将根剪碎。称取 20 克根放入破壁机中, 加入 100 mL 无菌水将根破碎至糊状, 经无菌纱布过滤后, 用生理盐水进行梯度稀释。取稀释溶液 100  $\mu$ L 分别涂布于上述 10 种常用微生物培养基, 其中 PDA 和 YEPAD 培养基置于 26  $^{\circ}$ C 培养, 其余培养基置于 28  $^{\circ}$ C 培养。培养 2–5 d, 用平板划线法挑取单菌落于对应的固体培养基上, 继续培养 2–5 d, 期间观察并记录菌落形态。利用通用引物 27F/1492R 和 ITS1/ITS4 分别 PCR 扩增细菌的 16S rRNA 和真菌的 18S rRNA 基因, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 将成功扩增得到的 PCR 产物送至上海生物工程股份有限公司测序。得到的序列用 BioEdit 拼接, 所得序列在 EzBioCloud 和 NCBI 上比对, 获得初步鉴定结果, 并利用 MEGA 7.0 软件构建菌株的系统发育树。

## 1.3 杜辮氏菌 Bjr8 的培养

挑取杜辮氏菌 Bjr8 单菌落, 接种于液体培

养基 PDB 中, 28  $^{\circ}$ C 摇床培养至  $OD_{600}=0.5$ 。吸取液体菌液, 在 PDA、NA、R2A 和 YMA 4 种固体平板上划线, 28  $^{\circ}$ C 培养 3 d 后观察菌落形态。同时, 以 2% 的接种量将菌液接种于 50 mL PDB、NB、R2B 和 YMB 液体培养基中, 28  $^{\circ}$ C 摇床培养 3 d 后观察发酵液的颜色变化。

## 1.4 杜辮氏菌 Bjr8 的系统进化树构建

将杜辮氏菌 Bjr8 的 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud 中进行比对, 选取相似性较高的序列, 同时选取能产生紫色杆菌素的紫色色杆菌(*Chromobacterium violacein*)、蓝黑紫色杆菌(*Janthinobacterium lividum*)、藤黄紫假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas ulvae*)的 16S rRNA 基因序列, 利用 MEGA7.0 构建系统进化树。

## 1.5 基因组测序和生物信息学分析

杜辮氏菌 Bjr8 的基因组由上海美吉公司测序完成, 基因组的特征分析在上海美吉生物的 I-Sanger 云平台([www.i-sanger.com](http://www.i-sanger.com))上完成。利用 antiSMASH 6.0 (<http://antismash.secondarymetabolites.org/>)对菌株的次级代谢产物生物合成基因簇进行分析。

## 1.6 菌株发酵及产物分析鉴定

杜辮氏菌 Bjr8 接种于 50 mL PDB 中, 48 h 后转接至含有 200 mL PDB 的 1 L 锥形瓶中, 28  $^{\circ}$ C 培养 4 d。收集所得 3 L 发酵液, 用乙酸乙酯萃取, 旋干后溶于 50 mL 甲醇, 样品经分子筛分离得到化合物 1 和 2。HPLC 检测条件: 流动相 A 为含 0.1% 甲酸的去离子水, 流动相 B 为乙腈, 流速 1 mL/min, 检测波长为 254。HPLC 洗脱程序为: 0–3 min, 10% 乙腈; 3–15 min, 10%–50% 乙腈; 15–17 min, 50%–90% 乙腈; 17–19 min, 90% 乙腈; 19–21 min, 90%–10% 乙腈; 21–35 min, 10% 乙腈。

## 1.7 基因簇的克隆与异源表达

以 pSET152::P<sub>hrdB</sub>-neo 为模板, 以 hrdB-F/R 为引物, PCR 扩增后可得到 hrdB 启动子片段, 经 Xba I 和 BamH I 酶切后连接到 pSET152 的相应位点得到重组质粒 pSET152::P<sub>hrdB</sub>。以杜辮氏菌 BjR8 基因组为模板, 以 vio Up-F/R 为引物, 扩增得到 503 bp 的 vioA 部分片段, 以 vio Dn-F/R 为引物, 扩增得到 500 bp 的 orf0372-orf0373 片段, 通过重叠延伸 PCR (overlap PCR) 将 2 个片段拼接在一起, 通过同源重组连入预先用 BamH I/EcoR I 线性化的 pSET152::P<sub>hrdB</sub>, 得到重组质粒 pSET152::vioUpDn。以杜辮氏菌 BjR8 的基因组为模板, 分 4 个片段克隆紫色杆菌素基因簇, 依次经酶切连接到 pBluescript II KS(+) 得到重组质粒 pBS::vio。通过 PCR-targeting 的方法, 将基因簇转移到预先用 BamH I 线性化的 pSET152::vioUpDn, 得到重组质粒 pSET152::vio。将 pSET152::vio 转入大肠杆菌 ET12567/pUZ8002 中, 通过接合转移导入变铅青链霉菌 TK23 中<sup>[26]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 茎瘤芥根际微生物的分离与初步鉴定

我们随机采集了重庆市涪陵区二渡村和邓家村的茎瘤芥根, 选用 10 种常用微生物培养基对根际及内生微生物进行分离和纯培养, 共得到微生物 256 株。首先, 通过观察菌落形态、大小、颜色和干湿等特征, 将菌株大致分为细菌 (229 株) 和真菌 (27 株)。随后, 使用通用引物分别对细菌的 16S rRNA 基因和真菌 18S rRNA 基因进行 PCR 扩增, 所得 PCR 产物进行测序和序列分析, 对其中 120 个菌株进行了鉴定。通过构建系统发育树对这些菌株进行了初步分析, 发现细菌主要包括变形菌门 (Proteobacteria)、厚壁菌门 (Firmicutes) 和放线菌门 (Actinobacteria), 分别

归于 35 个属, 共 95 个种 (图 2), 其中链霉菌属 (Streptomyces) 的菌株最多 (36 株), 其次为芽孢杆菌属 (Bacillus) (11 株)。真菌仅有子囊菌门 (Ascomycota), 分别归属于 10 个属, 共 25 个种, 其中青霉属 (Penicillium) 和篮状菌属 (Talaromyces) 种类较多。以上结果表明, 茎瘤芥根含有丰富多样的微生物, 其中细菌更为丰富。

### 2.2 杜辮氏菌 BjR8 的形态特征与初步鉴定

分离的菌株中有 2 株杜辮氏菌 BjR8 和 BjR16, 分别分离自 PDA 和 Gauze's Synthetic Medium No.1 培养基, 其中 BjR8 在 PDA 平板上呈现紫色菌落, 后续研究主要围绕 BjR8 展开。首先, 将杜辮氏菌 BjR8 分别接种在 4 种不同的固体培养基 (PDA、R2A、YMA 和 NA) 平板上, 培养 3 d 后对菌株形态进行了观察, 发现 BjR8 在 4 种固体培养基上均呈现紫色 (图 3A), 菌落表面光滑、湿润、黏稠, 在 PDA、YMA 和 NA 培养基上呈圆形凸起, 在 R2A 培养基上呈不规则凸起 (图 3B)。将该菌株分别接种于相应的液体培养基中, 培养 3 d 后, 发现 PDB 发酵液呈深紫色, R2B 发酵液呈淡紫色, 而 YMB 和 NB 发酵液则呈现黄色 (图 3C), 我们推测该菌在 PDB 和 R2B 中可以产生紫色化合物。此外, 我们对液体培养液中的菌株形态进行了显微观察, 发现 BjR8 在 4 种液体培养基中均呈短杆状 (图 3D)。以上结果表明, BjR8 是一株可以产生紫色化合物的短杆状细菌。为了进一步鉴定 BjR8, 将其 16S rRNA 基因序列 (ON384039.1) 在 NCBI 中进行 Blast 比对分析, 选取部分同源序列, 利用 MEGA 7.0 构建系统进化树, 结果发现 BjR8 与 Duganella aceris strain SAP-35 的亲缘关系最近 (图 4), 其同源性为 98.56%, 将其命名为 Duganella sp. BjR8。

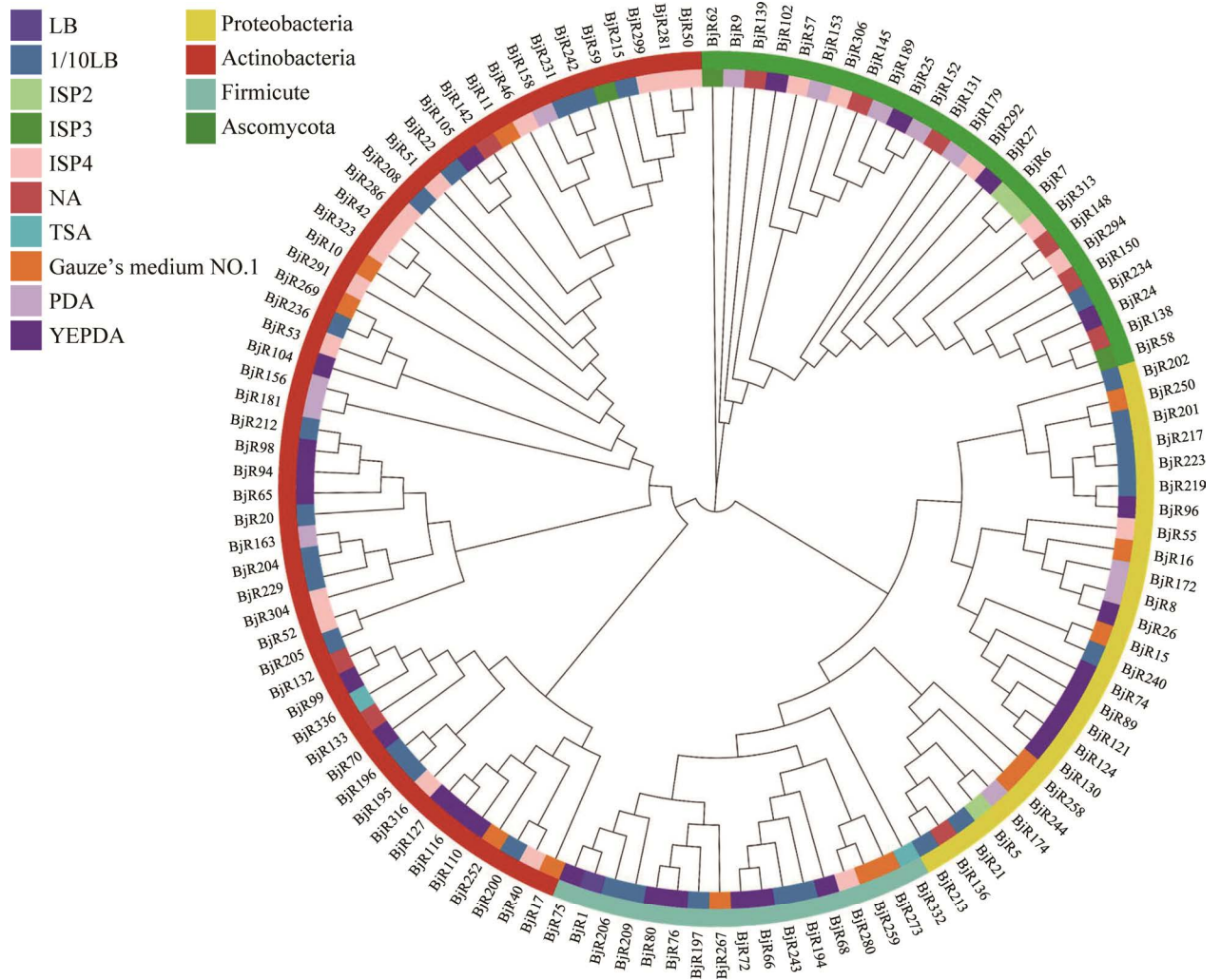


图 2 茎瘤芥根际分离微生物菌株的系统发育特征 从内圈到外圈的环分别代表分离菌株所用培养基和菌株所属门类，最外层表示分离微生物菌株的保存编号

Figure 2 Cladogram depicting the phylogenetic relationship among 120 isolates from Chinese mustard rhizosphere. The inner ring depicts the medium used for culture of the isolated microbial strains. The outer ring shows the four phyla to which the isolates belong. The outermost tag indicates strain numbers.

### 2.3 基因组测序及分析

Illumina HiSeq 二代测序质控数据显示，插入序列长 480 bp，原始 reads 读长 150 bp，经过一系列的质量剪切之后得到的高质量 reads，质控后的 reads 用来进行基因组组装，Circos 基因组如图 5 所示。PacBio 三代测序结果显示，总 Reads 的数量为 210 407，平均 reads 读长 7 361.95 bp，总碱基长 1 549 006 813 bp。测序

得到的基因组信息显示，该菌株为杜擻氏菌，其基因组为一条环状染色体，全长 7 205 593 bp，平均 GC 含量为 64.67%。预测有 6 241 个编码基因，基因总长度 6 579 390 bp，占基因组百分比为 91.31%，平均长度 1 054 bp。基因组中有 84 个 tRNA，共 21 种类型，其中 rRNA 共有 14 个，包括 16S rRNA 和 23S rRNA 各 7 个(表 4)。进一步分析发现 KEGG 数据库中共有 3 001 个基因，



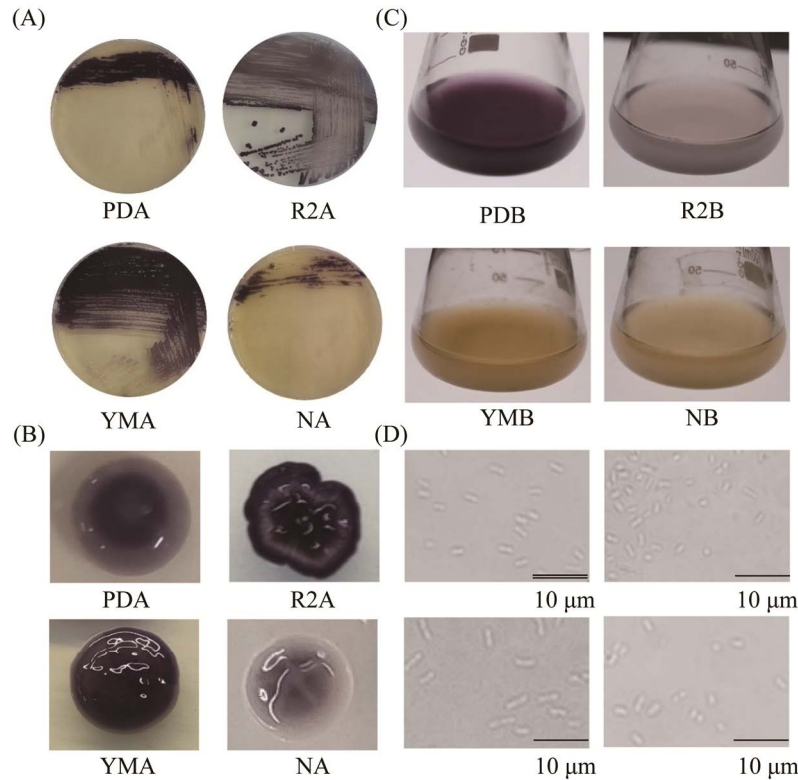


图 3 杜擗氏菌 *BjR8* 在不固体培养基上(A, B)和液体培养基中的生长情况(C, D)

Figure 3 Growth of *Duganella* sp. *BjR8* on different solid media (A, B) or in liquid media (C, D).

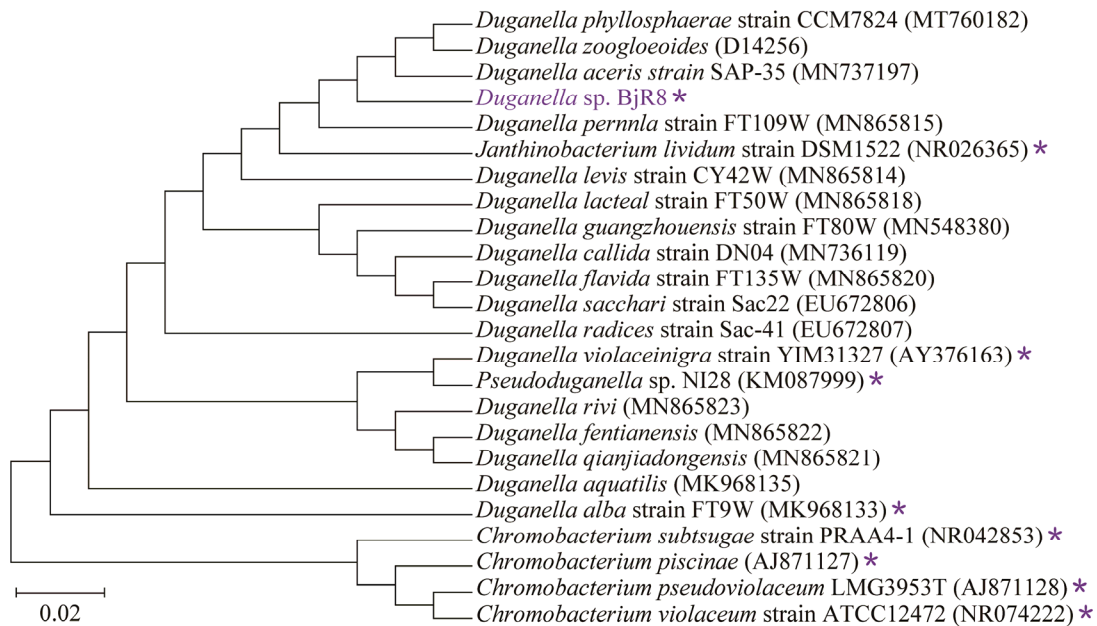


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree showing the relationships between *Duganella* sp. *BjR8* and closely related species. Violacein-producing strains were indicated with a purple star, and numbers in parentheses represent accession numbers of 16S RNA sequences in GenBank.

表 4 杜辮氏菌 BJR8 的基因组特征

Table 4 Genomic characteristics of *Duganella* sp. BJR8

Feature	Chromosome characteristics
Chromosome size/bp	7 205 593
G+C content/%	64.67
Predicted genes	6 241
rRNA operons	14
tRNA genes	84
sRNA genes	29
Genes assigned to COG	5 479
Genes assigned to GO	1 720
Genes assigned to KEGG	3 001
CRISPR repeat regions	65
Prophages	0
Simple tandem repeats	178
Interspersed repeats	56
Genomic islands	7
Carbohydrate-active enzymes	237
Transposable element	4
Antibiotic resistance genes	386
Virulence factors	858
Secondary metabolite gene clusters	9

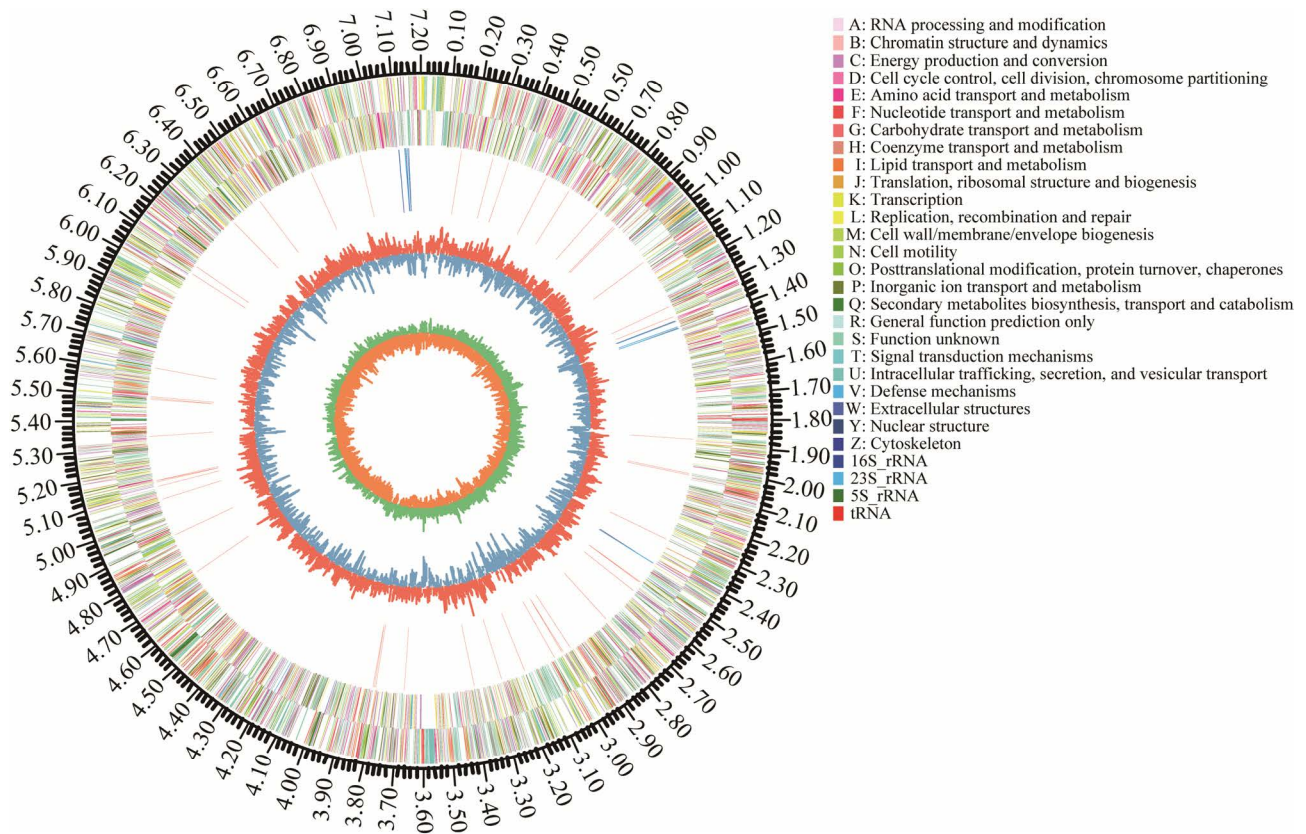


图 5 杜辮氏菌 BJR8 的基因组图

Figure 5 Circular genome map of *Duganella* sp. BJR8. Starting from the inner circle moving outwards, the following tracks are shown: GC-Skew, G+C content, rRNA and tRNA, predicted protein coding genes on forward and reverse strand, and genome size.

占基因数目的 48.09%，根据其功能主要分为胞内生命过程(cellular processes)、代谢(metabolism)、人类疾病(human diseases)、遗传信息处理(genetic information processing)、有机体生命系统(organismal systems)和环境信息处理(environmental information processing) 6类,其中代谢相关基因数目为 2 465 个(图 6)。在 COG 数据库中共有 5 479 个基因, 占总基因数目的 87.79%, 包括 22 种类型, 除了未知功能基因外, 信号转导机制(signal transduction mechanisms)和转录(transcription)相关基因数目最多, 分别为

443 个和 419 个(图 7)。GO 数据库中共 1 720 个基因, 占总基因数目的 27.56%, 根据功能不同这些基因被分为 3 类, 包括分子功能(molecular function)、细胞组成(cellular component)和生物过程(biological process) (图 8)。

为了评估杜榭氏菌 Bjr8 的次级代谢产物合成能力, 对其基因组序列进行了 antiSMASH 分析, 共发现 9 个次级代谢产物生物合成基因簇, 分别命名为基因簇 1–9 (表 5), 其中包含 1 个非核糖体多肽合成酶(NRPS)类、1 个聚酮合成酶(PKS)类、1 个 NRPS-PKS 类、4 个核糖体

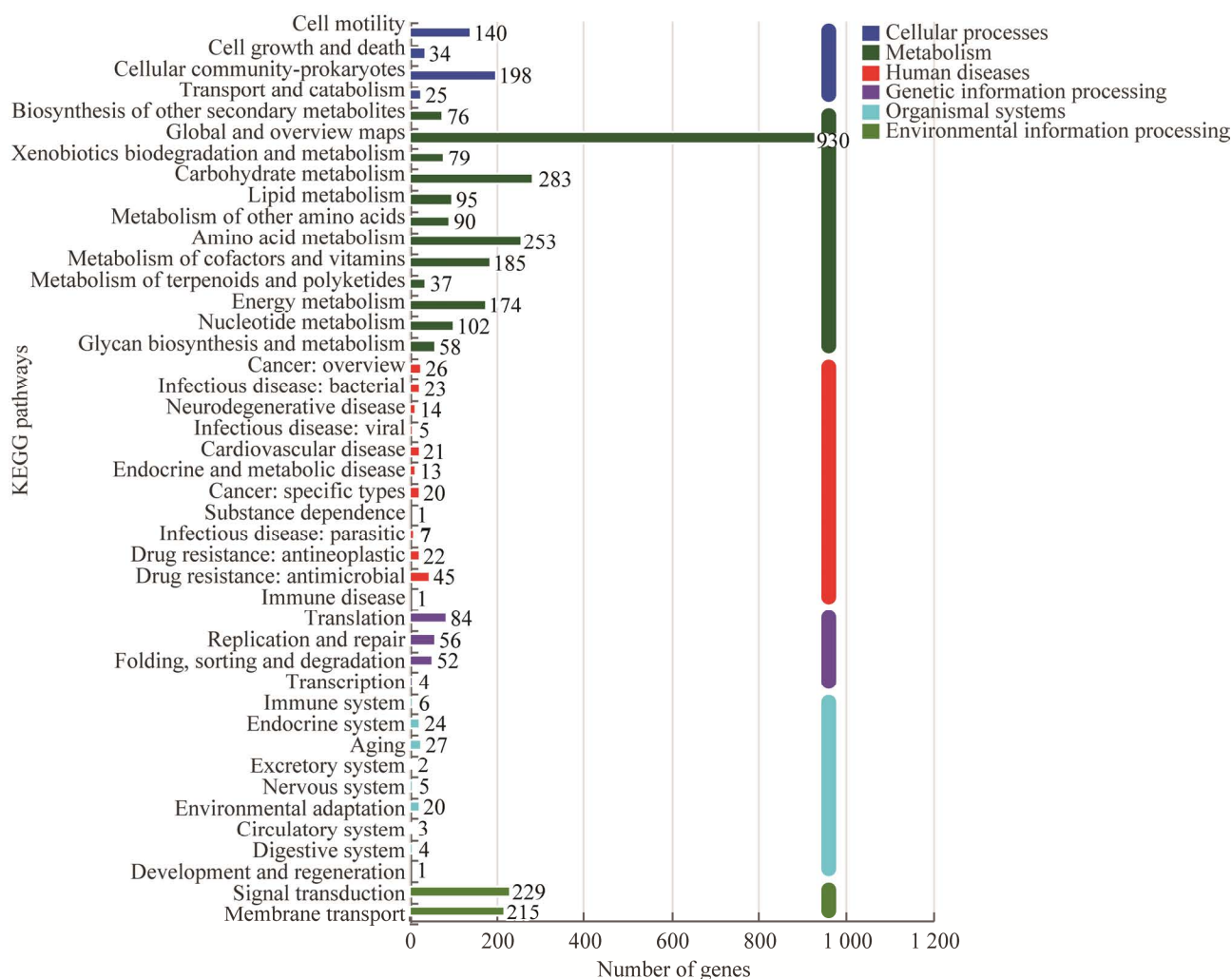


图 6 杜榭氏菌 Bjr8 基因组 KEGG 数据库注释结果

Figure 6 The annotation result of *Duganella* sp. Bjr8 genome against KEGG database.

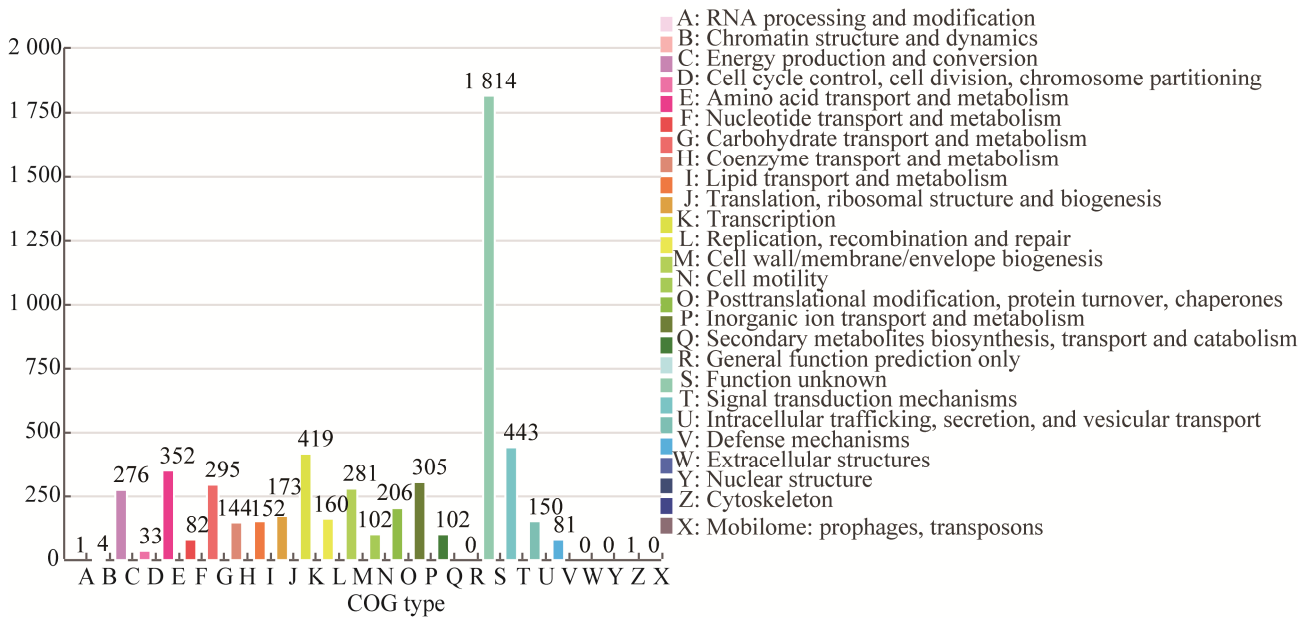


图 7 杜辮氏菌 BjR8 基因组 COG 数据库注释结果

Figure 7 The annotation result of *Duganella* sp. BjR8 genome against COG database.

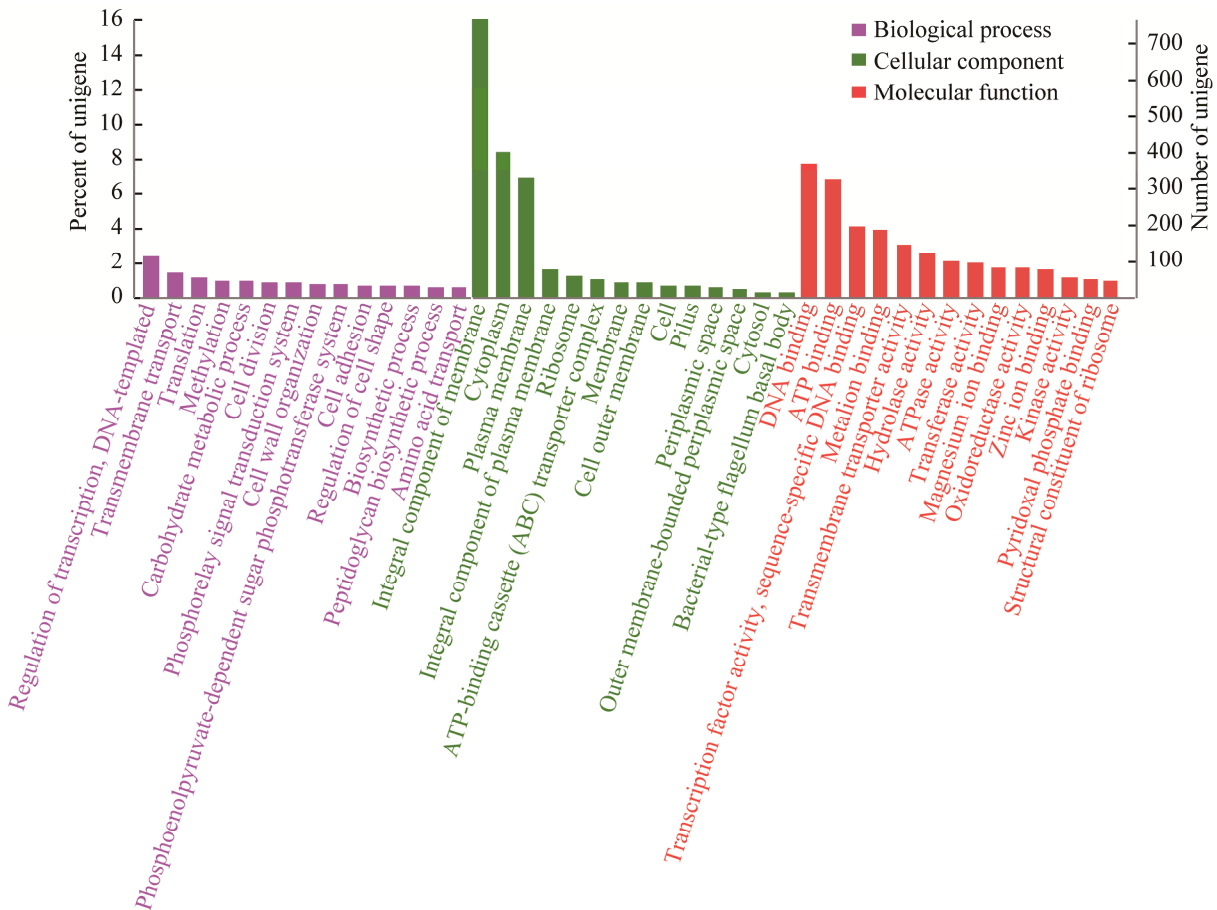


图 8 杜辮氏菌 BjR8 基因组 GO 数据库注释结果

Figure 8 The annotation result of *Duganella* sp. BjR8 genome against GO database.

合成和翻译后修饰多肽(RiPP)类、1个萜类(terpene)和1个生物碱(alkaloid)类。其中,基因簇2与来自 *Duganella* sp. B2<sup>[29]</sup>的紫色杆菌素基因簇有100%的同源性,与来自紫色色杆菌(*Chromobacterium violaceum*)<sup>[30]</sup>的紫色杆菌素基因簇有80%的同源性,基因簇9与来自费氏弧菌(*Vibrio fischeri*) ES114<sup>[31]</sup>的APE基因簇有40%的同源性,其余7个基因簇与已知化合物编码基因簇同源性很低,说明该菌具有产生多种新型化合物的潜力。

#### 2.4 紫色杆菌素的鉴定

基于杜擗氏菌 Bjr8 的形态观察及基因组序列分析,我们预测该菌具备产生紫色杆菌素的能力。为了验证这一推测,我们收集了 PDB、R2B、YMB 和 NB 的发酵液,通过 HPLC 分析在 PDB 发酵液中检测到2个明显的峰,其保留时间分别为 21.1 min 和 22.3 min,分别命名为化合物 1 和 2 (图 9A)。在 R2B 和 YMB 中也检测到这2个化合物,但其峰值明显偏低,而在 NB 中几乎未检测到这两个峰的存在(图 9A)。HRMS 分析发现化合物 1 的分子量为 344.094 1 [M+H]<sup>+</sup>,化合物 2 的分子量为 328.099 5 [M+H]<sup>+</sup> (图 9B),确定化合物 1 为紫色杆菌素,化合物 2 为脱氧紫色杆菌素。以上结果表明,杜擗氏菌 Bjr8 可以产生紫色杆菌素和脱氧紫色杆菌素,且在 PDB 培养基中产量较高。

#### 2.5 紫色杆菌素基因簇的克隆及其异源表达

综上所述,杜擗氏菌 Bjr8 基因组中有一个紫色杆菌素基因簇(基因簇 2),进一步分析发现,该基因簇由一个转录单元组成 *orf0366-0370*,其编码产物分别为 VioA-E 的同源蛋白(表 6)。为了进一步验证该基因簇负责紫色杆菌素的生物合成,我们首先以杜擗氏菌 Bjr8 基因组为模板,通过 PCR 分别获得涵盖整个基因簇的4个 DNA 片段 F1-F4,依次经酶切、连接将其克隆到

pBluescript II KS(+)上,得到重组质粒 pBS::vio (图 10A)。随后,通过 PCR-targeting 的方法,将基因簇转移到链霉菌整合型质粒 pSET152 上,得到重组质粒 pSET152::vio (图 10A)。值得一提的是,在 pSET152::vio 中, *vioABCDE* 表达由组成型 *hrdB* (天蓝色链霉菌 sigma 70 编码基因)启动子控制。获得的重组质粒经 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳检测,发现电泳条带与预期一致(图 10B),说明我们成功克隆得到了紫色杆菌素基因簇。

将重组质粒 pSET152::vio 通过接合转移导入变铅青链霉菌 TK23 中,得到重组菌株 TK23-vio。同时,将质粒 pSET152 导入变铅青链霉菌 TK23 中,得到对照菌株 TK23-pSET152。将变铅青链霉菌 TK23、TK23-pSET152 和 TK23-vio 分别接种于 R5MS 平板上,结果发现 TK23 和 TK23-pSET152 呈现红色,而 TK23-vio 呈现紫色(图 11A),说明紫色杆菌素基因簇在链霉菌中成功异源表达。将 TK23、TK23-pSET152 和 TK23-vio 分别在 SCM3 中进行发酵,结果显示,只有 TK23-vio 的发酵液呈现明显的紫色(图

表 5 杜擗氏菌 Bjr8 基因组的 antiSMASH 分析  
Table 5 antiSMASH analysis of the genome sequence of *Duganella* sp. Bjr8

Cluster	Type	From	To	Most similar known BGC
1	RiPP	30 602	41 295	unknow
2	Alkaloid	419 316	442 337	Violacein
3	RiPP	585 161	607 099	unknow
4	RiPP	1 604 586	1 613 666	unknow
5	RiPP	2 181 326	2 192 973	unknow
6	Terpene	3 783 019	3 806 355	unknow
7	NRPS	3 914 526	4 005 801	unknow
8	PKS	4 507 847	4 559 826	unknow
9	NRPS-PKS	5 627 658	5 671 264	APE Vf

表 6 杜辏氏菌 BJR8 紫色杆菌素生物合成基因的功能分析

Table 6 Summary of genes within the violacein biosynthetic gene cluster of *Duganella* sp. BJR8

ORF	No. of amino acids	Proposed function	Protein Homology	Amino acid Identity/%
<i>vioA</i>	435	FAD-dependent oxidoreductase	<i>Rugamonas</i> sp. FT81W FAD-dependent oxidoreductase (WP_161087100.1)	423/434 (97)
<i>vioB</i>	1 007	Iminophenyl-pyruvate dimer synthase	<i>Rugamonas</i> sp. FT81W iminophenyl-pyruvate dimer synthase VioB (WP_161087101.1)	974/1 006 (97)
<i>vioC</i>	431	FAD-dependent monooxygenase	<i>Rugamonas</i> sp. FT81W FAD-dependent monooxygenase (OFA07151.1)	426/430 (99)
<i>vioD</i>	373	Tryptophan hydroxylase	<i>Rugamonas</i> sp. FT81W tryptophan hydroxylase (MYM98255.1)	364/372 (98)
<i>vioE</i>	190	Violacein biosynthesis enzyme	<i>Rugamonas</i> sp. FT81W violacein biosynthesis enzyme VioE (WP_161087104.1)	183/189 (97)

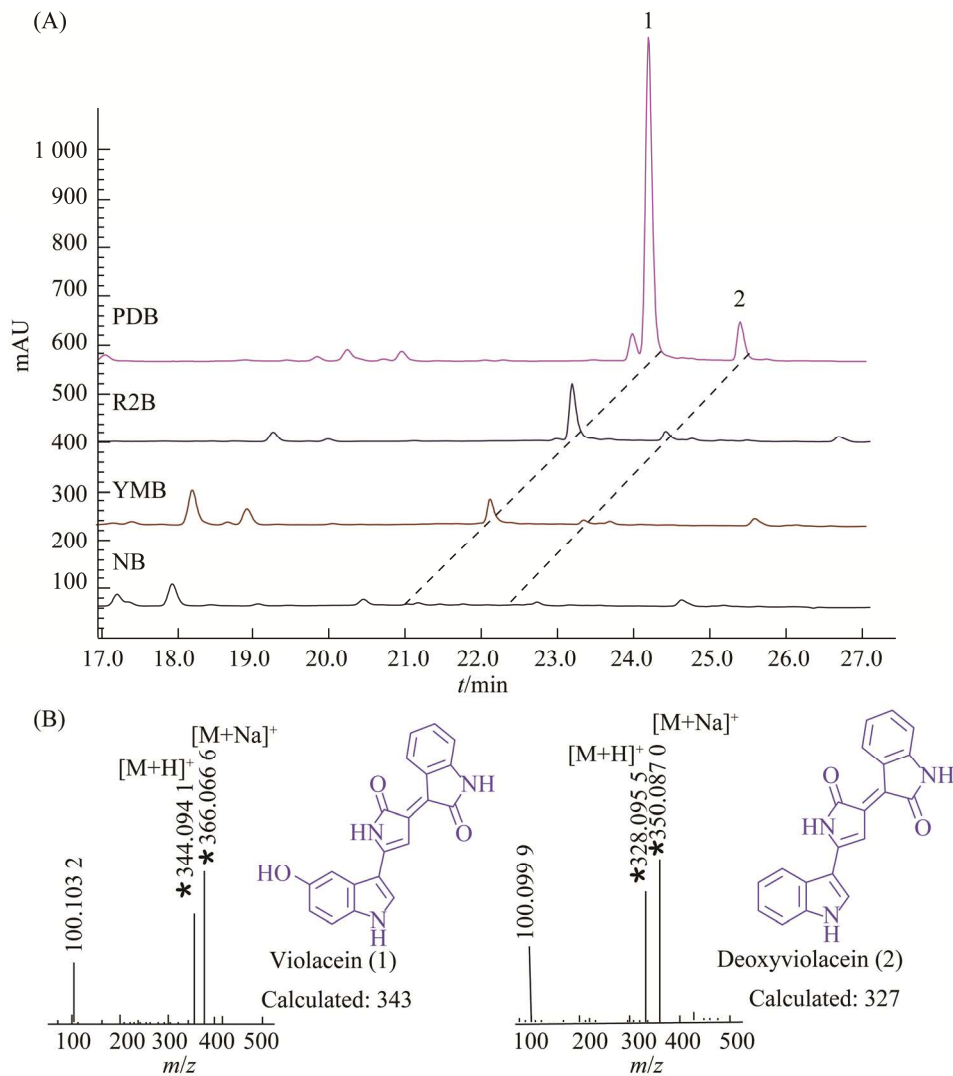


图 9 杜辏氏菌 BJR8 发酵液的 HPLC 分析及其产物的 HRMS 分析

Figure 9 HPLC analysis of *Duganella* sp. BJR8 in different fermentation media (A) and the result of HRMS analysis of Compounds 1 and 2 (B). 1: violacein; 2: deoxyviolacein.

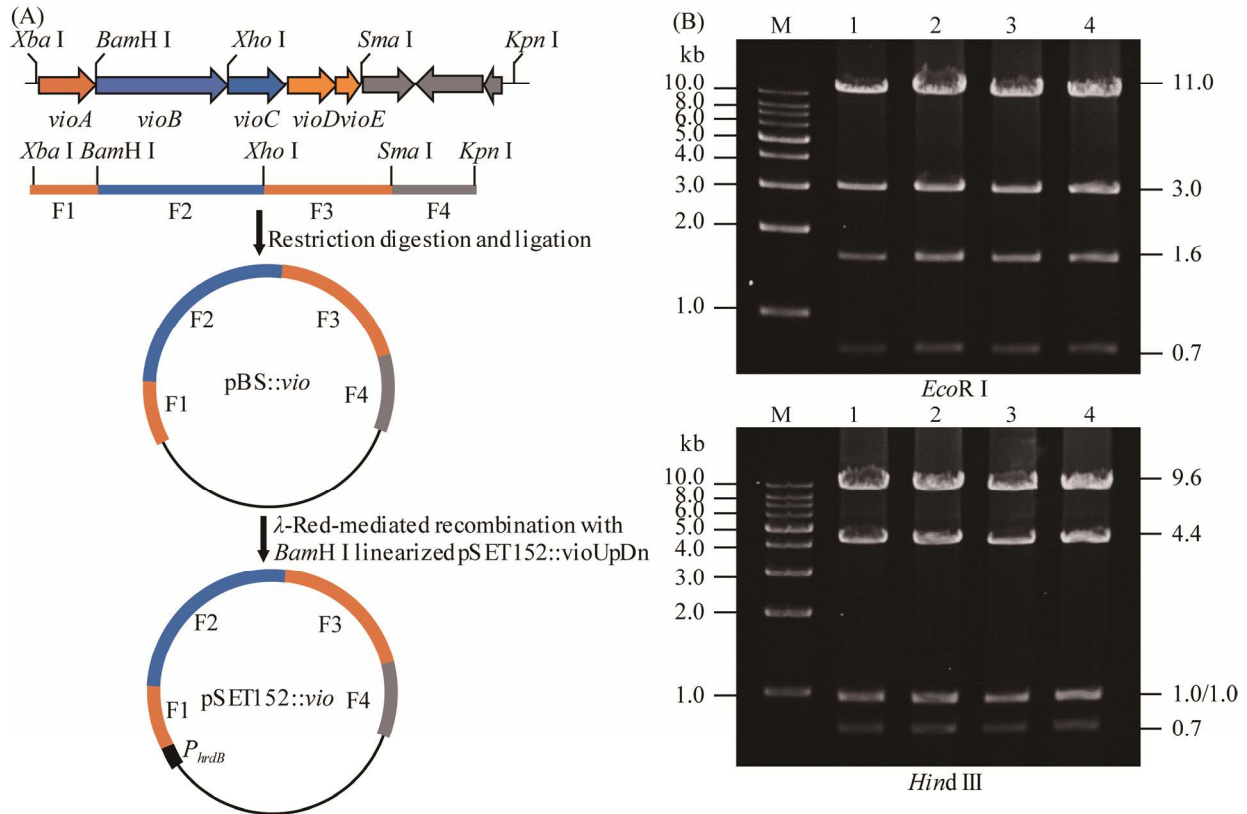


图 10 重组质粒 pSET152::vio 的构建示意图及其酶切验证

Figure 10 A simplified schematic diagram for the construction of pSET152::vio (A) and confirmation of the recombinant plasmids by restriction digestion (B).

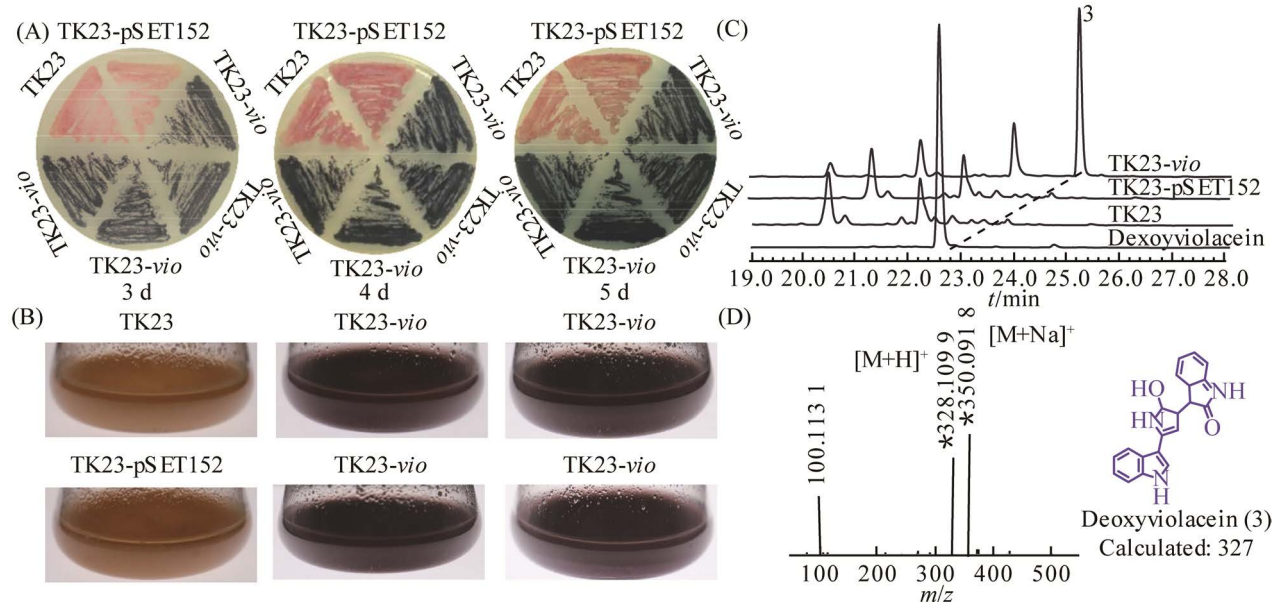


图 11 紫色杆菌素基因簇的异源表达及其产物鉴定 链霉菌菌株在 R5MS 固体平板上的表征(A), 在 SCM3 液体培养基中发酵(B)以及发酵液的 HPLC 分析(C)和 HRMS 检测(D)

Figure 11 Heterologous expression of the *vioABCDE* gene cluster in *S. lividans* TK23. The recombinant strains were cultivated on R5MS solid plates (A), in liquid SCM3 (B), and the fermentation broths were subjected to HPLC analysis (C) and HRMS analysis (D).

11 B)。取发酵液进行 HPLC 检测,发现 TK23-*vio* 在 22.3 min 有新化合物的积累(图 11C), HRMS 检测该化合物的分子量为 328.109 8 [M+H]<sup>+</sup> (图 11D),说明 *vio* 基因簇成功在变铅青链霉菌 TK23 中实现异源表达,且其表达产物为脱氧紫色杆菌素,并未检测到紫色杆菌素。

### 3 讨论

近年来,国内外研究人员对植物的根际微生物群落进行了较为系统的研究<sup>[32-36]</sup>,茎瘤芥根际微生物群落多样性的报道却明显偏少。罗远莉等对茎瘤芥根肿病发病程度不同的土壤中微生物多样性进行了研究,发现不同发病程度土壤中细菌和真菌种类存在差异<sup>[4]</sup>。王殿东等对茎瘤芥根肿病不同发病时期根际土壤真菌群落变化进行了研究,发现不同发病时期真菌菌群的变化规律<sup>[5]</sup>。本研究在重庆市涪陵区二渡村和邓家村随机采集了的茎瘤芥根,从中分离得到 256 株菌,并对其中 120 株菌进行了鉴定,对其微生物群落多样性进行了初步研究。后续研究中,我们计划增加不同样品的采集,如不同区域选择、不同生长时期和不同病害程度等,通过宏基因组测序对茎瘤芥根际微生物组的多样性进行系统深入的研究,结合微生物纯培养技术,建立茎瘤芥根际微生物菌种资源库。

植物根际微生物不仅在植物生长发育、胁迫耐受和病原抵御等方面发挥着重要的作用,而且是一个重要的微生物资源宝库,其中蕴藏了丰富多样的遗传资源。我们从分离鉴定的微生物菌株中选择了一株杜辮氏菌 BJR8,进行了基因组测序和生物信息学分析,发现该菌含有 9 个次级代谢基因簇,其中 7 个与已知化合物编码基因簇同源性很低,说明该菌具有产生多种类型新化合物

的合成潜力。目前,正在通过不同技术手段,对这 7 个基因簇进行功能解析,以期获得具有新结构新功能的次级代谢产物。

杜辮氏菌 BJR8 基因组中含有一个紫色杆菌素生物合成基因簇,通过分片段克隆,我们获得了完整的紫色杆菌素基因簇,并将其导入不同异源宿主中进行异源表达。目前,已成功在变铅青链霉菌 TK23 中实现了异源表达,并检测到紫色杆菌素的结构类似物脱氧紫色杆菌素,但未检测到紫色杆菌素。据文献报道,紫色杆菌素的生物合成由 *vioABCDE* 负责完成,其中脱氧紫色杆菌素的合成由其中的一个分支途径完成,需要其中 4 个基因 *vioA*、*vioB*、*vioC* 和 *vioE* 的参与,而紫色杆菌素合成除了这 4 个基因外,还需要 *vioD* 的参与。考虑到 5 个基因组成一个转录单元 *vioABCDE*,而且 *vioD* 位于 *vioE* 之前,我们推测 *vioD* 可以在链霉菌中正常转录,我们未检测到紫色杆菌素可能是由于 *vioD* 的翻译水平或蛋白稳定性欠佳所致,相关机制解析正在进行之中。

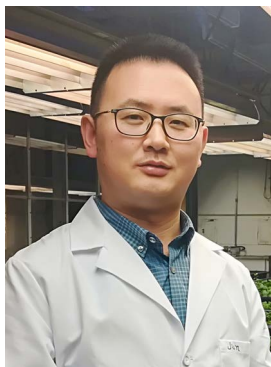
### 参考文献

- [1] 邹瑞昌, 罗云米, 陈磊, 王爱民, 鞠丽萍, 杜纪艳, 万正杰. 重庆茎瘤芥(榨菜)优良品种介绍及优质高效栽培技术. 长江蔬菜, 2021, 15: 11-14.  
Zou RC, Luo YM, Chen L, Wang AM, Ju LP, Du JY, Wan ZJ. Introduction of good cultivars of *Brassica juncea* var. *tumida* Tsen et Lee in Chongqing and its good quality and high efficiency cultivation techniques. *Journal of Changjiang Vegetables*, 2021, 15: 11-14. (in Chinese)
- [2] 陈春明, 刘峻希, 况睿. 重庆涪陵区: 打好绿色“五张牌”念好榨菜发展经. 乡村振兴, 2022, 2: 2.
- [3] Trivedi P, Leach JE, Tringe SG, Sa TM, Singh BK. Plant-microbiome interactions: from community assembly to plant health. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(11): 607-621.
- [4] 罗远莉, 董代文, 王旭一, 蒋欢, 阎玉芳. 茎瘤芥根



- 肿病根际土壤微生物菌落多样性. 中国园艺学会, 2013, 9: 204–214.
- Luo YL, Dong DW, Wang XY, Jiang H, Yan YF. Microbe diversity of rhizosphere soil of *Brassica Juncea* var. *tumida* infected by *Plasmodiophora brassicae*. *Chinese Society for Horticultural Science*, 2013, 9: 204–214. (in Chinese)
- [5] 王殿东, 谭永忠, 田雪亮, 张超, 秦明一, 潘丽梅. 茎瘤芥(榨菜)根肿病不同发病时期根际土壤真菌群落变化特征的高通量分析. *中国蔬菜*, 2016, 5: 33–37. Wang DD, Tan YZ, Tian XL, Zhang C, Qin MY, Pan LM. High throughput analysis on change characteristics of rhizosphere soil fungal community during different occurrence times of tuber mustard clubroot disease. *China Vegetables*, 2016, 5: 33–37. (in Chinese)
- [6] Pemberton JM, Vincent KM, Penfold RJ. Cloning and heterologous expression of the violacein biosynthesis gene cluster from *Chromobacterium violaceum*. *Current Microbiology*, 1991, 22(6): 355–358.
- [7] Pantanella F, Berlutti F, Passariello C, Sarli S, Morea C, Schippa S. Violacein and biofilm production in *Janthinobacterium lividum*. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 102(4): 992–999.
- [8] Zhang X, Enomoto K. Characterization of a gene cluster and its putative promoter region for violacein biosynthesis in *Pseudoalteromonas* sp. 520P1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(6): 1963–1971.
- [9] Aranda S, Montes-Borrego M, Landa BB. Purple-pigmented violacein-producing *Duganella* spp. inhabit the rhizosphere of wild and cultivated olives in Southern Spain. *Microbial Ecology*, 2011, 62(2): 446–459.
- [10] Choi SY, Kim S, Lyuck S, Kim SB, Mitchell RJ. High-level production of violacein by the newly isolated *Duganella violaceinigra* str. NI28 and its impact on *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 15598.
- [11] Wang H, Jiang P, Lu Y, Ruan Z, Jiang R, Xing XH, Lou K, Wei D. Optimization of culture conditions for violacein production by a new strain of *Duganella* sp. B2. *Biochemical Engineering Journal*, 2009, 44(2): 119–124.
- [12] Andrighetti-Frohner CR, Antonio RV, Creczynski-Pasa TB, Barardi CR, Simoes CM. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 2003, 98(6): 843–848.
- [13] Sasidharan A, Sasidharan NK, Amma DB, Vasu RK, Nataraja AV, Bhaskaran K. Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522). *Journal of Microbiology*, 2015, 53(10): 694–701.
- [14] Cauz ACG, Carretero GPB, Saraiva GKV, Park P, Mortara L, Cuccovia IM, Brocchi M, Gueiros-Filho FJ. Violacein targets the cytoplasmic membrane of bacteria. *ACS Infectious Diseases*, 2019, 5(4): 539–549.
- [15] Cazoto LL, Martins D, Ribeiro MG, Duran N, Nakazato G. Antibacterial activity of violacein against *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 2011, 64(5): 395–397.
- [16] Park H, Park S, Yang YH, Choi KY. Microbial synthesis of violacein pigment and its potential applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2021, 41(6): 879–901.
- [17] Whitman WB. *Bergey's Manual of Systematic of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Inc., 2015.
- [18] Hiraishi A, Shin YK, Sugiyama J. Proposal to reclassify *Zoogloea ramigera* IAM 12670 (P. R. Dugan 115) as *Duganella zoogloeooides* gen. nov., sp. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, 47(4): 1249–1252.
- [19] Kampfer P, Wellner S, Lohse K, Martin K, Lodders N. *Duganella phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the leaf surface of *Trifolium repens* and proposal to reclassify *Duganella violaceinigra* into a novel genus as *Pseudoduganella violaceinigra* gen. nov., comb. nov.. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35(1): 19–23.
- [20] Li WJ, Zhang YQ, Park DJ, Li CT, Xu LH, Kim CJ, Jiang CL. *Duganella violaceinigra* sp. nov., a novel mesophilic bacterium isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary*

- Microbiology*, 2004, 54(Pt 5): 1811–1814.
- [21] Lu H, Deng T, Liu F, Wang Y, Yang X, Xu M. *Duganella alba* sp. nov., *Duganella aquatilis* sp. nov., *Duganella margarita* sp. nov. and *Duganella levis* sp. nov., isolated from subtropical streams in China. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(6): 3801–3808.
- [22] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Saravanan VS, Hari K, Lee KC, Lee JS. *Duganella sacchari* sp. nov. and *Duganella radices* sp. nov., two novel species isolated from rhizosphere of field-grown sugar cane. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(Pt 3): 1126–1131.
- [23] Haack FS, Poehlein A, Kroger C, Voigt CA, Piepenbring M, Bode HB, Daniel R, Schafer W, Streit WR. Molecular keys to the *Janthinobacterium* and *Duganella* spp. interaction with the plant pathogen *Fusarium graminearum*. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1668.
- [24] Gust B, Challis GL, Fowler K, Kieser T, Chater KF. PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *PNAS*, 2003, 100(4): 1541–1546.
- [25] Paget MS, Chamberlin L, Atrih A, Foster SJ, Buttner MJ. Evidence that the extracytoplasmic function sigma factor *sigmaE* is required for normal cell wall structure in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(1): 204–211.
- [26] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, and Hopwood DA. Practical *Streptomyces* Genetics. John Innes Foundation, 2000.
- [27] Bierman M, Logan R, O'Brien K, Seno ET, Rao RN, Schonher BE. Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp.. *Gene*, 1992, 116(1): 43–49.
- [28] Du D, Zhu Y, Wei J, Tian Y, Niu G, Tan H. Improvement of gougertin and nikkomycin production by engineering their biosynthetic gene clusters. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(14): 6383–6396.
- [29] Jiang PX, Wang HS, Zhang C, Lou K, Xing XH. Reconstruction of the violacein biosynthetic pathway from *Duganella* sp. B2 in different heterologous hosts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(4): 1077–1088.
- [30] August PR, Grossman TH, Minor C, Draper MP, MacNeil IA, Pemberton JM, Call KM, Holt D, Osburne MS. Sequence analysis and functional characterization of the violacein biosynthetic pathway from *Chromobacterium violaceum*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2000, 2(4): 513–519.
- [31] Cimermanic P, Medema MH, Claesen J, Kurita K, Wieland Brown LC, Mavrommatis K, Pati A, Godfrey PA, Koehrsen M, Clardy J, Birren BW, Takano E, Sali A, Linington RG, Fischbach MA. Insights into secondary metabolism from a global analysis of prokaryotic biosynthetic gene clusters. *Cell*, 2014, 158(2): 412–421.
- [32] Ding LJ, Cui HL, Nie SA, Long XE, Duan GL, Zhu YG. Microbiomes inhabiting rice roots and rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology*, 2019, 95(5): fiz040.
- [33] Donn S, Kirkegaard JA, Perera G, Richardson AE, Watt M. Evolution of bacterial communities in the wheat crop rhizosphere. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(3): 610–621.
- [34] Kwak MJ, Kong HG, Choi K, Kwon SK, Song JY, Lee J, Lee PA, Choi SY, Seo M, Lee HJ, Jung EJ, Park H, Roy N, Kim H, Lee MM, Rubin EM, Lee SW, Kim JF. Rhizosphere microbiome structure alters to enable wilt resistance in tomato. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(11): 1100–1116.
- [35] Peiffer JA, Spor A, Koren O, Jin Z, Tringe SG, Dangl JL, Buckler ES, Ley RE. Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *PNAS*, 2013, 110(16): 6548–6553.
- [36] Schneiderberg M, Cheng X, Franken C, De Hollander M, Van Velzen R, Schmitz L, Heinen R, Geurts R, Van Der Putten WH, Bezemer TM, Bisseling T. Quantitative comparison between the rhizosphere effect of *Arabidopsis thaliana* and co-occurring plant species with a longer life history. *The International Society for Microbial Ecology Journal*, 2020, 14(10): 2433–2448.



**司军**, 博士, 副研究员, 博士生导师。科研上主要从事蔬菜遗传育种与生物技术, 十字花科蔬菜根肿病的生物防控等工作。近年来, 主持或主研参加了国家重点研发计划项目, 国家自然科学基金项目, 重庆市社会事业与民生保障科技创新专项项目、鲁渝科技扶贫协作示范项目, 川渝联合实施重点研发项目等多个项目的研究工作, 在 *Frontiers in Plant Science*、*Theoretical and Applied Genetics*、*Horticulture Research* 和《园艺学报》《植物保护学报》《中国蔬菜》等刊物上发表论文 10 余篇。主持或主研育成甘蓝新品种西园 11 号、12 号、13 号、14 号、15 号、16 号、西园秋丰、西园冬秀、西园秋翠, 西园冬盛。获得国家授权发明专利 4 项, 主研参加的“西园系列甘蓝新品种选育及推广应用”项目获教育部科技进步一等奖, 出版教材或专著 5 部。



**牛国清**, 博士, 研究员, 博士生导师。主要围绕天然产物发现、生物合成与精细调控和代谢工程改造等方面, 通过微生物学、分子生物学和天然产物化学等学科交叉, 开展微生物天然产物生物合成与合成生物学研究, 旨在应对耐药菌造成的抗生素危机和满足现代农业发展对绿色农药的需求。近年来已在 *Trends in Biochemical Sciences*、*Trends in Biotechnology*、*FEMS Microbiology Reviews*、*Trends in Microbiology*、*Molecular Cell*、*Metabolic Engineering*、*Cell Chemical Biology*、*ACS Synthetic Biology*、*Molecular Microbiology*、*Applied and Environmental Microbiology* 等 SCI 收录刊物发表论文 20 余篇。主持国家自然科学基金面上项目、国家重点研发计划“合成生物学”重点专项子课题、“973”项目子课题、重庆市“科技创新领军人才支持计划”项目、西南大学“聚贤工程”启动项目、重庆市自然科学基金、重庆市基础科学与前沿技术研究一般项目、中央高校基本业务费专项等。