

生防菌株贝莱斯芽孢杆菌 HNU24 全基因组测序及分析

曹秀兰¹, 叶雨婷¹, 马天浩¹, 胡安娜¹, 曹宇¹, 陈鹏泽¹, 伍壮生^{2*}, 李鹏^{1*}

1. 海南师范大学/热带岛屿生态学教育部重点实验室/海南省热带动植物生态学重点实验室, 海南海口 571158; 2. 海南省农业科学院蔬菜研究所, 海南海口 571100

摘要: 本研究旨在解析对茄雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 具有较强拮抗活性的生防菌株 HNU24 的基因组特征。采用 BGISEQ-500 和 ONT PromethION 平台相结合的策略, 对 HNU24 的全基因组进行了测序、组装、基因预测与功能注释、蛋白质同源分析。遗传进化分析结果表明: HNU24 为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*), 其完整基因组序列长度为 3 932 768 bp, GC 含量 46.48%, 编码 3822 个基因, 其中有 43 个碳水化合物活性酶基因家族。纤维素酶活性实验进一步表明其具有分解纤维素的能力。在 HNU24 基因组中预测到 13 个次级代谢产物生物合成基因簇, 其中包含表面活性素 (surfactin)、泛革素 (fengycin)、植物唑霉素 (plantazolicin)、大环内酰亚胺 (macrolactin)、杆菌烯 (bacillaene)、地非西丁 (difficidin)、杆菌毒素 (bacillibactin) 和杆菌溶菌素 (bacilysin) 8 种已报道的对青枯菌等病原菌有拮抗活性的化合物。5 个未能比对到同源基因或相似度较低, 可能为未鉴定和报道的新化合物。此外, 盆栽试验表明 HNU24 对番茄具有显著的促生长作用。综上, HNU24 可能通过分泌活性化合物来拮抗茄雷尔氏菌并促进番茄生长, 是一种潜在的生物肥料菌株, 相关结果为进一步开展 HNU24 在生物防治方面的研究和应用奠定基础。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 番茄青枯病; 全基因组; 次级代谢产物

中图分类号: S435.73 文献标识码: A

Analysis of the Whole Genome Sequence of Biocontrol Strain *Bacillus velezensis* HNU24

CAO Xiulan¹, YE Yuting¹, MA Tianhao¹, HU Anna¹, CAO Yu¹, CHEN Pengze¹, WU Zhuangsheng^{2*}, LI Peng^{1*}

1. Hainan Normal University / Key Laboratory of Ministry of Education for Ecology of Tropical Islands / Key Laboratory of Tropical Animal and Plant Ecology of Hainan Province, Haikou, Hainan 571158, China; 2. Vegetable Research Institute, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571100, China

Abstract: In order to reveal the genome characteristics of HNU24, which has excellent antagonistic ability to *Ralstonia solanacearum*, its complete genome was sequenced by the BGISEQ-500 and ONT PromethION technology, and the genome assembly, gene prediction, function annotation, and protein homology analysis also were conducted. Phylogenetic analysis results demonstrated that HNU24 belonged to *Bacillus velezensis*. Its completed genomic sequence length was 3 932 768 bp, GC content was 46.48%, and had 3822 genes. A total of 43 carbohydrate active enzyme gene families were identified in the genome, and the cellulase activity experiment further confirmed that the strain HNU24 had the ability to degrade cellulose. Thirteen clusters of secondary metabolite biosynthesis genes were predicted in genome, including eight compounds: surfactin, fengycin, plantazolicin, butirosin A/butirosin B, macrolactin, bacillaene, difficidin, bacillibactin and bacilysin, which have been reported as the antibacterial components. Five unknown components, which were found no homologous genes or were less similar to the known database sequences, may be new compounds that have not been identified and reported. In addition, greenhouse experiment demonstrated that HNU24 had significant growth promoting effect on tomato plants. Thus, HNU24 may antagonize *R. solanacearum* and promote tomato growth

收稿日期 2022-04-24; 修回日期 2022-07-19

基金项目 海南省重点研发计划项目 (No. ZDYF2020080)。

作者简介 曹秀兰 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 修复生态学。*通信作者 (Corresponding author): 李鹏 (LI Peng), E-mail: dayuleepong@163.com; 伍壮生 (WU Zhuangsheng), E-mail: dawu0719@163.com。

by secreting active compounds, and it is a potential biofertilizer strain. The relevant results would lay a foundation for further research and application of HNU24 in biological control.

Keywords: *Bacillus velezensis*; tomato bacterial wilt; complete genome; secondary metabolites

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.05.004

生物防治由于靶向明确且安全无污染,近年来已经成为发展可持续农业领域的研究热点。芽孢杆菌属的菌株是主要的生防细菌筛选目标之一,其中绝大部分是有益微生物,具有强大的生防潜力,同时根围或根际促生细菌也常来源于此属^[1-2]。属内枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)等已经被制成各类微生态制剂,广泛应用于农业、养殖、水产等领域,且成效显著^[3-4]。

贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*)于1999年被发现,2005年被首次报道和命名,但不同来源菌株的形态和理化性质不尽相同^[5]。已有研究结果表明贝莱斯芽孢杆菌分布广泛、生长迅速、能够产生大量次生代谢物质如抗菌蛋白、脂肽类抗生素等特性,是优良的生防菌株资源^[6]。如贝莱斯芽孢杆菌对禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、禾谷丝核菌(*Rhizoctonia cerealis*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)等多种植物病原菌有明显的拮抗活性^[7-10],同时杨成等^[11]的研究表明,贝莱斯芽孢杆菌 Y6 可通过侵入钉螺体内干扰糖原利用而达到杀灭的目的。其强大的抑菌谱得益于多种次生代谢产物介导下的多种抗菌机制,例如竞争作用、溶菌作用、拮抗作用等^[6]。王淋敏^[12]、张荣胜等^[13]的研究表明,使用贝莱斯芽孢杆菌制成的菌剂能够刺激植物生长,表明其也具有一定的促生长和诱导抗性的功能。FZB42 是贝莱斯芽孢杆菌的模式菌株之一,其全基因组测序与功能预测结果表明,约有 10% 的基因资源用于产生各类次级代谢产物,途径广泛、类型多样,且这些次级代谢产物均具备不同程度的抑菌和促进植物生长的能力,实验也证明该菌株对数十种植物病原细菌和病原真菌具有强大的抑制能力^[14]。

菌株 HNU24 是以强致病力茄雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)菌株 EP1^[15]为指示菌,从番茄砧木根系分离得到的一株生防菌,前期实验表明该菌株对 EP1 具有较强的拮抗活性。为进一步解析 HNU24 的功能机制和基因组特征,本

研究采用 BGISEQ-500 和 ONT PromethION 平台相结合的测序技术,组装得到 HNU24 的完整基因组序列,并进行基因预测、同源蛋白簇(cluster of orthologous groups of proteins, COG)、基因本体论(gene ontology, GO)、京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)、碳水化合物活性酶数据库(carbohydrate-active enzymes, CAZy)、次级代谢产物分析,经基因组聚类分析表明 HNU24 为贝莱斯芽孢杆菌,且温室实验表明其对番茄具有显著的促生长活性。相关结果对于进一步开展 HNU24 在生物防治方面的研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 HNU24 保藏于广东省微生物菌种保藏中心,菌株保藏编号为 GDMCC61231。取 HNU24 单菌落接种于 50 mL 的 LB 液体培养基中,37 °C, 150 r/min 培养至 $OD_{600}=1.0$,然后在 4 °C, 12 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,用于基因 DNA 提取,具体提取方法参照黄鹤等^[16]的方法。

1.2 方法

1.2.1 基因组测序、组装和序列分析 基因组测序。基于 BGISEQ-500 和 ONT PromethION 测序技术平台分别对 HNU24 菌株进行高通量全基因组测序,委托武汉希望生物科技有限公司进行。

基因组组装:使用 Unicycler 0.4.8 软件对 HNU24 菌株基因组测序产生的二代短读长和三代长读长测序数据进行混合组装,得到一条完整的环状基因组序列。

基因注释:使用 prokka v1.14.5 软件对 HNU24 基因组中的蛋白质编码基因和 tRNA、rRNA 等非编码基因进行注释。对蛋白编码基因,进一步使用 eggNog-mapper v2.1.5 软件进行 GO、KEGG、COG 和 CAZy 等功能注释。

1.2.2 分类地位和遗传进化分析 使用 GTDB-tk v1.6.0 软件分析 HNU24 的基因组序列,以确定其分类学地位。该软件利用细菌基因组中广泛存在的 120 个保守基因,对 HNU24 菌株进行系统发育

分析, 寻找 Genome Taxonomy Database 数据库 (RS202) 中与其关系最为接近的细菌物种。进一步分别使用 pyani v0.2.11 软件和在线工具 GGDC 3.0 (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php>) 计算 HNU24 和其近缘细菌基因组间的平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 和数字 DNA-DNA 杂交值, 以进一步判断 HNU24 的分类学地位。

1.2.3 CAZy 酶类数据库分析 碳水化合物活性酶 (CAZy) 按其功能分类主要包括糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GHs)、糖基转移酶 (glycosyl transferases, GTs)、多糖裂解酶 (polysaccharide lyases, PLs)、碳水化合物酯酶 (carbohydrate esterase, CEs)、辅助氧化还原酶 (auxiliary activities, AAs) 以及没有催化活性的碳水化合物结合模块 (carbohydrate-binding modules, CBMs)。基于碳水化合物活性酶数据库, 利用 hmmer^[17] 软件进行碳水化合物酶类基因的功能注释与分析。

1.2.4 次级代谢产物合成基因簇分析 使用 antiSMASH (version 5.1.2) 软件在线分析预测菌株 HNU24 基因组中的拮抗物质合成相关基因簇。

1.2.5 纤维素降解酶活性检测 分别将 HNU24 和 FZB42 在 5 mL 的 LB 液体培养基中 28 °C, 180 r/min 条件下振荡培养 24 h, 制备纤维素培养基平板 (羧甲基乙基纤维素 1.0 g, 磷酸钠 3.8 g, 琼脂糖 8 g, 溶解于 1 L 蒸馏水中, 其中羧甲基乙基纤维素需要在热水浴条件下溶解, 121 °C 灭菌 20 min), 每皿 25 mL, 待培养基冷却凝固后打孔, 每孔加入 40 μL 的 HNU24 或 FZB42 菌液, 培养 24 h, 加入适量 1 g/L 的刚果红染液, 以染液没过培养基为准, 室温静置 10 min, 倒掉染液, 往培养基里加入 1 mol/L NaCl 溶液脱色, 室温静置 10 min, 倒掉 NaCl 溶液, 重复脱色 2 次后, 白色背景下对培养基中形成的透明圈进行拍照记录和直径测量。

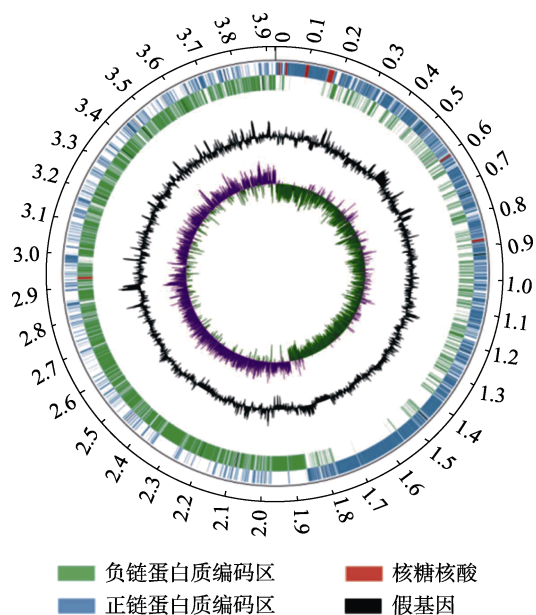
1.2.6 温室促生长实验 将 1 mL ($OD_{600}=1.0$) 的 HNU24 菌悬液在 100 mL 的 LB 液体培养基中振荡培养 48 h (28 °C, 180 r/min), 6000 r/min 离心 5 min, 去除培养基后用无菌水 100 mL 重悬制成悬液, 制备相应菌体悬液 500 mL。选出健康、长势良好且一致的番茄幼苗, 分为叶面喷施清水组 (A 组)、叶面喷施处理组 (B 组, 含 HNU24)、灌根清水组 (C 组)、灌根处理组 (D 组, 含 HNU24) 4 个组, 每组 3 个重复, 每个重复 10 株幼苗; 叶

面喷施清水组用清水进行叶面喷施处理, 至叶面湿润不滴水为止; 灌根清水组用清水进行灌根处理, 每盆每次灌根 100 mL 无菌水; 叶面喷施处理组用去培养基的 HNU24 无菌水重悬液进行叶面喷施, 至叶面湿润不滴水为止; 灌根处理组用去培养基的 HNU24 无菌水重悬液进行灌根处理, 每盆灌根 100 mL 菌悬液。将上述处理的番茄幼苗在室温 30 °C 的温室内培养, 为保证植株不受水分胁迫, 所有苗每隔 3 d 用 100 mL 的清水灌根, 30 d 后记录植株株高。

2 结果与分析

2.1 测序与组装

通过对测序结果进行组装, 获得了 HNU24 的完整基因组序列, 长度为 3 932 768 bp, GC 含量为 46.48%, 共编码 3822 个基因, 鉴定出 99 个 tRNA 基因, 33 个 rRNA 基因, 1 个 tmRNA 基因, 2 个 ncRNA 基因, 58 个假基因, 1 个 SPR-RNA 基因, 3747 个蛋白质编码区, 26 个生物核糖开关以及 12 个转座酶基因 (sequence read archive 授权号: SRR16216500) (图 1)。



第 1 圈 (从外向内): 基因组的大小 (Mb); 第 2 圈: 正链基因; 第 3 圈: 负链基因; 第 4 圈: 正链长链非编码 RNA; 第 5 圈: 负链长度非编码 RNA; 第 6 圈: 重复序列; 第 7 圈: GC 百分含量; 第 8 圈: GC 偏好。

1st circle (circles from outer to inner): Genome size; 2nd circle: Forward strand gene; 3rd circle: Reverse strand gene; 4th circle: Forward strand ncRNA; 5th circle: Reverse strand ncRNA; 6th circle: Repeat sequences; 7th circle: GC percent; 8th circle: GC-SKEW.

图 1 HNU24 全基因组圈图

Fig. 1 Circle diagram of HNU24 genome

2.2 分类地位与遗传进化分析

为了进一步确定菌株 HNU24 的分类地位,从数据库中下载了 45 个芽孢杆菌的全基因组,通过 ANI 和聚类分析,所有的菌株同 HNU24 被分为 A 和 B (B1 和 B2) 两个大支(图 2), *B. sonorensis* NBRC 101234、*B. paralicheniformis* KJ-16、*B. licheniformis* ATCC 14580、*B. licheniformis* DSM 13 等聚类为 A 支,与 HNU24 的 ANI 值低于 80%。HNU24 与 *B. velezensis* FZB42、*B. velezensis* KACC 18228、*B. velezensis* KTCT 13012 等聚类为 B1 支,其 ANI 值介于 97%~100%之间,高于种的分类阈值 95%, *B. atrophaeus* NBRC15539、*B. mojavensis* RO-H-1、*B. halotolerans* ATCC25096 等 29 株菌聚类为 B2 支,与 HNU24 的 ANI 值在 93%~95%之间,低于分类阈值。综上,菌株 HNU24 可归属为贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*),且与 FZB42 具有最高的基因组相似性。

2.3 基因功能注释及蛋白同源性分析

本研究对 HNU24 进行了基因功能注释、COG 功能分类分析。COG 功能分类统计结果表明(图 3),共有 3646 个蛋白具有明确的 COG 分类,约

占总蛋白数的 95.37%。在 22 个 COG 类别当中,其中最多的分类是功能未知的类群(876 个),占 COG 分类蛋白总数的 24.03%,分类为氨基酸运转与代谢的蛋白数量次之,占 8.83%,然后依次是转录相关蛋白(8.42%),碳水化合物运输和代谢相关蛋白(6.77%),无机离子转运和代谢相关蛋白(6.39%),能量生产和转换(5.57%),细胞壁/细胞膜/细胞外膜的合成(5.49%),翻译、核糖体、结构和生物发生(5.02%),信号转导机制(4.28%),复制、重组和修复(3.68%),辅酶转运与代谢(3.59%),脂质转运与代谢(3.57%),次级代谢产物合成、运输和分解(3.29%),翻译后修饰、蛋白质周转、分子伴侣(2.69%),核苷酸转运与代谢(2.66%),细胞运动(1.59%),防御机制(1.56%),胞内运输、分泌和滤泡转运(1.29%),细胞周期控制、控制细胞分裂、染色体分离(1.23%),染色体结构及动力学(0.03%),DNA 加工与修饰(0.03%)。

2.4 CAZy 酶类数据库对比分析

CAZy 酶类数据库对比结果表明菌株 HNU24

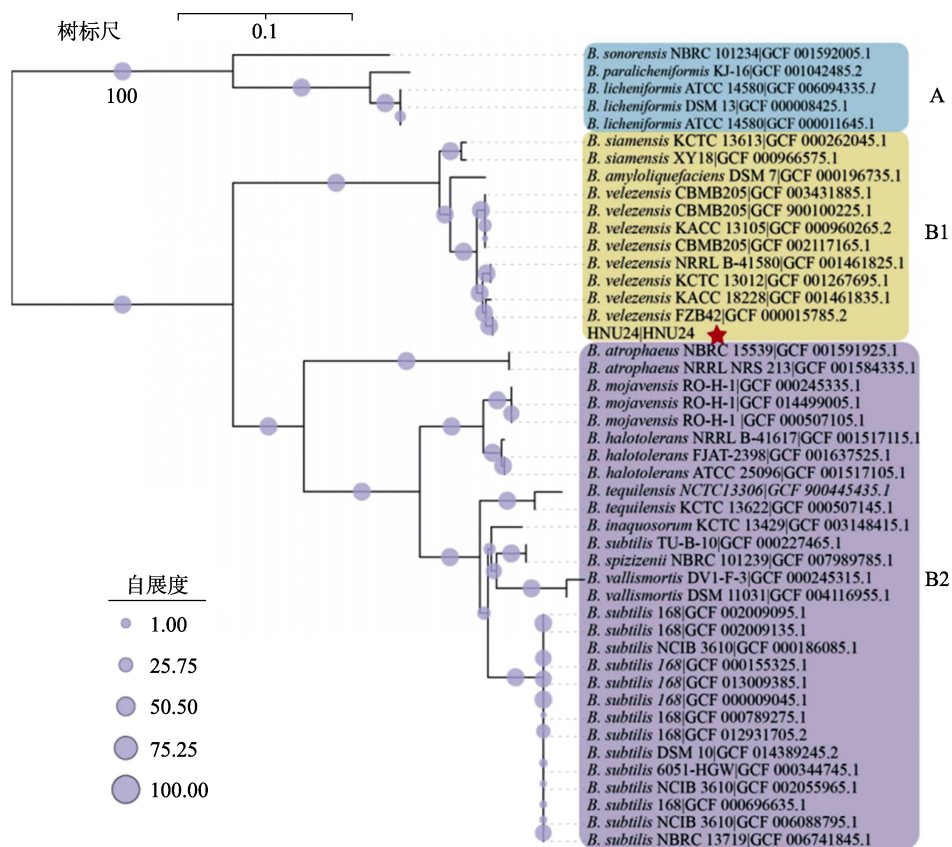


图 2 HNU24 及其近缘种遗传进化分析

Fig. 2 Genetic evolutionary analysis of HNU24 and its closely related species

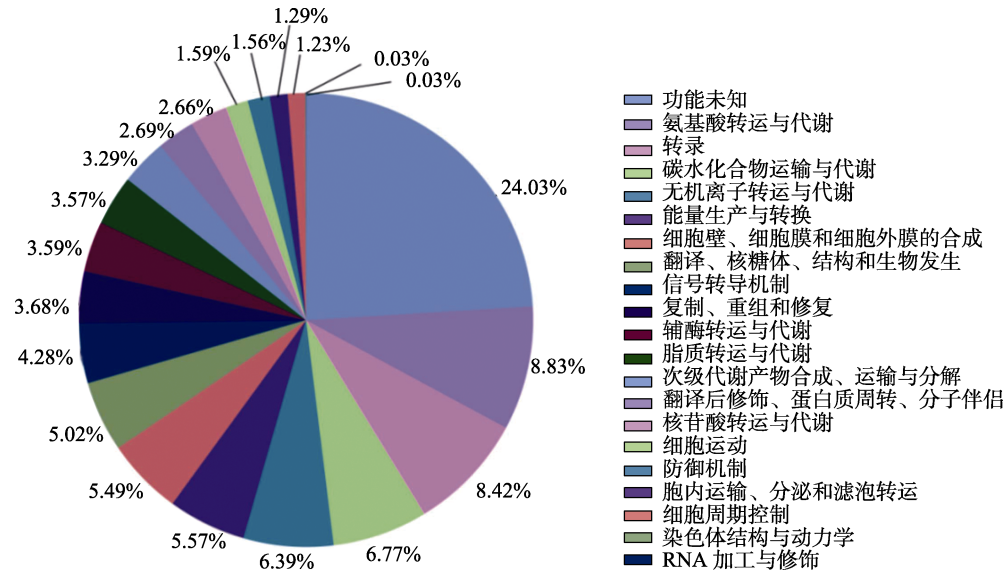


图 3 贝莱斯芽孢杆菌 HNU24 中基因的 COG 功能分类
Fig. 3 COG function classification of genes in HNU24

编码的碳水化合物活性酶基因家族 43 个 (表 1), 分别为 GTs (22 个)、GHs (13 个)、CBMs (2 个)、CEs (1 个) 基因家族, 另外还发现有复合酶类, 复合类型为 GH13/GH31 (2 个)、AA10/CBM73 (1 个)、CBM6/GH43 (1 个)、GH5/GH9 (1 个)。其中 GT 家族最多, 约占整个基因家族的 50%, GH 家族次之, 约占 29.5%, 复合酶类占整个基因家族的 13.6%。其中 GH9 家族对纤维素和木聚糖的降解能够发挥很大的作用, GH43、GH26、GH5、GH51 等家族也与纤维素和半纤维素的水解相关, 说明 HNU24 具有降解纤维素、半纤维素、木聚糖的潜力。为了进一步确定碳水化合物水解酶是否表达, 利用纤维素培养基结合刚果红染色法, 将其与贝莱斯芽孢杆菌模式菌株 FZB42 进行纤维素降解酶活性比较, 结果显示 HNU24 透明圈直径和 FZB42 相当, 均值为 18 mm (图 4), 说明其具备与 FZB42 相当的纤维素酶降解活性。CBM50 家族的酶类够裂解几丁质和纤维

素, 通过连接部分糖苷水解酶, 以分解几丁质和肽聚糖。推测菌株 HNU24 也具备分解几丁质和肽聚糖的潜力。

2.5 次级代谢产物预测

通过使用 antiSMASH 软件预测, 在 HNU24 基因组中预测到 13 个次级代谢产物生物合成基因簇, 其中 8 个能够找到完全相似或者相似度极高的已鉴定基因簇 (表 2), 分别是表面活性素 (surfactin)、植物唑霉素 (plantazolicin)、大环内酰亚胺 (macrolactin)、杆菌烯 (bacillaene)、泛革素 (fengycin)、地非西丁 (difficidin)、杆菌毒素 (bacillibactin)、杆溶菌素 (bacilysin), 其相似度除表面活性素为 91%外, 其余均为 100%, 另有 1 种聚酮合酶类似物与丁胺菌素 A/丁胺菌素 B (butirosinA/butirosinB) 相似度仅为 7%、2 种烯萜类化合物、1 种三型聚酮合酶化合物以及 1 种非核糖体多肽类化合物的基因簇尚未在数据库中对比出相似化合物基因簇, 极有可能是未知的化合物。

表 1 贝莱斯芽孢杆菌 HNU24 基因组中 CAZy 酶类基因家族
Tab. 1 CAZy enzyme gene families in genome of HNU24

CAZy 酶类家族 CAZy enzyme family	基因亚族 (数量) Gene subfamily (quantity)
糖苷水解酶 (GHs)	GH43 (3)、GH13 (1)、GH26 (1)、GH32 (3)、GH4 (1)、GH5 (1)、GH51 (2)、GH68 (1)
糖苷转移酶 (GTs)	GT1 (4)、GT2 (6)、GT26 (1)、GT28 (2)、GT4 (5)、GT51 (4)
碳水化合物结合模块 (CBMs)	CBM50 (2)
碳水化合物酯酶, (CEs)	CE10 (1)
复合类	GH13/GH31 (2)、AA10/CBM73 (1)、CBM6/GH43 (1)、GH5/GH9 (1)

表 2 次生代谢产物合成区域鉴定结果
Tab. 2 Identification results of secondary metabolite synthesis region

基因组位点 Genomic locus		产物类型 Product type	最相似已知基因簇 Most similar known gene cluster		
起始位点 Initial site	结束位点 Terminal site		最相似产物 Most similar product	相似度 Similarity/%	来源 Source
323 652	388 511	非核糖体多肽类	表面活性素	91	<i>B. velezensis</i> FZB42
722 603	747 120	含 RRE 元素的产物簇;含线性唑的肽	植物唑霉素	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
942 266	983 510	聚酮酶类类似物	丁胺菌素 A/丁胺菌素 B	7	<i>Streptomyces</i> sp. A299 1200
1 069 135	1 086 364	萜烯类	—	—	—
1 373 424	1 459 809	反式 AT 型酮聚合酶	大环内酰亚胺	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
1 683 338	1 783 940	反式 AT 型酮聚合酶; 三型聚酮聚合酶; 非核糖体多肽类	杆菌烯	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
1 853 071	1 990 508	非核糖体多肽类; 反式 AT 型酮聚合酶; β 内酯	泛草素	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
2 017 463	2 039 346	萜烯类	—	—	—
2 105 832	2 146 932	三型酮聚合酶	—	—	—
2 275 725	2 369 514	反式 AT 型酮聚合酶	地非西丁	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
2 859 258	2 907 389	非核糖体多肽类	—	—	—
3 004 381	3 056 169	非核糖体多肽类; 其他未指杆明的核糖体合成和翻译后修饰的肽产物 (RiPP) 簇	菌毒素	100	<i>B. velezensis</i> FZB42
2 579 398	3 620 816	其他	杆溶菌素	100	<i>B. velezensis</i> FZB42

注: —代表该基因簇在数据库中尚未比对到同源序列。

Note: —means the gene cluster has not been identified in the database.

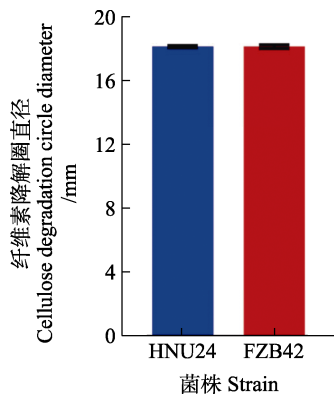
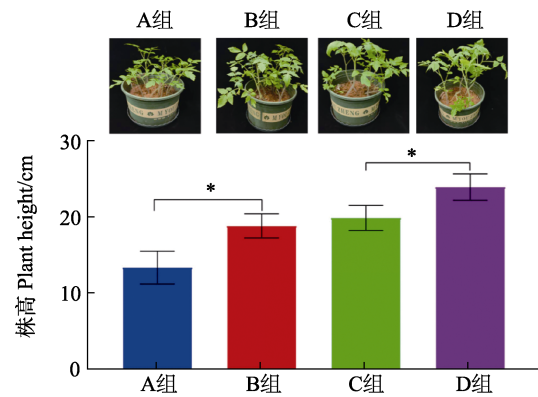


图 4 HNU24 和 FZB42 纤维素降解酶活性检测

Fig. 4 Detection of cellulose degrading enzyme activity of HNU24 and FZB42

2.6 生防菌 HNU24 温室促生长实验

为了检测 HNU24 的促生长活性,本研究以番茄(东绿明星番茄)为研究对象开展了温室促生长实验(图 5),结果显示通过在叶面喷施处理和灌根处理 HNU24 菌悬液,与对照相比,均对番茄株高有显著促进作用,且灌根的促进作用更加明显。采用灌根方式和叶面喷施方式施加 HNU24 时, HNU24 促进番茄株高增长率分别为 26.2%和 18.6%。



*表示处理间差异显著 ($P < 0.05$)。

* indicates significant difference between treatments ($P < 0.05$).

图 5 HNU24 促进番茄幼苗生长效果

Fig. 5 Effect of strain HNU24 promote tomato seedlings growth

3 讨论

通过采用 BGISEQ-500 和 ONT PromethION 平台相结合的测序技术得到了一株对茄雷尔氏菌具有拮抗活性的菌株 HNU24 的全基因组序列。通过与枯草芽孢杆菌、解淀粉酶芽孢杆菌和贝莱斯芽孢杆菌等主要芽孢菌属的菌株基因组的 ANI 值和聚类分析,结果显示 HNU24 归属为贝莱斯

芽孢杆菌，并与菌株 FZB42 的亲缘关系最近。

CAZy 数据库预测结果表明，HNU24 可以产生纤维素合酶、阿拉伯聚糖酶、阿拉伯呋喃糖苷酶、几丁质合成酶等酶类，具有降解纤维素、半纤维素、木聚糖、几丁质等物质的潜力。本研究中纤维素降解实验也进一步证明其纤维素降解活性。相对于其他芽孢杆菌，HNU24 预测出了较高比例的复合酶类，涉及糖苷水解酶家族内的复合、碳水化合物结合模块与糖苷水解酶和辅助氧化还原酶与碳水化合物结合模块的跨家族复合，表明此类酶在功能发挥方面可能存在一定的复合性，或是能够与其他酶类发生互作。另外，通过对比 CAZy 数据库中贝莱斯芽孢杆菌与 HNU24 的各酶类分布情况，结合已经报道的其他芽孢杆菌碳水化合物酶类数量及分布情况^[18-21]，发现数据库中注释的 116 个贝莱斯芽孢杆菌的碳水化合物酶的平均数量约 110~130 个，且各酶类数量分布比例相对稳定，但是 HNU24 预测出的碳水化合物酶总量远低于其他贝莱斯芽孢杆菌平均数量，仅为平均水平的三分之一，且并未预测出多糖裂解酶（PLs），AAs 也只以复合酶类的形式存在，但其仍旧具备极大的抗菌活性和促生能力。这也使得 HNU24 区别于其他菌株。可能是该菌株分离自海南热带地区，其在适应海南特殊的地理及气候条件的过程中发生进化，加大了复合酶类的比例，丢失了部分功能冗余的酶类，保留了对自身特性贡献度最大的酶类以减小自身的代谢成本^[22]。

根据次级代谢产物预测结果，HNU24 能够通过多种途径产生不同类型的 13 种次级代谢产物，涵盖了同类代表菌株 FZB42 中所有已被证实的具有抗菌活性的所有活性代谢产物。在已鉴定出相似度极高的 8 个次生代谢产物中，在 FZB42 或芽孢杆菌属内其他菌株上均有相关功能报道，表面活性素（surfactin）已被证实与介导生物膜的形成有关^[23]；泛革素（fengycin）能够抑制真菌菌丝生长，如黄曲霉 ABA-31^[24]；杆溶菌素（bacilysin）对细菌和真菌具有广谱抗菌活性，研究报道其为贝莱斯芽孢杆菌拮抗革兰氏阴性食源性致病菌的主要参与者^[25]；杆菌烯（bacillaene）是一类通过抑制蛋白合成来拮抗细菌和真菌的多烯类抗生素，NANNAN 等^[25]和 EREGA 等^[26]的研究表明，其能够对空肠弯曲菌的生物膜形成起抑制作用^[27]；大环内酯亚胺（macrolactin）、地非西丁（difficidin）是大环内酯类抗生素，常见于各类芽孢杆菌中，

有研究显示地非西丁有助于解淀粉芽孢杆菌拓宽抗菌范围^[28-29]，菌毒素（bacillibactin）的直接抗菌活性能够扩大 *B. amyloliquefaciens* MBI600 抗菌范围^[30]。与属内其他芽孢杆菌相比，如 *B. subtilis* 168T、*B. amyloliquefaciens* DSM7T 等^[28-29]，HNU24 产生次级代谢产物的种类更多，途径更广。值得关注的是，有 1 个基因簇并未找到高相似度的同源蛋白，仅与 *Streptomyces* sp. A2991 中 saccharide 途径合成的 butirosin A 或 butirosin B 有 7% 的相似度，另有 4 个基因簇在数据库中并未寻找到同源蛋白，这表明在 HNU24 中可能存在新的抗菌物质有待开发。

通过对贝莱斯芽孢杆菌 HNU24 基因序列信息的解析，从基因组层面展示其在生物防治方面和促进植物生长方面具有巨大潜力，对今后该菌株的开发应用方向提供一定的理论基础和指导。

参考文献

- [1] 刘丹丹, 李敏, 刘润进. 我国植物根围促生细菌研究进展[J]. 生态学杂志, 2016, 35(3): 815-824.
LIU D D, LI M, LIU R J. Research progress of plant rhizosphere growth promoting bacteria in China[J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(3): 815-824. (in Chinese)
- [2] 穆文强, 康慎敏, 李平兰. 根际促生菌对植物的生长促进作用及机制研究进展[J]. 生命科学, 2022, 34(2): 118-127.
MU W Q, KANG S M, LI P L. Advances in the growth-promoting effects and mechanisms of inter-rooted growth-promoting bacteria on plants[J]. Life Sciences, 2022, 34(2): 118-127. (in Chinese)
- [3] 屈平平. 芽孢杆菌制剂对毛皮动物源大肠杆菌的体外抑制作用[J]. 饲料研究, 2020, 43(9): 82-85.
QU P P. Inhibitory effect of bacillus preparation on *E. coli* from fur animals *in vitro*[J]. Feed Research, 2020, 43(9): 82-85. (in Chinese)
- [4] 邓凤如, 陈韵声, 范琳, 赵乐怡, 邓诣群, 文继开. 动物用芽孢杆菌微生态制剂中蜡样芽孢杆菌的分离及安全性[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3714-3725.
DENG F R, CHEN Y S, FAN L, ZHAO L Y, DENG Y Q, WEN J K. Isolation and safety of *Bacillus cereus* from animal bacillus probiotics[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3714-3725. (in Chinese)
- [5] 蔡高磊, 张凡, 欧阳友香, 赵昌松, 彭宣和, 江爱明. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)研究进展[J]. 北方园艺, 2020, 12: 162-167.
CAI G L, ZHANG F, OUYANG Y X, ZHAO C S, PENG X

- H, JIANG A M. Research progress of *Bacillus velezensis*[J]. Northern Horticulture, 2018(12): 162-167. (in Chinese)
- [6] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634-3649.
ZHANG D F, GAO Y X, WANG Y J, LIU C, SHI C B. Advances in classification, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3634-3649. (in Chinese)
- [7] 宗英, 赵月菊, 刘阳, 杨庆利. 一株贝莱斯芽孢杆菌抑制禾谷镰刀菌的研究[J]. 核农学报, 2018, 32(2): 310-317.
ZHONG Y, ZHAO Y J, LIU Y, YANG Q L. Study on inhibition of *Fusarium graminearum* by a strain of *Bacillus velezensis*[J]. Journal of Nuclear Agriculture, 2018, 32(2): 310-317. (in Chinese)
- [8] 张琼, ZABIHULLAH S, 唐灿明. 贝莱斯芽孢杆菌 SZAD1 对大丽轮枝菌的生物防治效果[J]. 棉花学报, 2020, 32(4): 329-338.
ZHANG Q, ZABIHULLAH S, TANG C M. Biocontrol effect of *Bacillus velezensis* SZAD1 on *Verticillium dahliae*[J]. Journal of Cotton, 2020, 32(4): 329-338. (in Chinese)
- [9] 夏明聪, 邓晓旭, 齐红志, 谢夏, 徐文, 张洁, 孙润红, 潘娅梅, 武超, 杨丽荣. 贝莱斯芽孢杆菌 YB-145 对小麦纹枯病的防病及促生作用[J]. 河南农业科学, 2021, 50(10): 76-83.
XIA M C, DENG X X, QI H Z, XIE X, XU W, ZHANG J, SUN R H, PAN Y M, WU C, YANG L R. Control and growth promoting effects of *Bacillus velezensis* YB-145 on wheat sheath blight[J]. Henan Agricultural Science, 2021, 50(10): 76-83. (in Chinese)
- [10] 李永丽, 周洲, 尹新明. 贝莱斯芽孢杆菌 Mr12 预防苹果轮纹病等病害的潜力及其全基因组分析[J]. 果树学报, 2021, 38(9): 1459-1467.
LI Y L, ZHOU Z, YIN X M. Potential and genome-wide analysis of *Bacillus velezensis* Mr12 for preventing apple ring rot[J]. Journal of Fruit Trees, 2021, 38(9): 1459-1467. (in Chinese)
- [11] 杨成, 乔云龙, 刘辉, 潘中武. 贝莱斯芽孢杆菌 Y6 杀螺活性及其机制的初步研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2021, 33(3): 248-253, 261.
YANG C, QIAO Y L, LIU H, PAN Z W. Preliminary study on the molluscicidal activity and mechanism of *Bacillus velezensis* Y6[J]. Chinese Journal of Schistosomiasis Control, 2021, 33(3): 248-253, 261. (in Chinese)
- [12] 王淋敏. 贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)促生作用的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2017.
WANG L M. Study on the growth promoting effect of *Bacillus velezensis* [D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [13] 张荣胜, 戴秀华, 刘永锋, 陈志谊. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 的促水稻生长作用及促生长物质分析[J]. 核农学报, 2018, 32(6): 1230-1238.
ZHANG R S, DAI X H, LIU Y F, CHEN Z Y. Growth promoting effect of *Bacillus amyloliquefaciens* Lx-11 on rice and analysis of growth promoting substances[J]. Journal of Nuclear Agriculture, 2018, 32(6): 1230-1238. (in Chinese)
- [14] LI P, WANG D, YAN J, ZHOU J N, DENG Y Y, JIANG Z D, CAO B H, HE Z F, ZHANG L H. Genomic analysis of phylotype I strain EP1 reveals substantial divergence from other strains in the *Ralstonia solanacearum* species complex[J]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 1719.
- [15] CHEN X H, KOUMOUTSI A, SCHOLZ R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(9): 1007-1014.
- [16] 黄鹤, 芦现杰, 胡海峰. *Actinoplanes* sp. N902-109 全基因组序列测定及分析[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(3): 171-177.
HUANG H, LU X J, HU H F. Sequencing and analysis of the whole genome of *Actinoplanes* sp. N902-109[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2015, 40(3): 171-177. (in Chinese)
- [17] EDDY S R. Profile hidden markov Models[J]. Bioinformatics, 1998, 14(9): 755-763.
- [18] 戴利铭, 李岚岚, 刘一贤, 施玉萍, 蔡志英. 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, SHI Y P, CAI Z Y. Whole genome sequencing and bioinformatics analysis of biocontrol bacterium BS-3 of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. Microbiology China, 2021, 48(6): 2073-2088. (in Chinese)
- [19] 李铭晗, 赵权. 鸡源地衣芽孢杆菌的分离鉴定及全基因组分析[J]. 吉林农业大学学报, 2022, 44(5): 613-623.
LI M H, ZHAO Q. Isolation, identification and genome analysis of *Bacillus licheniformis* from chicken[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2022, 44(5): 613-623.
- [20] 韩长志, 祝友朋, 许僖. 草芽孢杆菌 XF-1 的碳水化合物活性酶类(CAZymes)蛋白预测与遗传分析[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2018, 46(3): 95-100.
HAN C Z, ZHU Y P, XU X. Carbohydrate active enzymes (cazymes) protein prediction and genetic relationship analysis of *Bacillus subtilis* XF-1[J]. Journal of Henan Normal University (Natural Science Edition), 2018, 46 (3): 95-100. (in Chinese)
- [21] 柳少燕, 陈捷胤, 李蕾, 戴小枫. 拮抗菌与病原菌碳水化合物酶类比较分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2013, 32(1): 97-104.
LIU S Y, CHEN J Y, LI L, DAI X F. Comparative analysis

- of carbohydrate enzymes between antagonists and pathogens[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2013, 32(1): 97-104. (in Chinese)
- [22] 祝友朋, 韩长志. 枯草芽孢杆菌 BEST195 的碳水化合物酶类(CAZymes)的分布与进化分析[J]. *西南农业学报*, 2021, 34(6): 1195-1200.
- ZHU Y P, HAN C Z. Distribution and evolutionary analysis of carbohydrase classes (CAZymes) of *Bacillus subtilis* BEST195[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2021, 34(6): 1195-1200. (in Chinese)
- [23] GUIMARÃES C, PASQUALINO I, SOUSA J, NOGUEIRA F, SELDIN L, CASTILHO L, FREIRE D. *Bacillus velezensis* H2O-1 surfactin efficiently maintains its interfacial properties in extreme conditions found in post-salt and pre-salt oil reservoirs[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2021, 208: 112072.
- [24] WU J J, CHOU H P, HUANG J W, DENG W L. Genomic and biochemical characterization of antifungal compounds produced by *Bacillus subtilis* PMB102 against *Alternaria brassicicola*[J]. *Microbiological Research*, 2021, 251: 126815.
- [25] NANNAN C, VU H, GILLIS A, CAULIER S, NGUYEN T, MAHILLON J. Bacilysin within the *Bacillus subtilis* group: gene prevalence versus antagonistic activity against gram-negative foodborne pathogens[J]. *Journal of Biotechnology*, 2021, 327: 28-35.
- [26] EREGA A, STEFANIC P, DOGSA I, DANEVČIČ T, ŠIMUNOVIĆ K, KLANCNIK A, SMOLE MOŽINA S, MANDIC M I. Bacillaene mediates the inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Campylobacter jejuni* biofilms[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 7(12): e02955-20s.
- [27] CHAKRABORTY K, KIZHAKKEKALAM V, JOY M, DHARA S. Difficidin class of polyketide antibiotics from marine macroalga-associated *Bacillus* as promising antibacterial agents[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2021, 105(16): 6395-6408.
- [28] DIMOPOULOU A, THEOLOGIDIS I, BENAKI D, KOUKOUNIA M, ZERVAKOU A, TZIMA A, HATZINIKOLAOU D, SKANDALIS N. Direct antibiotic activity of bacillibactin broadens the biocontrol range of *Bacillus amyloliquefaciens* MBI600[J]. *mSphere*, 2021, 6(40): e00376- e0037621.
- [29] KALLIMACHOS N, POLINA T, EVANGELIA T E. Genomic analysis and secondary metabolites production of the endophytic *Bacillus velezensis* Bvel1: a biocontrol agent against botrytis cinerea causing bunch rot in post-harvest table grapes[J]. *Plants*, 2021 10: 1716.
- [30] FAN B, WANG C, SONG X F, DING X L, WU L, WU H J, GAO X W, BORRISS R. Corrigendum: *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 9: 1279.