

阎春兰,余福燕,王艺霏,等.耐盐芽孢杆菌SF-18的生防潜能与基因组学分析[J].华中农业大学学报,2024,43(4):192-203.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2024.04.021

耐盐芽孢杆菌SF-18的生防潜能与基因组学分析

阎春兰,余福燕,王艺霏,李潇潇,彭仙凤,程国军

中南民族大学生命科学院,武汉430074

摘要 为从极端环境中分离具有优良抗菌活性的生物防治菌剂,采用稀释涂布平板法从新疆阿克苏盐碱地土样中分离筛选到1株具有明显抑菌作用的耐盐菌株SF-18;以大丽轮枝菌为指示菌,利用牛津杯法测定该菌株发酵液拮抗活性的稳定性,并利用2代和3代测序技术获得该菌株完整的基因组序列,对测序数据进行基因组组装、预测、功能注释及次级代谢产物合成基因簇预测。结果显示,该菌株对金黄色葡萄球菌和大丽轮枝菌具有明显的抑制作用,能在18% NaCl的条件下生长;SF-18菌体发酵液在-20~80℃均具有较强的抑菌活性,能耐受pH 5~12的酸碱度环境;通过16S rDNA基因和gyrB基因序列分析,鉴定SF-18菌株隶属于芽孢杆菌属(*Bacillus*);全基因组序列分析结果显示菌株有480个基因参与了多种碳源的代谢,含有编码亚精胺和海藻糖等与菌株抗逆性相关化合物合成的基因,以及能够降解病原菌细胞壁的葡聚糖酶、几丁质酶等酶的相关基因;次级代谢产物预测分析SF-18含有合成bacillaene、bacillibactin等多种抗性化合物的基因簇,推测菌株SF-18可能通过产生抑菌性的次级代谢产物以及相关降解酶来达到抑菌的效果,在农业生物防治中具有较好的应用前景。

关键词 耐盐菌;芽孢杆菌;生物防治;基因组学;大丽轮枝菌;次级代谢产物

中图分类号 S476.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2024)04-0192-12

生物防治与化学防治相比,具有高效、安全、无毒等绿色环保优势,在多种病虫害防治中得到广泛应用。利用有益微生物防治植物病害起始于利用真菌防治猝倒病^[1],目前防治植物病害的有益微生物种群已经涵盖到真菌、放线菌、细菌甚至病毒(噬菌体)等多种微生物,其中芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)等微生物应用最多,尤其是芽孢杆菌属,因其营养需求简单、抗逆性强、生长速度快、杀菌高效、具有广谱抑菌活性、对人和动物无害、广泛分布于土壤、植物表面及内部等特点,是生防菌筛选的理想对象^[2-3]。目前,芽孢杆菌属防治植物真菌病害应用广泛,种类包括枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)^[4-5]、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)^[6-7]、贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)^[8-9]、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)^[10]、侧孢芽孢杆菌(*B. laterosporus*)^[11]、凝结芽孢杆菌(*B. coagulans*)^[12]、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)^[13]、短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)^[14]、短小芽孢杆菌(*B. pumilus*)^[15]、坚强芽孢杆菌(*B. firmus*)^[16]等。

芽孢杆菌的生物防治机制主要体现在通过分泌

抗菌物质拮抗病原菌、与病原菌竞争营养和空间位点^[1]、溶菌作用、诱导植物产生抗病性以及植物的促生作用^[17]等,其中最主要的抑菌机制是对病原菌的拮抗作用。芽孢杆菌属的菌株生长代谢过程中分泌的抗菌物质已达到60多种,包括脂肽类、多肽类、聚酮类、酶类和其他抗菌活性物质等^[3]。脂肽类化合物和多肽类化合物由非核糖体途径(nonribosomal peptides synthetase, NRPS)产生,按照结构差异主要分为三大类:丰原素(fengycin)、伊枯草菌素(iturin)和表面活性素(surfactin)等;杆菌素(bacillaene)、大环内酰胺(macrolactin H)和地非西丁(difficidin)等聚酮类化合物由聚酮合成酶(polyketidesynthase, PKS)途径合成;通过核糖体途径(ribosomal synthesis, RS)产生的抑菌物质主要有细菌素和蛋白酶类,如几丁质酶、葡聚糖酶、纤维素酶、脂肪酶等多种真菌细胞壁裂解酶,对于抑制病原真菌非常有效^[18]。

近年来,生防细菌不断被发掘和研究,测序技术的发展使得多种芽孢杆菌属细菌,如贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)^[8,19]、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)^[4-5]、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)^[20-21]

收稿日期:2023-10-25

基金项目:国家自然科学基金项目(32372809);省级大学生创新创业训练计划项目(SCX2023058)

阎春兰, E-mail: yanchunlan@mail.scuec.edu.cn

的全基因组序列获得解析,寻找新的具有病原真菌拮抗作用的细菌的难度越来越大,因此,从极端环境中分离具有优良抗菌活性的特殊菌株逐渐成为研究热点^[22]。盐碱地分布广泛,约占地球陆地总面积的1/4。中国的盐碱土资源非常丰富,盐碱地面积超过3 300万hm²。盐碱土壤中含有丰富的耐盐、耐碱微生物资源,对于盐碱地的高效改良具有重要的研究价值和现实意义^[23]。

本研究从新疆阿克苏盐碱地土样中分离筛选获得1株具有明显抑菌作用的耐盐菌株SF-18,对该菌株进行序列分析鉴定,测定温度、酸碱度处理下该菌株的发酵液对大丽轮枝菌的抑菌活性及其稳定性;利用2代和3代测序技术,获得该菌株完整的基因组序列,分析、挖掘抑菌活性物质的遗传基础,以期为该菌株抑菌机制的研究以及作为生物防治菌剂的进一步开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

耐盐菌株SF-18,从新疆阿克苏盐碱地土样中用稀释涂布平板法分离获得;指示菌为金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kieb.)。

1.2 培养基

筛选培养基:酵母粉10g,胰蛋白胨5g,KCl 2g,MgSO₄·7H₂O 2g,蒸馏水1 000 mL,调节pH值至7.0,琼脂1.5g/100 mL,加入质量分数为3%、5%的NaCl制成高盐筛选培养基。121℃湿热灭菌20 min后,倒平板备用。

1.3 菌株的分离与纯化

采用10倍梯度稀释法,将土样粉末稀释至10⁻³、10⁻⁴,每个稀释梯度的土样悬液取100 μL,分别均匀涂布到质量分数为3%、5% NaCl的高盐筛选培养基平板各1个,37℃恒温培养2 d,观察其生长情况。挑取单菌落划线纯化并编号,划线平板同样使用相对应质量分数NaCl的筛选培养基。

1.4 菌株的分子鉴定

芽孢杆菌属内的各物种间亲缘关系较近,仅分析16S rDNA序列难以鉴别芽孢杆菌属内的物种,*gyrB*基因(编码DNA促旋酶B亚单位蛋白)是可替代16S rDNA序列的系统发育标记,可有效区分芽孢杆菌属内菌种之间的差异^[24]。根据菌株SF-18全基因组注释结果,选取其中16S rDNA基因和*gyrB*基

因序列,通过BLAST程序与NCBI数据库中已有的序列比对,比较分析同源性并构建系统进化树(MEGA7.0.26软件)。

1.5 菌株的抑菌性能研究

采用牛津杯法测定菌株的抑菌性能^[25]。用接种环挑取菌株SF-18,接种于装有5 mL LB液体培养基的血清瓶中,37℃、180 r/min恒温振荡培养12~16 h,得菌体悬液。指示菌金黄色葡萄球菌的过夜培养物稀释至10⁶个/mL,取0.1 mL均匀涂布LB固体培养基平板;用已灭菌的棉签蘸取指示菌大丽轮枝菌的孢子,均匀涂抹到PDA培养基平板上;用镊子夹取已灭菌的牛津杯放置在固体平板上,牛津杯内加入100 μL菌液SF-18,将平板正放于37℃恒温培养箱中培养3~4 d,观察抑菌效果。

1.6 菌株的耐盐性

配制含质量分数3%、5%、10%、15%、18%、20%、30% NaCl的LB固体培养基平板,接种菌株SF-18和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) CCTCC AB 90008(正常LB固体培养基,对照),每个处理3个重复,置于37℃恒温培养箱倒置培养2~4 d,观察生长状况。

1.7 菌株的发酵液稳定性研究

菌株的发酵液稳定性研究参照文献[8]进行。先制备种子液,再获得发酵液。发酵液于4℃、12 000 r/min离心5 min,弃菌体收集上清液用于发酵液稳定性实验。

1)温度对菌株发酵液稳定性的影响。取本文“1.7”上清液,进行温度耐受能力检测^[26],温度处理分别为-20、20、37、60、80、100℃,处理时间为2 h,处理后恢复室温,取100 μL处理后的上清液,加入牛津杯中,每个处理做3个平行,观察菌株SF-18对大丽轮枝菌的抑菌效果,检测其抗菌能力。

2)pH对菌株发酵液稳定性的影响。取本文“1.7”上清液,对其进行pH耐受能力检测,pH处理为2、4、6、8、10、12(以上清液原始pH为对照),处理时间为4 h,处理之后调回至原始pH值^[25],取100 μL处理后的上清液,加入牛津杯中,每个处理做3个平行,观察菌株SF-18对大丽轮枝菌的抑菌效果,检测其抗菌能力。

1.8 菌株SF-18的全基因组测序和分析

1)全基因组测序。将在LB液体培养基中培养至指数期的菌株SF-18离心收集菌体,提取其基因组DNA,委托金唯智(Genewiz)公司进行全基因组

测序,测序平台为Illumina Novaseq和PacBio sequel,对测序数据进行质控分析,再利用软件HGAP4或者Falcon(version 0.3)进行初步组装,将过滤掉低质量的二代测序数据比对到组装结果上,使用软件Pilon对组装结果进行进一步的校正,得到最终的完整的染色体序列。

利用软件Prodigal(3.02)版本对编码基因进行预测;利用Rfam(version 12.0)数据库对非编码RNA,如rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA和microRNA等多种已知功能的RNA及一些未知功能的RNA等进行预测。

2) 基因功能分析。基因功能注释菌株SF-18预测得到的基因序列,通过BLAST程序与非冗余蛋白数据库(non-redundant protein database, NR)、基因功能数据库(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、同源蛋白簇数据库(cluster of orthologous groups of proteins, COG)、数据库GO(gene ontology)、碳水化合物相关的酶数据库CAZy(carbohydrate-active enzymes database)等数据库进行比对分析,注释得分最高的比对结果(一致性和覆盖率均默认 $\geq 40\%$),获得功能注释信息。

在网站http://antismash.secondarymetabolites.org提交菌株的全基因组序列,预测其合成次级代谢产物的基因簇,将基因注释结果与NCBI数据库BLAST比对结果进行综合分析,推测分析菌株SF-18中编码次级代谢产物的基因簇和可能的抑菌物质。

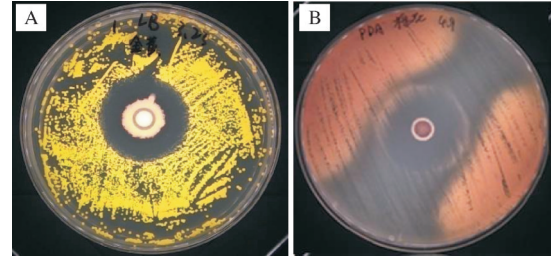
2 结果与分析

2.1 菌株SF-18对金黄色葡萄球菌和大丽轮枝菌的抑制作用

本研究从新疆阿克苏盐碱地土样中分离筛选获

得的耐盐菌株SF-18,菌体为杆菌,形成芽孢,菌体长 $2.0\sim 2.5\ \mu\text{m}$,宽 $0.5\sim 0.8\ \mu\text{m}$,革兰氏染色结果为阳性,菌落半透明突起,乳白色,吡啶实验阳性,VP实验阳性。

拮抗实验发现,菌株SF-18对金黄色葡萄球菌和大丽轮枝菌均具有较好的抑制作用,结果如图1所示,抑菌圈直径分别为 $(2.87\pm 0.05)\ \text{cm}$ 和 $(3.4\pm 0.1)\ \text{cm}$ 。



A:金黄色葡萄球菌; B:大丽轮枝菌。A:*S. aureus*; B:*V. dahliae*。

图1 菌株SF-18对病原菌的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effect of strain SF-18 on pathogenic microorganism

2.2 菌株SF-18的耐盐性及其发酵液抑菌作用的稳定性

菌株对NaCl的耐受实验结果(表1)显示,在质量分数3%、5%、10%的NaCl条件下,SF-18菌体生长迅速且生长状况良好,与菌株CCTCC AB 90008(正常LB固体培养基,对照)的生长状况无差异;NaCl质量分数为15%时,菌体生长需要2 d,分泌黏液较多;NaCl质量分数为18%的条件下,菌体生长需要4 d且菌落较少,培养至7 d左右,菌落增多;NaCl质量分数为20%时,菌体没有生长。而对照菌株枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) CCTCC AB 90008仅在质量分数3%、5%的NaCl条件下生长迅速且生长状况良好,随着NaCl质量分数升高,菌体不生长。

表1 菌株SF-18对NaCl的耐受情况

Table 1 Tolerance of strain SF-18 to NaCl

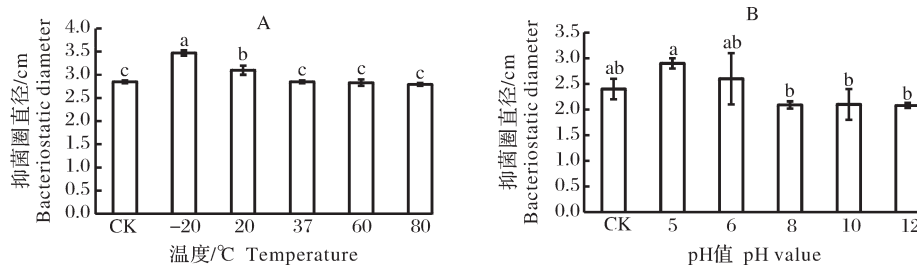
菌株 Strain	NaCl质量浓度 NaCl concentration						
	Control	3%	5%	10%	15%	18%	20%
SF-18	+++++	+++++	+++++	++++	++	+	0
CCTCC AB 90008	+++++	+++++	+++++	0	0	0	0

注:+++++:生长迅速且菌落较多;++++:生长迅速且菌落多;+++:生长慢且菌落少;+:生长较慢且菌落少;0:无生长。

Note:+++++:Rapid growth and abundant bacterial colonies;++++:Rapid growth and many bacterial colonies;+++ : Slow growth and few bacterial colonies; +: Slower growth and few bacterial colonies; 0: No growth.

以大丽轮枝菌为指示菌,测定菌株SF-18发酵液抑菌作用的稳定性,结果如图2所示。SF-18菌株的抑菌活性物质能耐受 $-20\sim 80\ ^\circ\text{C}$ 的温度条件(图2A),在此范围内,随着温度的升高,抗菌活性有所下

降,但不能耐受 $100\ ^\circ\text{C}$ 的高温(结果未显示)。pH稳定性结果显示,该菌株的抑菌物质能耐受较宽的酸碱环境范围,在pH 12的条件下仍然具有较强的抑菌活性,在pH 5的条件下抑菌活性最强(图2B)。



A: 温度; B: pH 值。图中不同小写字母表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。
A: Temperature; B: pH value. Different lowercase letters indicate significant different ($P < 0.05$).

图2 菌株 SF-18 发酵液中抑菌物质对大丽轮枝菌抑菌作用的稳定性

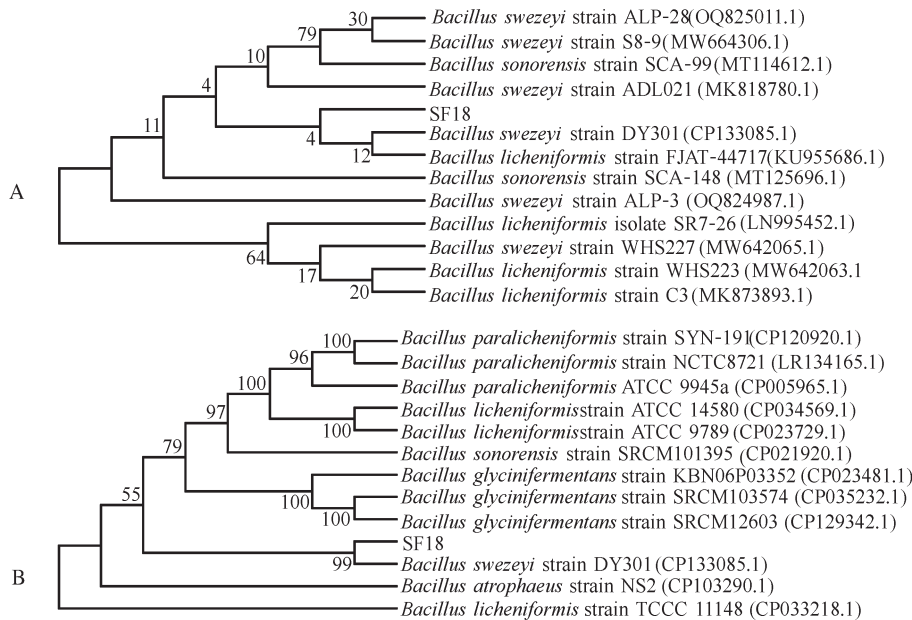
Fig. 2 The stability of inhibitory materials in strain SF-18 cell-free supernatant against *V. dahliae* under different environmental conditions

2.3 菌株 SF-18 的基因组分析

菌株 SF-18 的基因序列位于 1 条染色体上, 不含质粒, 全基因组大小为 3 759 102 bp, 平均 GC 含量为 45.14%, 共编码 4 392 个基因、80 个 rRNA、82 个 tRNA 和 115 个非编码 RNA (ncRNA)。

基于菌株 SF-18 的 16S rDNA 序列和 *gyrB* 基因构建系统发育树, 结果如图 3 所示。16S rDNA 序列比对结果显示, 菌株 SF-18 与菌株 *B. swezeyi* DY301

和 *B. licheniformis* FJAT-44717 聚在一起, 再与 *B. swezeyi* ADL021 等多株菌株聚为一簇(图 3A); *gyrB* 基因的序列比对结果显示, 菌株 SF-18 与菌株 *B. swezeyi* DY301 聚在一起, 再与 *B. glycinifermentans* SRCM12603、*B. sonorensis* SRCM101395、*B. licheniformis* ATCC 14580 等菌株聚成一簇(图 3B)。因此, SF-18 隶属于芽孢杆菌属(*Bacillus*), 与斯韦泽伊芽孢杆菌 (*B. swezeyi*) 亲缘关系最近。



A: 基于 16S rDNA 序列; B: 基于 *gyrB* 序列。A: Based on 16S rDNA gene sequence; B: Based on *gyrB* gene sequence.

图3 菌株 SF-18 的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic relationship of strain SF-18

2.4 基因组序列的功能注释结果

将预测到的菌株 SF-18 各基因的蛋白序列, 与 NR、COG、GO、KEGG、CAZy 等多个数据库进行对比, 获得功能注释, 结果如表 2 所示。NR 数据库中基因获得功能注释最多, 基因组的 4 392 个基因均得到注释; 在 COG、KEGG 和 GO 数据库分别有 3 733、

2 439、1 473 个基因获得功能注释, 分别占基因总数的 84.99%、57.60% 和 33.54%; 有 480 个基因在 CAZy 数据库中获得注释, 是本研究使用的数据库中获得基因功能注释最少的, 仅占基因总数的 10.93%。

1) COG 数据库注释结果分析。菌株 SF-18 中 84.99% 的编码蛋白基因 (3 733 个基因) 在 COG 数

表2 数据库中菌株SF-18基因功能注释情况

Table 2 The gene functional annotation of strain SF-18 in different database

数据库类型 Types of database	基因数量 Gene number	比例/% Percentage
NR	4 392	100.00
COG	3 733	84.99
KEGG	2 439	57.60
GO	1 473	33.54
CAZy	480	10.93

数据库中得到注释(图4),分为21个COG亚类,其中,

常规功能预测基因471个,未知功能基因353个,分别占总蛋白序列的10.72%和8.04%。此外,amino acid transport and metabolism(氨基酸运输与代谢)、transcription(转录)、carbohydrate transport and metabolism(碳水化合物运输及代谢)和inorganic ion transport and metabolism(无机离子运输与代谢)是含量较为丰富的几个亚类,其参与基因分别为362、322、320和232个,分别占总蛋白序列的8.24%、7.33%、7.29%和5.28%。

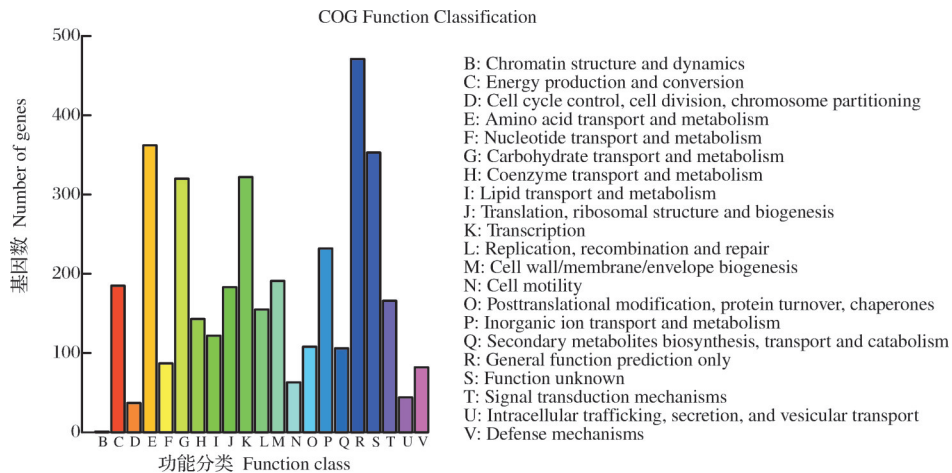


图4 菌株SF-18的基因组COG功能注释结果

Fig. 4 Functional classification of strain SF-18 genome in COG database

2)GO注释结果分析。GO数据库注释结果显示,菌株SF-18基因组中基因富集到3个方面共1 473个GO terms中(图5)。其中,biological process(生物学过程)共14个分支,被注释到2 530个基因,metabolic process、cellular process和localization分支中涉及的基因最多,各有990、667和355个基因;molecular function(分子功能)12个分支共有3 046个注释结果,注释结果最多的3个分支是binding、catalytic activity、transporter activity,分别为1 460、1 054和236个基因。cellular component(细胞组分)8个分支中注释到992个基因,与membrane part、membrane、cell part有关的基因相关性最高,分别有302、275和219个。

3)KEGG注释结果分析。KEGG数据库比对分析发现,SF-18基因组中共有2 439个编码蛋白富集到6大类信号通路层次的40条代谢通路中,占基因总数的55.53%,其中21条代谢通路的基因数大于20个(图6),参与metabolism(代谢类)通路的基因最多,其次是环境信息处理类通路。在metabolism通路中,基因注释结果最多的分别是carbohydrate metabolism(碳水化合物代谢),有385个基因注释结

果、amino acid metabolism(氨基酸代谢),有283个基因被注释以及global and overview maps(全局和概述图谱)通路,有280个基因注释结果;在环境信息处理类通路,最多的注释结果集中在membrane transport(膜转运)有153个基因被注释和signal transduction(信号转导)通路,有136个基因被注释。KEGG结果说明菌株SF-18中存在丰富的代谢通路,暗示着菌株具有非常活跃的代谢活动。

4)CAZy功能分析。CAZy数据库比对分析(表3)显示,属于CAZy家族的蛋白质结构域(6大类别)的编码基因在菌株SF-18基因组中共有480个,其中,208个基因编码的蛋白属于糖苷转移酶家族(glycosyl transferases,GTs)、131个属于糖苷水解酶(glycoside hydrolases,GHs)家族、49个编码碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases,CEs)、4个编码辅助氧化还原酶(auxiliary activities, AAs)、8个编码多糖裂解酶(polysaccharide lyases,PLs)、80个编码碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding modules,CBMs),其中,在整个基因家族占比较高的是糖苷转移酶家族的蛋白(GTs)(43.33%)和糖苷水解酶

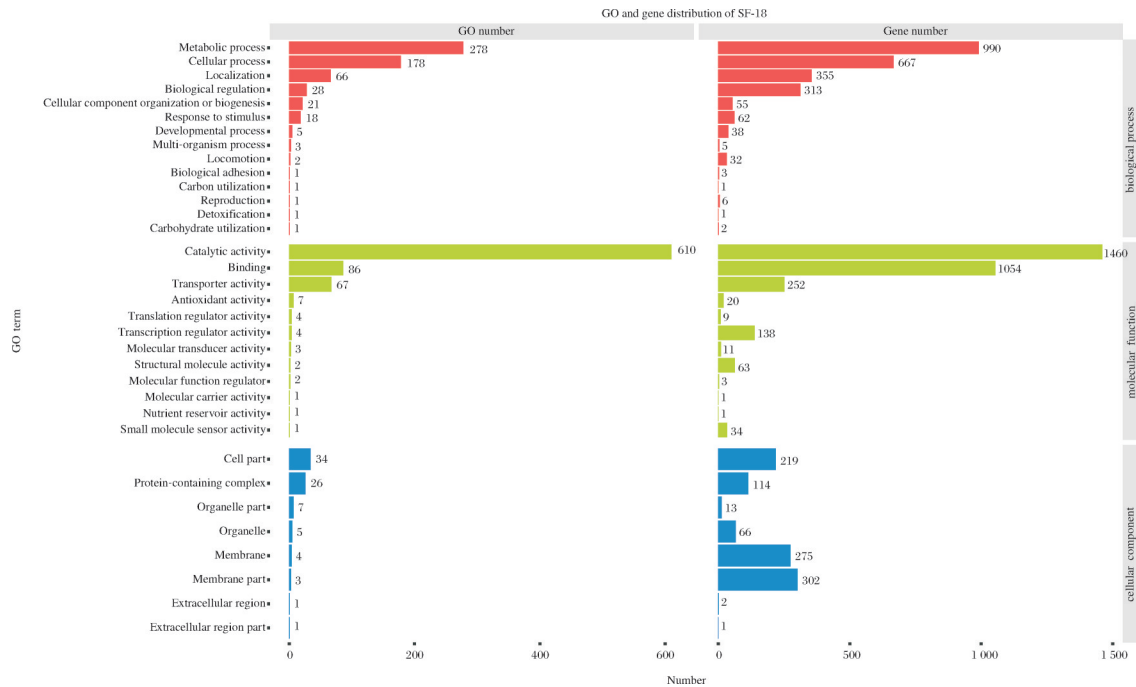


图 5 菌株 SF-18 基因组 GO 注释结果

Fig. 5 GO annotation result of strain SF-18 genome

(GHs)家族(27.29%)。对这些基因家族进行分析发现,SF-18基因组中含有编码几丁质酶(chitinase)的基因(*GH18*、*GH19*、*GH48*和*CBM50*等)、纤维素酶(cellulase)的基因(*GH5*、*GH9*、*GH12*、*GH26*、*GH48*等),降解木聚糖的相关酶基因(*GH18*、*GH26*、*CBM9*、*CBM13*等),降解肽聚糖的相关酶基因(*GT51*、*CBM50*等),降解葡聚糖酶(glucanase)的相关酶基因(*GH1*、*GH3*、*GH9*、*GH12*、*GH16*、*GH48*、*GH51*等),以及编码溶菌酶(lysozyme)的相关酶基因(*GH23*、*GH25*等)等。因此,从基因角度推测,菌株 SF-18 潜在地具有降解几丁质、葡聚糖、纤维素、木聚糖、肽聚糖等物质的能力。

2.5 菌株 SF-18 的次级代谢产物合成基因簇分析结果

芽孢杆菌的抑菌活性与其产生的次级代谢产物关系密切^[18]。预测菌株 SF-18 有 16 个次级代谢产物基因簇(表 4),分析具有抗菌活性的物质如下:聚酮化合物(bcillaene)、schizokinen、丁酰苄菌素(butirosin)、抗霉枯草菌素(mycosubtilin)、丰原素(fengycin)、普切明酸(pulcherriminic acid)、儿茶酚型嗜铁素(bacillibactin)、mersacidin、zwittermicin A 等。这些次级代谢产物基因簇中,丰原素(fengycin)、儿茶酚型嗜铁素(bacillibactin)、抗霉枯草菌素(mycosubtilin)通过非核糖体途径(NRPS)合成,聚酮化合物(bcillaene)

通过聚酮合成酶途径(PKS)合成;羊毛硫类细菌素(mersacidin)是通过核糖体途径(RS)合成。

对这些基因簇进行分析,发现 Cluster 1、Cluster 14 和 Cluster 16 这 3 个基因簇能比对到完全相似的已鉴定基因簇,分别与菌株 *B. velezensis* FZB42 的 bacillaene 合成基因簇(BGC0001089), *Bacillus* sp. WMMC1349 的 bacillibactin/bacillibactin E/bacillibactin F 合成基因簇(BGC0002695)、*Bacillus* sp. HIL-Y85/54728 的 mersacidin 合成基因簇(BGC0000527)的相似性均为 100%; Cluster 6、Cluster 7、Cluster 5 和 Cluster 10 这 4 个基因簇与已鉴定的基因簇具有较高的相似性,如 Cluster 6 与 *B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633 的 mycosubtilin 合成基因簇(BGC0001103)具有 50% 的相似性, Cluster 7 与 *B. velezensis* FZB42 的 fengycin 合成基因簇(BGC0001095)具有 60% 的相似性; Cluster 5 与 schizokinen 合成基因簇(BGC0002683)相似性为 60%; Cluster 10 与 cytolysinClyL1/cytolysin ClyLs 合成基因簇(BGC0000504)相似性为 40%; 有 2 个基因簇与已鉴定的基因簇存在一定的相似性,如 Cluster 4 与 *B. circulans* 的丁酰苄菌素(butirosin)基因簇(BGC0000693)相似性为 7%; Cluster 3 与 *B. cereus* 的双效菌素(zwittermicin A)基因簇(BGC0001059)相似性为 22%; 菌株 SF-18 中还可能存在一些功能未知的基因簇(Cluster 2、8、9、11、13、15),包括 phospho-

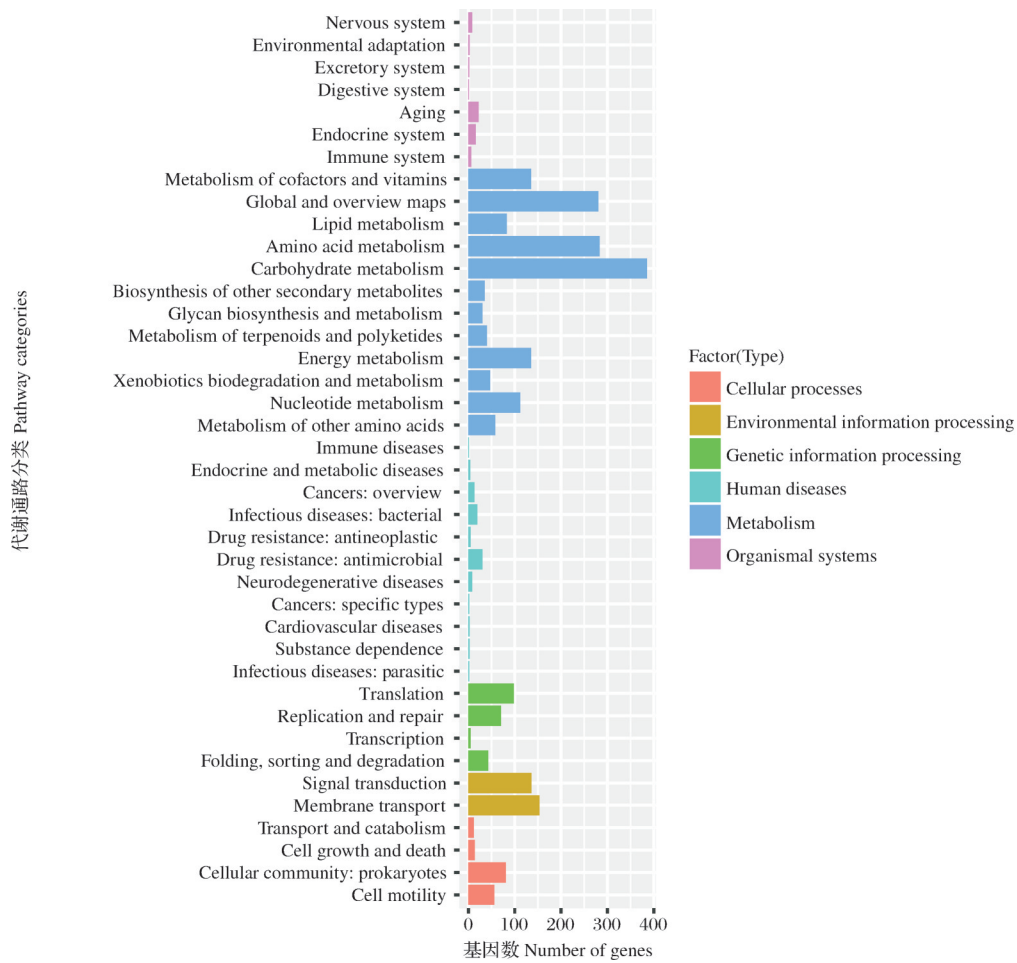


图6 菌株SF-18的基因组KEGG数据库注释结果

Fig. 6 The annotated analysis results of KEGG database for strain SF-18 genome

表3 菌株SF-18基因组中CAZy统计结果

Table 3 Statistical results of CAZy in strain SF-18 genome

碳水化合物活性酶基因家族 Carbohydrate-active enzyme family	基因数 Number of genes	基因亚家族(基因数) Gene subfamily (number of genes)
糖苷转移酶 Glycosyl transferases (GTs)	208	GT1(8), GT2(97), GT4(51), GT5(6), GT8(3), GT9(7), GT19(1), GT24(1), GT26(1), GT28(7), GT30(3), GT34(1), GT35(1), GT41(2), GT47(1), GT49(1), GT51(15), GT66(1), GT96(1)
糖苷水解酶 Glycoside hydrolases (GHs)	131	GH1(8), GH2(3), GH3(9), GH4(5), GH5(5), GH9(1), GH12(1), GH13(10), GH16(1), GH17(2), GH18(6), GH19(1), GH23(10), GH25(1), GH26(1), GH28(6), GH31(1), GH32(11), GH33(3), GH39(3), GH42(2), GH43(6), GH47(1), GH48(1), GH51(1), GH53(3), GH65(3), GH68(2), GH72(1), GH73(5), GH93(2), GH99(1), GH105(2), GH109(3), GH113(1), GH130(2)
碳水化合物酯酶 Carbohydrate esterases (CEs)	49	CE1(1), CE4(10), CE6(2), CE7(1), CE8(2), CE9(6), CE11(7), CE12(4), CE14(9), CE15(1),
辅助氧化还原酶 Auxiliary activities (AAs)	4	AA4(1), AA6(1), AA10(2)
多糖裂解酶 Polysaccharide lyases (PLs)	8	PL1(4), PL9(1), PL11(2), PL12(1)
碳水化合物结合模块 Carbohydrate-binding modules (CBMs)	80	CBM2(3), CBM3(2), CBM5(4), CBM6(1), CBM9(2), CBM12(1), CBM13(5), CBM32(2), CBM34(1), CBM35(1), CBM48(2), CBM50(50), CBM51(2), CBM57(3), CBM63(1)

表4 菌株 SF-18 中合成次级代谢产物的编码基因簇
Table 4 The encoding clusters of synthesizing secondary metabolite in strain SF-18

基因簇 ID Cluster ID	序列长度/bp Nucleotide length	基因数目 Gene number	基因簇类型 Cluster type	同源性/% Ratio of genes show similarity	功能 Most similar known cluster
Cluster 1	141 439	11	Polyketide+NRP	BGC0001089 (100)	Bacillaene
Cluster 2	10 828	8	—	—	—
Cluster 3	80 732	11	NRP+Polyketide	BGC0001059 (22)	Zwittermicin A
Cluster 4	42 090	11	Thiopeptide	BGC0000693 (7)	Butirosin A/butirosin B
Cluster 5	15 466	10	Others	BGC0002683 (60)	Schizokinen
Cluster 6	75 887	42	NRP+Polyketide	BGC0001103 (50)	Mycosubtilin
Cluster 7	28 512	11	NRP	BGC0001095 (60)	Fengycin
Cluster 8	21 887	11	Terpene	—	—
Cluster 9	41 104	48	T3PKS	—	—
Cluster 10	22 002	21	RiPP:Lanthipeptide	BGC0000504 (40)	CytolysinClyLI/cytolysin ClyLs
Cluster 11	24 996	25	—	—	—
Cluster 12	20 750	21	Others	BGC0002103 (66)	Pulcherrimic acid
Cluster 13	10 345	10	RiPP-like	—	—
Cluster 14	51 828	47	NRP	BGC0002695 (100)	Bacillibactin/bacillibactin E/bacillibactin F
Cluster 15	20 273	22	—	—	—
Cluster 16	23 237	21	RiPP:Lanthipeptide	BGC0000527 (100)	Mersacidin

nate 2 种、萜类(terpene) 1 种、T3PKS (type III PKS) 类 1 种、RiPP-like 1 种、RRE-containing 1 种。

2.6 其他抗菌相关因子

菌株 SF-18 能够耐受 18% 的 NaCl, 分析其基因组序列, 发现基因组中具有产生亚精胺 (spermidine) / 腐胺 (putrescine) 合成酶和转运系统的基因, 以及海藻糖蛋白代谢等与菌株的抗逆性密切相关的基因; 也存在与诱导寄主抗性相关的合成乙酰乳酸合酶与乙酰乳酸脱羧酶等的基因, 从基因角度说明菌株 SF-18 能够诱导寄主产生抗性。在基因组中, 还含有编码植酸酶 (phytase) 的编码基因。

3 讨论

芽孢杆菌属细菌如枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、贝莱斯芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等作为生防菌, 防治多种作物病害成效显著, 这些生防菌多数从植物根际等生境中获得, 不同的芽孢杆菌对环境的抗逆性程度不同。

本研究从新疆阿克苏盐碱地土样中分离筛选到 1 株耐盐芽孢杆菌 SF-18, 经 16S rDNA 序列分析初步鉴定为芽孢杆菌属 (*Bacillus*), 与斯韦泽伊芽孢杆菌 (*B. swezeyi*) 亲缘关系最近。由于芽孢杆菌属内的物种间亲缘关系较近, 可以采用编码 DNA 促旋酶 B 亚单位蛋白的 *gyrB* 基因来提高芽孢杆菌鉴定的准确度^[24], 因此, 本研究基于 16S rDNA 序列构建了菌株

SF-18 的系统进化树, 通过 *gyrB* 基因再次确定了 SF-18 的系统进化关系。

菌株 SF-18 基因组全长 3 759 102 bp, 平均 GC 含量为 45.14%, 共编码 4 392 个基因。芽孢杆菌具有生防潜能的关键因素是其产生的抑菌次级代谢产物^[27], SF-18 基因组中存在大量与抗菌物质合成相关的基因簇, 包括与聚酮化合物 bacillaene、儿茶酚型嗜铁素 (bacillibactin)、羊毛硫类细菌素 mersacidin 等物质完全一致的合成基因簇, 同源性较高的丰原素 (fengycin)、schizokinen、抗霉枯草菌素 (mycosubtilin) 等合成基因簇, 以及同源性不高的丁酰甘菌素 (butirosin) 和 zwittermicin A 的合成基因簇。多聚烯类抗生素 bacillaene 由聚酮合成酶途径 (PKS) 合成, 能抑制蛋白质的合成^[28], 对细菌和真菌均有抑制作用; 儿茶酚型嗜铁素 bacillibactin 通过非核糖体途径 (NRPS) 合成, 是一种对铁离子具有高亲和性的螯合剂, 通过对病原菌生长和发挥活性必需的可溶性铁离子的竞争作用抑制病原菌的生长而发挥生防功效^[29]。羊毛硫类细菌素 mersacidin 通过核糖体途径 (RS) 合成, 属于 Class II 类的羊毛硫肽, 能结合 lipid II 这一合成细菌肽聚糖的重要前体, 使得掺入葡萄糖和 D-丙氨酸受到抑制, 从而阻止细菌细胞壁的单体聚合形成具有功能的胞壁质^[30]。丰原素 (fengycin) 存在于多种芽孢杆菌中的广谱性抗菌物质, 过改变病原真菌生物膜的结构与通透性进一步影响脂膜的

稳定性和完整性,从而产生抑菌作用^[31];抗霉枯草菌素(mycosubtilin)属于伊枯草菌素家族的抗菌肽,由聚酮合酶-NRPS杂合体系合成,通过影响细胞膜的完整性和改变膜的通透性而引起菌体的死亡^[32];schizokinen是一种铁载体,与结合并利用外源异羟羟酸型嗜铁素相关^[33];普切明酸(pulcherrimic acid)能够通过螯合铁离子抑制病原微生物的生长^[34];丁酰菌素(butirosin)是一种氨基糖苷类抗生素,有效作用于沙门氏菌等革兰氏阴性菌^[35];双效菌素 zwittermicin A是自然界发现的第一种水溶性氨基多元醇小分子抗生素,是一类新抗生素,同时具备非核糖体肽和聚酮杂合特征,对多种微生物的生长起到抑制作用^[36]。此外,SF-18基因组中还包含有6种功能未知的基因簇。该菌株对金黄色葡萄球菌和大丽轮枝菌的抑制活性可能就是与这些已知的具有良好抑菌活性的物质相关,而其他功能尚不明确的代谢产物的存在也可能对该菌株的抑菌活性有一定作用。

真菌细胞壁由多糖组成,主要成分为几丁质、 β -1,3-葡聚糖、甘露聚糖、纤维素和半乳糖聚合物等,结构复杂^[37]。真菌的细胞壁在真菌的存活中起着至关重要的保护作用,细胞壁结构的破坏会导致细胞质膜的破裂与细胞的溶解^[38]。几丁质在几丁质酶的作用下水解生成2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖(GlcNAc),葡聚糖酶、纤维素酶和肽聚糖酶等能与几丁质酶协同作用,破坏真菌细胞壁结构的完整性,进而抑制真菌菌丝的生长和孢子的萌发,从而达到生物防治的效果^[39],因此,各种细胞壁的降解酶也可作为一种重要的抑菌物质用于真菌病害的防治。在菌株SF-18基因组中共获得480个CAZy家族的编码基因,含有大量与几丁质、纤维素、木聚糖、肽聚糖等降解细胞壁结构相关的酶的编码基因,推测菌株SF-18通过各种碳水化合物酶系的共同作用降解病原真菌的细胞壁也是其抑菌的机制之一。

SF-18能够耐受18%的NaCl,发酵液抑菌性能稳定,对其基因组序列分析发现,该菌株具有产生亚精胺(spermidine)/腐胺(putrescine)合成酶和转运系统的基因,以及海藻糖蛋白代谢相关的基因。作为小分子物质,亚精胺和海藻糖均具有保护机体耐受高盐、低温、低湿环境的功能^[40],而从基因角度揭示了菌株SF-18具有耐受极端环境的能力,拓宽了菌株的生存环境。

在菌株SF-18的基因组中,也含有生成乙酰乳酸合酶与乙酰乳酸脱羧酶等与诱导抗性相关的基

因^[41],从基因角度说明菌株SF-18能够诱导寄主产生抗性。在基因组中还存在有植酸酶基因。植酸及植酸盐在植酸酶的作用下可被水解成肌醇与磷酸(或磷酸盐),土壤中量施用产植酸酶的微生物,不但可以提高土壤中植酸形式磷的生物利用率,对植物具有明显的促生和增产作用^[42],还可降低过量施用磷肥对环境造成的污染,具有改善土壤的潜力。

参考文献 References

- [1] 杨立,陈美兰,邵爱娟,等.生防菌对药用植物土传病害的抗病机制及应用探讨[J].中国中药杂志,2012,37(21):3188-3192. YANG L, CHEN M L, SHAO A J, et al. Discussion on applications and mechanisms of biocontrol microorganisms used for controlling medicinal plant soil-borne diseases[J]. China journal of Chinese materia medica, 2012, 37(21): 3188-3192 (in Chinese with English abstract).
- [2] 王蕊,王腾,李二峰.生防芽孢杆菌在植物病害领域的研究进展[J].天津农学院学报,2021,28(4):71-77. WANG R, WANG T, LI E F. Research advances of biocontrol *Bacillus* in the field of plant diseases[J]. Journal of Tianjin Agricultural University, 2021, 28(4): 71-77 (in Chinese with English abstract).
- [3] FIRA D, DIMKIĆ I, BERIĆ T, et al. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species[J]. Journal of biotechnology, 2018, 285: 44-55.
- [4] 高圣凤,刘爱勤,桑利伟,等.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. GAO S F, LIU A Q, SANG L W, et al. 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 with English abstract).
- [5] 王晓宇,罗楚平,陈志谊,等.枯草芽孢杆菌Bs-916的全基因组分析[J].中国农业科学,2011,44(23):4807-4814. WANG X Y, LUO C P, CHEN Z Y, et al. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* bs-916[J]. Scientia agricultura sinica, 2011, 44(23): 4807-4814 (in Chinese with English abstract).
- [6] 王继华,徐世强,张木清.解淀粉芽孢杆菌的研究进展[J].亚热带农业研究,2017,13(3):191-195. WANG J H, XU S Q, ZHANG M Q. Research progress on *Bacillus amyloliquefaciens* [J]. Subtropical agriculture research, 2017, 13(3): 191-195 (in Chinese with English abstract).
- [7] 张莹,秦宇轩,尚庆茂,等.解淀粉芽孢杆菌L-H15的促生与抗病特性研究[J].农业机械学报,2017,48(12):284-291. ZHANG Y, QIN Y X, SHANG Q M, et al. Characteristics of

- growth-promotion and antibiosis by *Bacillus amyloliquefaciens* L-H15[J]. Transactions of the CSAM, 2017, 48(12): 284-291(in Chinese with English abstract).
- [8] 李铮,王金辉,丁丽丽,等. 贝莱斯芽孢杆菌菌株 NZ-4 生防潜能及基因组学分析[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(2): 117-125. LI Z, WANG J H, DING L L, et al. Biocontrol potential and genomic analysis of *Bacillus velezensis* strain NZ-4[J]. Jiangsu agricultural sciences, 2023, 51(2): 117-125 (in Chinese with English abstract).
- [9] 李苗苗,张家韬,崔传斌,等. 三株芽孢杆菌的生防特性研究[J]. 中国烟草科学, 2020, 41(4): 80-89. LI M M, ZHANG J T, CUI C B, et al. Study on biocontrol characteristics of three *Bacillus* strains[J]. Chinese tobacco science, 2020, 41(4): 80-89 (in Chinese with English abstract).
- [10] SULTANA R, KIM K. *Bacillus thuringiensis* C25 suppresses popcorn disease caused by *Ciboria shiraianain* mulberry (*Morus australis* L.) [J]. Biocontrol science and technology, 2016, 26(2): 145-162.
- [11] 邢芳芳,宋涛,徐文凤,等. 侧孢芽孢杆菌在生防中的应用及研究进展[J]. 山东农业科学, 2014, 46(6): 146-149. XING F F, SONG T, XU W F, et al. Application of *Bacillus laterosporus* in biological prevention and research advances [J]. Shandong agricultural sciences, 2014, 46(6): 146-149 (in Chinese with English abstract).
- [12] 柳成东,赵平,王乙茹,等. 凝结芽孢杆菌抑菌性能的研究进展[J]. 饲料工业, 2021, 42(10): 58-64. LIU C D, ZHAO P, WANG Y R, et al. Research progress on antibacterial properties of a probiotic *Bacillus coagulans* [J]. Feed industry, 2021, 42(10): 58-64 (in Chinese with English abstract).
- [13] 郭继平,马光,苏长青. 一株生防地衣芽孢杆菌分泌蛋白质的鉴定及分析[J]. 北方园艺, 2018(18): 29-35. GUO J P, MA G, SU C Q. Identification and analysis of secreted proteins from a biocontrol strain of *Bacillus licheniformis* [J]. Northern horticulture, 2018(18): 29-35 (in Chinese with English abstract).
- [14] 龚国利,王忠忠. 短短芽孢杆菌的鉴定及其抑菌物质的初步研究[J]. 陕西科技大学学报, 2017, 35(4): 126-131. GONG G L, WANG Z Z. Identification of *Brevibacillus brevis* strain and preliminary study on its antibacterial substance [J]. Journal of Shaanxi University of Science & Technology, 2017, 35(4): 126-131(in Chinese with English abstract).
- [15] 王静,曹建敏,陈德鑫,等. 短小芽孢杆菌 AR03 挥发性有机物的抑菌活性及其组分分析[J]. 中国农业科学, 2018, 51(10): 1908-1919. WANG J, CAO J M, CHEN D X, et al. Antimicrobial effect and components analysis of volatile organic compounds from *Bacillus pumilus* AR03 [J]. Scientia agricultura sinica, 2018, 51(10): 1908-1919 (in Chinese with English abstract).
- [16] 周全胜. 25 亿 CUF/g 坚强芽孢杆菌可湿性粉剂防治水稻纹枯病效果研究[J]. 现代农业科技, 2018(9): 141. ZHOU Q S. Study on the control effect of 2.5 billion CUF/g *Bacillus fortis* wetttable powder on rice sheath blight [J]. Modern agricultural science and technology, 2018(9): 141 (in Chinese).
- [17] 王卫雄,沈博,贾洪柏,等. 根际生防菌群的应用及其防病增效的潜在机制[J]. 生物技术通报, 2020, 36(9): 31-41. WANG W X, SHEN B, JIA H B, et al. Application of rhizospheric biocontrol consortia and the potential mechanisms of their enhancing efficacy on disease-suppressive effect [J]. Biotechnology bulletin, 2020, 36(9): 31-41 (in Chinese with English abstract).
- [18] 王华,聂蓓蓓,包立军,等. 生防芽孢杆菌抑真菌机制及其在桑树真菌病害防治中的潜在应用价值[J]. 蚕业科学, 2021, 47(2): 186-193. WANG H, NIE B B, BAO L J, et al. Antifungal mechanism of biocontrol *Bacillus* and its potential application in the control of mulberry fungal diseases [J]. Acta sericologica sinica, 2021, 47(2): 186-193 (in Chinese with English abstract).
- [19] 李虹梅,何明川,高熹,等. 生防菌贝莱斯芽孢杆菌 MC2-1 全基因组测序分析[J]. 南方农业学报, 2022, 53(12): 3420-3432. LI H M, HE M C, GAO X, et al. Whole genome sequencing analysis of a biocontrol bacterium *Bacillus velezensis* MC2-1 [J]. Journal of southern agriculture, 2022, 53(12): 3420-3432 (in Chinese with English abstract).
- [20] 李苏冉,李雪,冯佳霖,等. 生防菌解淀粉芽孢杆菌 SQ-2 全基因组测序及生物信息学分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(3): 1073-1097. LI S R, LI X, FENG J L, et al. Whole genome sequencing and genomics analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* SQ-2 with biocontrol activity [J]. Microbiology China, 2023, 50(3): 1073-1097 (in Chinese with English abstract).
- [21] 戴利铭,李岚岚,刘一贤,等. 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[J]. 微生物学通报, 2021, 48(6): 2073-2088. DAI L M, LI L L, LIU Y X, et al. Whole genome sequencing and genomics analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* BS-3 with biocontrol activity [J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 2073-2088 (in Chinese with English abstract).
- [22] 李江,李光友. 极端微生物:生物活性物质的新源泉[J]. 自然杂志, 2011, 33(5): 275-280. LI J, LI G Y. Extremophilic microorganisms: new resources of bioactive substances [J]. Chinese journal of nature, 2011, 33(5): 275-280 (in Chinese with English abstract).
- [23] 俞冰倩,朱琳,魏巍. 我国盐碱土壤微生物研究及其展望[J]. 土壤与作物, 2019, 8(1): 60-69. YU B Q, ZHU L, WEI W. Microorganisms research in saline soil of China: progress and prospects [J]. Soils and crops, 2019, 8(1): 60-69 (in Chinese with English abstract).

- [24] WANG L T, LEE F L, TAI C J, et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group [J]. International journal of systematic and evolutionary microbiology, 2007, 57: 1846-1850.
- [25] 孙平平, 崔建潮, 贾晓辉, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的抑制作用评价及全基因组分析 [J]. 微生物学报, 2018, 58(9): 1637-1646. SUN P P, CUI J C, JIA X H, et al. Complete genome analysis of *Bacillus velezensis* L-1 and its inhibitory effect on pear gray and blue mold [J]. Acta microbiologica sinica, 2018, 58(9): 1637-1646 (in Chinese with English abstract).
- [26] 王传旭, 于慧瑛, 赵爱华, 等. 1 株盐湖芽孢杆菌 AF-1 的鉴定及其抗尖孢镰刀菌活性研究 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 2019, 41(1): 164-171. WANG C X, YU H Y, ZHAO A H, et al. Identification of *Bacillus* sp. AF-1 from a salt lake in Yuncheng and the antimicrobial activity against *Fusarium oxysporum* [J]. Journal of Yunnan University (natural sciences edition), 2019, 41(1): 164-171 (in Chinese with English abstract).
- [27] 高晓丹, 马鸣超, 曹凤明, 等. 基于生物化学和基因组学方法的 *Bacillus velezensis* 19573-3 生防潜力评价 [J]. 植物营养与肥料学报, 2021, 27(6): 1068-1079. GAO X D, MA M C, CAO F M, et al. Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* 19573-3 identified using biochemistry and genomics methods [J]. Journal of plant nutrition and fertilizers, 2021, 27(6): 1068-1079 (in Chinese with English abstract).
- [28] MÜLLER S, STRACK S N, HOEFLER B C, et al. Bacillaene and sporulation protect *Bacillus subtilis* from predation by *Myxococcus xanthus* [J]. Applied and environmental microbiology, 2014, 80(18): 5603-5610.
- [29] 刘邮洲, 沈佳慧, 乔俊卿, 等. 芽孢杆菌嗜铁素研究进展 [J]. 江苏农业学报, 2023, 39(1): 266-276. LIU Y Z, SHEN J H, QIAO J Q, et al. Research progress of siderophore produced by *Bacillus* spp. [J]. Jiangsu journal of agricultural sciences, 2023, 39(1): 266-276 (in Chinese with English abstract).
- [30] BRÖTZ H, BIERBAUM G, REYNOLDS P E, et al. The antibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation [J]. European journal of biochemistry, 1997, 246(1): 193-199.
- [31] JIN P F, WANG H N, LIU W B, et al. A new cyclic lipopeptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-2 and safety evaluation [J]. Pesticide biochemistry and physiology, 2018, 147: 40-45.
- [32] YU C J, LIU X, ZHANG X Y, et al. Mycosubtilin produced by *Bacillus subtilis* ATCC6633 inhibits growth and mycotoxin biosynthesis of *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* [J/OL]. Toxins, 2021, 13(11): 791 [2023-10-25]. <https://doi.org/10.3390/toxins13110791>.
- [33] STOREY E P, BOGHOZIAN R, LITTLE J L, et al. Characterization of 'Schizokine': a dihydroxamate-type siderophore produced by *Rhizobium leguminosarum* IARI 917 [J]. Biometals, 2006, 19(6): 637-649.
- [34] GORE-LLOYD D, SUMANN I, BRACHMANN A O, et al. Snf2 controls pulcherrimic acid biosynthesis and antifungal activity of the biocontrol yeast *Metschnikowia pulcherrima* [J]. Molecular microbiology, 2019, 112(1): 317-332.
- [35] HEIFETZ C L, CHODUBSKI J A, PEARSON I A, et al. Butirosin compared with gentamicin *in vitro* and *in vivo* [J]. Antimicrobial agents and chemotherapy, 1974, 6(2): 124-135.
- [36] HE H Y, SILO-SUH L A, HANDELSMAN J, et al. Zwittermicin A, an antifungal and plant protection agent from *Bacillus cereus* [J]. Tetrahedron letters, 1994, 35(16): 2499-2502.
- [37] LATGÉ J P. Tasting the fungal cell wall [J]. Cellular microbiology, 2010, 12(7): 863-872.
- [38] 朱信霖, 扈东营, 陈显振, 等. 作用于细胞壁的抗真菌药物研究进展 [J]. 菌物学报, 2022, 41(6): 871-877. ZHU X L, HU D Y, CHEN X Z, et al. A review of the study on antifungal drugs acting on cell wall [J]. Mycosystema, 2022, 41(6): 871-877 (in Chinese with English abstract).
- [39] 张博阳, 朱天辉, 韩珊, 等. 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. ZHANG B Y, ZHU T H, HAN S, et al. Cloning, expression and antibacterial functions of ChiKJ40, a chitinase gene from *Streptomyces sampsonii* [J]. Microbiology China, 2018, 45(5): 1016-1026 (in Chinese with English abstract).
- [40] ALCÁZAR R, BITRIÁN M, BARTELS D, et al. Polyamine metabolic canalization in response to drought stress in *Arabidopsis* and the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* [J]. Plant signaling & behavior, 2011, 6(2): 243-250.
- [41] 刘长乐, 郭月, 李芳芳, 等. 抗 ALS 类除草剂作物种质创制与利用研究进展 [J]. 植物遗传资源学报, 2022, 23(2): 333-345. LIU C L, GUO Y, LI F F, et al. Advances in development and utilization of crop germplasm resources resistant to ALS herbicides [J]. Journal of plant genetic resources, 2022, 23(2): 333-345 (in Chinese with English abstract).
- [42] IDRISSE E E, MAKAREWICZ O, FAROUK A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect [J]. Microbiology, 2002, 148(pt 7): 2097-2109.

Biocontrol potential and genomic analysis of salt tolerant bacterium *Bacillus* sp. SF-18

YAN Chunlan, YU Fuyan, WANG Yifei, LI Xiaoxiao, PENG Xianfeng, CHENG Guojun

College of Life Sciences, South-Central Minzu University, Wuhan 430074, China

Abstract The dilution coating plate method was used to isolate and screen a salt-tolerant strain SF-18 with significant antibacterial activity from soil samples in Aksu saline alkali land, Xinjiang to obtain biocontrol agents with elite antibacterial activity from extreme environments. The stability of the antagonistic activity of the supernatant of strain SF-18 cell-free fermentation was determined using the Oxford Cup method, with the *Verticillium dahliae* as an indicator strain. The whole genome of strain SF-18 was sequenced with Illumina Novaseq platform and PacBio sequel platform. Data sequenced were used to assembly gene, annotate the function of gene, and predict gene clusters involved in synthesizing secondary metabolites. The results showed that strain SF-18 had a significant inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Verticillium dahliae*, and grew in the broth containing 18% NaCl. The supernatant of strain SF-18 cell-free fermentation had strong antibacterial activity at -20-80 °C and tolerated pH 5-12 environments. The strain SF-18 was identified as belonging to the genus *Bacillus* based on analyzing the sequence of 16S rDNA gene and *gyrB* gene. The results of whole genome analysis showed that there were 480 genes of strain SF-18 involved in the metabolism of multiple carbon sources, including genes encoding compounds related to stress resistance such as spermidine and trehalose, and genes related to enzymes such as glucanase and chitinase that can hydrolyze the cell wall of pathogen. The results of predicting secondary metabolites showed that strain SF-18 contained gene clusters involved in synthesizing a various of resistant compounds including bacillaene, bacillibactin, mersacidin, fengycin, zwittermicin. It is speculated that strain SF-18 may achieve antibacterial effects by producing antibacterial secondary metabolites and related degradation enzymes, and has good application prospects in biological control of agriculture.

Keywords salt-tolerant bacteria; *Bacillus*; biological control; genomics; *Verticillium dahliae*; secondary metabolites

(责任编辑:张志钰)