

董文杰,郝芳敏,臧全宇,等.基于全基因组测序的多粘类芽孢杆菌 NBmelon-1 生防机制探究及验证[J].华中农业大学学报,2025,44(2):200-211.DOI:10.13300/j.cnki.hnlnxb.2025.02.020

基于全基因组测序的多粘类芽孢杆菌 NBmelon-1 生防机制探究及验证

董文杰^{1,2},郝芳敏¹,臧全宇¹,马二磊¹,丁伟红¹,王毓洪¹

1.宁波市农业科学研究院/宁波市特色园艺作物品质调控和抗性育种重点实验室,宁波 315040;

2.浙江万里学院,宁波 315199

摘要 为研究多粘类芽孢杆菌 NBmelon-1 的抑菌促生机制,采用三代 PacBio 测序技术进行全基因组测序,分析潜在的功能基因以及预测次级代谢产物合成基因簇等;检测抑菌促生相关基因的表达情况;利用粗提物拮抗试验明确抑菌物质的主要成分,并验证该菌促生潜力,进一步明确其生防机制。结果显示,多粘类芽孢杆菌 NBmelon-1 基因组大小为 5.7 Mb,GC 含量为 45.68%,含有 4 984 个编码基因;基因组中存在大量与诱导植物抗病性、水解酶和促进植物生长相关的基因,共预测到 5 个脂肽类次级代谢产物合成基因簇;采用酸沉淀法从 NB-melon-1 培养物中分离获得的粗提物对多种甜瓜病原真菌具有明显的抑菌活性,说明其中含有抑菌物质。促生潜力试验表明该菌株能够合成生长激素 IAA、具有产铁载体能力,并为植物提供氮元素。以上结果表明,菌株 NBmelon-1 是一株多功能生防菌,具有广阔的应用前景。

关键词 多粘类芽孢杆菌;全基因组;次级代谢产物;抑菌作用

中图分类号 Q933; S476 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)02-0200-12

甜瓜(*Cucumis melo* L.)是我国重要经济作物之一,具有多种营养成分和食用价值,广受消费者的喜爱^[1]。由于单一品种高密度重茬种植,导致连作障碍频发,土传病害加剧,其中甜瓜枯萎病是典型的土传真菌病害。目前对甜瓜枯萎病的防治主要以化学防治为主,但易产生耐药性和污染环境。生物防治作为绿色安全防治手段,是一种可持续且环境友好的替代方法^[2]。

类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)细菌作为土壤和植物微生态的优势种群,抗逆性强,具有良好的生防潜力和促生效果^[3]。多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)为类芽孢杆菌属的模式种,具有广谱抗性和促生效果,且为非致病性细菌,是一类重要的根际有益菌。该菌通过固氮、溶磷、产铁载体和分泌植物激素等方式促进植物生长。Abdallah 等^[4]研究发现 *P. polymyxa* Sx3 能通过固氮、溶磷并产生吲哚乙酸,促进水稻的生长。此外,该菌通过位点竞争、诱导植

物系统抗性和分泌拮抗物质等方式抑菌^[5]。Timmusk 等^[6]研究表明 *P. polymyxa* 可定殖于拟南芥的根部形成生物保护膜,抑制病原菌的入侵。Kim 等^[7]研究发现 *P. polymyxa* APEC136 能够促进苹果淀粉酶和蛋白酶产生,有效抑制苹果采后炭疽病和白腐病的发生。除此之外,多粘类芽孢杆菌可产生多肽类抗生素、抑菌蛋白和其他小分子抑菌物质,如核苷类物质、吡嗪类物质等^[8-10],其中多肽类抗生素是其发挥抑菌作用的主要物质。Kajimura 等^[11]研究发现 *P. polymyxa* KT-8 产生的多肽类物质杀镰孢菌素 A、B、C、D 具有明显的体外抑菌活性。

目前,针对多粘类芽孢杆菌的研究主要集中于其生物学特性,以及其生防机制的探讨^[12],然而,传统方法很难全面挖掘出该菌所含有的生防相关基因。全基因组测序技术作为研究物种信息的有力手段,极大地促进了细菌基因组的高效解析,能够揭示潜在的功能及其作用机制。陈俊毅等^[13]通过全基因

收稿日期:2024-11-12

基金项目:宁波市科技局重点研发计划暨“揭榜挂帅”项目(2023Z115);浙江省西甜瓜良种育繁推科技创新平台项目(ZJ2019-80);国家西甜瓜产业技术体系建设专项(CARS-25)

董文杰,E-mail:dongwenjie032020@163.com

通信作者:王毓洪,E-mail:yhwangsc@163.com

组测序技术获得 *P. polymyxa* SC2 中具有预测功能的分泌蛋白共 89 个。全基因组测序技术的发展有效地促进了多粘类芽孢杆菌的研究。笔者所在课题组前期从甜瓜根部筛选出 1 株高效生防菌 *P. polymyxa* NBmelon-1, 通过三代 (PacBio) 测序技术, 获得该菌株完整的基因组序列, 挖掘其促生和抑菌基因, 预测次级代谢产物合成基因簇; 通过酸沉淀法和硫酸铵沉淀法对抑菌物质进行粗提取, 初步明确抑菌物质成分; 同时对该菌株促生和产酶潜力进行测定, 以为后续深入挖掘其生防机制以及工业化开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株: *P. polymyxa* NBmelon-1 由浙江省宁波市农业科学研究院甜瓜课题组分离并保存^[14]。甜瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum*)、黑点根腐病菌 (*Monosporascus cannonballus*)、蔓枯病菌 (*Stagonosporopsis cucurbitacearum*)、根腐病菌 (*F. solani*) 由浙江省宁波市农业科学研究院蔬菜所保存。

供试培养基: NA 培养基、NB 培养基、PDA 培养基、阿须贝固氮培养基^[15]、有机磷培养基^[15]、PKO 无机磷培养基^[16]、CAS 检测培养基^[16]、蛋白胨水液体

培养基^[17]、钾细菌固体培养基^[16]、R₂A 培养基^[18]、纤维素刚果红培养基^[19]。

供试药剂: 盐酸、甲醇购自国药集团化学试剂有限公司。*L*-色氨酸、硫酸铵购自北京酷来博科技有限公司。Salkowski 比色液购自福州飞净生物科技有限公司。

1.2 全基因组测序

将 *P. polymyxa* NBmelon-1 接种于 NB 培养基, 28 °C、180 r/min 培养 24 h 后 8 000 r/min、离心 5 min 收集菌体, 送北京贝瑞和康生物技术有限公司进行测序。将编码基因序列与不同功能数据库进行注释, 包括基因本体论 (GO)、同源蛋白簇 (COG)、京都基因与基因组百科全书 (KEGG)、碳水化合物活性酶数据库 (CAZy)、病原菌毒力因子数据库 (VFDB)。利用 antiSMASH v7.0.0 对次级代谢产物合成基因簇进行预测。

1.3 PCR 扩增

根据已知多粘类芽孢杆菌基因组中脂肽化合物合成及促生相关的基因设计引物 (表 1), 以 *P. polymyxa* NBmelon-1 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。取 5 μL PCR 产物于 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳, 在凝胶成像系统上观察结果并拍照。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

目标 Target	引物 Primer	引物序列 ^[20] Sequence (5'→3')	片段大小/bp Size
Polymyxin B biosynthesis	PMXB-F	GGCGAATGAAGTCAAGGA	524
	PMXB-R	AACGAATTGCCACCCAAAC	
Polymyxin C biosynthesis	PMXC-F	TACACGGTCTTGTCATCATC	1 234
	PMXC-R	GCGTACAGTCCCTTCATCTTC	
Polymyxin D biosynthesis	PMXD-F	CTCGCAGGTTTACTTCGTTT	621
	PMXD-R	CCAATGCTGGGATTCTGTTAT	
Protease	CEL44C-F	TTTGGTTACCGCATGGGTG	2 600
	CEL44C-R	TTTCGGACGGAGAGGAGAGTGT	
Fusaricidins biosynthesis	FUSA-F	CAAGGATTGACCGTAGGTG	1 564
	FUSA-R	GTAGGGATTATGGCTGACCG	
Cellulose A	CEL5A-F	CTGCTAACCTGGTCAACG	1 076
	CEL5A-R	GCTCAAGGCATTAGTTCTC	
Cellulose B	CEL5B-F	CTTGCTGTTGGCATTGAGC	1 438
	CEL5B-R	CCTTGCGAATCCATCTTC	
β-Glucan	PJT-F	TACTAATTGCTCGTATATTACCA	750
	PJT-R	TTGCGAATGTGTTCTGGGAACC	
IAA biosynthesis	IAA-F	GGGAATTCTTACTCGTCCCCATCAGC	1 749
	IAA-R	CTCGGATCCCCATGAGTGCACAAATTCC	

1.4 抑菌物质粗提物制备及活性检测

1)酸沉淀法^[21]。取NBmelon-1无菌发酵液,用6 mol/L HCl调pH至2.0,4℃下静置12 h后,4℃、12 000 r/min离心10 min,将沉淀溶解于少量甲醇(滤膜灭菌)中,获得脂肽粗提物,0.22 μm微孔滤膜过滤后-20℃保存。

2)硫酸铵沉淀法^[22]。取NBmelon-1无菌发酵液,缓慢加入硫酸铵直至饱和,4℃下静置12 h,4℃、12 000 r/min离心10 min,用原无菌发酵液1/10体积的0.02 mol/L Tris-HCl(pH=6.8)溶解沉淀,获得蛋白粗提物,0.22 μm微孔滤膜过滤后-20℃保存。

3)抑菌试验。将甜瓜枯萎病菌、黑点根腐病菌、蔓枯病菌、根腐病菌的菌饼接种于PDA培养基平板中央,将3个牛津杯平均放置于平板上,注入200 μL粗提液。以无菌水、甲醇为对照,每个处理3次重复。28℃下培养3~5 d,测定抑菌圈直径。

1.5 促进植物生长活性及产纤维素酶能力测定

1)溶磷能力。取5 μL纯化后的*P. polymyxa* NBmelon-1菌株悬液,分别接种至有机磷和无机磷培养基,于30℃下倒置培养3~5 d,若形成透明圈,则表明其具备溶磷能力。测量透明圈直径和菌落直径,计算二者比值。

2)解钾能力。取5 μL纯化菌株悬液接种于钾细菌固体培养基,于28℃倒置培养3 d,若观察产生透明圈,则表明其具备解钾能力。测量透明圈直径和菌落直径并计算比值。

3)铁载体生产能力。取5 μL纯化菌株悬液接种于CAS检测培养基,于30℃倒置培养5~7 d。若菌落周围产生橙黄色晕圈,则表明该菌具备产铁载体能力。测量橙色铁载体晕圈直径和菌落直径,计算二者比值。

4)固氮能力。取5 μL纯化菌株悬液接种于阿须贝固氮培养基,于30℃倒置培养3 d。若能正常生长,则表明其具备固氮能力。

5)产NH₃能力。将纯化的菌株悬液接种于含有5 mL蛋白胨水液体培养基的试管中,于36℃下培养24 h。加入Kovacs试剂后,若上层呈现红色,则为阳性反应,表明其具备产NH₃能力。

6)分泌吲哚乙酸(IAA)能力。将纯化后菌株接种于100 mL的R₂A(含色氨酸)的培养基中,于28℃、180 r/min培养24 h。取菌悬液50 μL滴置白色陶瓷板上,同时加入50 μL比色液。以比色液中加入50 μL 50 mg/L的IAA和无菌水作为对照组。在

室温下避光放置30 min后,观察颜色变化。颜色变粉红者为阳性,表示能够分泌IAA。

7)产纤维素酶的能力。将5 μL纯化菌株悬液接种于纤维素刚果红培养基上,于30℃倒置培养5~7 d。若形成透明圈,则表明其具备产纤维素酶的能力。测量透明圈直径和菌落直径,计算两者比值。

2 结果与分析

2.1 菌株NBmelon-1的基因组特征

P. polymyxa NBmelon-1基因组大小为5 765 142 bp, GC含量为45.68%,共4 984个蛋白编码基因,编码基因长度占基因组总长度的85.63%(图1);该基因组中含有106个tRNA、6个sRNA、14个5S rRNA、13个16S rRNA、14个23S rRNA、3个CRISPR-Cas;同时预测到233个重复序列(表2)。

1)COG功能注释。*P. polymyxa* NBmelon-1基因组中共含有4 071个编码蛋白基因,注释到4类COG功能,共划分21个亚类,占所有编码蛋白基因的81.68%(图2),集中在主要功能预测(general function prediction only, 14.32%)、碳水化合物转运及代谢(carbohydrate transport and metabolism, 11.83%)、转录(transcription, 11.49%)、氨基酸的转运与代谢(amino acid transport and metabolism, 9.58%)和无机离子转运与代谢(inorganic ion transport and metabolism, 6.60%);还存在大量未知功能的基因322个,占编码蛋白基因6.46%。

2)GO注释。*P. polymyxa* NBmelon-1基因组中共有3 483个编码蛋白基因注释到GO功能,占总编码基因的68.88%(图3)。与分子功能(molecular function)相关的基因数为2 734个,主要参与ATP结合、DNA结合、金属离子结合等。参与生物过程(biological process)的基因数为2 543个,其中参与转录调控(regulation of transcription, 1.80%)的基因数最多。细胞成分(cellular component)相关的基因数为1 638个,该本体下参与膜组分的基因数是所有GO功能注释中数目最多的。此外,含有与诱导抗性相关的基因,如超氧化物歧化酶活性和过氧化物酶活性等;含有与病原体细胞壁水解的相关基因,如纤维素酶活性和葡聚糖酶活性等;还含有植物促生相关基因,如生长素合成等。以上结果表明,该菌具有抑菌、诱导植物抗性和促生的潜能。

3)KEGG注释。*P. polymyxa* NBmelon-1基因组中共有2 545个编码蛋白基因注释到KEGG途径

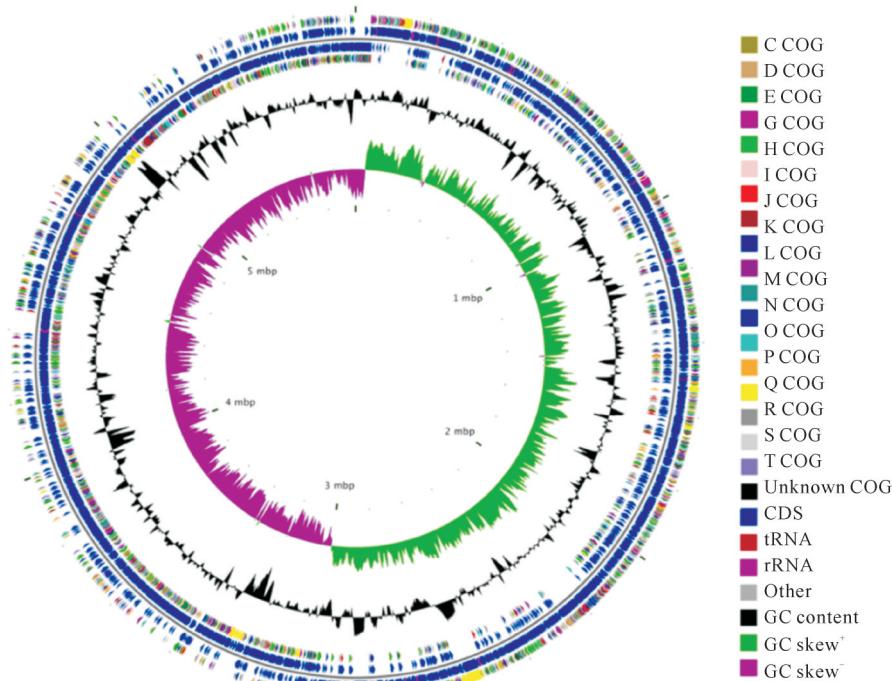
图1 *P. polymyxa* NBmelon-1的基因组图Fig. 1 Genome map of *P. polymyxa* NBmelon-1

表2 菌株NBmelon-1基因组的基本特征

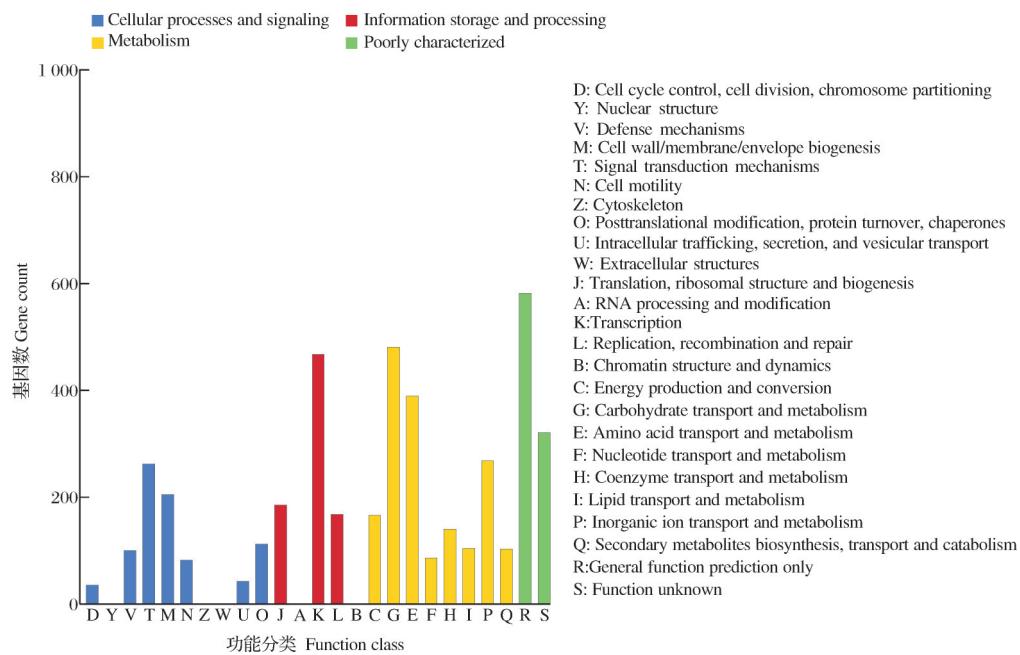
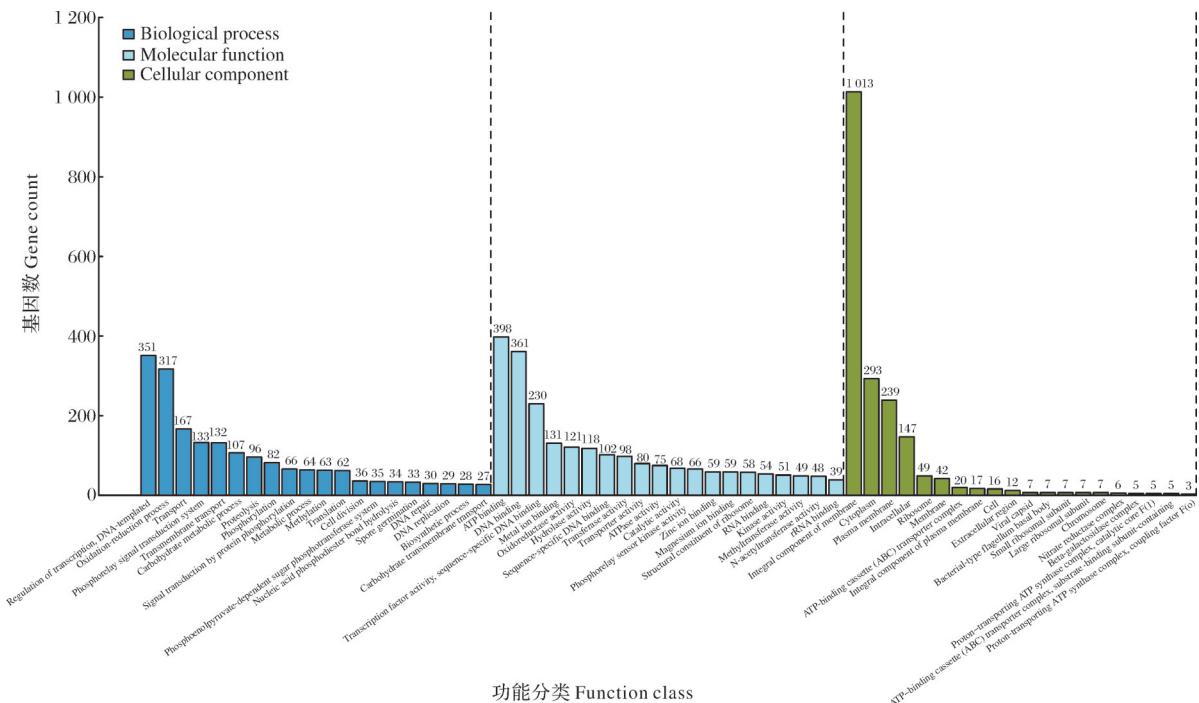
Table 2 Basic properties of the genome of
P. polymyxa NBmelon-1

类型 Feature	数量 Number
Genome size	5 765 142 bp
GC content	45.68%
Protein-coding genes	4 984
tRNA	106
sRNA	6
5S rRNA	14
16S rRNA	13
23S rRNA	14
CRISPR	3
Number of repeat sequences	233

的6大类中,参与27条代谢通路,占总编码基因的51.06%(图4)。其中与代谢相关的基因数最多,主要富集在碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism)和氨基酸代谢(amino acid metabolism)等12条代谢途径中。KEGG富集分析表明,该菌株存在能够合成万古霉素(vancomycin)、链霉素(streptomycin)等抗生素生物合成有关的代谢通路,能代谢抗坏血酸、果糖、甘露糖、淀粉、蔗糖和脂肪酸等,说明 *P. polymyxa* NBmelon-1 在抑菌和促生方面存在一定潜力。

4) 碳水化合物活性酶。*P. polymyxa* NBmelon-1基因组中共有450个编码蛋白基因归属于6类碳水化合物活性酶(CAZymes)(图5),其中,189个基因编码糖苷水解酶(glycoside hydrolases, GHs)、109个基因编码糖苷转移酶(glycosyltransferases, GTs)、70个基因编码碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)、39个基因编码辅助氧化还原酶(auxiliary activities, AAs)、30个基因编码碳水化合物结合组件(carbohydrate-binding modules, CBMs)和13个基因编码多糖裂解酶(polysaccharide lyases, PLs),其中, GH43、GH5、GH30等与纤维素和半纤维素降解有关^[23]; GH13与淀粉的水解有关^[24]; CE1、CE3和CE7与木聚糖降解有关^[25]; CE4、GH18与肽聚糖的降解有关^[25]; CBM50通常结合GHs降解几丁质或肽聚糖^[26],表明 *P. polymyxa* NBmelon-1 可能具备降解纤维素、淀粉、几丁质和肽聚糖等物质的潜能。

5) 毒力因子。*P. polymyxa* NBmelon-1基因组中共有232个毒力因子(virulent factor, VF)被注释,其中与免疫调节(immune modulation)相关基因最多,为80个,其次是营养/代谢(nutritional/metabolic factor)和生物膜(biofilm),分别为31和23个(表3)。菌株NBmelon-1中可能具有生防作用的毒力因子主要与黏附(*pilR*)、分泌系统(*essC*)和外毒素(*hlyB*、*cylR2*)有关,说明 *P. polymyxa* NBmelon-1 可能释放

图2 *P. polymyxa* NBmelon-1基因组COG注释Fig. 2 COG annotated map of the genome of *P. polymyxa* NBmelon-1图3 *P. polymyxa* NBmelon-1基因组GO注释Fig. 3 GO annotation of the genome of *P. polymyxa* NBmelon-1

毒力因子抑制病原菌侵染植株。

2.2 次级代谢产物合成基因簇

通过antiSMASH预测菌株NBmelon-1含有5个次级代谢产物合成基因簇,且该菌编码的5个次级代谢产物均由NRPS途径合成(图6)。Cluster 2和Cluster 5分别是具有抑菌活性的脂肽类化合物(tridecapin M)和多粘菌素(polymyxin)的合成基因簇,

与已知菌株来源的相对应的基因簇相似度均达100%。而Cluster 1和Cluster 4与具有抑菌活性的杀镰孢菌素B(fusaricidin B)和十三肽菌素(tridecapin)的生物合成基因簇有一定的相似性,相似度分别为37%和40%。Cluster 3与已知菌株

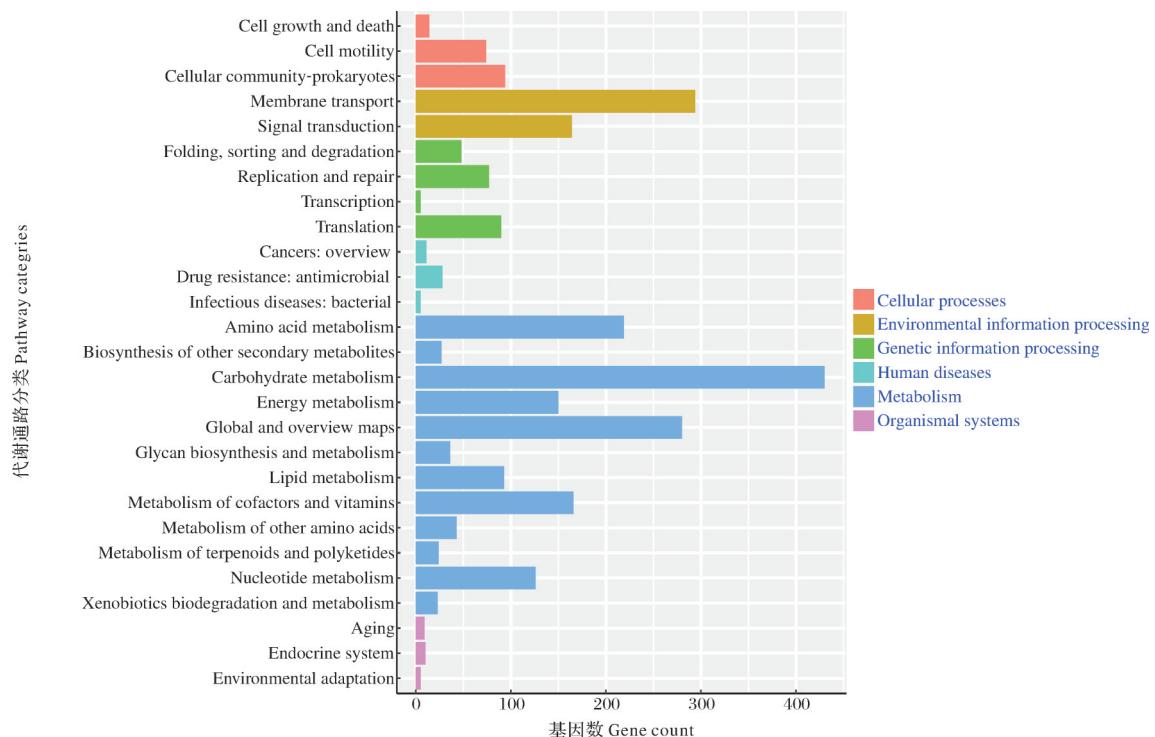


图4 P. polymyxa NBmelon-1基因组KEGG注释

Fig. 4 KEGG annotation of the genome of P. polymyxa NBmelon-1

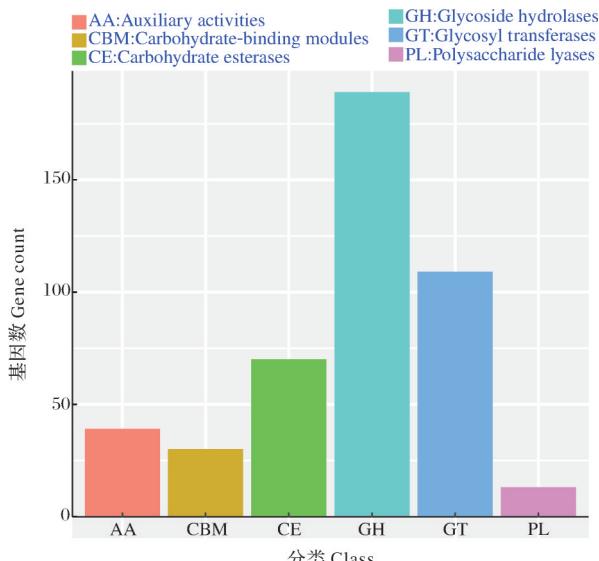


图5 P. polymyxa NBmelon-1基因组CAZymes

Fig. 5 CAZymes in the genome of P. polymyxa NBmelon-1

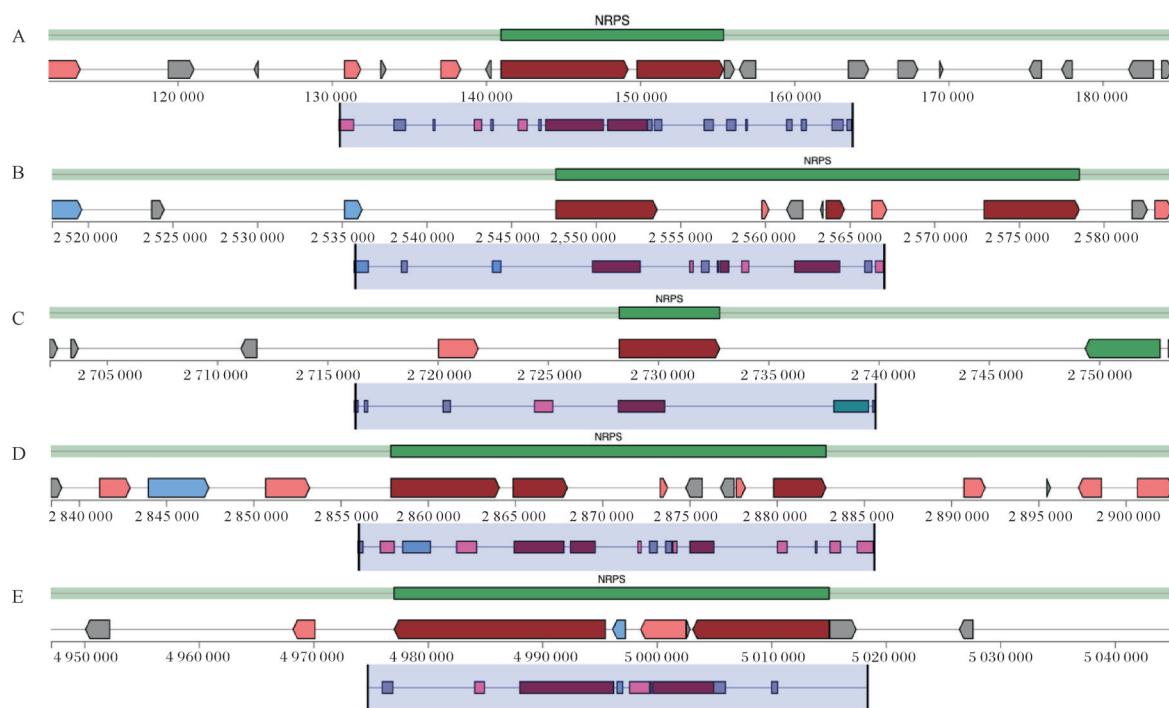
BGC0001728的Peanilipoheptin合成基因簇有一定相似度,但仅为11%(表4)。以上结果表明,该菌株能够产生具有抑菌活性的次级代谢产物,具有较大的生防潜力。

2.3 抑菌促生相关基因的PCR检测

根据多粘类芽孢杆菌的抑菌促生相关基因设计特异性引物进行扩增,发现P. polymyxa NBmelon-1

毒力因子分类 VF category	NB melon-1	
	基因数 Gene count	基因数 Gene count
免疫调节 Immune modulation	80	
营养/代谢 Nutritional/Metabolic factor	31	
生物膜 Biofilm	23	
运动性 Motility	19	
外毒素 Exotoxin	18	
信号调控 Regulation	18	
分泌系统 Effector delivery system	15	
抗逆性 Stress survival	10	
黏附性 Adherence	7	
胞外酶 Exoenzyme	4	
抗菌活性/竞争优势 Antimicrobial activity/Competitive advantage	3	
其他 Others	4	

能够扩增到合成Polymyxin的编码基因PMXB、PMXC、PMXD, Fusaricidins的编码基因FUSA, β -葡聚糖的编码基因PJT以及合成IAA的编码基因,且条带与预期大小相符(图7),表明P. polymyxa NB-melon-1具有合成Polymyxin和Fusaricidins这2类抑菌脂肽类物质的潜力,同时该菌株基因组中存在其他与防御机制相关基因和促生相关基因。



A-E: 分别为Cluster 1—5 Cluster 1 to 5 respectively.

图6 *P. polymyxa* NBmelon-1基因组中次级代谢产物基因簇Fig. 6 Gene cluster of secondary metabolites in the genome of *P. polymyxa* NBmelon-1表4 *P. polymyxa* NBmelon-1次级代谢产物合成基因簇Table 4 Synthesis of gene cluster by *P. polymyxa* NBmelon-1 secondary metabolites

基因簇ID Cluster ID	基因簇类型 Cluster type	大小/bp Size	次生代谢产物合成基因簇ID Secondary metabolite synthetic gene cluster ID	功能(同源性)/% Most similar known cluster (Similarity)
Cluster 1	NRPS	72 917	BGC0001152	杀镰孢菌素B Fusaricidin B (37%)
Cluster 2	NRPS	66 152	BGC0001843	十三肽菌素M Tridecaptein M (100%)
Cluster 3	NRPS	50 934	BGC0001728	脂肪类化合物 Peanilipoheptin (11%)
Cluster 4	NRPS	64 317	BGC0000449	十三肽菌素 Tridecaptein (40%)
Cluster 5	NRPS	98 006	BGC0000408	多粘菌素 Polymyxin (100%)

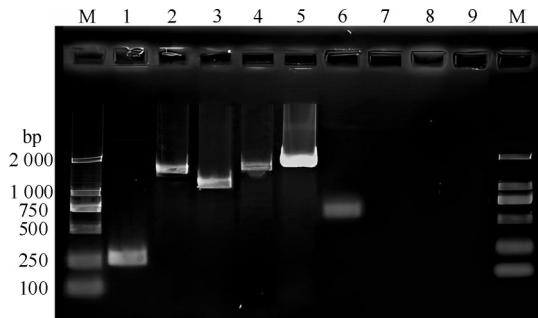
2.4 粗提物抑菌活性

通过酸沉淀法所得到的抑菌物质为脂肽类粗提物,硫酸铵饱和沉淀法获得的抑菌物质为蛋白类粗提物。通过抑菌试验可知,脂肽类粗提物能明显抑制病原真菌的生长,而蛋白类粗提物则无明显拮抗效果(图8、表5),表明 *P. polymyxa* NBmelon-1 脂肽类物质是发挥抑菌效果的主要物质。

2.5 促生特性及纤维素酶活性

对 *P. polymyxa* NBmelon-1 产 IAA、溶磷和解钾

等促生能力进行测定。结果显示,该菌株无法通过溶磷(图9B、9C)、解钾(图9D)和产NH₃(图9E)来促进植物生长,但在产IAA试验中呈阳性反应,在CAS培养基能够产生橙黄色晕圈,且可溶性指数达到1.75,同时在固氮培养基上能够正常生长,表明 *P. polymyxa* NBmelon-1 具有合成生长激素 IAA(图9A)、较强的产铁载体(图9G)及为植物提供氮元素(图9F)的能力。通过对其纤维素酶生成能力的测定,结果显示 *P. polymyxa* NBmelon-1 不具备产纤维素酶的能力。



M: DL2000 DNA Marker; 1~9: PMXB, PMXC, PMXD, FUSA, IAA, PJT, CEL44C, CEL5A, CEL5B扩增产物 Amplified products of PMXB, PMXC, PMXD, FUSA, IAA, PJT, CEL44C, CEL5A, CEL5B.

图7 *P. polymyxa* NBmelon-1抑菌促生相关基因分子验证结果

Fig. 7 Molecular verification results of genes related to inhibition and growth promotion of *P. polymyxa* NBmelon-1

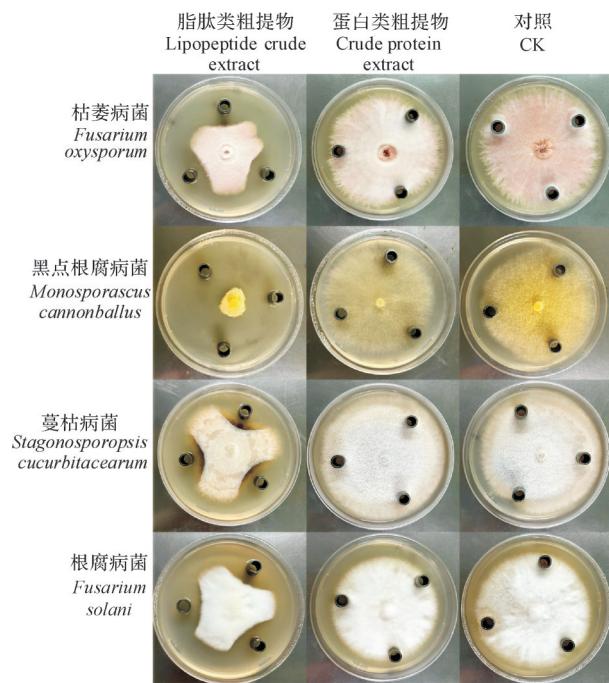


图8 *P. polymyxa* NBmelon-1抑菌物质拮抗试验

Fig. 8 Antagonism test of antimicrobial substances of *P. polymyxa* NBmelon-1

3 讨 论

土传病害是造成甜瓜产业发展缓慢的重要原因之一,通常施加化学农药防治,但随着对环保问题的重视,该方法受到了严格的限制,而生物防治因其绿色安全、无污染得到广泛关注。多粘类芽孢杆菌是一类重要的植物根际促生菌,同时具有生物防治的能力,可有效抑制镰刀菌等土传病原菌^[27]。笔者所在课题组前期从甜瓜根部分离得到1株*P. polymyxa*

表5 2种粗提物抑菌效果对比

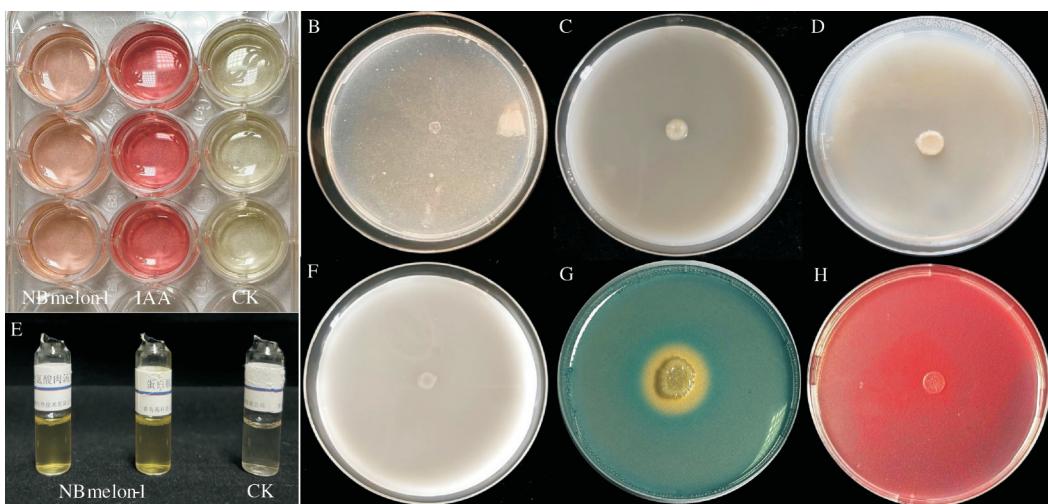
Table 5 Comparison of antibacterial effects between two crude extracts

病原菌 Pathogenic bacteria	脂肽类粗提物 Lipopeptide crude extract	蛋白类粗提物 Crude protein extract
<i>Fusarium oxysporum</i>	+	—
<i>Monosporascus cannonballus</i>	++	—
<i>Stagonosporopsis cucurbitacearum</i>	+	—
<i>Fusarium solani</i>	+	—

注 Note: ++: 抑菌圈直径>10 mm Inhibition zone diameter >10 mm; +: 抑菌圈直径 7~10 mm Inhibition zone diameter 7~10 mm; -: 不抑菌 No inhibition.

NBmelon-1,表现出广谱抑菌特性和促生能力。为深入该菌潜在的抑菌基因和分子机制,本研究采用全基因测序技术,获得NBmelon-1完整的基因组序列。结果表明该菌株基因组大小为5 765 142 bp,GC含量为45.68%,共4 984个编码基因。GO注释表明菌株NBmelon-1基因组中存在与诱导抗性相关基因,如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(CAT)等,SOD和CAT可保护植物细胞免受破坏,诱导植物产生抗性^[28-29]。同时,发现该菌基因组中存在与病原体细胞壁水解的相关基因,如纤维素酶和葡聚糖酶等。KEGG功能注释显示,与碳水化合物代谢和氨基酸代谢相关的基因数目最为丰富,与COG注释结果吻合。同时注释到淀粉、果糖和蔗糖等多种代谢通路,说明NBmelon-1能够利用多种碳源生长发育,有助于在复杂的环境中竞争营养物质、成功定殖。此外,还注释到多个生物合成抗生素通路,这可能是NBmelon-1能够拮抗多种病原菌的潜在原因。

碳水化合物活性酶(CAZymes)是生防菌拮抗病原菌的一类重要分泌蛋白,可破坏病原菌的细胞壁结构,阻止其入侵。通过CAZy数据库注释,显示共450个CAZy家族编码基因在*P. polymyxa* NBmelon-1基因组中被预测得到,其中包括纤维素酶、肽聚糖酶、几丁质酶等与细胞壁裂解密切相关的基因。几丁质酶可有效水解几丁质,破坏病原真菌细胞壁结构的完整性,从而拮抗真菌生长^[30]。若纤维素酶、葡聚糖酶和肽聚糖酶等与几丁质酶产生协同效应,则抑菌效果将显著增强^[31]。但通过纤维素酶活性实验,表明该菌不具备产纤维素酶的能力。因此,推测菌株NBmelon-1可通过合成肽聚糖酶、几丁质酶等降解酶,破坏真菌细胞壁结构,抑制病原菌生长。此外,发现菌株NBmelon-1中含有232个毒力因子,其中可能具有生防作用的毒力因子主要与黏附(*pilR*)、分泌



A:产 IAA IAA production; B:溶有机磷 Dissolved organic phosphorus; C:溶无机磷 Dissolved inorganic phosphorus; D:解钾 Potassium; E:产 NH₃ NH₃ production; F:固氮 Nitrogen fixation; G:产铁载体 Iron carrier production; H:产纤维素酶 Cellulase production.

图9 *P. polymyxa* NBmelon-1促进植物生长及产纤维素酶能力测定

Fig. 9 Determination of the plant growth promotion and cellulase production ability of *P. polymyxa* NBmelon-1 系统(*essC*)和外毒素(*hlyB*、*cylR2*)有关^[32]。说明 NBmelon-1 可能通过黏附基因进行定殖,形成生物膜以抵御病原菌的入侵;通过分泌毒素干扰病原菌神经递质的传递,诱发病原菌细胞坏死。

多粘类芽孢杆菌展现出生防潜力的关键在于其能够产生抑菌次级代谢产物。*P. polymyxa* NB-melon-1 所编码的 5 个肽类次级代谢产物均通过非核糖途径(NRPS)合成,可在绿色防治、医药开发和农药生产等方面发挥重要作用。Polymyxin 是一类聚阳离子环肽类抗生素,包括 A、B、C、D 等成分,对细菌具有广谱抑制性,尤其对革兰氏阴性菌有强烈抑制作用^[33-34]。Fusaricidin 是一类环脂肽化合物,主要对革兰氏阳性细菌和多种病原真菌具有抑制活性^[35]。此类抗生素常用于植物病害的防治,尤其是对世界公认的病原菌镰刀菌,具有良好的防治效果^[36]。Peanilipoheptin 是一种未知的脂七肽类次级代谢产物^[37]。线性阳离子脂肽 Tridecaptin 通过抑制细胞壁肽聚糖合成,引起菌体崩解,从而对多种革兰氏阴性菌具有抑菌效果^[38]。为明确菌株 NBmelon-1 的抑菌物质,对其抑菌基因进行分子验证,并提取抑菌粗提物。结果表明,该菌含有生成 Polymyxin、Fusaricidin 的相关基因;通过粗提物活性实验,进一步明确了该菌抑菌物质为脂肽类物质,上述结果证实基因组测序结果的可靠性。

多粘类芽孢杆菌促进植物生长主要是通过固氮、溶磷、解钾和获取铁等方式,提高养分的吸收利用,以及通过分泌植物激素,促进植物生长发育。*P.*

polymyxa NBmelon-1 具有较强的产铁载体和为植物提供氮元素的能力。通过产 IAA 测定结果,可知该菌株能够分泌 IAA。IAA 是一种吲哚类具有生长素活性的广谱性植物生长调节剂,可通过促进细胞分裂、加速细胞伸长等方式,促进植物生长^[39]。说明该菌具有良好的促进植物生长的能力。

综上所述,*P. polymyxa* NBmelon-1 具有固氮、分泌铁载体和 IAA 等能力,可促进植物生长。全基因组测序结果表明,该菌基因组中含有多个次级代谢产物合成基因簇,以及存在超氧化物歧化酶、葡聚糖酶、肽聚糖酶等多种酶的编码基因。表明 NB-melon-1 能够分泌具有抑菌活性的次级代谢产物和降解酶,破坏病原菌细胞壁、诱导植物产生抗性等方式达到防治病害的效果,为其后续被开发为高效生物菌剂提供科学依据。未来应结合 HPLC-MS/MS 技术,进一步明确该菌的抑菌物质,深入分析该菌株的拮抗机制。

参考文献 References

- [1] 杨念,王蔚宇,曹春意,等.我国甜瓜产业发展现状及趋势分析[J].中国瓜菜,2019,32(8):50-54.YANG N,WANG W Y,CAO C Y,et al.Development status and trend analysis of melon industry in China [J].China cucurbits and vegetables,2019,32(8):50-54 (in Chinese).
- [2] 阮妙鸿,郑秀琴,甘林,等.不同鲜食玉米品种鞘腐病抗病性及生防菌剂防病效果研究[J].中国生物防治学报,2024,40(3):652-660.RUAN M H,ZHENG X Q,GAN L,et al.Resistance of different fresh maize varieties to sheath rot and control

- effects of biocontrol agents on disease [J]. Chinese journal of biological control, 2024, 40(3) : 652-660 (in Chinese with English abstract).
- [3] 王翠翠. 多粘类芽孢杆菌SC2的全基因组测序[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011. WANG C C. Whole genome sequencing of *Paenibacillus polymyxa* SC2 [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2011 (in Chinese with English abstract).
- [4] ABDALLAH Y, YANG M, ZHANG M, et al. Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by *Paenibacillus polymyxa* Sx3 [J]. Letters in applied microbiology, 2019, 68(5):423-429.
- [5] 胡琼,任国平.多粘类芽孢杆菌在植物生产中的应用及作用机制[J].北方园艺,2020(24):137-144.HU Q,REN G P.Application and mechanism of *Paenibacillus polymyxa* in plant production [J]. Northern horticulture, 2020 (24) : 137-144 (in Chinese with English abstract).
- [6] TIMMUSK S, GRANTCHAROVA N, GERHART H WAGNER E. *Paenibacillus polymyxa* invades plant roots and forms biofilms [J]. Applied and environmental microbiology, 2005, 71(11):7292-7300.
- [7] KIM Y S, BALARAJU K, JEON Y. Effects of rhizobacteria *Paenibacillus polymyxa* APEC136 and *Bacillus subtilis* APEC170 on biocontrol of postharvest pathogens of apple fruits [J]. Journal of Zhejiang University. science. B, 2016, 17 (12):931-940.
- [8] BENEDICT R G, LANGLYKKE A F. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa* [J]. Journal of bacteriology, 1947, 54(1) : 24-25.
- [9] ELVERDAM I, LARSEN P, LUND E. Isolation and characterization of three new polymyxins in polymyxins B and E by high-performance liquid chromatography [J]. Journal of chromatography A, 1981, 218:653-661.
- [10] KAVITHA S, SENTHILKUMAR S, GNANAMANICKAM S, et al. Isolation and partial characterization of antifungal protein from *Bacillus polymyxa* strain VLB16 [J]. Process biochemistry, 2005, 40(10):3236-3243.
- [11] KAJIMURA Y, KANEDA M. Fusaricidin A, a new depsipeptide antibiotic produced by *Bacillus polymyxa* KT-8. Taxonomy, fermentation, isolation, structure elucidation and biological activity [J]. The journal of antibiotics, 1996, 49(2):129-135.
- [12] 聂俊辉,王平,张立新,等.多粘类芽孢杆菌LY1的全基因组测序及分析[J].湖南农业科学,2022(5) : 1-6. NIE J H, WANG P, ZHANG L X, et al. Whole-genome sequencing and analysis on *Paenibacillus polymyxa* LY1 [J]. Human agricultural sciences, 2022(5):1-6 (in Chinese with English abstract).
- [13] 陈俊毅,温华强,梁均卿,等.全基因组预测多粘类芽孢杆菌SC2的分泌蛋白[J].基因组学与应用生物学,2019,38(12): 5436-5443. CHEN J Y, WEN H Q, LIANG J T, et al. Genome-wide prediction of secreted proteins from *Paenibacillus polymyxa* SC2 [J]. Genomics and applied biology, 2019, 38 (12):5436-5443 (in Chinese with English abstract).
- [14] 郝芳敏,臧全宇,马二磊,等.甜瓜多种真菌病害拮抗细菌NBmelon-1的鉴定及其促生和生防效果[J].中国瓜菜, 2021, 34(7) : 14-19. HAO F M, ZANG Q Y, MA E L, et al. Identification, biocontrol and growth promoting effects of antagonistic bacteria NBmelon-1 of various fungal diseases in melon [J]. China cucurbits and vegetables, 2021, 34(7) : 14-19 (in Chinese with English abstract).
- [15] 高佩,马亚琼,何永超,等.中国沙棘根际固氮菌的分离、鉴定及促生能力比较[J].福建农林大学学报(自然科学版), 2024, 53(4):522-531. GAO P, MA Y Q, HE Y C, et al. Isolation, identification and growth-promoting ability of *Azotobacter* in rhizosphere of *Hippophae rhamnoides* subsp. *sinensis* Rousi [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (natural science edition), 2024, 53(4):522-531 (in Chinese with English abstract).
- [16] 唐嘉城.百香果内生菌多样性及其对水稻促生作用的研究[D].广州:华南农业大学,2021.TANG J C. Diversity of endophytes in passion fruit and its effect on rice growth [D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [17] KAPADIA C, PATEL N, RANA A, et al. Evaluation of plant growth-promoting and salinity ameliorating potential of halophilic bacteria isolated from saline soil [J/OL]. Frontiers in plant science, 2022, 13:946217[2024-11-12].<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.946217>.
- [18] 刘克寒,杨升辉,黄巧云,等.黑龙江大豆根瘤菌及根际促生菌株的筛选及应用[J].生物技术通报,2025, 41(1) : 252-262. LIU K H, YANG S H, HUANG Q Y, et al. Isolation and application of soybean rhizobia and symbiosis-promoting rhizobacteria from Heilongjiang Province [J]. Biotechnology bulletin, 2025, 41(1) : 252-262 (in Chinese with English abstract).
- [19] 吴际,朱晓峰,王媛媛,等.生防细菌Sneb2010的鉴定及其对甜瓜枯萎病的防治效果研究[J].中国生物防治学报, 2024, 40 (6) : 1331-1346. WU J, ZHU X F, WANG Y Y, et al. Identification of bacteria strain sneb2010 and its control effect on melon *Fusarium* wilt [J]. Chinese journal of biological control, 2024, 40(6) : 1331-1346 (in Chinese with English abstract).
- [20] 马夙静.多粘类芽孢杆菌ZYPP18的分离鉴定与促生防病效果测定[D].泰安:山东农业大学,2018. MA S J. Isolation and identification of *Paecilomyces polymyxa* ZYPP18 and determination of growth-promoting and disease-preventing effects [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese with English abstract).
- [21] 娄向弟,周强,贺江,等.贝莱斯芽孢杆菌PJP10的抑菌物质稳定性及活性代谢产物挖掘[J].微生物学通报,2024, 51 (3):935-949. LOU X D, ZHOU Q, HE J, et al. Stability evaluation and genome mining of antimicrobial metabolites of *Bacillus velezensis* PJP10 [J]. Microbiology China, 2024, 51 (3) :

- 935-949 (in Chinese with English abstract).
- [22] 邓阳.*Paenibacillus polymyxa* JSa-9 抗菌物质的结构鉴定及小麦生防应用研究[D].南京:南京农业大学,2012.DENG Y. Structural identification of antibacterial substances from *Paenibacillus polymyxa* JSa-9 and its application in wheat biocontrol [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [23] 曹秀兰,叶雨婷,马天浩,等.生防菌株贝莱斯芽孢杆菌 HNU24 全基因组测序及分析[J].热带作物学报,2023,44(5):905-913.CAO X L, YE Y T, MA T H, et al. Analysis of the whole genome sequence of biocontrol strain *Bacillus velezensis* HNU24 [J]. Chinese journal of tropical crops, 2023, 44(5):905-913 (in Chinese with English abstract).
- [24] 张德锋,高艳侠,可小丽,等.贝莱斯芽孢杆菌 LF01 基因组序列分析及其代谢产物的生防作用[J].水产学报,2022,46(2):196-206.ZHANG D F, GAO Y X, KE X L, et al. Genomic analysis of *Bacillus velezensis* LF01 strain and the biocontrol effect of its secondary metabolites [J]. Journal of fisheries of China, 2022, 46 (2) : 196-206 (in Chinese with English abstract).
- [25] 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).
- [26] 罗梅,陈欣瑜,董章勇.全基因组预测哈茨木霉的效应子[J].西南农业学报,2020,33(9):1964-1968.LUO M, CHEN X Y, DONG Z Y. Prediction of candidate effectors from genome of *Trichoderma harzianum* [J]. Southwest China journal of agricultural sciences, 2020, 33(9) : 1964-1968 (in Chinese with English abstract).
- [27] LING N, RAZA W, MA J H, et al. Identification and role of organic acids in watermelon root exudates for recruiting *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 in the rhizosphere [J]. European journal of soil biology, 2011, 47(6):374-379.
- [28] 鲁海菊,熊欣燕,冯渝,等.枇杷根系对木霉 P.9 菌株及枇杷腐病病菌的生理响应[J].中国南方果树,2022,51(5):67-70. LU H J, XIONG X Y, FENG Y, et al. Physiological response of loquat roots to *Trichoderma* P. 9 and pathogen of loquat root rot [J]. South China fruits, 2022, 51 (5) : 67-70 (in Chinese with English abstract).
- [29] 胡炎.东南景天对镉胁迫的响应和镉再转运的生理与分子机制[D].杭州:浙江大学,2019.HU Y. Response of *Sedum alfredii* to cadmium stress and physiological and molecular mechanism of cadmium re-transport [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019 (in Chinese with English abstract).
- [30] 黄佳敏.几丁质酶基因的克隆表达及其抗真菌应用研究[D].福州:福州大学,2021.HUANG J M. Cloning and expression of chitinase gene and its antifungal application [D]. Fuzhou: Fuzhou University, 2021 (in Chinese with English abstract).
- [31] 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).
- [32] 赵美茜.生防菌茂物朝井杆菌 CSR-2 抑菌作用研究及全基因组序列分析[D].长春:吉林大学,2022.ZHAO M X. Study on bacteriostasis of biocontrol bacterium CSR-2 and its whole genome sequence analysis [D]. Changchun: Jilin University, 2022 (in Chinese with English abstract).
- [33] AINSWORTH G C, BROWN A M, BROWNLEE G. Aerosporein, an antibiotic produced by *Bacillus aerosporus* greer [J]. Nature, 1947, 160:263.
- [34] 刘晶晶,庞叶洲,张敬泽.茄子黄萎病病原菌致病型分化及其生物防治[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2019,45(4):407-417.LIU J J, PANG Y Z, ZHANG J Z. Pathogenic differentiation and biological control of *Verticillium* wilt of eggplant [J]. Journal of Zhejiang University (agriculture and life sciences), 2019, 45(4):407-417 (in Chinese with English abstract).
- [35] RYU J, KIM J M, LEE C W, et al. Structural analysis and enhanced production of fusaricidin from *Paenibacillus kribbensis* CU01 isolated from yellow loess [J]. Journal of basic microbiology, 2017, 57(6):525-535.
- [36] 于晓溪,吴慧玲,刘铭,等.具有杀镰孢菌素合成功能基因菌株的筛选与鉴定[J].生物技术通报,2012,28(10):217-222. YU X X, WU H L, LIU M, et al. Screening and identification of the strain with fusaricidin biosynthesis related gene [J]. Biotechnology bulletin, 2012, 28 (10) : 217-222 (in Chinese with English abstract).
- [37] VATER J, HERFORT S, DOELLINGER J, et al. Genome mining of the lipopeptide biosynthesis of *Paenibacillus polymyxa* E681 in combination with mass spectrometry: discovery of the lipoheptapeptide paenilipopeptin [J]. Chembiochem, 2018, 19(7):744-753.
- [38] SHOJI J, HINO O H, SAKAZAKI R, et al. Isolation of tridecaptins A, B and C (studies on antibiotics from the genus *Bacillus*. XXIII) [J]. The journal of antibiotics, 1978, 31 (7) : 646-651.
- [39] WAGI S, AHMED A. *Bacillus* spp.: potent microfactories of bacterial IAA [J/OL]. PeerJ, 2019, 7: e7258 [2024-11-12]. <https://doi.org/10.7717/peerj.7258>.

Exploration and verification of biocontrol mechanisms of *Paenibacillus polymyxa* NBmelon-1 based on whole genome sequencing and analysis

DONG Wenjie^{1,2}, HAO Fangmin¹, ZANG Quanyu¹, MA Erlei¹, DING Weihong¹, WANG Yuhong¹

1.Ningbo Academy of Agricultural Sciences/Ningbo Key Laboratory for Quality Control and Resistance Breeding of Characteristic Horticultural Crops, Ningbo 315040, China;

2.Zhejiang Wanli University, Ningbo 315199, China

Abstract *Paenibacillus polymyxa* NBmelon-1 is an efficient biocontrol bacterium isolated from the roots of sweet melons. The third-generation of PacBio sequencing technique was used to sequence the whole genome of strain NBmelon-1 to study the biocontrol mechanisms of *P. polymyxa* NBmelon-1. The potential functional genes were analyzed and clusters of genes involved in the synthesis of secondary metabolites were predicted. The expression of genes related with antibacterial effect and promoting the growth of plants was detected. The antagonism test of crude extracts was used to identify the main components of antibacterial substances and validate the potential of the bacteria to promote the growth of plants, further clarifying its biocontrol mechanism. The results showed that the genome of *P. polymyxa* NBmelon-1 was 5.7 Mb, with a GC content of 45.68% and 4 984 coding genes. There were a large number of genes involved in inducing plant disease resistance, hydrolytic enzymes, and promoting plant the growth of plants in the genome. A total of five clusters of genes involved in the synthesis of secondary metabolites of lipopeptides were predicted. The crude extracts isolated from NBmelon-1 culture with acid precipitation method had significant antibacterial activity against a variety of pathogenic fungi from melon, indicating the presence of antibacterial substances. The results of growth potential test showed that the strain was capable of synthesizing growth hormone IAA, producing iron carriers, and providing nitrogen elements for plants. It is indicated that *P. polymyxa* NBmelon-1 is a multifunctional biocontrol bacterium with broad prospects for development and application in agricultural production.

Keywords *Paenibacillus polymyxa*; whole genome sequencing; secondary metabolites; antiblastic effect

(责任编辑:葛晓霞)