



芽孢杆菌 SK007 的分类鉴定及其拮抗植物病原菌的功能分析

靳泽星^{1,2} 秦娅¹ 王洁丽¹ 杜妮妮¹ 李哲斐^{1,2} 陈卫民^{*1,2}

1 陕西省农业与环境微生物重点实验室 陕西 杨凌 712100

2 西北农林科技大学生命科学院 陕西 杨凌 712100

摘要:【背景】农业生产中,发掘和利用具有生防功能的微生物资源是保障粮食安全和提高作物产量的重要举措。【目的】明确土壤中芽孢杆菌 SK007 的分类地位,验证其对多种植物病原菌的拮抗作用,挖掘潜在的生防功能。【方法】通过 16S rRNA 基因和基因组分析方法确定分离菌株 SK007 的分类地位;采用平板对峙法研究该菌株对番茄灰霉病菌、白菜黑斑病菌、烟草赤星病菌、小麦赤霉病菌、马铃薯干腐病菌等植物病原菌的拮抗作用;采用 AntiSMASH 分析和预测菌株 SK007 的抗生素相关基因。【结果】基于 16S rRNA 基因、全基因组序列、平均核苷酸一致性和 DNA 同源性分析,结果表明菌株 SK007 属于 *Bacillus velezensis*,并且具有产生脂肽类抗生素和聚酮类抗生素的基因,对多种植物病原真菌有较强的抗性。此外,菌株 SK007 基因组中抗生素基因簇数目较多,丰富度高。【结论】芽孢杆菌 SK007 在拮抗植物病原菌方面有许多优良性状,具有促进作物抗病和增产的潜力。

关键词: 芽孢杆菌, 16S rRNA 基因, 基因组, AntiSMASH

Classification and identification of *Bacillus* sp. SK007 with biocontrol activity

JIN Ze-Xing^{1,2} QIN Ya¹ WANG Jie-Li¹ DU Ni-Ni¹ LI Zhe-Fei^{1,2} CHEN Wei-Min^{*1,2}

1 Shaanxi Key Laboratory of Agricultural and Environmental Microbiology, Yangling, Shaanxi 712100, China

2 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

Abstract: [Background] Discovery and utilization of microorganisms with biocontrol activity is important to keep crop health and yield in agricultural production. [Objective] Our study aimed to clarify the taxonomic status of *Bacillus* sp. SK007 isolated from soil, and to validate its antagonistic effect on multiple plant pathogens and, therefore uncover its potential biocontrol functions. [Methods] We first used 16S rRNA gene and whole-genome sequencing analysis to determine the taxonomic status of strain SK007. Plate isolate-antagonistic experiments were applied to explore the antagonistic effect of strain SK007 on *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola*, *Alternaria alternata*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium solani*. AntiSMASH was used to predict antibiotic genes of strain SK007. [Results] Based on the analysis of 16S rRNA gene and whole-genome sequencing, average nucleotide identity and digital

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2018YFD0200403)

***Corresponding author:** Tel: 86-29-87092262; E-mail: chenwm029@nwsuaf.edu.cn

Received: 11-11-2018; **Accepted:** 19-02-2019; **Published online:** 02-04-2019

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0200403)

***通信作者:** Tel: 029-87092262; E-mail: chenwm029@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2018-11-11; **接受日期:** 2019-02-19; **网络首发日期:** 2019-04-02

DNA-DNA hybridization, the results demonstrated that strain SK007 belonged to *Bacillus velezensis*, and possessed the genes in producing the lipopeptide antibiotics and polyketone antibiotics. In addition, SK007, with a large number and high abundance of antibiotic gene clusters in genome, exhibited strong resistance to a variety of plant pathogenic fungi. **[Conclusion]** *Bacillus velezensis* SK007 has excellent traits in plant disease resistance, and thus has potential roles in facilitating plant resistance to disease and promoting crop yield.

Keywords: *Bacillus* sp., 16S rRNA gene, Genome, AntiSMASH

芽孢杆菌是一大类革兰氏阳性细菌，在自然环境中分布非常广泛。芽孢杆菌种群庞大、繁殖能力强，可产耐热、耐旱、抗紫外线的芽孢，具有提升植物抗逆能力与促进植物生长的特性，用作菌剂在储存和运输过程中也具有天然的优势。因此，在农业生产中芽孢杆菌具有重要的作用。

目前，利用芽孢杆菌制成的菌剂产品非常多。例如，Gustafson公司开发的混合菌剂BioYield(包含芽孢杆菌FZB42和枯草芽孢杆菌GB122)用于防治蔬菜和果树的白粉病、霜霉病、疫病和灰霉病等。AgraQuest(现为拜耳作物科学公司)研发的Serenade、Sonata和Rhapsody等，用于防治葡萄、苹果、梨、香蕉、樱桃、番茄、辣椒和西兰花的细菌性叶斑病、霜霉病、早疫病和白粉病等^[1]。芽孢杆菌还具有提高作物抗病、抗寒、抗旱能力；增加土壤养分、改良土壤结构、提高肥料利用率；促进土壤中有机质的腐解，刺激作物生长等作用。研究人员发现，菌株*Bacillus velezensis* FZB42通过产生生长素提升植物根系分泌物的释放量，该菌处理种子后植物根的生物量显著提升^[2]。韩国的研究人员发现一株芽孢杆菌可分泌脱落酸，从而增强寄主植物的抗盐碱能力^[3]。我国的科研人员在长达20年的施肥试验中发现，本土*Bacillus asahii*类群在提高当地作物产量和增加土地肥力方面同样表现出重要作用^[4]。

芽孢杆菌抑制病原菌生长主要通过产生抗菌物质，这些抗菌物质包括脂肽类化合物、聚酮类化合物^[5]。脂肽类抗生素主要分为泛革素(Fengycin)、表面活性素(Surfactin)和伊枯草菌素(Iturin)三大类，除此之外还有Kustakins^[6]、

Bacillopeptins^[7]、杆菌溶素(Bacilysin)^[8]和地衣菌素(Licheniformin)等，每种脂肽类抗生素都有多种同系物^[9]。聚酮类抗生素是由聚酮合酶催化合成，聚酮合酶主要分为三类：PKS I (Polyketide synthase type I)，用于合成大环内酯类抗生素，如红霉素；PKS II (Polyketide synthase type II)，主要合成芳香化合物如四环类化合物；PKS III (Polyketide synthase type III)又称查尔酮合酶，在植物、真菌、细菌中都有发现，可以合成一系列的芳香聚酮类化合物^[10-13]。

在自然界中，土壤中蕴藏着非常丰富的微生物资源，但是绝大多数微生物不能培养，严重地阻碍了人们对微生物资源的开发和利用。因此，不断分离和挖掘新的微生物资源、准确鉴定其分类地位、快速分析抗性潜力等研究仍然是微生物研究的核心内容。本试验从土壤中分离得到一株细菌SK007，初步研究发现该菌株对植物病原真菌具有拮抗作用，16S rRNA基因序列比对结果显示该菌属于芽孢杆菌。但是，该芽孢杆菌在分类上存在较多争议。例如，2005年，Ruiz-García等首先报道了*Bacillus velezensis*，其分类地位与*Bacillus subtilis*和*Bacillus amyloliquefaciens*最相近^[14]；2008年，Wang等通过基因组的DNA同源分析等方法却认为*Bacillus velezensis*与*Bacillus amyloliquefaciens*属于同种不同名，前者发现晚于后者^[15]；2015年，Dunlap等基于全基因组序列分析，认为*B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*与*Bacillus methylotrophicus*应属于同种^[16]；2016年，Dunlap等又进一步通过模式菌株的全基因组数据分析，最终认定*B. amyloliquefaciens*、

B. methylotrophicus 和 *B. velezensis* 属于同种, 归属 *B. velezensis*^[17]。因此, 本文拟通过核心基因组、平均核苷酸一致性(Average nucleotide identity, ANI)、DNA 同源性分析(DNA-DNA hybridization, DDH)和抑菌相关功能基因分析等多种方法, 对该菌株 SK007 进行分类和功能特性研究, 确定分类地位, 同时探索拮抗特性, 为其在农业生产中的应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

主要试剂和仪器: 胰蛋白胨、酵母粉, 赛默飞世尔科技公司; 氯化钠、葡萄糖, 广东光华科技股份有限公司。电热恒温培养箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 全温摇床, 上海南荣实验室设备有限公司。

培养基: LB 培养基(胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, 氯化钠 10.0 g/L)和 PDA 培养基(马铃薯 200.0 g/L, 葡萄糖 20.0 g/L)。

试验菌种: 菌株 SK007, 分离自西北农林科技大学试验田土壤。

植物病原菌: 番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、白菜黑斑病菌(*Alternaria brassicicola*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)和马铃薯干腐病菌(*Fusarium solani*)由西北农林科技大学单卫星老师提供。

1.2 菌株 SK007 在不同条件下的生长测定

在不同温度(4、10、15、20、28、37、45、50、55 °C)、pH 值(2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0、12.0)、氯化钠(0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%)浓度条件下, 将菌株 SK007 菌液接种于 LB 液体培养基中, 180 r/min 振荡培养, 每个梯度做 3 个重复, 分别于 0 h 和 48 h 取样, 采用 Epoch 微量紫外分光光度计测定其 OD_{600} 吸光值, 检测菌株 SK007 不同温度、pH 和盐浓度情况下生长情况。

1.3 植物病原真菌拮抗试验

采用平板对峙法, 首先在平皿中间分别放置番茄灰霉病菌、白菜黑斑病菌、烟草赤星病菌、小麦赤霉病菌和马铃薯干腐病菌 5 种植物病原菌的菌块, 然后在每个平皿中放置 3 片无菌的小滤纸片, 滤纸片分别注入 20 μ L 的 SK007 菌悬液、SK007 发酵液和 LB 液体培养基, 每种病原菌拮抗试验重复 3 次, 培养温度 18 °C, 培养时间 5 d。

1.4 菌株 SK007 的基因组测序和 16S rRNA 基因序列分析

菌株 SK007 接种于 LB 液体培养基中, 在 28 °C、180 r/min 条件下培养 24 h 获得其菌体。使用 CTAB 法提取菌体 SK007 的总 DNA, 送至诺禾致源公司测序, 获得全基因组序列, 上传至 NCBI 获得 GenBank 登录号 QXJQ00000000, 获得注释结果后, 从中获取 16S rRNA 基因序列。在 16S rRNA 基因序列分析中, 依据 EzTaxon-e server (<http://www.ezbiocloud.net/>)序列对比结果, 选取与菌株 SK007 相似度最高的模式菌株, 使用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。在基因组分析中, 选择上述具有全基因组序列的全部参比菌株, 由 NCBI 数据库下载获得。

1.5 ANI 和 DDH 分析

平均核苷酸一致性(ANI)是指两个基因组间同源基因的相似性, 普遍认为亲缘关系较近的种群间 ANI 值至少为 70%–75%, 而 ANI 值达到 95% 以上的菌株定义为同一个种^[18]。本研究中使用软件 Jspecies (<http://jspecies.ribohost.com/>)中的 Mummer^[19]对 8 株芽孢杆菌的基因组 ANI 值进行计算。

DNA 同源性分析(DDH)是常用于基因组水平区分原核生物种属的重要指标, 通常将 DDH 值 \geq 70%的菌株认为是同种^[20]。使用 Genome-to-genome distance calculation (<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>)计算 8 株芽孢杆菌基因组的 DDH 值^[5], 使用 R 中的 Heatmap 软件包对计算产生的 ANI 值和 DDH 值进行热图的绘制, 直观展示 ANI 和 DDH 分析结果。

2 结果与分析

2.1 不同温度、pH 和氯化钠浓度条件下菌株 SK007 的生长情况

生长试验结果表明, 菌株 SK007 在 15–50 °C 温度范围均能生长; 耐受 pH 范围是 4.0–9.0, 可在氯化钠浓度为 11% 的 LB 液体培养基中生长。

2.2 植物病原真菌拮抗试验

拮抗试验结果如图 1 所示, 菌株 SK007 对番茄灰霉病菌、白菜黑斑病菌及烟草赤星病菌存在不同强度拮抗作用, 而对小麦赤霉病菌、马铃薯干腐病菌无拮抗作用。LB 培养基滤纸片为对照, 菌丝生长正常; 发酵液滤纸片抑菌圈较小, 菌丝部分覆盖滤纸片, 菌丝边缘有消融现象; 菌悬液滤纸片菌株 SK007 形成菌落, 菌丝生长受到限制, 边缘生长存在断层, 其抑菌圈明显。结果可见, 菌株 SK007 不仅在共培养时产生拮抗作用, 而且可以在无病原菌的情况下分泌具有拮抗作用的化合物, 但共培养时其抑菌作用更加显著。

2.3 菌种鉴定

2.3.1 16S rRNA 基因系统发育树

如图 2 所示, 在 16S rRNA 基因系统发育树

中, 菌株 SK007 与芽孢杆菌属(*Bacillus*)聚类在一起, 其 16S rRNA 基因序列与模式菌株 *B. velezensis* FZB42、*B. amyloliquefaciens* DSM 7、*B. velezensis* NRRL B-41580、*B. mojavensis* RO-H-1、*B. nakamurai* NRRL B-41091 及 *B. vallismortis* DV1-F-3 的序列相似性均达到 99.7%, 亲缘关系最近。

2.3.2 基因组分析和核心基因组系统发育树

核心基因组构建的系统发育树具有很高的分辨率^[21], 能够进一步确定菌株 SK007 的分类地位。基因组测序结果显示, 菌株 SK007 的基因组大小为 3.84 Mb, (G+C)mol% 含量为 46.6%。核心基因组系统发育树通过 ITEP (Integrated toolkit for exploration of microbial pangenomes) 软件构建, ITEP 是能够进行直系同源检测、功能区域分析、核心基因与可变基因区域鉴定及序列比对生成系统发育树的分析软件。基于 8 株菌全基因组序列的 2 312 个核心基因构建的系统发育树如图 3 所示, 菌株 SK007 与 *B. velezensis* FZB42、*B. velezensis* NRRL B-41580 及 *B. amyloliquefaciens* DSM 7 聚为一类。

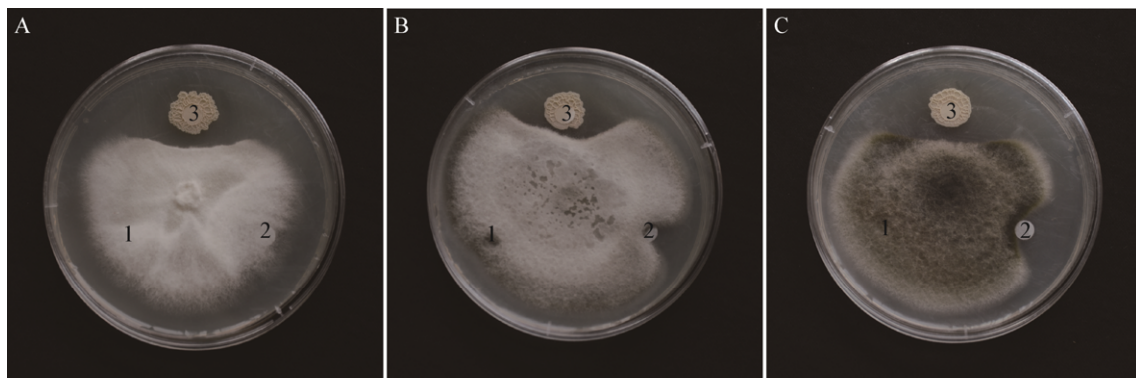


图 1 SK007 菌株分别与番茄灰霉病菌(A)、白菜黑斑病菌(B)和烟草赤星病菌(C)的平板对峙试验

Figure 1 The plate isolate-antagonistic experiments of strain SK007 with *Botrytis cinerea* (A), *Alternaria brassicae* (B) and *Alternaria alternata* (C)

注: 1、2 和 3 号滤纸片分别为 LB 培养基、发酵液和菌悬液。

Note: The filter paper sheets of 1, 2 and 3 were LB medium, culture filtrate and bacterial suspension, respectively.

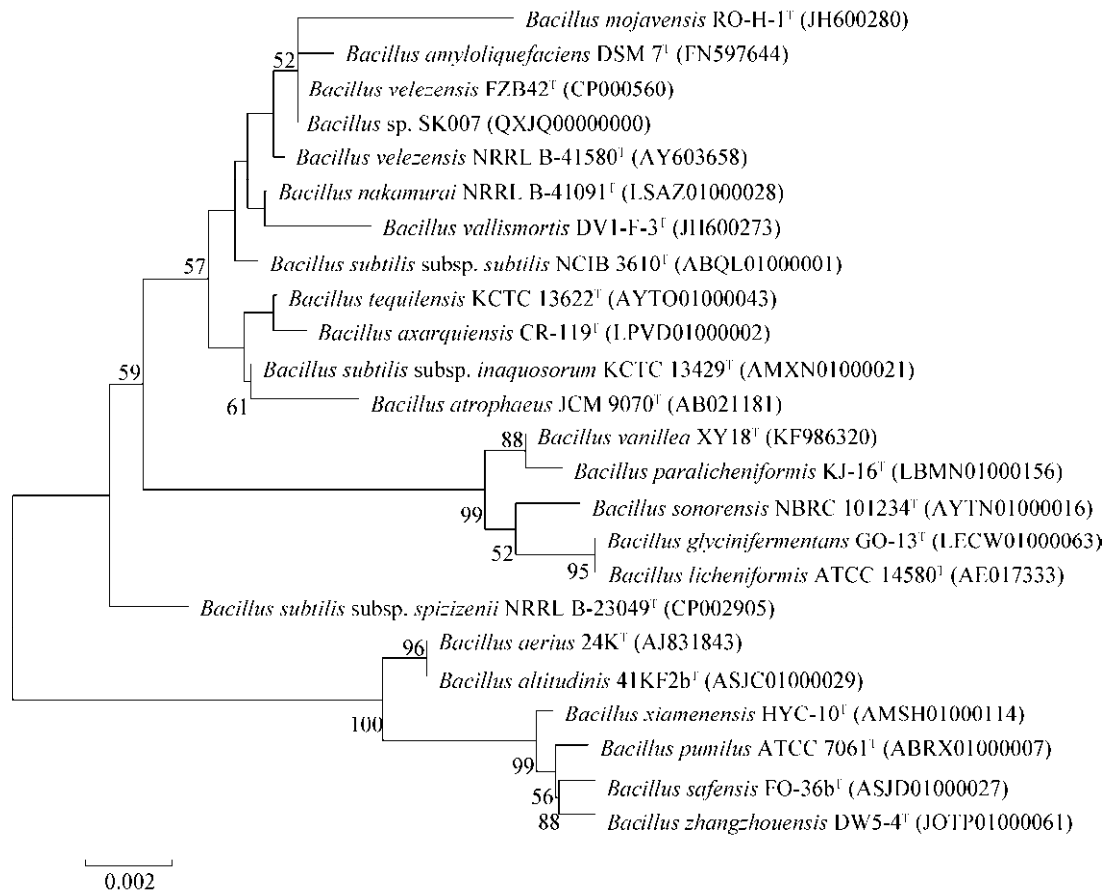


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建菌株 SK007 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of the strain SK007 based on 16S rRNA gene sequence

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; 线段 0.002 表示序列差异的分支长度。

Note: The numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank; The numbers in each branch points denote the percentages supported by bootstrap; Bar=0.2% nucleotide divergence.

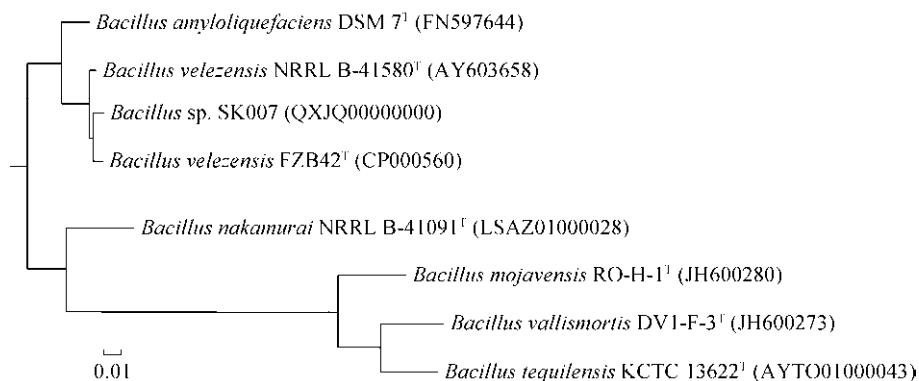


图 3 基于 2312 个核心基因构建菌株 SK007 的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain SK007 based on 2312 core-genome sequences

注: 括号中的序号为相关菌株 GenBank 的登录号; 线段 0.01 表示序列差异的分支长度。

Note: The numbers in parentheses represent the sequence accession numbers in GenBank; Bar=1% nucleotide divergence.

2.3.3 ANI 和 DDH 分析

使用 JSpeciesWS 获得 ANIm (Average nucleotide identity based on MUMmer)值^[19], 并绘制热图, 如图 4A 所示。ANI 结果显示, 菌株 SK007 与 *B. amyloliquefaciens* DSM7、*B. velezensis* NRRL B-41580 及 *B. velezensis* FZB42 的 ANI 值分别为 94.15%、98.33%和 98.34%, 依据 ANI 值 95%的种间鉴定标准, SK007 与菌株 NRRL B-41580 及 FZB42 应为同种。NRRL B-41580 与 FZB42 的 ANI 值一致性也高达 98.4%。从芽孢杆菌 ANI 值的热图中可发现, 菌株 SK007 与 NRRL B-41580 及 FZB42 的 ANI 值一致性高, 与其它菌株相比 ANI 值相对低。

本试验的 DDH 值通过在线(<http://ggdc.dsmz.de/distcalc2.php>) 上传基因组数据, 然后使用 Genome-to-genome distance calculation (GGDC) V2.1 计算获得的^[11], DDH 值的估算建立在真实的参考数据上的 DDH 值和基因组序列的基础上。菌株 SK007 与 DSM7、NRRL B-41580 及 FZB42 的 DDH 值分别为 55%、84.6%和 85.1%, 显然 SK007 与 NRRL B-41580 及 FZB42 的 DDH 值更高, 且高于种间 70%的鉴定标准。整理 DDH 值, 利用 R 语言 Heatmap 函数绘制热图如图 4B 所示, DDH 值与 ANI 值保持一致, 结果相互验证。

2.4 AntiSMASH 功能性分析

2.4.1 脂肽类和聚酮类合成基因

通过 AntiSMASH 分析, 在菌株 SK007 基因组中共检测到 39 个基因与抗生素合成相关, 与已知基因序列的相似性均大于 97% (表 1)。其中, 脂肽类检测出 3 个泛革素(Fengcin)基因簇、3 个表面活性素(Surfacin)基因簇和 1 个杆菌溶素(Bacilysin)基因簇, 这些基因簇组成完整的泛革素、表面活性素、杆菌溶素生物合成基因簇; 聚酮类基因簇检测出 4 个 PKS I 型基因簇、1 个 PKS III 型基因簇和 1 个 Hybrid NRPS/PKS (Hybrid nonribosomal peptide synthetase/polyketide synthase) 基因簇, 包括 Bacillaene、Macrolactin 和地非西丁(Difficidin)合成酶基因。

2.4.2 菌株 SK007 次生代谢基因簇分析

将菌株 SK007 与亲缘关系较近的 7 株模式菌株基因组进行对比, 如图 5 所示, 结果发现 SK007 次生代谢产物基因簇数目最多。菌株 SK007 与 NRRL B-41580 及 FZB42 有相似的次生代谢产物基因簇分布, 但是 SK007 聚酮类基因簇 Difficidin 数目高于 NRRL B-41580 与 FZB42, 且 SK007 与 NRRL B-41580 的脂肽类基因簇 Fengycin 和 Surfactin 数目都高于菌株 FZB42, 同时 SK007 与 FZB42 中都未检测到基

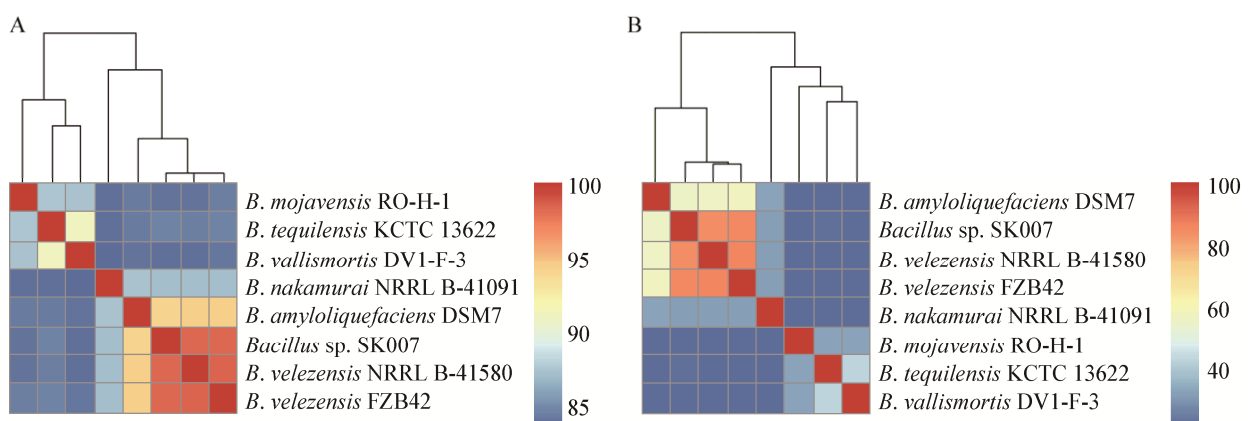


图 4 ANI (A)和 DDH (B)热图

Figure 4 Heatmap analysis of ANI (A) and DDH (B) value

注: 不同颜色表示不同的 ANI 或 DDH 值; 红色表示最高的 ANI 或 DDH 值; 蓝色表示最低的 ANI 或 DDH 值。

Note: The color represents the ANI or DDH value; The red indicates the highest ANI or DDH value; The blue indicates the least ANI or DDH value.

表 1 抗生素基因比对表

Table 1 The comparison table of antibiotic genes

Number	The locus tag of SK007	Functional genes	Hit with	Identity (%)
1	D2718_18190	<i>fenA</i>	RBAM_018460	98
2	D2718_18185	<i>fenB</i>	RBAM_018450	98
3	D2718_18180, D2718_18595	<i>fenC</i>	RBAM_018440	97–98
4	D2718_03715, D2718_18590	<i>fenD</i>	RBAM_018430	98
5	D2718_03720	<i>fenE</i>	RBAM_018420	98
6	D2718_07010	<i>sfAA</i>	RBAM_003650	99
7	D2718_17330, D2718_18600	<i>sfAB</i>	RBAM_003660	98–99
8	D2718_17335, D2718_18605	<i>sfAC</i>	RBAM_003680	98–99
9	D2718_17340	<i>sfAD</i>	AJ575642	99
10	D2718_04285	<i>bacA</i>	RBAM_034930	99
11	D2718_04280	<i>bacB</i>	RBAM_034920	100
12	D2718_04275	<i>bacC</i>	RBAM_034910	99
13	D2718_04270	<i>bacD</i>	RBAM_034900	99
14	D2718_04265	<i>bacE</i>	RBAM_034890	100
15	D2718_00005, D2718_00015, D2718_00020	PKS (Bacillaene)	AJ634060	97–98
16	D2718_00010	Hybrid NRPS/PKS (Bacillaene)	RBAM_016980	98
17	D2718_09560, D2718_09565, D2718_09570, D2718_09575, D2718_09580, D2718_09585, D2718_09590, D2718_09595	PKS I (Macrolactin)	AJ634061	97–98
18	D2718_05740, D2718_05745, D2718_05750, D2718_05755, D2718_16150, D2718_16155, D2718_16160, D2718_16165, D2718_16170	PKS I (Difficidin)	AJ634062	98

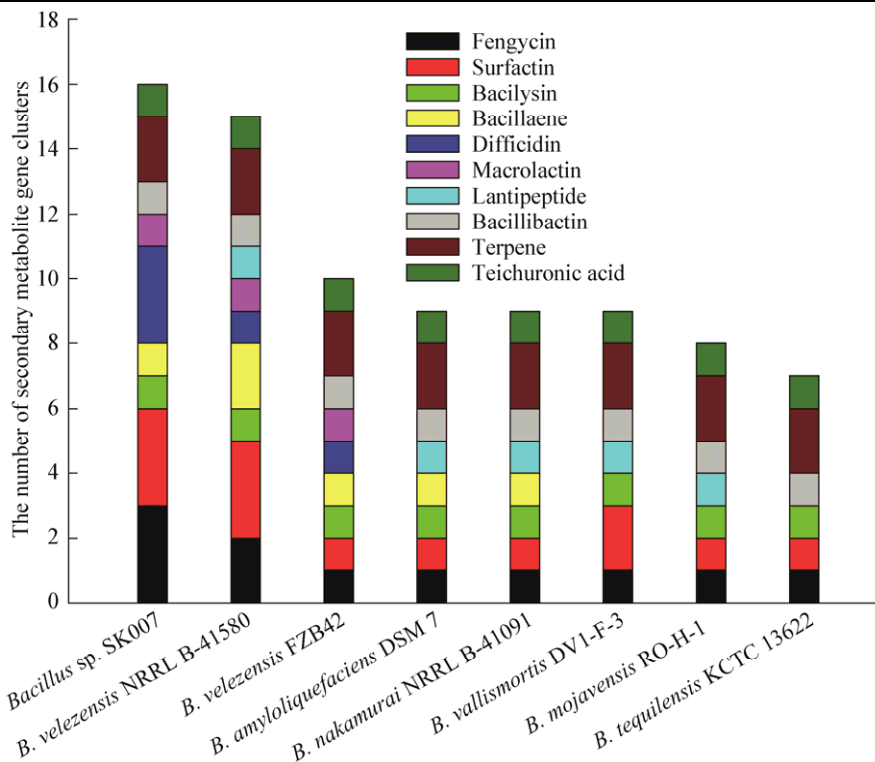


图 5 次生代谢产物基因簇对比图

Figure 5 The comparison of secondary metabolite gene clusters

注: 每种颜色代表一种次生代谢产物基因簇。

Note: Each color in the cluster represents a different class of secondary metabolite.

因簇羊毛硫肽类(Lantipeptide)。结合这 8 株菌的系统发育关系分析,我们发现分类地位相近的菌株其次生代谢产物基因簇分布也相近,并且这些菌株都含有数目几乎一致的次生代谢产物基因簇:儿茶酚型铁载体(Bacillibactin)、萜类(Terpene)和糖醛酸磷壁酸(Teichuronic acid)。

3 讨论与结论

根据 16S rRNA 基因序列分析,初步鉴定分离自土壤的 SK007 菌株为芽孢杆菌,但是由于 16S rRNA 基因难以区分亲缘关系接近的菌种 *B. amyloliquefaciens* 和 *B. velezensis*,本试验通过核心基因组、ANI 和 DDH 等基因组的分析方法确定菌株 SK007 与 *B. velezensis* FZB42 和 *B. velezensis* NRRL B-41580 属于同种,应归属于贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。

在农业生产中,芽孢杆菌是一类重要的生防菌,传统的试验分析和鉴定方法很难全面地分析芽孢杆菌抗性物质,也不能充分挖掘其全部抗菌潜力。生物信息学工具弥补了这些方面的不足,它可以从基因组的角度出发深入认识生物体的性质和功能,为微生物的研究带来新的途径^[2,21]。AntiSMASH 是预测多种次生代谢产物基因簇的在线工具,能够较完整地预测细菌和真菌的次生代谢产物基因簇,特别是生物抗生素的基因簇。本文运用 AntiSMASH 对菌株 SK007 进行抗生素基因分析,发现该菌株具有脂肽类和聚酮类抗生素基因簇。其中,泛革素(Fengcin)是一种环状脂肽类化合物,对植物病原真菌、细菌和线虫都有抗性^[23],其合成基因有 *fenA*、*fenB*、*fenC*、*fenD* 和 *fenE*。表面活性素(Surfactin)是一种表面活性剂,通过形成离子通道破坏细胞膜结构导致内容物的释放,最终引起细胞死亡,表面活性素合成基因有 *srfAA*、*srfAB*、*srfAC* 和 *srfAD*。除了直接作用于植物病原菌外,表面活性素可协同泛革素激发植物产生诱导系统抗病性(Induced systemic resistance),这种抗病性可有效降低植物地上部分病害的发生,研究人员

将过表达泛革素和表面活性素的枯草芽孢杆菌接种于菜豆和番茄,显著降低了菜豆和番茄叶子部位灰霉病的发作^[24]。芽孢杆菌中还有杆菌溶素(Bacilysin)合成基因 *bacABCDEF*,杆菌溶素是一种非核糖体合成二肽,其中 *bacA* 编码预苯酸脱水酶,*bacB* 编码异构酶或鸟苷酰转移酶,*bacC* 编码氧化还原酶或还原酶,*bacD* 则编码一种连接酶,*bacE* 编码大环内酯输出蛋白或透性酶^[25]。有研究发现菌株 *B. velezensis* FZB42 能够利用自身产生的杆菌溶素有效地杀死铜绿微囊藻,抑藻率达 98.78%,因此可以将其作为生防剂有效地控制藻华^[26]。其次,SK007 中还有聚酮类化合物合成基因,这类物质一般是由细菌、真菌产生的天然化合物,该类化合物由低级脂肪酸聚合而成,具有长碳链结构,包括 Bacillaene、Macrolactin 和 Difficidin 三类,对细菌有强烈的抑制作用^[19]。Bacillaene 是线性结构的六烯大环内酯类化合物,主要抑制原核生物蛋白质的合成^[27]。Macrolactin 是一类 24 元大环内酯类化合物,Macrolactin 家族成员众多,可抑制多种革兰氏阳性致病菌^[28]。Difficidin 是多烯类抗生素,具有磷酸基团的高度不饱和大环内酯类物质,具有广泛的抗细菌活性,可抑制蛋白质的合成,而且可能具有破坏细胞膜的功能^[29],研究表明该抗生素能有效地抑制水稻细菌性枯萎病和细菌性叶枯病的致病菌^[30]。另外,菌株 SK007 与多种芽孢杆菌模式菌株共有儿茶酚型铁载体(Bacillibactin)、萜类(Terpene)和糖醛酸磷壁酸(Teichuronic acid)基因簇,它们应为芽孢杆菌属重要的次生代谢产物基因簇。已有大量 *B. velezensis* FZB42 在植物促生方面的研究,其促生作用与其根系定殖能力密切相关^[31-32]。我们推断菌株 SK007 也可在根系定殖,增强植物对病原微生物的抵抗能力。本研究为菌株 SK007 在生物防治及大田作物抗病和增产方面的应用提供了一定的理论依据。

REFERENCES

- [1] Cawoy H, Bettiol W, Fickers P, et al. *Bacillus*-based biological control of plant diseases[A]//Stoytcheva M. Pesticides in the Modern World-Pesticides Use and Management[M]. Rijeka:

- InTech, 2011: 273-302
- [2] Talboys PJ, Owen DW, Healey JR, et al. Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14: 51
- [3] Shahzad R, Khan AL, Bilal S, et al. Inoculation of abscisic acid-producing endophytic bacteria enhances salinity stress tolerance in *Oryza sativa*[J]. Environmental and Experimental Botany, 2017, 136: 68-77
- [4] Feng YZ, Chen RRL, Hu J, et al. *Bacillus asahii* comes to the fore in organic manure fertilized alkaline soils[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2015, 81: 186-194
- [5] Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, et al. Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions[J]. BMC Bioinformatics, 2013, 14: 60
- [6] Béchet M, Caradec T, Hussein W, et al. Structure, biosynthesis, and properties of kurstakins, nonribosomal lipopeptides from *Bacillus* spp.[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 95(3): 593-600
- [7] Yang SB, Liu XL. Research advances in *Paenibacillus polymyxa* and their bioactive substances[J]. Microbiology China, 2008, 35(10): 1621-1625 (in Chinese)
杨少波, 刘训理. 多粘类芽孢杆菌及其产生的生物活性物质研究进展[J]. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1621-1625
- [8] Ozcengiz G, Aytekin S, Islerel ET, et al. *Bacillus subtilis* overproduces industrially important extracellular enzymes upon the targeted deletion of bacilysin biosynthetic operon[J]. New Biotechnology, 2018, 44: S89
- [9] Zhang Y, Li ZS, Mao BZ. Advances in research on antagonistic substances secreted by biological control of *Bacillus*[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Sciences, 2016, 57(12): 1960-1967 (in Chinese)
张莹, 李章胜, 毛碧增. 生防芽孢杆菌分泌的拮抗物质的研究进展[J]. 浙江农业科学, 2016, 57(12): 1960-1967
- [10] Sayari M, Steenkamp ET, van der Nest MA, et al. Diversity and evolution of polyketide biosynthesis gene clusters in the *Ceratocystidaceae*[J]. Fungal Biology, 2018, 122(9): 856-866
- [11] Wang YS, Zhang B, Zhu JP, et al. Molecular basis for the final oxidative rearrangement steps in chartreusin biosynthesis[J]. Journal of the American Chemical Society, 2018, 140(34): 10909-10914
- [12] Hug JJ, Panter F, Krug D, et al. Genome mining reveals uncommon alkylpyrones as type III PKS products from myxobacteria[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2018, 46: 319
- [13] Shen JJ, Mao XM, Chen XA, et al. Recent advances in acyltransferase domain of type I polyketide synthases[J]. Chinese Journal of Organic Chemistry, 2014, 38(9): 2377-2385 (in Chinese)
沈洁洁, 毛旭明, 陈新爱, 等. I 型聚酮合酶中酰基转移酶结构域的研究进展[J]. 有机化学, 2014, 38(9): 2377-2385
- [14] Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Velez in Malaga, southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55: 191-195
- [15] Wang LT, Lee FL, Tai CJ, et al. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 671-675
- [16] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, et al. Phylogenomic analysis shows that *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* is a later heterotypic synonym of *Bacillus methylotrophicus*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(7): 2104-2109
- [17] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, et al. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3): 1212-1217
- [18] Liu B, Hu GP, Tang WQ. Characteristic of average nucleotide identity (ANI) based on the whole genomes from *Bacillus* species in *Bacillus*-like genus[J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 28(9): 833-843 (in Chinese)
刘波, 胡桂萍, 唐唯其. 基于全基因组的芽孢杆菌平均核苷酸同源性(ANI)分析[J]. 福建农业学报, 2013, 28(9): 833-843
- [19] Richter M, Rosselló-Móra R, Glöckner FO, et al. JSpeciesWS: a web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison[J]. Bioinformatics, 2016, 32(6): 929-931
- [20] Cho JC, Tiedje JM. Bacterial species determination from DNA-DNA hybridization by using genome fragments and DNA microarrays[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(8): 3677-3682
- [21] Sun ZH, Zhang WY, Guo CY, et al. Comparative genomic analysis of 45 type strains of the genus *Bifidobacterium*: a snapshot of its genetic diversity and evolution[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117912
- [22] Wei ZY, Jin DC, Deng Y. Bioinformatics tools and applications in the study of environmental microbial metagenomics[J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 890-901 (in Chinese)
魏子艳, 金德才, 邓晔. 环境微生物宏基因组学研究中的生物信息学方法[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 890-901
- [23] López G, Diaz-Cárdenas C, Shapiro N, et al. 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
- [24] Ongena M, Jourdan E, Adam A, et al. Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants[J]. Environmental Microbiology, 2007, 9(4): 1084-1090
- [25] Wu LM, Li X, Wu HJ, et al. 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, 等. 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
- [26] Wu LM, Wu HJ, Chen LN, et al. Bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 has specific bactericidal activity against harmful algal bloom species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(24): 7512-7520
- [27] Müller S, Strack SN, Hoefler BC, et al. Bacillaene and sporulation protect *Bacillus subtilis* from predation by *Myxococcus xanthus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(18): 5603-5610
- [28] Romero-Tabarez M, Jansen R, Sylla M, et al. 7-O-malonyl macrolactin A, a new macrolactin antibiotic from *Bacillus subtilis* active against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin-resistant Enterococci, and a small-colony variant of *Burkholderia cepacia*[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2006, 50(5): 1701-1709
- [29] Wilson KE, Flor JE, Schwartz RE, et al. Difficidin and oxydifficidin: novel broad spectrum antibacterial antibiotics produced by *Bacillus subtilis*. II. Isolation and physico-chemical characterization[J]. Journal of Antibiotics, 1987, 40(12): 1682-1691
- [30] Wu LM, Wu HJ, Chen LN, et al. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 12975
- [31] Fan B, Chen XH, Budiharjo A, et al. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein[J]. Journal of Biotechnology, 2011, 151(4): 303-311
- [32] Kang HY, Li S, Guo CH, et al. Mechanisms of PGPR colonization and the application in the biocontrol of plant disease[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(34): 13237-13239,13298 (in Chinese)
康慧颖, 李帅, 郭长虹, 等. PGPR 的定殖机制及其在植物生防中的应用[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(34): 13237-13239,13298