

文章编号: 1674-7054(2023)04-0389-10



# 贝莱斯芽孢杆菌 HN-2 次生代谢产物处理下 黄单胞菌 (*Xoo*) 的转录组分析

高雪, 劳广术, 谭 峥, 方渝凯, 刘文波, 靳鹏飞, 缪卫国  
(海南大学 植物保护学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

**摘要:** 为探究贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)菌株 HN-2 正丁醇提取物对黄单胞菌(*Xoo*)的抑菌机制, 分别用菌株 HN-2 正丁醇提取物和杆菌肽处理 12 h 后的 *Xoo* 进行转录组测序(RNA-seq)并利用 GO 数据库和 KEGG 数据库对转录组数据进行分析。转录组数据分析结果表明, HN-2 正丁醇提取物和杆菌肽处理后 *Xoo* 菌内均有大量差异表达基因(DEGs), HN-2 处理组共得到 1 512 个差异表达基因, 其中上调表达基因 871 个, 下调表达基因 641 个; GO 富集分析发现 HN-2 正丁醇提取物处理后, *Xoo* 的差异表达基因主要聚类在代谢过程、细胞组分、大分子复合物、催化活性等方面; KEGG 聚类分析发现 HN-2 正丁醇提取物处理后, 核糖体途径所包含的差异表达基因数目最多, 差异最显著, 其余主要参与的代谢途径有淀粉和蔗糖代谢、苯甲酸酯降解、甘油磷脂降解、细菌趋化性等。结果表明, HN-2 正丁醇提取物主要影响 *Xoo* 的核糖体途径、淀粉和蔗糖代谢途径、细菌趋化性途径。

**关键词:** 贝莱斯芽孢杆菌; 黄单胞菌; 抑菌活性; 表达差异基因

**中图分类号:** Q 78      **文献标志码:** A

**引用格式:** 高雪, 劳广术, 谭峥, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 HN-2 次生代谢产物处理下黄单胞菌(*Xoo*)的转录组分析 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(4): 389-398. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsww.2023.04.006

水稻(*Oryza sativa* L.)白叶枯病是一种由黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)引起的细菌性病害, 在各水稻种植区均有发生, 并且危害严重, 是我国水稻重要病害之一<sup>[1]</sup>。发病后叶片产生黄绿色病斑, 最终变黄枯死, 每年造成水稻产量减少 20%~30%, 严重时减产 50%, 甚至绝收<sup>[2]</sup>。虽然目前有一些抗病品种, 但是抗病性易随着时间而逐渐减弱。防治白叶枯病的化学药剂有铜制剂、有机磷、有机氮、噻唑类等<sup>[3-8]</sup>, 这些药剂大部分在田间使用时易使病菌产生抗药性, 对环境有影响。如噻唑啉在田间已有明显抗性<sup>[9]</sup>; 5-氧吩噻啉类药剂持效期短, 病害易复发, 水稻白叶枯病的防治形势依旧严峻。

生物防治是一种高效且对环境友好的策略, 可以用于植物病害的治理<sup>[10]</sup>。生防芽孢杆菌是目前应用最广泛的生防细菌之一, 对各种真菌、细菌和病毒的侵染造成的植物病害, 都能够有效地抑制<sup>[11]</sup>, 并且还具有良好的促进植物增产、诱导植物抗病的能力。目前, 越来越多生防芽孢杆菌被开发成农药, 得到商品化产品<sup>[12]</sup>。芽孢杆菌能够产生次级代谢物质来抑制和杀灭有害微生物, 这些活性代谢物质主要包括酶类、细菌素类, 以及受到关注最多的脂肽类等<sup>[13-14]</sup>, 如地衣形芽孢杆菌(*Bacillus licheni formus*)可以发酵产生一种具有良好的抑制细菌活性的脂肽类物质——杆菌肽。杆菌肽目前作为一种多肽类抗生素已经被广泛地应

收稿日期: 2022-04-28      修回日期: 2022-06-18

**基金项目:** 海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(2019RC163); 海南省青年科技英才创新计划(QCXM201903); 国家自然科学基金地区科学基金项目(31960552); 海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目(322RC591); 海南大学校内科研启动经费项目 [KYQD(ZR)1842]

**第一作者:** 高雪(1997-), 女, 海南大学植物保护学院 2019 级硕士研究生. E-mail: 19095132210042@hainanu.edu.cn

**通信作者:** 靳鹏飞(1987-), 男, 副教授. 研究方向: 微生物生物防治研究. E-mail: jinpengfei@hainanu.edu.cn; 缪卫国(1969-), 男, 教授. 研究方向: 植物病理学研究. E-mail: Miao@hainanu.edu.cn

用于医学<sup>[15]</sup>。有研究<sup>[16]</sup>表明芽胞杆菌属(*Bacillus* spp.)能够产生具有较强拮抗 *Xoo* 的脂肽类活性物质。*Bacillus* strain D13 可以产生一种挥发性物质,该挥发性物质具有较好的抑制 *Xoo* 的活性<sup>[17]</sup>。解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 分泌的抗生素类物质 bacilysin 和 difficidin 对水稻黄单胞菌 *Xoo* 具有显著的抑菌作用<sup>[18]</sup>。笔者所在实验室的研究<sup>[19]</sup>发现,贝莱斯芽胞杆菌 HN-2 产生的 C<sub>15</sub>surfactin A 对 *Xoo* 具有较强抗菌活性,能抑制 *Xoo* 的生长,并通过介导抗氧化剂相关酶的活性而引发过敏性反应,有效地诱导水稻对 *Xoo* 的抗性。虽然目前已经有一些关于芽胞杆菌抑制 *Xoo* 的研究,然而贝莱斯芽胞杆菌抑制 *Xoo* 的作用机制尚不明确。因此,本研究以 HN-2 菌株发酵液正丁醇提取物处理 12 h 后的 *Xoo* 为研究对象,进行转录组测序和分析,拟求得 *Xoo* 应对 HN-2 抑菌活性成分的代谢途径基因表达差异图谱,为后续进一步揭示贝莱斯芽胞杆菌 HN-2 的抑植物病原细菌 *Xoo* 机理提供前期数据和理论参考。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料及样品准备** 贝莱斯芽胞杆菌 HN-2 为本实验室从土壤中分离保存,稻黄单胞菌 *Xoo*(PXO99A)由笔者所在的实验室提供保存。杆菌肽(98%,分析纯)购自日本和光纯药株式会社有限公司。(1)HN-2 发酵活性物质的提取:接种 HN-2 菌株于 LB 培养基 37 °C, 180 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 48 h 后,离心 10 min 弃去菌体,得到 HN-2 发酵液上清液。等比例并充分混合正丁醇和 HN-2 发酵液上清液后,室温下静置过夜,用分液漏斗分离有机相得到上层正丁醇萃取液。在 67 °C 下将得到的上层正丁醇萃取液进行旋转蒸发浓缩,蒸发浓缩后的沉淀用少量甲醇充分溶解并进行冷冻干燥 12 h,得到 HN-2 抑菌活性成分粉末粗提物,-80 °C 保存备用,使用前称取 0.01 g 粗提物加入 1 mL 的超纯水充分溶解,并用一次性细菌过滤器过滤。(2)样品处理:从平板上挑取黄单胞菌的单菌落接种至 PSA 液体培养基中,共接种 9 瓶,在 28 °C, 180 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养至生长对数期( $OD_{600}=0.300$ )。此时向第一组菌液中加入 HN-2 正丁醇提取物至终浓度为 MIC<sub>50</sub> 值(2.36 mg·mL<sup>-1</sup>),第二组菌液加入杆菌肽至终浓度为 MIC<sub>50</sub> 值(11.96

mg·mL<sup>-1</sup>),第三组菌液不做任何处理,继续振荡培养 12 h,3 次重复,将 HN-2 正丁醇提取物处理 12 h 的样品命名为“*Xoo*-HN-2”,杆菌肽处理 12 h 的样品命名为“*Xoo*-G”,对照组命名为“*Xoo*-CK”。

**1.2 转录组测序和生物信息学分析** 样品 *Xoo* 总 RNA 的提取使用天根 RNA 提取试剂盒,并将提取的 RNA 送到广州基地奥生物科技公司进行质检,以保证所有样品最终都获得高质量的总 RNA。利用 Illumina HiSeq X Ten 测序平台(Illumina Inc, CA, USA)进行转录组建库测序及分析。步骤:(1)去除核糖体 RNA;(2)RNA 随机打断为 200 nt 片段;(3)加入六碱基随机引物、缓冲液、dNTPs、RNase H 和 DNA 聚合酶 I 合成 cDNA 第一条链;(4)使用 dUTP 代替 dTTP,合成 cDNA 第二条链;(5)末端修复 3'、5'端,加 A 尾,连接接头;(6)使用 UNG 酶降解 cDNA 第二条链,以保留 RNA 方向信息;(7)PCR 扩增产生 DNA 的聚集片段,完成文库制备;(8)利用 Illumina 测序平台对构建好的文库进行双末端测序,将所得数据过滤后用于后续的转录组分析<sup>[20]</sup>。

**1.3 差异基因表达分析** 对样品中的 Mapped reads 数目和转录本长度进行归一化处理,使用 RAEM 软件,采用 FPKM(Fragments Per Kilobase of transcript per Million fragments mapped)作为衡量转录本的指标<sup>[21]</sup>,采用皮尔森相关系数(Pearson Correlation Coefficient, PCC)法检测重复样品之间的相关性,并利用 DESeq R 包分析不同处理后 *Xoo* 的差异表达基因。为进一步控制该过程中的错误发现率(false discovery rate, FDR),使用 edgeR<sup>[22]</sup> 软件对不同样品间差异表达基因定量分析。采用 FDR(false discovery rate)与 log<sub>2</sub>(FoldChange) (log<sub>2</sub>FC)来作为差异表达基因筛选的关键指标,筛选条件为 FDR<0.05 且 |log<sub>2</sub>FC|>1。

**1.4 基因功能富集分析** 将筛选得到的差异基因进行 GO 富集分析,用特定的 GO terms 给差异表达基因的表达模式注释;利用 KEGG 数据库找出在差异表达基因中,富集最显著的前 20 条代谢通路画图展示。

## 2 结果与分析

**2.1 RNA-seq 数据质控结果** 转录组原始数据质控过滤前后的黄单胞菌 *Xoo*(PXO99A)转录组

测序数据统计情况见表1。由表1可见, CK组、HN-2组、杆菌肽组的样本通过测序获得的原始碱基数(Raw Data)分别为3 669 218 400、3 356 470 200和5 089 554 000。3组原始序列经过质控后获得的Clean data分别为3 490 096 417、3 232 110 301和502 049 243。过滤后的总碱基数占原始序列的

比例分别为98.55%、98.53%和97.32%, Q20分别为98.03%、98.03%和97.32%, Q30分别为94.89%、94.89%和92.0%, GC含量分别为61.61%、61.06%和60.93%, 这些结果表明过滤后所获得的序列质量较好, 可靠性高, Clean reads可以用于后续的生物信息学分析。

表1 Reads 过滤前后碱基信息统计结果

样品碱基信息	样本名		
	<i>Xoo</i> -CK	<i>Xoo</i> -HN-2	<i>Xoo</i> -G
Raw data/bp	3 669 218 400	3 356 470 200	5 089 554 000
Q20/%	3 596 827 023 (98.03%)	3 293 722 095 (98.03%)	4 948 281 317 (97.22%)
过滤前 Q30/%	3 481 614 115 (94.89%)	3 188 133 592 (94.98%)	4 674 417 659 (91.84%)
N/%	5 182 (0.0%)	4 797 (0.0%)	41 169 (0.0%)
GC/%	2 260 575 649 (61.61%)	2 049 438 853 (61.06%)	3 095 193 280 (60.82%)
Clean data/bp	3 490 096 417	3 232 110 301	5 020 492 431
Q20/%	3 439 489 923 (98.55%)	3 184 723 700 (98.53%)	4 886 066 551 (97.32%)
Q30/%	3 336 281 653 (95.59%)	3 087 417 164 (95.52%)	4 618 772 865 (92.0%)
过滤后 N/%	4 928 (0.0%)	4 619 (0.0%)	40 606 (0.0%)
GC/%	2 158 506 542 (61.85%)	1 978 705 819 (61.22%)	3 059 001 170 (60.93%)

注: Raw data: 原始下机数据碱基总数(bp); Clean data: 过滤低质量reads后获得的有效数据碱基总数及占raw data的百分比; Q20(%): 测序碱基正确率达99%以上的碱基数及占过滤前/后碱基总数的比例; Q30(%): 测序碱基正确率99.9%以上的碱基数占过滤前/后碱基总数的比例; N (%): N碱基的数目及百分比; GC(%): GC碱基数目及百分比。

**2.2 样品重复性相关性检测** 本实验共有3个样本(CK组, HN-2组, G组), 通过主成分分析(PCA)可以评价样品重复性、找出离群样品、评估组间差异等。使用R语言获得各个样本在第一主成分(PC1)和第二主成分(PC2)2个综合变量中的数值大小, 作二维坐标图。如图1所示, PC1可以解释原所有基因的表达量总体方差的71.3%, PC2可以解释原所有基因的表达量总体方差的28.7%, PC1与PC2共可以解释总体方差的100%, 表明样品重复性高, 组间差异小。通过R计算3个样本及每个样本的3个生物学重复间的皮尔森相关系数(Pearson Correlation Coefficient, PCC)。如图2所示, 可以看到每个样本的3个生物学重复之间的相关系数呈对角线分布, 表明测序数据具有较强的重复性和较高的可信度, 可以用于后续的差异表达分析。

**2.3 差异基因表达统计分析** 如图3所示, HN-2

组和杆菌肽组相比, 共筛选到1 226个差异基因, 其中有612个基因在HN-2组中上调, 614个基因

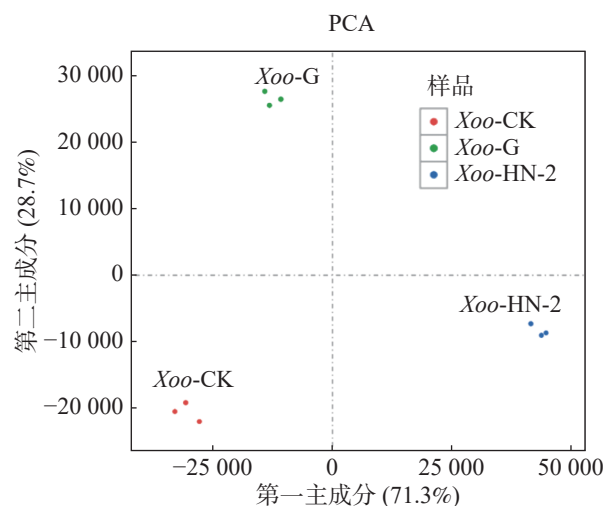


图1 主成分分析 PCA 图

坐标轴标签括号中的数值代表主成分解释总体方差的百分比。

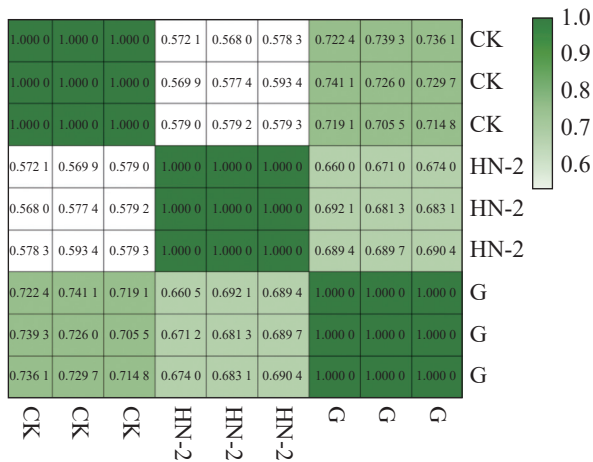


图2 相关性热图

皮尔森相关系数越趋近于1颜色越深,代表相关性越高。

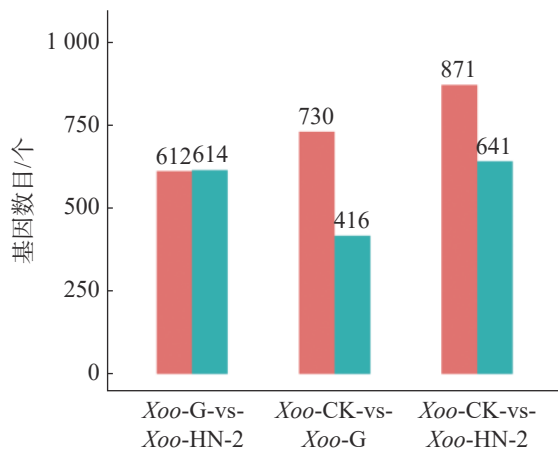


图3 样品间差异基因统计

红色代表上调表达的基因,蓝色代表下调表达的基因。

在 HN-2 组中下调。杆菌肽组和 CK 组相比,共筛选到 1 146 个差异基因,其中有 730 个基因在杆菌肽组中上调,416 个基因在杆菌肽组中下调。HN-2 组和 CK 组相比,共筛选到 1 512 个差异基因,其中有 871 个基因在 HN-2 组中上调,641 个基因在 HN-2 组中下调。此外无论是加入 HN-2 还是杆菌肽,上调表达基因都多于下调表达基因,并且 HN-2 组表达差异的表达基因总数多于杆菌肽组,说明经 HN-2 处理后, *Xoo* 有更多的基因被调控来参与到对 HN-2 处理后的适应过程中。本研究重点关注的是不同处理之间的差异,因此对两两比较的差异基因绘制了韦恩图(图 4)。图 4 可见,与杆菌肽组相比,HN-2 组有 275 个差异表达基因为其特有,是 HN-2 提取物与杆菌肽抑菌机制不同导致,这些 HN-2 组特有的差异基因有助于

进一步研究 HN-2 对 *Xoo* 的作用机理。因此,在后续对于 HN-2 组的差异表达基因定性分析时,这 275 个差异基因将作为重点研究分析对象。

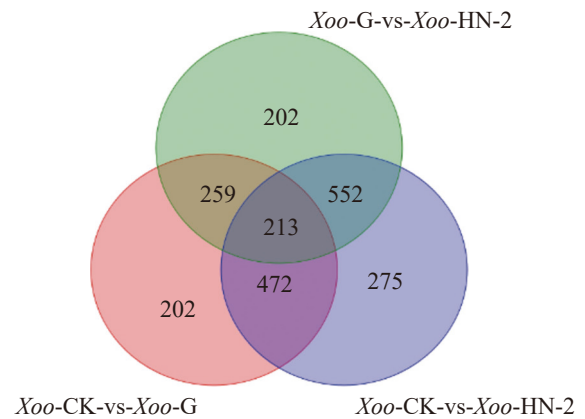


图4 差异表达基因韦恩图

## 2.4 GO 功能分析和 KEGG 通路分析

**2.4.1 差异表达基因的 GO 统计** 从图 5~7 中可以看出,在生物过程中,HN-2 组的差异基因主要集中在单体有机体过程、代谢过程和细胞进程等功能条目中,其中,单体有机体过程包含 33 个差异基因,代谢过程包含 35 个差异基因;细胞进程中包含 20 个差异基因,在细胞组分中,HN-2 组的差异基因主要富集在细胞、细胞成分和大分子复合物等功能条目中,其中,细胞核细胞成分均包含 17 个差异基因;在分子功能中,HN-2 组的差异基因主要富集在结合、催化活性和结构分子活性等功能条目中,其中,结合过程包含 26 个差异基因,催化活性包含 24 个差异基因,结构分子活性包含 9 个差异基因。此外,可以看到虽然 HN-2 组和杆菌肽组的富集结果大致相似,但是 HN-2 组的差异基因数目(共 148 个差异基因)显著多于杆菌肽组的差异基因数目(共 117 个差异基因)。

**2.4.2 转录组数据的 KEGG 通路分析** 对杆菌肽与 HN-2 正丁醇提取物处理后,菌株 *Xoo* 的代谢通路显著性富集分析,选取了富集最为显著的 20 条代谢通路画图(图 8~10)展示。图 8 表明,与对照组相比,杆菌肽处理后,富集程度较高、富集较为显著且包含差异基因数目较多的途径有鞭毛组装、核糖体途径、细菌趋化性和双组分系统氧化磷酸化等;图 9 表明,与对照组相比,HN-2 正丁醇提取物处理后,核糖体途径所包含的差异表达基因富集的程度最高、富集最显著且差异表达基因的数目最多,其余主要参与的代谢途径有淀粉和

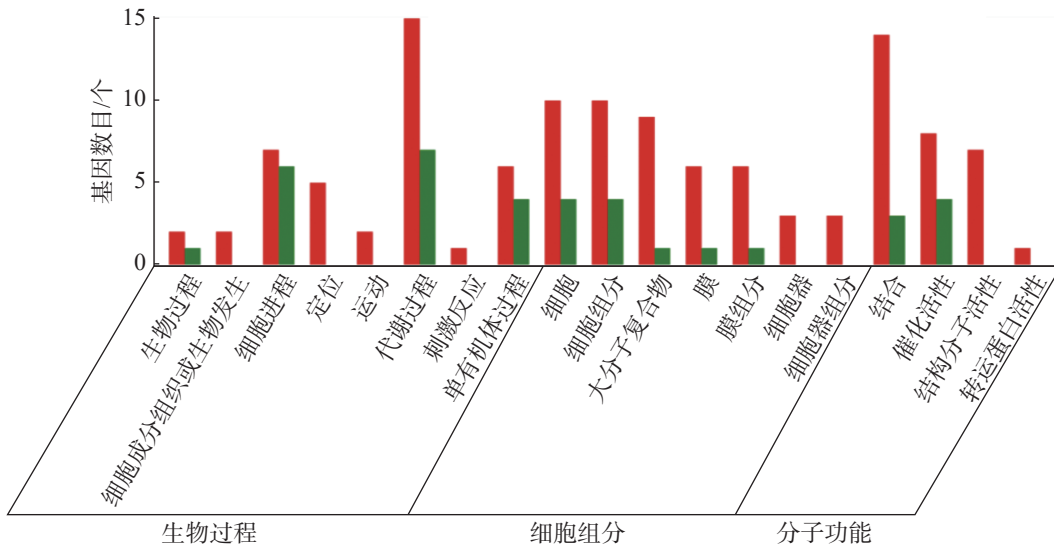


图 5 样品间差异基因 GO 分类图(CK vs 杆菌肽)

红色代表上调表达的基因, 绿色代表下调表达的基因。

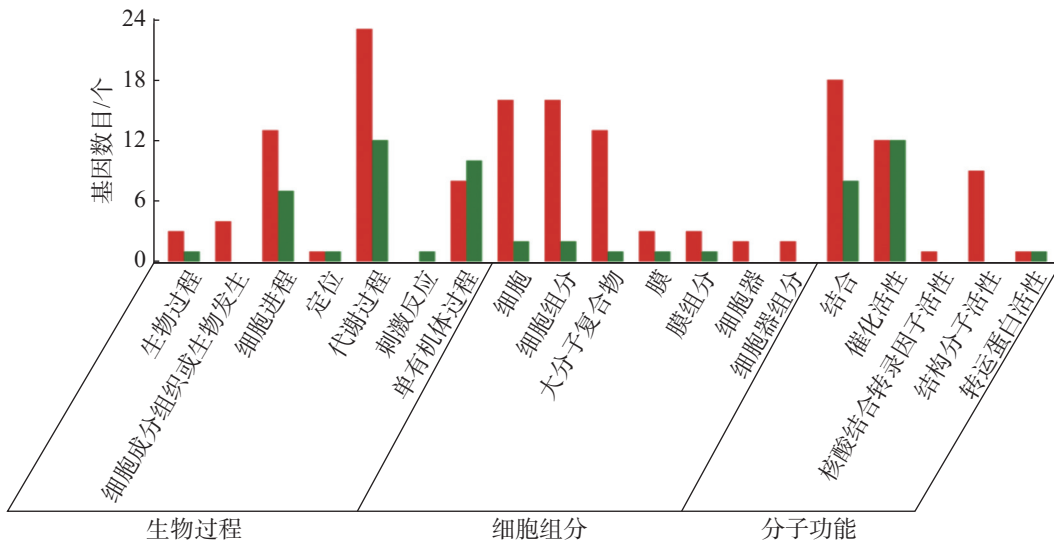


图 6 样品间差异基因 GO 分类图(CK vs HN-2)

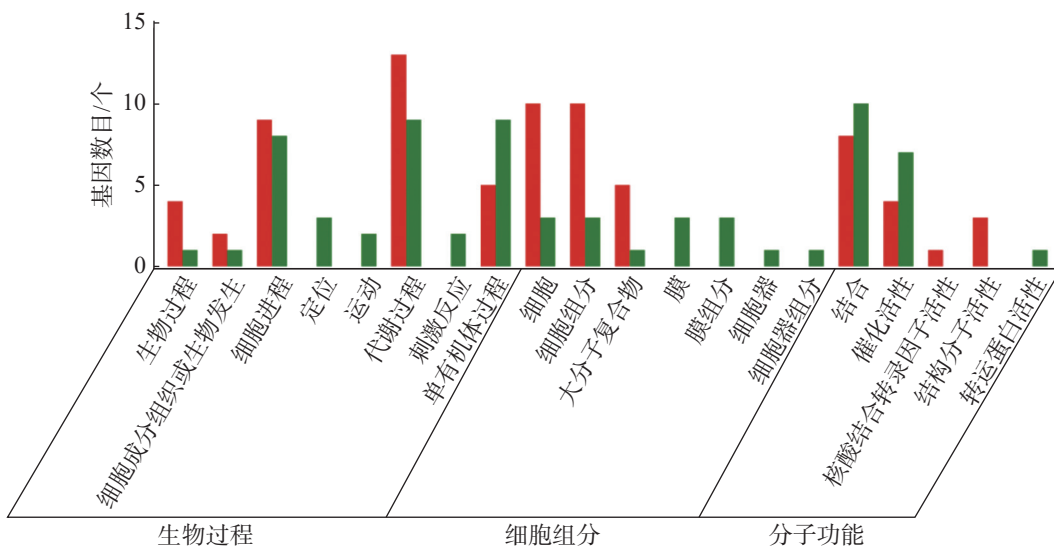


图 7 样品间差异基因 GO 分类图(杆菌肽 vs HN-2)

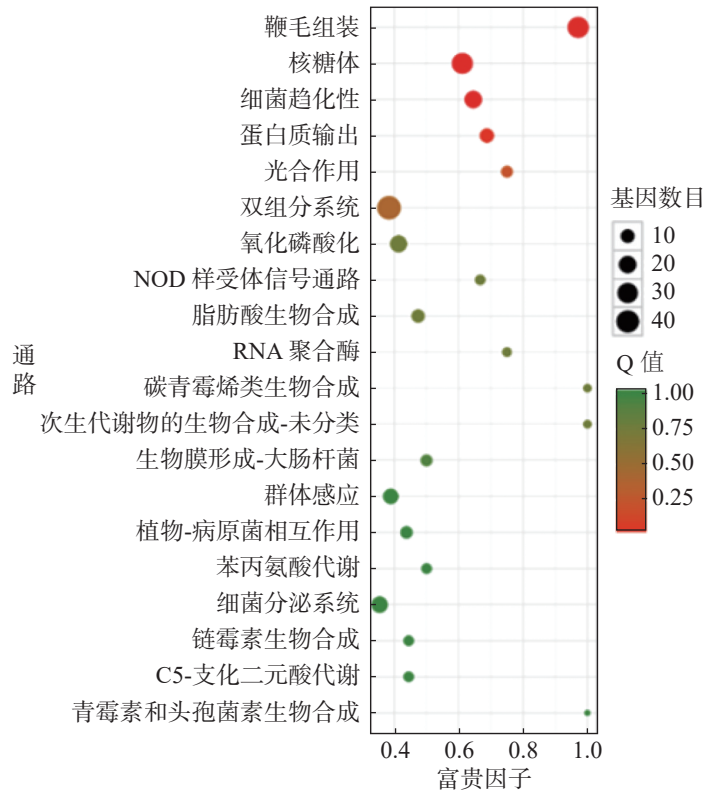


图 8 差异表达基因 KEGG 显著富集通路结果图(CK vs 杆菌肽)

横坐标富集因子越大,表示该代谢通路富集的程度越高。Q 值越趋近于 0,颜色越偏红,表示该代谢通路的富集越显著。圆点的大小代表富集的基因数目的多少,圆点越大代表富集的基因数目越多。

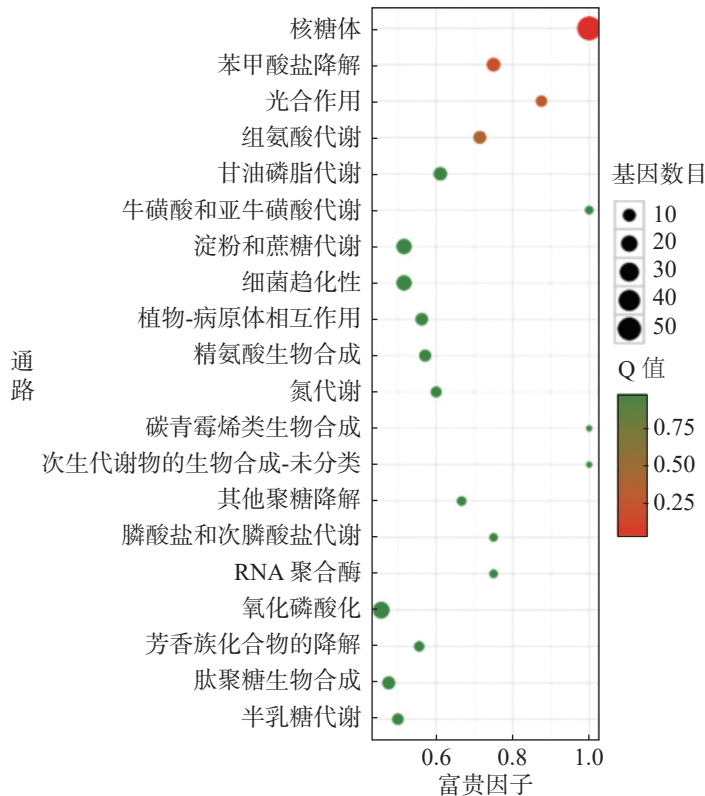


图 9 差异表达基因 KEGG 显著富集通路结果图(CK vs HN-2)

蔗糖代谢、苯甲酸降解、甘油磷脂降解、细菌趋化性等。因此,在后续对相关代谢途径的生物实验

证中,可以重点关注和研究核糖体途径的淀粉蔗糖代谢中的差异表达基因。

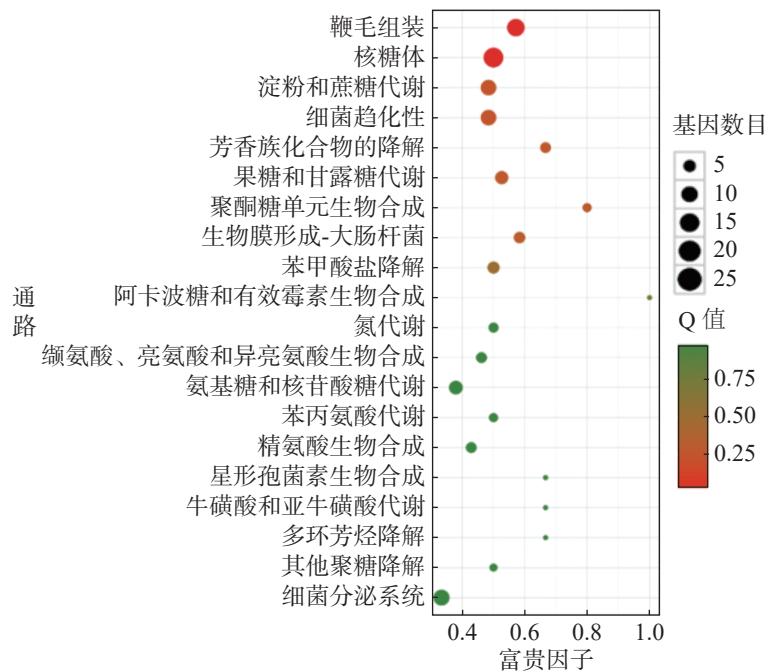


图 10 差异表达基因 KEGG 显著富集通路结果图(杆菌肽 vs HN-2)

### 3 讨论

黄单胞菌能够引起的水稻白叶枯病, 是水稻生产上的一类重要细菌病害<sup>[1]</sup>。生防细菌贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* 由 Ruiz-Garcia 等<sup>[23]</sup> 发现并命名, 因其具有对人畜和环境友好, 菌株不易产生抗药性、在自然环境中易降解等特点而受到广泛的研究和关注<sup>[24]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌具有优越的抑制细菌能力, 它能够产生许多抑菌活性物质, 其中关注度最高的是脂肽类物质<sup>[15]</sup>。本实验室的前期研究结果发现, 贝莱斯芽孢杆菌 HN-2 菌株发酵液的正丁醇提取物对 *Xoo* 具有很强的抑菌活性, 通过分离纯化, 得到了正丁醇提取物中的主要活性成分, 并利用高效液相色谱-质谱/质谱联用 (HPLC-MS/MS) 技术对其结构进行了鉴定, 结果表明贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) HN-2 正丁醇提取物中的 C<sub>15</sub> surfactin A 对 *Xoo* 具有较强抗菌活性, 能抑制 *Xoo* 的生长<sup>[19]</sup>, 但其具体的抑菌机制尚不明确。

已有研究通过对药剂处理前后转录组测序来探究抑菌物质对 *Xoo* 的作用机理, 如 Fan 等<sup>[25]</sup> 对邻香豆酸处理 30 min、1 h、3 h、6 h 的 *Xoo* 菌与 DMSO 对照处理的 *Xoo* 菌进行转录组测序, KEGG 聚类分析结果表明: 在处理 30 min 后, 差异表达基因没有明显聚类, 主要都集中在代谢途径方面; 处理

1 h 后, 氧化磷酸化途径富集最显著; 处理 3 h 后, 差异表达基因聚类在氧化磷酸化和蛋白质合成途径中; 处理 6 h 后, 差异表达基因集中在糖代谢途径、组氨酸代谢途径和细菌趋化性等方面。并且还发现, MarR 家族蛋白基因簇在 4 个时间段内都显著上调表达。据报道<sup>[25]</sup> MarR 家族蛋白与病原细菌转运抗生素有关。Liang 等<sup>[26]</sup> 对经过噻枯唑处理 4.5 h 和 9 h 后的 *Xoo* 转录组进行分析, 发现 *Xoo* 的组氨酸代谢途径显著被噻枯唑所抑制。Chen 等<sup>[27]</sup> 为了研究褪黑激素作为抗生素如何抑制黄单胞菌的生长, 分析了 200 μg·mL<sup>-1</sup> 浓度褪黑素处理 21 h 的 *Xoo* 的转录组数据, 结果表明, 138 个基因的 mRNA 转录水平发生了变化, 以应对褪黑激素的攻击。上调基因主要集中在鞭毛成分、转运蛋白活性等途径, 而催化活性、金属结合活性、碳水化合物代谢和氨基酸代谢等途径显著下调表达。在本实验中, 为进一步明确 HN-2 的抑菌机制, 将杆菌肽和 HN-2 正丁醇提取物处理 12 h 后的 *Xoo* 菌进行转录组测序。杆菌肽 (Bacitracin) 是一类由地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheni formus*) 发酵生产的一类脂肽类物质, 具有良好的抑制细菌活性<sup>[28]</sup>。杆菌肽的作用机制明确, 它通过抑制细胞壁的合成, 对细胞膜造成损伤, 使细胞质中离子和氨基酸外泄来发挥抑菌作用<sup>[29]</sup>。

与地衣芽孢杆菌一样,贝莱斯芽孢杆菌也能够通过非核糖体途径合成一些具有抑菌活性的脂肽类物质,因此本实验选择杆菌肽作为对比来检验贝莱斯芽孢杆菌 HN-2 的主要抑菌机制与杆菌肽是否具有相似性。

转录组测序分析后发现 *Xoo* 的核糖体途径、淀粉和蔗糖代谢途径、细菌趋化性途径等在受到 HN-2 正丁醇提取物的影响后显著上调表达,说明 HN-2 正丁醇提取物很可能通过影响这些代谢途径而发挥抑菌能力。由图 4 可以看到,HN-2 组与杆菌肽组中相同的差异基因仅占 HN-2 组所有差异基因的 45.3%,HN-2 组还有 54.7% 差异基因为其特有,因此,可以得出结论,HN-2 正丁醇提取物的抑菌活性与杆菌肽可能有部分相似性,但是其主要抑菌机理仍需要进一步探究与分析。通过 KEGG 富集分析结果发现,HN-2 正丁醇提取物处理后,核糖体途径富集的程度最高、富集最显著、且包含的差异表达基因数目最多。在核糖体途径中发现显著上调表达的 *rpoB*, *rpoB* 基因是结核分枝杆菌 (*M.tuberculosis*) 中编码 RNA 聚合酶  $\beta$  亚基的基因。万智敏等<sup>[30]</sup>的研究结果表明, *rpoB* 基因耐药决定区 (rifampin resistance-determining region, RRDR) 的突变可以引起 96% 以上的结核分枝杆菌临床分离株对利福平耐药,并且 *rpoB* 基因不同的突变模式对利福平产生的耐药程度有显著差异。由此可以推测菌株 HN-2 正丁醇提取物与利福平的抑菌机理可能存在一定相似性。此外,还发现核糖体途径中 *secY*, *secE* 和 *secG* 基因显著上调表达, *secY*, *secE* 和 *secG* 基因所编码的蛋白是分泌途径中主要的 3 种膜蛋白<sup>[31]</sup>,大多数细菌蛋白的运送都由 *secYEG* 复合体完成,可以推测 HN-2 正丁醇提取物可能影响了 *Xoo* 中蛋白的分泌与运输,从而影响 *Xoo* 菌与外界的物质交换。同时还发现 HN-2 正丁醇提取物处理后 *Xoo* 内淀粉和蔗糖代谢途径中的差异基因数目较多,差异较显著,可以推测 HN-2 正丁醇提取物可能使 *Xoo* 对淀粉和蔗糖等物质的代谢利用能力发生了改变。

本研究中,对 *Xoo* 经过 HN-2 正丁醇提取物和杆菌肽处理 12 h 转录组的分析结果表明,HN-2 正丁醇提取物主要影响 *Xoo* 的核糖体途径、淀粉和

蔗糖代谢途径、细菌趋化性途径。为进一步明确 HN-2 对 *Xoo* 的抑菌机理提供了理论基础。

## 参考文献:

- [1] 李争,熊鹏,纪志远,等.白叶枯病菌和细菌性条斑病菌多样性的 TALE 效应蛋白调控水稻抗(感)病性机理与利用策略[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(14): 2894 – 2901.
- [2] MANSFIELD J, GENIN S, MAGORI S, et al. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(6): 614 – 629.
- [3] 成家壮.防治水稻白叶枯病药剂的研究[J]. *世界农药*, 2008, 30(5): 13 – 15.
- [4] 郭镁溪,陈前武,查俊晖,等.50% 氧氯化铜防治水稻白叶枯病试验报告[J]. *福建农业*, 2014, 2014(9): 162 – 163.
- [5] 周艳丽,李薇,薛超,等.30% 壬菌铜微乳剂防治水稻白叶枯病药效试验[J]. *农药*, 2014, 53(5): 375 – 376.
- [6] 胡雪芳,梁亮,张志民,等.20% 寡聚酸碘对水稻白叶枯病的田间防治效果[J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(4): 872 – 874.
- [7] 黄家会,袁川,徐世林,等.10% 溃枯宁防治水稻白叶枯病试验示范[J]. *农药*, 1999, 38(10): 44 – 45.
- [8] 鲁传涛,宋凤仙,徐小双.中生菌素防治水稻白叶枯病的应用技术[J]. *农药*, 1998, 37(7): 20.
- [9] 沈光斌,周明国.水稻白叶枯病菌对噻枯唑的抗药性监测[J]. *植物保护*, 2002, 28(1): 9 – 11.
- [10] ZERIOUH H, ROMERO D, GARCÍA-GUTIÉRREZ L, et al. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(12): 1540 – 1552.
- [11] 余小霞,田健,伍宁丰.枯草芽孢杆菌芽孢表面展示外源蛋白的研究进展[J]. *中国农业科技导报*, 2013, 15(5): 31 – 38.
- [12] 崔晓,徐艳霞,刘俊杰,等.芽孢杆菌在农业生产中的应用[J]. *土壤与作物*, 2019, 8(1): 32 – 42.
- [13] TSUGE K, AKIYAMA T, SHODA M. Cloning sequencing and characterization of the iturin A operon [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(21): 6265 – 6273.
- [14] KOUMOUTSI A, CHEN X H, HENNE A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquifaciens* strain FZB42 [J]. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(4): 1084 – 1096.
- [15] NAM J, ALAM S T, KANG K, et al. Anti-staphylococcal activity of a cyclic lipopeptide, C<sub>15</sub>-bacillomycin D, produced by *Bacillus velezensis* NST6 [J]. *Journal of applied microbiology*, 2021, 131(1): 93 – 104.
- [16] JI G H, WEI L F, HE Y Q, et al. Biological control of rice bacterial blight by *Lysobacter antibioticus* strain 13-



- 1 [J]. *Biological Control*, 2008, 45(3): 288 – 296.
- [17] XIE S, ZANG H, WU H, et al. Antibacterial effects of volatiles produced by *Bacillus* strain D13 against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(1): 49 – 58.
- [18] WU L, WU H, CHEN L, et al. Difficidin and bacilysin from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 have antibacterial activity against *Xanthomonas oryzae* rice pathogens [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 12975.
- [19] JIN P, WANG Y, TAN Z, et al. Antibacterial activity and rice-induced resistance, mediated by C<sub>15</sub>surfactin A, in controlling rice disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2020, 169: 104669.
- [20] DENG X, LI M, LIU L, et al. Functional analysis of *Bu-ccella* reveals transcriptional regulation of MarR [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2020, 144: 104201.
- [21] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 323.
- [22] ROBINSON M D, MCCARTHY D J, SMYTH G K. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data [J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(1): 139 – 140.
- [23] RUIZ-GARCÍA C, BÉJAR V, MARTÍNEZ-CHECA F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 191 – 195.
- [24] 孙冰冰, 李伟, 魏军, 等. 生防芽孢杆菌的研究进展 [J]. *天津农业科学*, 2015, 21(12): 102 – 107.
- [25] FAN S, TIAN F, LI J, et al. Identification of phenolic compounds that suppress the virulence of *Xanthomonas oryzae* on rice via the type III secretion system [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(4): 555 – 568.
- [26] LIANG X Y, YU X Y, DONG W X, et al. Two thiadiazole compounds promote rice defense against *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by suppressing the bacterium's production of extracellular polysaccharides [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(8): 882 – 892.
- [27] CHEN X, SUN C, LABORDA P, et al. Melatonin treatment inhibits the growth of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2280.
- [28] OHKI R, TATENO K, OKADA Y, et al. A bacitracin-resistant *Bacillus subtilis* gene encodes a homologue of the membrane-spanning subunit of the *Bacillus licheniformis* ABC transporter [J]. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(1): 51 – 59.
- [29] BOPARAI J K, SHARMA P K. Mini review on antimicrobial peptides, sources, mechanism and recent applications [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2020, 27(1): 4 – 16.
- [30] 万智敏, 向延根, 马小华, 等. *rpoB* 基因不同突变位点结核分枝杆菌利福平体外最小抑菌浓度的变化 [J]. *广西医学*, 2016, 38(6): 773 – 775.
- [31] 岳红妮, 吴宽, 吴云锋, 等. 泡桐丛枝植原体 Sec 分泌蛋白转运系统 3 个亚基基因的克隆及蛋白特性分析 [J]. *植物保护*, 2009, 35(2): 25 – 31.

## Transcriptome analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* under the treatment of *Bacillus velezensis* HN-2 secondary metabolites

GAO Xue, LAO Guangshu, TAN Zheng, FANG Yukai, LIU Wenbo, JIN Pengfei, MIAO Weiguo

(School of Plant Protection/ Ministry of Education Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** Bacterial blight of rice is a bacterial disease caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), and it occurs in a large area, causing serious damage, and is difficult to control. In our laboratory a *Bacillus velezensis* strain HN-2 with a strong biocontrol activity isolated from the paddy soil was found that its n-butanol extract has a strong inhibitory activity against *Xoo*. In order to study the inhibition mechanism of the n-butanol extract of the strain HN-2 on *Xoo*, *Xoo* was treated with the n-butanol extract of HN-2 and bacitracin, respectively and analyzed by using transcriptome sequencing (RNA-seq), and the transcriptome data was then analyzed by using GO database and KEGG database. Transcriptome data analysis results showed that a large number of differentially expressed genes (DEGs) in *Xoo* after treatment with the n-butanol extract of HN-2 and bacitracin. A total of 1 512 DEGs were obtained after treatment with the n-butanol extract of HN-2, 871 DEGs were up-regulated and 641 down-regulated. GO enrichment analysis found that after treatment with the n-butanol extract of HN-2, the DEGs in *Xoo* are mainly clustered in the cell process, metabolic process, macromolecular complex, catalytic activities, etc. KEGG cluster analysis found that after treatment with the n-butanol extract of HN-2 the ribosomal pathway in *Xoo* contained the largest number of DEGs while the other major metabolic pathways involved are starch and sucrose metabolism, benzoate degradation, glycerophospholipid metabolism, bacterial chemotaxis, etc. This suggests the n-butanol extract of HN-2 should have a main impact on the ribosomal pathway, and pathways of starch and sucrose metabolism and bacterial chemotaxis.

**Keywords:** *Bacillus velezensis*; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; inhibitory activity; differentially expressed gene

(责任编辑:叶 静)