

烟草拮抗链霉菌FT05W基因组测序与几丁质酶家族基因鉴定

覃可¹, 桑维钧^{2*}, 陈孝玉龙², 李昊熙², 杨茂发^{2,3}

(1. 贵州大学农学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学烟草学院, 贵阳 550025; 3. 贵州大学昆虫研究所/贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵阳 550025)

摘要: 链霉菌 FT05W 是一株对烟草黑胫病等土传真菌病害具有良好拮抗作用的生防放线菌。本研究利用 Miseq PE300 高通量测序平台对链霉菌 FT05W 基因组进行序列测定, 共获得 6914188 个 reads, 通过 SPAdes 软件对序列进行拼接共得 1836 个 contigs, 其基因组全长为 7699129 bp, GC 比为 71%, 其中编码基因序列长度为 6037181 bp, 预测出 7434 个蛋白编码基因 (GenBank 登录号: NZ_QGMR00000000), 预测编码 7232 个蛋白。获得的基因注释信息为今后深入开展其在烟草上的生物防治机理研究奠定了重要的基础, 有助于推动烟草生防链霉菌功能基因的挖掘与利用, 为烟草生防链霉菌 FT05W 的进一步开发与应用提供理论依据。利用 MEGA 6.06 构建链霉菌 FT05W 的几丁质酶家族基因系统发育树, 共鉴定出 7 个几丁质酶家族基因, 其中 6 个为 18 家族几丁质酶基因, 1 个为 19 家族基因。

关键词: 烟草生防菌; 链霉菌; 基因组测序; 几丁质酶家族基因

中图分类号: S476 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2019)03-0463-11

Genome Sequencing and Identification of Chitinase Family Genes of *Streptomyces* sp. FT05W, an Antagonist of Tobacco Pathogens

QIN Ke¹, SANG Weijun^{2*}, CHEN Xiaoyulong², LI Haoxi², YANG Maofa^{2,3}

(1. Agricultural College of Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Tobacco College of Guizhou University, Guiyang 550025, China; 3. Guizhou Key Laboratory for Plant Pest Management of Mountainous Region/Institute of Entomology, Guiyang 550025, China)

Abstract: *Streptomyces* sp. FT05W was a biocontrol strain with antagonism to tobacco soil-borne fungal pathogens. In this study, we used Miseq PE300 next-generation sequencing platform to perform the genome sequencing, and obtained 6914188 reads. The SPAdes software was used to splice a total of 1836 contigs with a total genome length of 7699129 bp and a GC ratio of 71%. Length of the coding gene sequence was 6037181 bp, and 7434 protein-coding genes were predicted, which are predicted to encode 7232 proteins. Subsequently, through the comparison and analysis of databases such as GO, COG, KEGG, NR and TCDB, the genome prediction and basic function annotations were completed. The obtained gene annotation information lays an important foundation for further research on its biological control mechanism in tobacco. The results will help to promote the excavation and utilization of *Streptomyces* sp. functional genes and provide a theoretical basis for further development and application of *Streptomyces* sp. FT05W. Finally, the chitinase family gene phylogenetic tree of *Streptomyces* sp. FT05W was constructed using MEGA 6.06. A total of seven chitinase gene families were identified. Six were family 18 chitinase genes and one was family 19 gene.

Key words: tobacco biocontrol strain; *Streptomyces* sp.; genome sequencing; chitinase family gene

收稿日期: 2018-10-26

基金项目: 国家自然科学基金 (31701836); 贵州省烟草公司重大科技专项 (201603); 贵州省科技厅基础研究计划 (2018-1050); 贵州省烟草公司科技项目 (201826); 贵州省黔西南州烟草公司科技项目 (201804)

作者简介: 覃可, 硕士研究生, E-mail: zhaoxi151@sina.cn; *通信作者, 教授, E-mail: wjsang@163.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.03.016

近年来,基于有益微生物的生物防治成为了烟草病害防治研究中的热点。链霉菌 *Streptomyces* sp. FT05W 是一株多功能植物生防内生细菌,对核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 引起的菌核病有显著的生物防治效果,在温室条件下,FT05W 可降低 45%^[1,2]。同样,链霉菌 FT05W 对包括烟草疫霉致病型 *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*、镰刀菌在内的多种重要烟草病原菌具有良好的拮抗作用,对多种植物有不同程度的促进生长效果^[3,4]。并且,FT05W 对所试验植物种子萌发无抑制作用,通过进行 EGFP (加强型绿色荧光蛋白) 标记,采用共聚焦激光显微镜探测其在生菜根际的定殖,发现 FT05W 能够在植物根际快速、大量及稳定的建立种群,并且,电子扫描显微镜观察显示其能够在植物内部定殖,确定 FT05W 是所试寄主的有益内生菌^[4,5]。另外,FT05W 能产生几丁质酶等多种有益次生代谢产物和酶,在植物病害生物防治与促进生长上具有良好的应用前景。

几丁质是 N-乙酰基- β -D-葡萄糖胺 (GlcNAc) 的聚合物,是真菌细胞壁的主要组成成分,对病原真菌的细胞结构形态维持具有重要的作用。几丁质酶能够降解几丁质为低聚糖和单体成分,普遍具有抗菌活性^[6]。很多植物源几丁质酶提取物表现出了良好的体外抗菌活性^[7]。研究者通过使瓜类几丁质酶基因在水稻中表达,加强了水稻对稻瘟病和纹枯病的防御作用^[8]。同样,水稻几丁质酶基因被转入香蕉基因组中,加强了香蕉对黑叶条斑病的抵抗^[9]。此外,链霉菌等生物防治因子产生的几丁质酶可降解几丁质,导致病原真菌细胞破裂或死亡,从而阻碍病害的发生与发展^[10-12]。所以,几丁质酶的产生被认为是有益微生物作为生防因子的重要机理之一^[13]。并且,由于人类和高等动物代谢不依赖于几丁质,因此,以几丁质降解途径作为真菌病害防治的靶标相对安全,在生物防治领域具有较高的科学研究价值和应用潜能,是当下真菌病害生物防治机理的研究热点之一。

随着基因组测序技术的发展,众多科学家开始利用这一技术研究和验证链霉菌生物防治机理。Ge 等^[14]对产生武夷菌素的高效生防链霉菌菌株 CK-15 进行了全基因组测序与生物学信息分析,明确了其与武夷菌素产生相关的重要基因。模式菌株天蓝色链霉菌 A3(2)是首株进行全基因组测序及分析的链霉菌,共拥有 13 个几丁质酶基因^[15]。基因组的测序对生防链霉菌提供了大量的基础生物信息学资料,通过挖掘与解析部分基因的功能,将大大有助于我们对链霉菌生物防治机理的验证,推动我们对链霉菌分子生物防治机理的理解。近年来,细菌全基因组的测序成本正逐年降低,更方便了我们对生防链霉菌菌株基因组及生防关键基因进行研究。

目前,对于生防菌基因组测序方面的研究较多,但对于烟草病原拮抗菌的测序及几丁质酶家族基因的鉴定工作还少见报道。当下,国内外对于应用链霉菌进行生物防治的研究相对集中于直接的病害防治效果评价。而对于其生物防治的机理,尚未阐明,虽然国内外有很多成功利用链霉菌防控植物病害的报道,但总的来说链霉菌生物防治的作用机理还在积极探索当中。生防微生物通过定殖不仅在营养与空间竞争上占据优势,其种群的发展更是其他作用机理的先决条件。链霉菌在寄主定殖后产生一系列的有益次生代谢产物及酶(抗生素、植物生长激素、嗜铁素、 β -葡聚糖酶及几丁质酶等),以达到抑菌和促进寄主生长和提高免疫力的作用,比如链霉菌产生的几丁质酶可降解几丁质,对病原真菌菌丝生长有明显的抑制作用^[16-19]。几丁质酶家族基因的鉴定和分类是开展链霉菌在植物上的生物防治机理研究奠定了重要的基础,有助于推动烟草生防链霉菌功能基因的挖掘与利用,为植物生防链霉菌 FT05W 的进一步的开发与应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 链霉菌 FT05W 高质量 DNA 的提取

1.1.1 培养基制备 察氏培养基 (Czapek-Dox Medium): 硝酸钠 3.0 g, 磷酸氢二钾 1.0 g, 硫酸镁 0.5 g, 氯化钾 0.5 g, 硫酸亚铁 0.01 g, 蔗糖 30.0 g, 琼脂 20.0 g, 酵母粉 (Yeast Extract, OXOID, 英国) 2 g, ddH₂O (优普系列超纯水器) 1000 mL。经 121 °C、1 h 灭菌。把赛璐酚 (cellophane, 江苏鑫吉教学设备有限公司) 剪成直径 $d \leq 90$ mm 的圆形,平铺放入 ddH₂O 中,注意避免纸张粘黏。121 °C、1 h 灭菌 2 次。在无菌操作台中把灭菌后的察氏培养基倒入培养皿中待冷却凝固,然后用镊子分别把灭菌后的赛璐酚平铺在培养基表面。用接种环把链霉菌 FT05W 接入带有赛璐酚的察氏培养基内。放入 25 °C 的恒温培养箱中培养 5 d。

1.1.2 DNA 提取 用灭菌后的手术刀把经 5 d 培养的链霉菌 FT05W 轻轻刮下放入 1.5 mL 离心管内。采用细菌 DNA 提取试剂盒 (Sangon Biotech, 上海), 参考试剂盒说明书中提取革兰氏阳性菌基因法进行提取该菌 DNA。

1.1.3 DNA 质量检测 使用 NanoDrop2000 超微量紫外分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 对提取的链霉菌 FT05W 基因组 DNA 进行浓度测定, 然后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。

1.2 基因组测序

经质量和浓度测定合格的样品由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行 Miseq PE300 模式 (双端测序 PE) 测序。

1.3 基因组拼接

本研究针对的链霉菌小基因组的组装采用 SPAdes 软件^[20], 对原始序列进行序列错误校正, 通过多 Kmer 值进行组装获得最佳结果; 用 Gapcloser 及 GapFiller 对 contigs 补间隙空格, 使用大量成对的短序列来完成补间隙空格; 采用 PrInSeS-G 进行序列校正, 修正拼接过程中的碱基错误及小片段的插入缺失。

1.4 基因预测与注释

采用 Prokka 软件^[21]对各样本的组装结果进行基因预测, 即调用 Prodigal 预测编码基因, Aragorn 预测 tRNA, barrnap 预测 rRNA, Infernal 预测 miscRNA, 预测出的各类基因元件最终会加以汇总并完成初步注释, 并搜索基因组中出现的重复序列; 根据组装的基因组采用 RepeatModeler 进行重复序列 Denovo 预测, 利用 RepeatMasker 寻找基因组区段上各类型重复序列出现的位置和频率。采用 CRT^[22]进行 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) (成簇的短回文重复序列) 预测。随后, 将样本物种的蛋白序列与公共数据基因进行比较, 通过 gene 的相似性进行功能注释。基因相似性比对主要基于 Blast (Basic local alignment search tool) 算法。最后将蛋白序列分别与 COG/KOG^[23]、Swissprot^[24]、TrEMBL、GO^[25]、KEGG^[26]库进行比对, 取相似度 >30%, 且 $e < 1e-5$ 的注释, 合并基因得到的所有注释详细信息。

1.5 几丁质酶家族基因的鉴定与分类

通过查阅相关链霉菌属已发表的文章, 链霉菌属里关键的几丁质酶基因的碱基序列和蛋白编码均从 Genbank 找到, 包括了多少个基因, 来自多少个链霉菌种 (表 1)。在 Blast 里分别用查找出的几丁质酶的碱基序列和链霉菌 FT05W 基因组进行比对, 得到其相关性数据。再根据预测的几丁质酶碱基序列, 进一步确定链霉菌 FT05W 里的几丁质酶。

2 结果与分析

2.1 链霉菌 FT05W 基因组的提取和质量检测

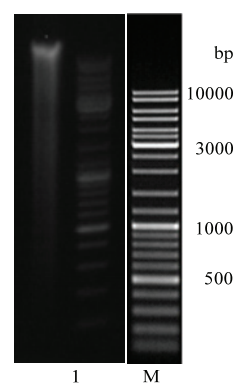
基因组电泳检测结果, 样本主条带清晰, 存在轻度降解, 总量为 100 μ L (图 1)。DNA 样本浓度测定采用 Qubit 定量检测, 样品浓度为 102 ng/ μ L, 足够构建二代测序文库。

2.2 基因组测序质量分析

链霉菌 FT05W 基因组测序数据量为 2081170588 bp, 平均序列长度为 301 bp。结果显示, reads1 91.60% 的碱基测序质量值都在 20 (Q20) 以上, reads1 82.94% 的碱基测序质量值都在 30 (Q30) 以上, reads2 76.39% 的碱基测序质量值都在 20 (Q20) 以上, reads2 61.05% 的碱基测序质量值都在 30 (Q30) 以上。reads1 N 碱基的数目为 130 bp, reads2 N 碱基的数目为 74 bp。reads1 的 GC 含量为 63.99%, reads2 的 GC 含量为 64.79%。由此看出测序质量较好。

2.3 基因组拼接和基因预测

拼接得到的基因组总长为 7699129 bp, 长度最



1: 链霉菌 *Streptomyces* sp. FT05W; M: Marker

图 1 基因组电泳检测

Fig. 1 Electrophoresis pattern of *Streptomyces* sp. FT05W genome

表 1 链霉菌已知几丁质酶家族基因

Table 1 Known chitinase family genes of *Streptomyces*

登录号 Accession number	物种 Species	基因 Gene
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiA</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiB</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiC</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiD</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiE</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiF</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiG</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiH</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiI</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiJ</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiK</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiL</i>
AL645882.2	<i>S. coelicolor</i> (A3)2	<i>ChiM</i>
AB017008.1	<i>S. coelicolor</i>	<i>ChiA</i>
AB017009.1	<i>S. coelicolor</i>	<i>ChiB</i>
AB017010.1	<i>S. coelicolor</i>	<i>ChiC</i>
AB017011.1	<i>S. coelicolor</i>	<i>ChiD</i>
AB017012.1	<i>S. coelicolor</i>	<i>ChiF</i>
AB017013.1	<i>S. coelicolor</i>	<i>ChiG</i>
AB009289.1	<i>S. griseus</i>	<i>ChiC</i>
AB081805.1	<i>S. griseus</i>	<i>Chi I</i>
AB081806.1	<i>S. griseus</i>	<i>Chi II</i>
AB081807.1	<i>S. griseus</i>	<i>Chi III</i>
D13775.1	<i>S. lividans</i>	<i>ChiA</i>
D84193.1	<i>S. lividans</i>	<i>ChiB</i>
D12647.1	<i>S. lividans</i>	<i>ChiC</i>
X71080.1	<i>S. olivaceoviridis</i>	<i>exo-ChiO1</i>
AJ276990.1	<i>S. olivaceoviridis</i>	<i>Chi92</i>
M82804.2	<i>S. plicatus</i>	<i>ChiA</i>
D14536.1	<i>S. thermoviolaceus</i>	<i>Chi40</i>
AB016844.1	<i>S. thermoviolaceus</i>	<i>Chi30</i>
AB016843.2	<i>S. thermoviolaceus</i>	<i>Chi25</i>

长的为 51521 bp, 平均长度为 4193.43 bp, 重叠群数量为 1836 bp, 其中的 GC 占比为 0.71%, N50 长度为 7225 bp (表 2)。

链霉菌 FT05W 基因组中共预测 7434 个基因, 平均长度为 812.1 bp, 长度大于 500 bp 的基因数目 4908, 长度大于 1000 bp 的基因数目 2114, N50 长度 1041 bp, 长度最长的基因长度为 10416 bp (图 2)。

2.4 基因注释

将蛋白序列分别与 CDD、COG、NR、PFAM、Swissprot、TrEMBL、GO、KEGG 库进行比对, 取相似度 >30%, 且 $e < 1e-5$ 的注释, 合并基因得到的所有注释详细信息 (图 3)。

以 CDD 数据库对预测出的基因做注释, 共注释基因 4868 个 (占总预测基因的 66.48%), 以 KOG

表 2 拼接得到的重叠群结果汇总

Table 2 Contig results summary

所有重叠群的一般信息 General information of All Contigs	碱基对 Base-pair (bp)
所有基因总长度 All length	7699129
N 碱基数 N number	0
长度最长的基因长度 Max length	51521
基因的平均长度 Average length	4193.43
重叠群数量 Contig number	1836
N50 长度 Length	7225
GC 占比 Ratio	0.71

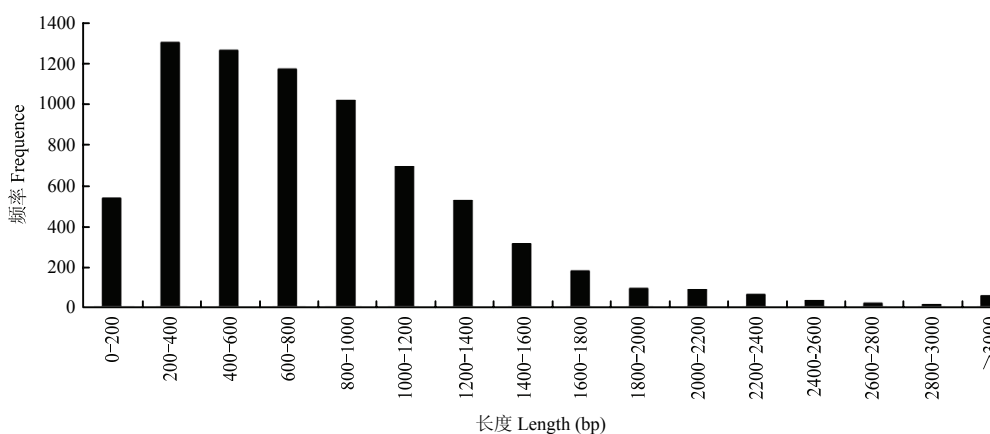


图 2 基因长度分布图

Fig. 2 Gene length distribution

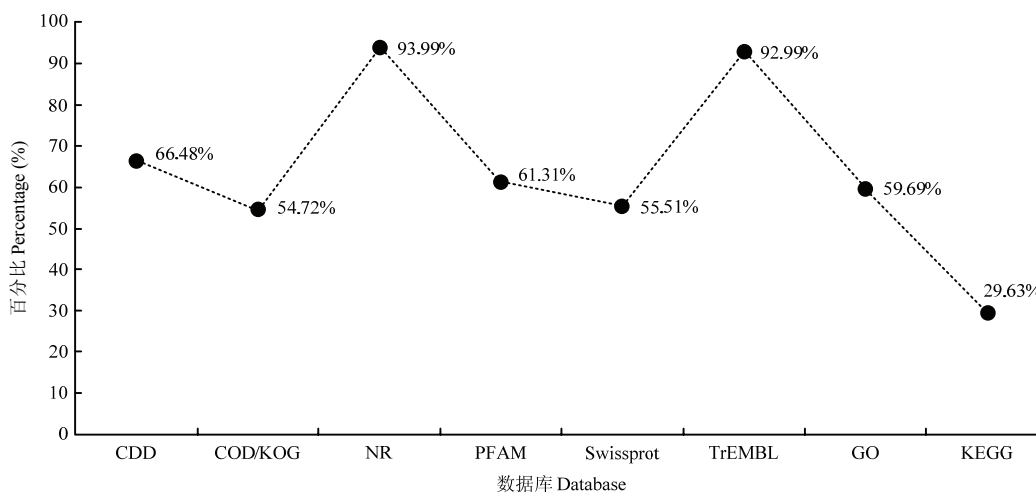


图 3 各数据库比例注释

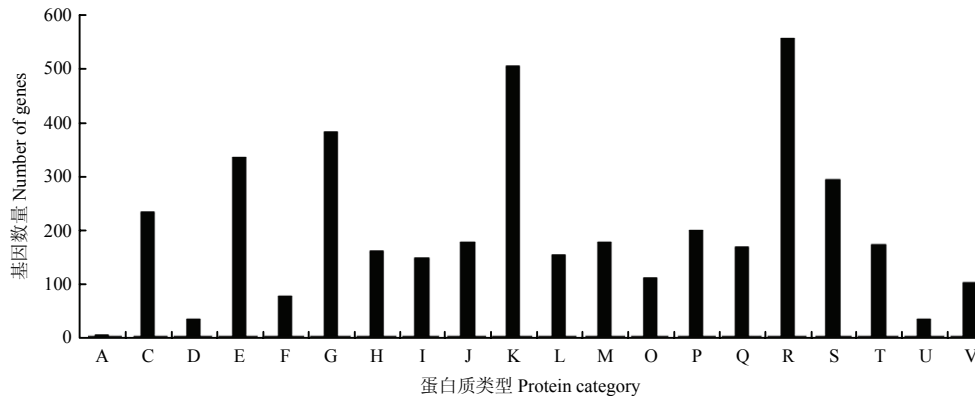
Fig. 3 Each database proportional comment

CDD: 保守结构域数据库 Conserved Domain Database; COG/KOG: 真核细胞的直系同源组 euKaryotic Ortholog Groups; NR: 非冗余数据库 Non-redundan Databaset; PFAM: Pfam 蛋白质结构域数据库 Pfam Protein Domain Database; Swiss-Prot: 手动注释和评蛋白质序列数据库 A manually annotated and reviewed protein sequence database; TrEMBL: TrEMBL 蛋白质序列数据库 TrEMBL Protein Database Release; GO: 基因本体 Gene Ontology; KEGG: 日本京都基因和基因组百科全书 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

数据库对预测出的基因做注释，共注释基因 4007 个（占总预测基因的 54.72%），以 NR 数据库对预测出的基因做注释，共注释基因 6883 个（占总预测基因的 93.99%），以 PFAM 数据库对预测出的基因做注释，

共注释基因 4490 个（占总预测基因的 61.31%），以 Swissprot 数据库对预测出的基因做注释，共注释基因 4065 个（占总预测基因的 55.51%），以 TrEMBL 数据库对预测出的基因做注释，共注释基因 6810 个（占总预测基因的 92.99%），以 GO 数据库对预测出的基因做注释，共注释基因 4371 个（占总预测基因的 59.69%），以 KEGG 数据库对预测出的基因做注释，共注释基因 2170 个（占总预测基因的 29.63%）（图 3）。

根据 COG (clusters of orthologous groups of proteins) 蛋白质直系同源簇数据库 (图 4)，除一般功能外，主要集中在转录基因 503 个基因，碳水化合物运输和代谢 382 个基因，氨基酸转运和代谢 333 个基因，能量生产和转换 232 个基因，共占整体 36.18%。基因较少存在于细胞周期控制、细胞分裂、染色体分配、细胞内运输、分泌和小泡运输，仅有 1 个基因存在于 RNA 加工与修饰。



A: 加工与修饰 RNA processing and modification RNA; C: 能量生产和转换 Energy production and conversion; D: 细胞周期控制, 细胞分裂, 染色体分配 Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; E: 氨基酸转运和代谢 Amino acid transport and metabolism; F: 核苷酸转运和代谢 Nucleotide transport and metabolism; G: 碳水化合物运输和代谢 Carbohydrate transport and metabolism; H: 辅酶的运输和代谢 Coenzyme transport and metabolism; I: 脂质转运和新陈代谢 Lipid transport and metabolism; J: 翻译, 核糖体结构和生物发生 Translation, ribosomal structure and biogenesis; K: 转录 Transcription; L: 复制, 重组和修复 Replication, recombination and repair; M: 细胞壁/膜/包膜生物发生 Cell wall/membrane/envelope biogenesis; O: 翻译后修饰, 蛋白质周转, 分子伴侣 Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; P: 无机离子转运和新陈代谢 Inorganic ion transport and metabolism; Q: 次级代谢产物的生物合成, 运输和分解代谢 Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; R: 仅限一般功能预测 General function prediction only; S: 未知功能 Function unknown; T: 信号转导机制 Signal transduction mechanisms; U: 细胞内运输, 分泌和小泡运输 Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; V: 防御机制 Defense mechanisms

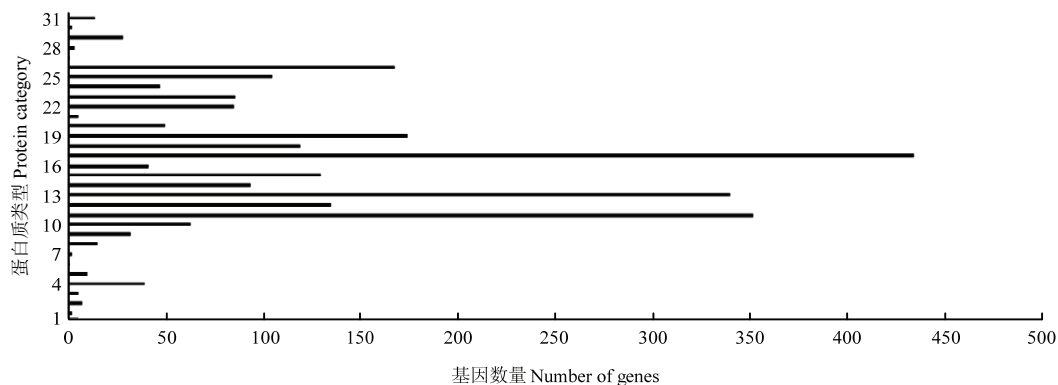
图 4 COG 注释图

Fig. 4 COG annotation chart

2.4.1 KEGG 代谢途径分析 基因参与的 KEGG 代谢通路可以分为 5 个分支: 有机系统 (图 5 1~8), 代谢 (图 5 9~20), 遗传信息处理 (图 5 21~24), 环境信息处理 (图 5 25~27), 细胞过程 (图 5 28~31)。基因主要集中在碳水化合物代谢、氨基酸代谢、基本代谢途径, 其次是能量代谢、膜转运、辅因子和维生素的代谢、类脂化合物代谢、核苷酸代谢、信号转导 (图 5)。根据 KEGG 分析, 能对应到 KEGG pathway 总共 2589 个基因, 涉及基因最多的是 ABC 转运蛋白代谢通路 (ko02010, 151 个基因)、氨基酸生物合成代谢通路 (ko01230, 137 个基因)、碳代谢通路 (ko01200, 115 个基因)。

2.4.2 GO 功能分类 基于 Blast uniprot 的结果 (即合并 swissprot 与 trembl 的结果), 利用得到的 uniprot 号比对 GO term。2589 个基因按各基因功能将其分为生物学过程 (图 6 1~22)、细胞组分 (图 6 23~38) 和分子功能 (图 6 39~51) 3 个类别, 共 51 个分支。其中, 生物学过程类别中涉及基因最多的为代谢过程和细胞过程, 细胞组分类别中涉及基因最多的为细胞和细胞部分, 分子功能类别中涉及基因最多的为结合和催化活性 (图 6)。

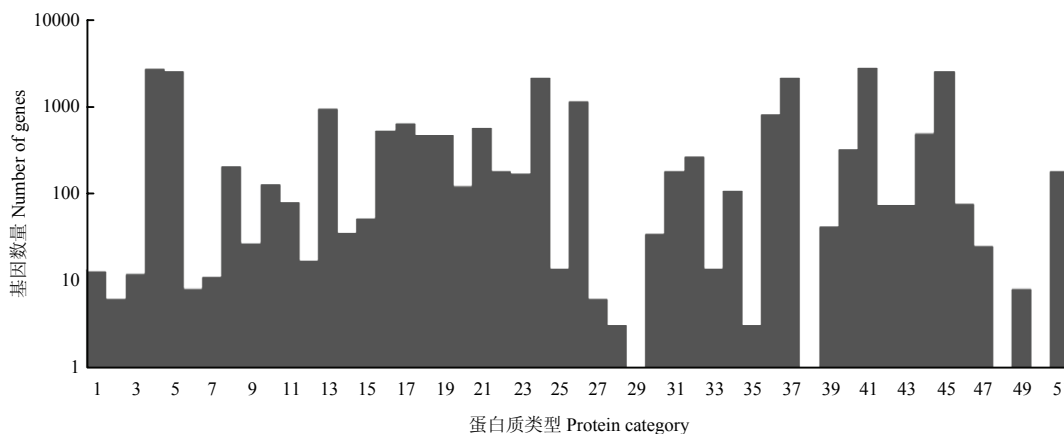
2.4.3 基因功能分析 对测序获得的链霉菌 FT05W 基因组进行 KOG 分类预测, 共有 4007 个基因分为 20 大类, 涉及基因最多的是仅一般功能预测 (555 个, 13.85%), 其次分别为转录 (503 个基因, 占 12.55%)、碳水化合物运输和代谢 (382 个基因, 占 9.53%)、氨基酸运输和代谢 (333 个基因, 占 8.31%)。



1: 发育 Development; 2: 消化系统 Digestive system; 3: 环境适应 Environmental adaptation; 4: 内分泌系统 Endocrine system; 5: 免疫系统 Immune system; 6: 感官系统 Sensory system; 7: 排泄系统 Excretory system; 8: 神经系统 Nervous system; 9: 其他次生代谢物的生物合成 Biosynthesis of other secondary metabolites; 10: 其他氨基酸的代谢 Metabolism of other amino acids; 11: 氨基酸代谢 Amino acid metabolism; 12: 辅因子和维生素的代谢 Metabolism of cofactors and vitamins; 13: 基本代谢途径 Overview; 14: 异生素生物降解和新陈代谢 Xenobiotics biodegradation and metabolism; 15: 脂质代谢 Lipid metabolism; 16: 聚糖的生物合成和代谢 Glycan biosynthesis and metabolism; 17: 碳水化合物代谢 Carbohydrate metabolism; 18: 核苷酸代谢 Nucleotide metabolism; 19: 能量代谢 Energy metabolism; 20: 萜类和聚酮化合物的代谢 Metabolism of terpenoids and polyketides; 21: 转录 Transcription; 22: 翻译 Translation; 23: 复制和修复 Replication and repair; 24: 折叠、整理和降解 Folding, sorting and degradation; 25: 信号转导 Signal transduction; 26: 膜运输 Membrane transport; 27: 信号分子和相互作用 Signaling molecules and interaction; 28: 细胞运动 Cell motility; 29: 运输和分解代谢 Transport and catabolism; 30: 细胞通信 Cell communication; 31: 细胞生长和死亡 Cell growth and death

图 5 Pathway 注释分类

Fig. 5 Pathway annotation classification



1: 复制 Reproduction; 2: 细胞杀伤 Cell killing; 3: 免疫系统过程 Immune system process; 4: 代谢过程 Metabolic process; 5: 细胞过程 Cellular process; 6: 生殖过程 Reproductive process; 7: 生物粘附 Biological adhesion; 8: 信号 Signaling; 9: 多细胞生物过程 Multicellular organismal process; 10: 发育过程 Developmental process; 11: 生长 Growth; 12: 运动 Locomotion; 13: 单个有机体过程 Single-organism process; 14: 正向调节生物过程 Positive regulation of biological process; 15: 负向调节生物过程 Negative regulation of biological process; 16: 生物调节过程 Regulation of biological process; 17: 对刺激的反应 Response to stimulus; 18: 定位 Localization; 19: 建立定位 Establishment of localization; 20: 多元生物过程 Multi-organism process; 21: 生物调节 Biological regulation; 22: 细胞组分的组织或生物合成 Cellular component organization or biogenesis; 23: 胞外区域 Extracellular region; 24: 细胞 Cell; 25: 类核 Nucleoid; 26: 膜 Membrane; 27: 病毒粒子 Virion; 28: 细胞连接处 Cell junction; 29: 细胞外基质 Extracellular matrix; 30: 膜封闭的内腔 Membrane-enclosed lumen; 31: 高分子配合物 Macromolecular complex; 32: 细胞器 Organelle; 33: 胞外区域部分 Extracellular region part; 34: 细胞器部分 Organelle part; 35: 病毒粒子部分 Virion part; 36: 膜部分 Membrane part; 37: 细胞部分 Cell part; 38: 共质体 Symplast; 39: 蛋白结合的转录因子活性 Protein binding transcription factor activity; 40: 核酸结合的转录因子活性 Nucleic acid binding transcription factor activity; 41: 催化活性 Catalytic activity; 42: 受体活性 Receptor activity; 43: 结构分子活性 Structural molecule activity; 44: 转运活性 Transporter activity; 45: 结合 Binding; 46: 电子载体活性 Electron carrier activity; 47: 抗氧化活性 Antioxidant activity; 48: 金属伴侣活性 Metallochaperone activity; 49: 酶调节活性 Enzyme regulator activity; 50: 蛋白质标签 Protein tag; 51: 分子传感器活性 Molecular transducer activity

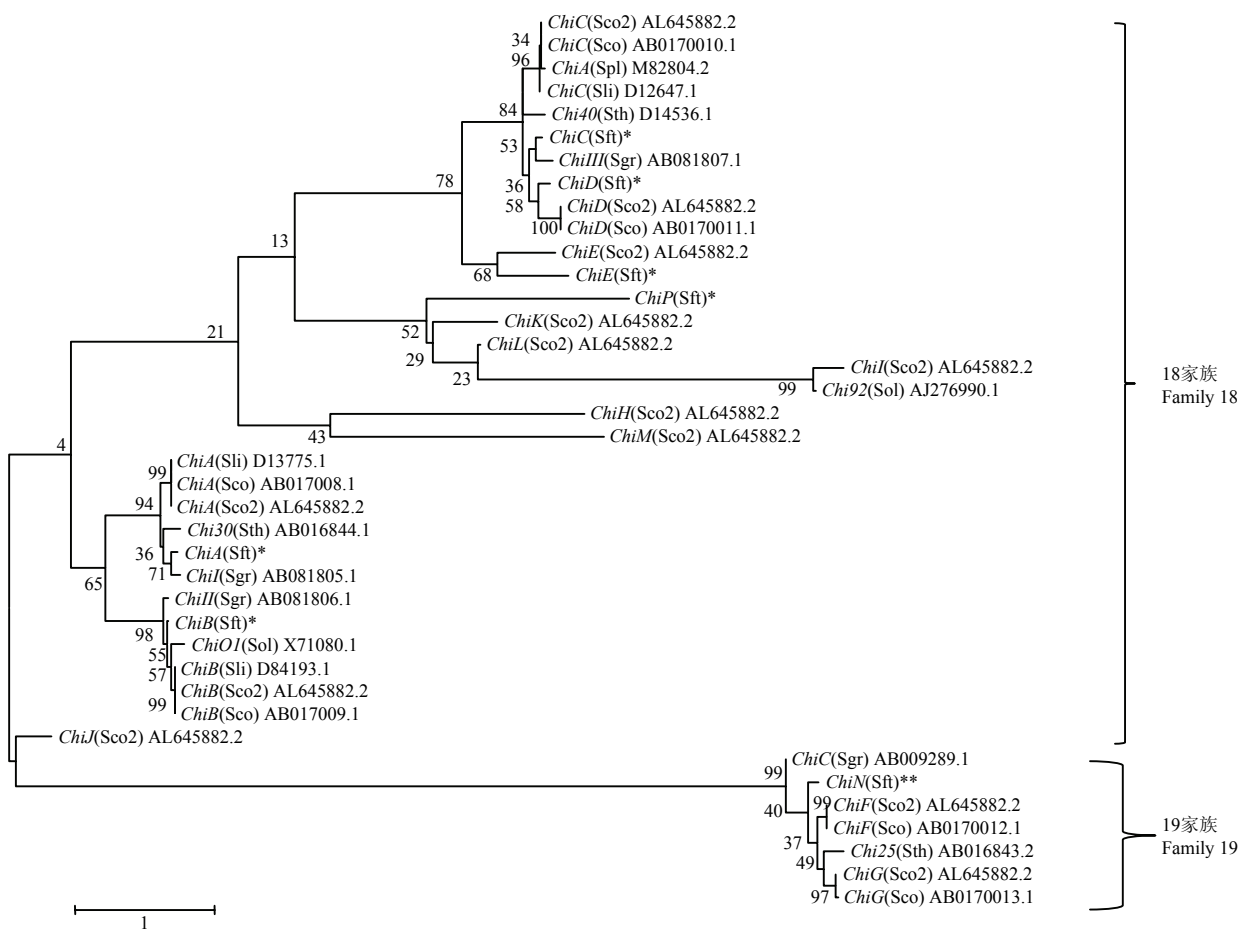
图 6 Level 2 水平 GO 注释上的基因分布

Fig. 6 Gene distribution on level 2 level GO annotation

2.4.4 碳水化合物活性酶 链霉菌 FT05W 基因组中含有 135 个糖苷水解酶 (glycoside hydrolases, GHs) 蛋白、56 个糖基转移酶 (glycosyl transferases, GTs) 蛋白、15 个多糖裂解酶 (polysaccharide lyases, PLs) 蛋白、90 个糖类酯解酶 (carbohydrate esterases, CEs) 蛋白和 36 个氧化还原酶 (auxiliary activities, AAs) 蛋白。此外, 还包含 67 个碳水化合物结合模块 (carbohydrate-binding modules, CBMs) 蛋白。

2.5 链霉菌 FT05W 几丁质酶家族基因的鉴定与分类

通过分别与已发表链霉菌几丁质酶家族基因(表 2)进行 Blast 对比, 在鉴定出链霉菌 FT05W(GenBank 登录号: NZ_QGMR00000000) 的基因组中鉴定出 8 个几丁质酶家族基因, 命名为 *ChiA*、*ChiB*、*ChiC*、*ChiD*、*ChiE*、*ChiP*、*ChiO* 和 *ChiN*。把从链霉菌 FT05W 中鉴定出的 8 个几丁质酶家族基因和已发表的 32 个链霉菌几丁质酶家族基因进行系统区系分析得到的结果表明, 链霉菌 FT05W 的几丁质酶基因 *ChiN* 与属于 19 家族的 *S. griseus* 中的 *ChiC* 更为接近, 也属于 19 家族^[27]。*ChiA*、*ChiB* 和 *ChiC* 同属于 18 家族的 *Chi I*、*Chi II* 和 *Chi III* 更为接近, 划分到 18 家族^[27]。*ChiE* 和 *S.coelicolor* A3(2) 中的 *ChiE* 更为接近, 划分为 18 家族^[28]。总而言之, 链霉菌 FT05W 的 7 个几丁质酶基因有 1 个属于 19 家族, 6 个属于 18 家族^[28,29] (图 7)



Sco: *Streptomyces coelicolor*; Sco2: *Streptomyces coelicolor* (A3)2; Sli: *Streptomyces lividans*; Spl: *Streptomyces plicatus*; Sol: *Streptomyces olivaceoviridis*; Sgr: *Streptomyces griseus*; Sth: *Streptomyces thermoviolaceus*

注: 带*为链霉菌 FT05W 18 家族几丁质酶家族基因, **为链霉菌 FT05W 19 家族几丁质酶家族基因; 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数。

Note: The band * is a chitinase family gene of the *Streptomyces* sp. FT05W 18 family, and ** is a chitinase family gene of the *Streptomyces* sp. FT05W 19 family; the numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together. The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position.

图 7 链霉菌 FT05W 与已知链霉菌几丁质酶家族基因的系统发育关系图

Fig. 7 Phylogenetic relationship between *Streptomyces* sp. FT05W and known *Streptomyces* chitinase family genes

3 讨论

链霉菌是一类广泛存在与土壤中的放线菌, 其中对人类和植物有害的种屈指可数, 赤霉病链霉菌 *S. scabies*、松节病链霉菌 *S. turgidiscabies* 会引起马铃薯等块茎植物的疮痂病^[30]。相反, 其他很多链霉菌由于产生诸多具有生物活性的次生代谢产物和酶, 而被认为具有良好的生物防治潜力, 比如说拮抗链霉菌 S—5、利迪链霉菌 A02、青紫链霉菌 *S. lividans*^[31-36]。烟草拮抗链霉菌 FT05W 是一株能够在植物上快速定殖的多功能植物生防内生细菌, 对其进行 EGFP (加强型绿色荧光蛋白) 标记, 采用共聚焦激光显微镜探测其在生菜根际的定殖, 发现 FT05W 能够在植物根际快速、大量及稳定的建立种群, 并且通过电子扫描显微镜观察, FT05W 显示其能够在植物内部定殖。

本研究采用 Miseq PE300 高通量测序平台对烟草拮抗链霉菌 FT05W 进行了基因组测序并进行生物信息学分析。结果显示, 链霉菌 FT05W 基因组长度和 GC 比 (7699129 bp, GC%: 71.0%) 与模式菌株天蓝色链霉菌(A3)2 (8667507 bp, GC%: 72.12%) 及其他植物病原菌拮抗链霉菌如不吸水链霉菌武夷变种 *S. ahydroscopicus* var. *wuyiensis* (9410232 bp, GC%: 72.25) 差距不大^[14]。相关结果显示 FT05W 具有链霉菌的共同特点和探索抑菌特性的足够数据量。

链霉菌 FT05W 基因组中共预测 7434 个基因, 将蛋白序列分别与 CDD、COG、NR、PFAM、Swissprot、TrEMBL、GO、KEGG 库进行比对, 得到的注释基因的数目和比例不尽相同, 其中注释基因数量和占总预测基因的比例最高的为 NR 数据库 (共注释基因 6883 个, 占总预测基因的 93.99%), 最低为 KEGG 数据库 (共注释基因 2170 个, 占总预测基因的 29.63%), 其原因可能为 KEGG 数据库主要以注释代谢通路相关基因为主, 忽略其他功能基因的注释。因此, 在未来的研究中应将获得的微生物基因组序列与多个数据库的对比, 有望减少重要基因注释的丢失。随后, 本文对链霉菌 FT05W 基因组进行 KOG 分类预测, 共有 4007 个基因被分为 20 大类, 其中碳水化合物运输和代谢 (382 个基因, 占 9.53%), 进一步分析显示其中含有 135 个糖苷水解酶 (GHs) 蛋白和 67 个碳水化合物结合模块 (Carbohydrate-Binding Modules, CBMs) 蛋白。这几类蛋白质包括了许多与链霉菌抑菌活性相关的基因。

几丁质酶可降解真菌的细胞壁主要成分几丁质, 导致真菌细胞破裂或死亡, 从而阻止病害的发生和发展。由于链霉菌中几丁质酶普遍具有良好的抗菌活性, 推测几丁质酶在 FT05W 的生物活性中扮演着重要的角色, 尤其是在其生物防治机理方面。根据氨基酸序列的相似性, 几丁质酶可分为 3 个家族的糖苷水解酶, 即 18 家族、19 家族和 20 家族几丁质酶^[37]。大部分的几丁质酶属于 18 和 19 家族。18 家族几丁质酶主要存在于微生物, 动物和部分高等植物 (class III 和 V) 中。之前, 19 家族几丁质酶被普遍认为只存在于高等植物 (class IV) 中, 并帮助植物抵御真菌病原物, 比如一些植物源几丁质酶表现出了良好的体外抗菌活性。此外, 将瓜类几丁质酶基因在水稻中表达, 加强了水稻对稻瘟病和纹枯病的防御作用, 而将水稻几丁质酶基因转入香蕉基因组中, 加强了香蕉对黑叶条斑病的抵抗^[8,9]。

Ohno 等^[27]首次在灰色链霉菌 *S. griseus* 中发现链霉菌 19 家族几丁质酶。随后, 科学家们多次证实 19 家族几丁质酶同样普遍存在于链霉菌中。发现链霉菌的 19 家族几丁质酶能够单独表现出抵抗里氏木霉 *Tricoderma reesei* 的抗真菌活性^[38-42]。研究表明链霉菌 J-13-3 的 19 家族几丁质酶能有效地抑制里氏木霉、黑曲霉 *Aspergillus niger* 生长; 天蓝色链霉菌(A3)2 中的 19 家族几丁质酶能抑制里氏木霉, 而且还对绿色木霉 *T. viride*、爪哇毛霉菌 *Mucor javanicus*、茄腐镰刀菌 *Fusarium solani*、黑曲霉 *A. niger* 菌丝生长^[37]。这些和目前的研究表明, 链霉菌家族 19 几丁质酶表现出对一些细菌, 酵母和真菌的生长抑制活性, 表明了 19 家族几丁质酶的植物 (class IV) 在防御某些微生物感染方面具有重要作用。通过与已发表的天蓝色链霉菌、青紫链霉菌、*S. plicatus*、橄榄绿链霉菌 *S. olivaceoviridis*、灰色链霉菌 *S. griseus* 和 *S. thermoviolaceus* 的几丁质酶家族基因进行对比, 构建系统发育树, 本研究鉴定出链霉菌 FT05W 中共有 8 个几丁质酶家族基因, 其中 6 个为 18 家族, 2 个为 19 家族^[27-29]。研究表明, 链霉菌 FT05W 中的 ChiA 与 *S. griseus* 的 *Chi I*、*ChiB*, 灰色链霉菌的 *Chi II*、*ChiC*, 灰色链霉菌的 *Chi III*、*ChiE*, 天蓝色链霉菌的 *ChiE*、*ChiN* 及灰色链霉菌的 *ChiC* 相似性较大; 而链霉菌 FT05W 的 *ChiD* 与灰色链霉菌的 *Chi III*、*ChiP* 和天蓝色链霉菌的 *ChiK* 和 *ChiL* 相似性较小^[27,28]。链霉菌 FT05W 的 *ChiD*、*ChiP* 为 2 个全新的几丁质酶家族基因。

由于植物源 19 家族几丁质酶基因具有提高烟草抗病性的特点, 本研究为下一步挖掘与解析链霉菌 19 家族几丁质酶基因的功能提供了基础资料, 有助于对烟草拮抗链霉菌分子生物防治机理的研究。

参 考 文 献

- [1] Chen X, Pizzatti C, Bonaldi M, *et al.* Biological control of lettuce drop and host plant colonization by rhizospheric and endophytic *Streptomyces*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(714): 1-21.
- [2] Chen X, Bonaldi M, Erlacher A, *et al.* Biocontrol of two *Streptomyces* spp. strains against lettuce basal drop caused by *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. *Phytopathology*, 2016, 106(6): S7-S26.
- [3] Bonaldi M, Kunova A, Saracchi M, *et al.* Streptomycetes as biological control agents against basal drop[J]. *Acta Horticulturae*, 2014, 1044(40): 313-318.
- [4] Kunova A, Bonaldi M, Saracchi M, *et al.* Selection of *Streptomyces* against soil borne fungal pathogens by a standardized dual culture assay and evaluation of their effects on seed germination and plant growth[J]. *BMC Microbiology*, 2016, 16(272), 1-11.
- [5] Sardi P, Saracchi M, Quaroni S, *et al.* Isolation of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized roots[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(8): 2691-2693.
- [6] Xie C C, Jia H Y, Chen Y H. Regulation of chitinase genes expression in bacteria[J]. *Hereditas*, 2011, 33(10): 1029-1038.
- [7] Grover A. Plant chitinases: genetic diversity and physiological roles[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2012, 31(1): 57-73.
- [8] Li P, Yan P, Sang X, *et al.* Transgenic indica rice expressing a bitter melon (*Momordica charantia*) class I chitinase gene (McCHIT1) confers enhanced resistance to *Magnaporthe grisea* and *Rhizoctonia solani*[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 125(4): 533-543.
- [9] Kovács G, László S, Géraldine J, *et al.* Expression of a rice chitinase gene in transgenic banana ('Gros Michel', AAA genome group) confers resistance to black leaf streak disease[J]. *Transgenic Research*, 2013, 22(1): 117-130.
- [10] Chater K F, Biró S, Lee K J, *et al.* The complex extracellular biology of *Streptomyces*: review article[J]. *Fems Microbiology Reviews*, 2010, 34(2): 171-198.
- [11] 陈中义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. *植物病理学报*, 2003, 33(2): 97-103.
- [12] Shen T, Wang C, Yang H, *et al.* Identification, solid-state fermentation and biocontrol effects of *Streptomyces hygroscopicus*, B04 on strawberry root rot[J]. *Applied Soil Ecology*, 2016, 103: 36-43.
- [13] 陈捷. 木霉菌诱导植物抗病性研究新进展[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(5): 733-741.
- [14] Ge B, Liu Y, Liu B, *et al.* Draft genome sequence of *Streptomyces ahygroscopicus* subsp. wuyiensis ck-15, isolated from soil in Fujian province, China[J]. *Genome Announcements*, 2015, 3(5): 1-2.
- [15] Saito A, Fujii T, Miyashita K. Distribution and evolution of chitinase genes in *Streptomyces* species: involvement of gene-duplication and domain-deletion[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2003, 84(1): 7-15.
- [16] Pawel B, Chian K, Paul S L. Not a peripheral issue: secretion in Plant-microbe interactions[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(4): 378-387.
- [17] Kim Y C, Leveau J, Mcspadden Gardener B B, *et al.* The multifactorial basis for plant health promotion by plant-associated bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(5): 1548-1555.
- [18] Augustine S K, Bhavsar S P, Kapadnis B P. A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23[J]. *Journal of Biosciences*, 2005, 30(2): 201-211.
- [19] Eltarabily K A. Rhizosphere-competent isolates of *Streptomyces* and non-*Streptomyces* actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber[J]. *Canadian Journal of Botany*, 2006, 84(2): 211-222.
- [20] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, *et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. *Journal of Computational Biology*, 2012, 19(5): 455-477.
- [21] Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation[J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(14): 2068-2069.
- [22] Bland C, Ramsey T L, Sabree F, *et al.* Crispr recognition tool (CRT): a tool for automatic detection of clustered regularly interspaced palindromic repeats[J]. *BMC Bioinformatics*. 2007, 8(209): 1-8.
- [23] Tatusov R L, Fedorova N D, Jackson J D, *et al.* The KOG database: an updated version includes eukaryotes[J]. *BMC Bioinformatics*. 2003, 4(1): 41.
- [24] https://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html[DB/OL].
- [25] Blake J A, Dolan M, Drabkin H, *et al.* Gene ontology annotations and resources[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(1): 530-535.

- [26] Ogata H, Goto S, Sato K, *et al.* KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(1): 29-34.
- [27] Ohno T, Armand S, Hata T, *et al.* A modular family 19 chitinase found in the prokaryotic organism *Streptomyces griseus* HUT 6037[J]. *Journal of bacteriology*, 1996, 178(17): 5065-5070.
- [28] Redenbach M, Kieser H M, Denapaité D, *et al.* A set of ordered cosmids and a detailed genetic and physical map for the 8Mb *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome[J]. *Molecular Microbiology*, 1996, 21(1): 77-96.
- [29] [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/\[DB/OL\]](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/[DB/OL]).
- [30] Joshi M V, Bignell D R D, Johnson E G, *et al.* The AraC/XylS regulator TxtR modulates thaxtomin biosynthesis and virulence in *Streptomyces scabies*[J]. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(3): 633-642.
- [31] 张克诚, 李研学, 贾恩宽, 等. 拮抗链霉菌 S—5 对棉花病害的防治作用[J]. *中国农学通报*, 2002, 18(2): 26-29.
- [32] 曹理想, 周世宁. 植物内生放线菌研究[J]. *微生物学通报*, 2004, 31(4): 93-96.
- [33] 刘宇, 刘建华, 刘伟成, 等. 利迪链霉菌 A02 诱导番茄抗灰霉病作用机制研究—对植株防御酶系的影响[J]. *华北农学报*, 2007, 22(2): 152-155.
- [34] Xue L, Gu M Y, Xu W L, *et al.* Antagonistic *Streptomyces* enhances defense-related responses in cotton for biocontrol of wilt caused by phytotoxin of *Verticillium dahliae*[J]. *Phytoparasitica*, 2016, 44(2): 225-237.
- [35] Viaene T, Langendries S, Beirinckx S, *et al.* *Streptomyces* as a plant's best friend?[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2016, 92(8): 1-10.
- [36] Jiang X, Liu W, Ji Y, *et al.* Expression of CPY107Z13 in *Streptomyces lividans* TK54 catalyzes the oxidation of avermectin to 4"-oxo-avermectin[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(5): 1957-1963.
- [37] Kawase T, Yokokawa S, Saito A, *et al.* Comparison of enzymatic and antifungal properties between family 18 and 19 chitinases from *Streptomyces coelicolor* A3(2)[J]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 2006, 70(4): 988-998.
- [38] Watanabe T, Kanai R, Kawase T. *et al.* Family 19 chitinases of *Streptomyces* species: characterization and distribution[J]. *Microbiology*, 1999, 145(12): 3353-3363.
- [39] Tsujibo H, Okamoto T, Hatano N, *et al.* Family 19 Chitinases from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC520: molecular cloning and characterization[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2000, 64(11): 2445-2453.
- [40] Tsujibo H, Kubota T, Yamamoto M, *et al.* Characterization of chitinase genes from an alkaliphilic actinomycete, *Nocardiopsis prasina* OPC-131[J]. *Applied Environmental Microbiology*, 2003, 69(2): 894-900.
- [41] Okazaki K, Yamashita Y, Noda M, *et al.* Molecular cloning and expression of the gene encoding family 19 chitinase from *Streptomyces* sp. J-13-3[J]. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 2004, 68(2): 341-351.
- [42] Yamashita Y, Okazaki K. Purification and antifungal activity of recombinant chitinase from *Escherichia coli* carrying the family 19 chitinase gene of *Streptomyces* sp. J-13-3[J]. *Journal of the Agricultural Chemical Society of Japan*, 2004, 68(10): 2193-2196.