

# 生防细菌产生的拮抗物质及其在生物防治中的作用\*

王光华<sup>1\*\*</sup> Jos M. Raaijmakers<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150040; <sup>2</sup>荷兰 Wageningen 大学植物科学系, Binnenhaven 8025)

**【摘要】** 利用生防细菌防治植物病害是生物防治的一个主要内容. 生防细菌防治植物病害发生发展的一个重要机制是产生拮抗物质. 生防细菌的拮抗物质种类多, 作用范围广. 同一种拮抗物质可以由多种细菌菌株产生, 而同一细菌也可以产生多种不同结构的拮抗物质. 运用现代分子生物学技术和先进的分析测试手段可以加快对产生拮抗物质生防细菌的研究, 了解生防细菌在寄主植物根围和叶围的定植效果, 明确拮抗物质在生物防治中的作用. 拮抗物质的产生除与细菌基因型有关外, 一些外在的生物和非生物因素如病原菌存在与否、温度、pH 和 C、N 营养等也影响拮抗物质产生. 文中论述了生防细菌应用中存在的问题, 指出混合菌剂的研制对防止病原菌抗性产生具有重要作用, 应是今后生防菌剂研制中的重点.

**关键词** 细菌 拮抗物质 生物防治

**文章编号** 1001-9332(2004)06-1100-05 **中图分类号** S336 **文献标识码** A

**Antibiotics production by bacterial agents and its role in biological control.** WANG Guanghua<sup>1</sup>, Jos M. Raaijmakers<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Institute of Northeast Geography and Agricultural Ecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150040, China; <sup>2</sup>Laboratory of Phytopathology, Department of Plant Sciences, Wageningen University, Binnenhaven 8025, The Netherlands). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2004, 15(6): 1100~1104.

Using bacteria to control plant diseases is one of the main strategies in plant protection, and its mechanism is commonly thought to be the production of antibiotics by bacteria. The produced antibiotics not only have structural diversity, but also have broad-spectrum activity against many pathogens. Experimental results showed that one kind of antibiotics could be produced by several bacterial strains, and one bacterial strain could also produced more than one kind of antibiotics. Recent development in molecular and bio-analytical techniques greatly promoted the research of bacterial bio-control, and the colonization survey of introducing bacterial strain to the rhizosphere and spermosphere of host plants. Besides bacterial genotypes, several biotic and abiotic factors including whether the pathogens existing or not, temperature, pH, carbon and nitrogen sources are also identified to affect the antibiotics production by bacteria. The authors illustrated some of the impeding problems in bacterial bio-control agents' application, and suggested that in the future research, more attention should be paid on developing mixed bio-control agent to avoid the anti-antibiotic activity of pathogens.

**Key words** Bacteria, Antibiotics, Biological control.

## 1 引言

人们在很早以前就开始利用各种有益的微生物资源处理植物的种子、块茎或根系等来达到促进植物生长, 保护植物免受病虫害危害的目的. 生物防治的研究是近年来随着化学农药的普及应用, 对环境安全和人类健康日益构成威胁从而得以重视. 在研究开发的各种生防菌中, 利用生防细菌来防治植物病害成为国内外在生物防治研究中的一个热点. 大量的研究表明, 生防细菌不仅在其生长发育过程中产生多种拮抗性或竞争性的代谢产物, 通过直接或间接作用, 达到阻碍或杀死病原菌的效果, 而且这些细菌大多是从植物的根围和叶围等处分离得到的, 对植物具有较好的亲合性, 接种后易于在植物上定植, 生防效果持久稳定.

## 2 生防细菌产生拮抗物质的种类多样性

许多研究表明, 生防细菌在离体条件下产生各种各样的次生代谢产物. 早期对 *Pseudomonas* spp. 研究证明, 该菌的某些菌株产生嗜铁素(siderophores). 它可以与环境中的铁离

子高度结合, 而使植物病原菌缺乏铁营养不能够生长繁殖<sup>[27]</sup>, 这是典型的营养竞争防治植物病害的例子. 随着研究的不断深入, 发现细菌在生长过程中还产生许多种具有拮抗活性的物质. 这些物质包括多种抗生素类、酶类和挥发性等成分, 在植物病害生物防治中起到关键性的作用<sup>[6, 46]</sup>.

生防细菌产生的拮抗物质多是一些低分子量的化学物质. 这些物质在很低浓度下就可阻碍病原微生物的生长发育<sup>[12]</sup>. 表 1 归纳了一些生防细菌产生的主要拮抗物质及其防治的主要病原菌. 由表 1 可以看出, 能够产生拮抗物质的细菌种类很多, 且产生的拮抗物质也是多种多样, 不仅同一种细菌可以产生多种拮抗物质, 而且一种拮抗物质也可以从多种细菌的代谢产物中检测到, 如 *Bacillus cereus* 菌株 UW85<sup>[19]</sup> 和 *Pseudomonas fluorescens* 菌株 CHA0 和 Pf-5<sup>[2, 25]</sup> 可以产生多种拮抗物质.

\* 中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-19-4-03)和哈尔滨市青年科学基金资助项目(2003AFQYJ002).

\*\* 通讯联系人.

2003-02-02 收稿, 2003-06-16 接受.

表 1 生防细菌菌株及其产生的主要拮抗物质

Table 1 Selected examples of antibiotics produced by bacterial biocontrol agents

拮抗物质 Antibiotic	细菌菌株 Species/strain	目标病原菌 * Target pathogen	寄主/地点 Host/Origin	文献 Reference
DAPG	<i>Pseudomonas</i> spp.			
	Q2-87	Ggt	小麦/美国 Wheat/USA	47
	CHAO	Ggt, Tb, Pu	烟草/瑞士 Tobacco/Switzerland	24
	F113	Pu	甜菜/爱尔兰 Sugar beet/Ireland	43
	PFM2	St	小麦/美国 Wheat/USA	28
	Pf-5	Pu, Rs	棉花/美国 Cotton/USA	21
	Q8r1-96	Ggt	小麦/美国 Wheat/USA	39
Phenazines	<i>Pseudomonas</i> spp.			
	2-79RN10	Ggt	小麦/美国 Wheat/USA	49
	30-84	Ggt	小麦/美国 Wheat/USA	36
	PGS12	Fo	玉米/比利时 Corn/Belgium	16
	In-b-109	Rs, Gg	水稻/菲律宾 Rice/Philippines	40
	PCL1391	Fo	番茄/西班牙 Tomato/Spain	8
Oomycin A	PNA1	Fo, Rs	鹰嘴豆/印度 Chickpea/India	1
	<i>P. fluorescens</i> Hv37a	Pu	大麦/美国 Barley/USA	18
Pyoluteorin	<i>P. fluorescens</i>			
	Pf-5	Pu, Rs	棉花/美国 Cotton/USA	21
Pyrrolnitrin	CHAO	Tb, Pu	烟草/瑞士 Tobacco/Switzerland	24
	<i>P. fluorescens</i> BL915	Rs	棉花/美国 Cotton/USA	29
	<i>B. cepacia</i> B37w	Fs	马铃薯 Potato	5
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	Bc, Rs	葡萄/乌兹别克斯坦 Grape/Uzbekistan	7
DDR	<i>Serratia</i> spp.	Vd, Rs, Ss	油菜 Oilseed rape	22
	<i>P. borealis</i> MA342	Pt, Tc	小麦/大麦 Wheat/Barley	20
Viscosinamide	<i>P. fluorescens</i> DR54	Rs, Pu	甜菜/丹麦 Sugar beet/Denmark	34
Butyrolactones	<i>P. aureofaciens</i> 63-28	Pu, Pc	小麦/加拿大 Wheat/Canada	14
N-BBS	<i>Pseudomonas</i> sp. AB2	Pu, Rs, Bc	土壤/韩国 Soil/Korea	26
AFA	<i>S. violaceusniger</i> YCED-9	Pu	莴苣 Lettuce	49
Pantocin A 和 B	<i>P. agglomerans</i> EH318	Eh	苹果/美国 Apple/USA	52
Xanthobaccins	<i>Stenotrophomonas</i> SB-K88	Pu	甜菜/日本 Sugar beet/Japan	33
AFC-BC11	<i>B. cepacia</i> BC11	Rs	土壤/棉花 Soil, Cotton	23
Kanosamine	<i>B. cereus</i> UW85	Pm	苜蓿 Alfalfa	32
Zwittermycin A	<i>B. cereus</i> UW85	Pm	苜蓿 Alfalfa	44
Peptide	<i>B. amyloliquefaciens</i> RC-2	Pu	黄瓜/日本 Cucumber/Japan	53

\* At: *Agrobacterium tumefaciens*; Ggt: *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*; Tb: *Thielaviopsis basicola*; Pu: *Pythium ultimum*; St: *Septoria tritici*; Rs: *Rhizoctonia solani*; Fo: *Fusarium oxysporum*; Gg: *G. graminis*; Ps: *Pythium splendens*; Fs: *Fusarium sambucinum*; Pt: *Pyrenophora teres*; Tc: *Tilletia caries*; Pc: *Phytophthora cryspyogea*; Bc: *Botrytis cinerea*; Eh: *Erwinia herbicola*; Pm: *Phytophthora medicaginis*; Vd: *Verticillium dahliae*; Ss: *Sclerotinia sclerotiorum*.

### 3 生防细菌产生拮抗物质的作用范围广谱性

许多生防细菌产生拮抗物质的作用范围是广谱性的。1960年, Nishida<sup>[35]</sup>发现, 由 *Pseudomonas* 和 *Burkholderia* 产生的 Pyrrolnitrin 对许多人类细菌性和真菌性疾病都具有一定的防治效果。进一步研究发现, Pyrrolnitrin 对多种植物真菌性病原菌如: *Rhizoctonia solani*、*Botrytis cinerea*、*Verticillium dahliae* 和 *Sclerotinia sclerotiorum* 及一些革兰氏阳性细菌, 特别是对 *Streptomyces* 具有很好的防治效果<sup>[29]</sup>。同样由多种 *Pseudomonas fluorescens* 菌株产生的拮抗物质 DAPG, 不仅可以防治多种植物真菌和细菌性病害, 还可以防治植物线虫病害。Cronin<sup>[9]</sup>用提纯的 DAPG 处理线虫提高了线虫 *Globodera rostochiensis* 胞囊的孵化率, 降低幼虫的活动。芽孢杆菌 (*Bacillus*) 是除 *Pseudomonas* 之外的另一类重要的生防细菌, 由 *Bacillus* spp. 产生的多肽类物质对多种植物真菌和细菌病害在活体和离体条件下都表现出很强的拮抗活性<sup>[53]</sup>。王光华等<sup>[48]</sup>对芽孢杆菌 BRF-1 菌株平板对峙培养实验结果证明, 该菌的代谢产物对多种植物病原真菌具有很强的拮抗活性; 而由 *Bacillus cereus* 和 *B. thuringiensis* 产生的拮抗物质 Zwittermycin A 对多种植物真菌性病害, 特别是由 *Phytophthora* 和 *Pythium* 引起的病害有很好的防治效

果<sup>[44]</sup>。值得注意的是, Zwittermycin A 与 Bt 毒素蛋白具有协同作用效果, 可以提高 Bt 毒素蛋白杀虫活性<sup>[4]</sup>。

生物表面活性剂 (biosurfactant) 是最近发现的一类具有生防作用的拮抗物质。荧光假单胞杆菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 的某些菌株产生的生物表面活性剂, 降低了病原菌孢子的表面张力, 在细胞膜内外膨压的作用下, 使孢子细胞破裂而死亡。Souza<sup>[45]</sup>对 *P. fluorescens* SS101 的研究表明, 将浓度为 25~50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  的提纯生物表面活性剂在离体条件下, 观察对腐霉菌游动孢子的作用。结果表明, 游动孢子在 30 sec 内活动受到明显抑制, 60 sec 后孢子细胞膜破例, 孢子消失。盆栽生物测试也证明, SS101 菌株对由 *Phytophthora* 和 *Pythium* 引起的花卉和蔬菜病害有很好的防治效果。

### 4 拮抗物质在生物防治中作用效果的验证

细菌产生的拮抗物质对植物病原菌的拮抗作用大多是基于在离体条件下与病原菌的对峙培养或抑制病原孢子萌发实验而获得的。而在原位条件下拮抗物质的作用效果可用以下实验得到间接的佐证: 1) 应用细菌的培养滤液或提纯的拮抗物质获得了与直接应用野生型菌株同样的防治效果, 如 B916 无细胞培养液对水稻纹枯病防效可达 58.1%, 而孢子发酵液为 77%<sup>[6]</sup>; 2) 应用紫外诱变等技术, 获得不产生拮抗

物质的突变体,应用该突变体处理植物降低生防细菌的防治效果;3)通过基因工程技术,调控拮抗物质生物合成途径,提高野生型菌株拮抗物质合成效率,从而提高了生防效果.如 Ligon<sup>[29]</sup>将多拷贝的调节基因 *gacA* 转入 *P. fluorescens* 菌株 BL915 中,提高了 Pyrrolnitrin 产率 2.5 倍,显著地提高了对 *Rhizoctonia solani* 的防治效果;4)将编码合成拮抗物质基因导入异源的、不产生拮抗物质的菌株中,然后对转座子的生防效果进行评价,如 Fenton<sup>[11]</sup>将 *P. fluorescens* 菌株中 DAPG 生物合成基因片段(大约 6 kb)转入非产菌株 M114 中,获得转座子的 DAPG 产量高于亲本,提高了对由 *Pythium ultimum* 引起的甜菜根腐病的防治效果.

随着研究手段的不断进步,对细菌产生拮抗物质种类和数量也可以在原位进行定性和定量研究.一种广泛采用的方法是应用诸如 *gus*、*gfp* 和 *lacZ* 等报告基因进行标记,利用报告基因进行标记虽然在微生物生态学研究中被广泛的应用,但该方法只能进行定性研究,不能进行定量分析,在实际应用中存在一定的局限性.另一种方法是采用薄层层析(TLC)和高效液相色谱(HPLC)对原位接种生防菌产生的拮抗物质进行定性和定量测试.特别是 HPLC 法,由于其精确性好、灵敏度高等优点,在生防菌产生拮抗物质的原位研究中被广泛应用.如 Raaijmakers<sup>[38]</sup>采用 HPLC 对生长在小麦全蚀病抑病土中的小麦根系上由 *Pseudomonas* spp. 产生的 DAPG 测定表明,小麦每克根鲜土中含有 20 ng 的 DAPG,进一步证明了 *Pseudomonas* spp. 产生的 DAPG 是防治小麦全蚀病发生的主要原因.

## 5 影响拮抗物质产生的因素

大量的室内实验结果表明,很多细菌产生拮抗物质,可以作为生防菌应用.但田间应用证明,多数菌株的效果很不稳定,导致菌株商品化率很低.生防菌剂的效果不稳定与很多因素有关,一方面从内因上分析与合成拮抗物质的基因表达调控产生变异有关.对 *Pseudomonas* 研究发现,拮抗物质的产生受一系列内在因子调控,这些因子包括 *GacA/GacS* 调节系统、依赖通过 N-酰基高丝氨酸内酯调节的细胞密度和  $\delta$  因子等<sup>[13,41]</sup>.另一方面,很多外在的因素也影响拮抗物质的产生. Bonsall<sup>[3]</sup>研究表明在离体条件下, *Pseudomonas* 菌株 Q<sub>2</sub>-87、Q<sub>2</sub>-87(pPHL5122)和 Q69c-80(pPHL5122)在 YM 琼脂培养基上产生 DAPG 的量要远高于在 YM 液体培养基,其中 Q<sub>2</sub>-87 在 YM 琼脂培养基上产生 DAPG 是 YM 液体培养基的 60 倍.3 种供试菌株在 27 °C 条件下产生的 DAPG 要高于在室温(22~24 °C)条件下的处理.

在自然条件下,定植于植物根面的 *Pseudomonas* spp. 产生 DAPG 的能力也与菌株特征、土壤物理化学性状及是否存在致病菌有关. Keel<sup>[24]</sup>从未感病土壤和感染小麦全蚀病致病菌(*G. graminis* var. *tritici*)的感病土中生长的小麦根土分别提取到 0.04  $\mu\text{gDAPG}\cdot\text{g}^{-1}$ 根土和 0.10  $\mu\text{gDAPG}\cdot\text{g}^{-1}$ 根土,表明在致病菌存在的条件下促进荧光假单胞杆菌合成更多的 DAPG.而 Maurhofer<sup>[30]</sup>用同样的方法从感染 *Pythium*

*ultimum* 和未感染的每克根土中只提取得到 0.25  $\mu\text{g}$  和 0.23  $\mu\text{g}$  的 DAPG.可见 *Pseudomonas* spp. 产生 DAPG 数量受不同致病菌诱导表现出较大的差异. Bonsall<sup>[3]</sup>用 Q<sub>2</sub>-87 和遗传改良后的高产菌株 Q<sub>2</sub>-87(pPHL5122)分别接种小麦,然后播种在 RSL 和 SSL 两种土壤上,结果表明,两种菌株在 RSL 土壤中产生的 DAPG 量高于在 SSL 土壤中的 2~5 倍,且不论在何种土壤上 Q<sub>2</sub>-87(pPHL5122)产生 DAPG 量都高于原菌株 Q<sub>2</sub>-87,表明在离体条件下合成 DAPG 能力强的菌株在自然条件下合成能力也强.

植物在生长过程中向外界释放或分泌很多有机物质提供给微生物生长.植物种类不同,在分泌有机物种类和数量上存在差异,导致细菌在利用这些营养产生拮抗物质上也存在较大的不同. Milner<sup>[32]</sup>发现,向 *Bacillus cereus* 培养介质中添加苜蓿幼苗分泌物,该菌产生 Kanosamine 的量提高了 3 倍. Duffy 和 Defago<sup>[10]</sup>对产生 DAPG 的 *P. fluorescens* 菌株 CHA0 和其它 41 株 *Pseudomonas* 菌株在利用碳源、无机磷源和矿质营养元素效率上的试验结果也表明,菌株之间在利用不同营养物质产生 DAPG 上存在较大的差异,供给葡萄糖提高了大多数菌株产生 DAPG 的能力, Zn 在提高菌株产生 DAPG 能力上存在菌株特异性,而供给 P 抑制了大多数菌株 DAPG 的产生.

环境因素不仅影响细菌拮抗物质的产生,而且也影响拮抗物质活性. Chin-A-Woeng<sup>[8]</sup>报道,在 pH5.7 离体条件下,拮抗物质 phenazine-1-carboxamide 的抗真菌活性是拮抗物质 phenazine-1-carboxylic acid(PCA)的 10 倍,表明在酸性条件下降低了 PCA 的抗菌活性.与 PCA 相反,拮抗物质 DAPG 的抗菌活性在酸性条件下明显地大于在中性和碱性环境,对 *Pythium* spp. 引起的病害防治效果也相对较高<sup>[45]</sup>.向土壤施用  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  比  $\text{NO}_3^--\text{N}$  更能提高荧光假单胞杆菌防治小麦全蚀病的效果<sup>[42]</sup>.

## 6 分子生物学技术在产生拮抗物质生防细菌研究中的应用

由表 1 可以看出,能够产生拮抗物质的细菌种类很多,在自然界中分布很广,但这些细菌主要生存在植物的根围或叶围上,从植物根围或叶围中分离获得的菌株接种植物后生防效果更好、更稳定,这就要求在植物病害生物防治研究中,首先要从植物的根围或叶围中分离,筛选具有生防潜力的菌株.过去对生防菌的筛选都是基于大量的室内工作,非常耗时耗力.随着现代分子生物学技术的进展,许多细菌合成拮抗物质的基因都已克隆测序,基于对不同拮抗物质产生基因的序列分析,可以用这些基因的某些片段为模板,设计特殊的引物和探针,直接对分离获得的菌株进行分子水平的检测,大大地提高了工作效率,减轻了劳动强度.

荧光假单胞杆菌可产生多种拮抗物质,包括 Pyoluteorin(Plt)、Pyrrolnitrin(Pm)、Phenazine-1-Carboxylic acid(PCA)和 2,4-Diacetylphloroglucinol(Phl 或 DAPG)等,在目前植物病害生物防治研究中占有重要的地位. Raaijmakers<sup>[37]</sup>和 Souza<sup>[45]</sup>等根据合成 Plt、Pm、PCA 和 Phl 的基因序列,设计了 4 对

表 2 用于 PCR 检测产生 4 种不同拮抗物质的引物特征

Table 2 Characteristics of the primer sets for identification 4 antibiotics by PCR analysis

引物 Primer	序列* Sequence	G + C (%)	T <sub>m</sub> (°C)	位置 Position	产物长度 Product length(bp)	拮抗物质 Antibiotics	参考文献 Reference
PRND1	GGGGCGCCGTGGTATGGA	76.2	82.4	5269	786	Prn	45
PRND2	YCCGCGCCTGYCTGGTCTG	66.6	74.2	6055			
PLTC1	AACAGATCGCCCCGGTACAGAACG	58.3	74.2	12282	438	Plt	45
PLTC2	AGGCCGGACACTCAAGAACTCG	58.3	73.8	12720			
Phl2a	GAGGACGTCGAAGACCACCA	60	73	1915	745	DAPG	37
Phl2b	ACCGCAGCATCGTGTATGAG	50	72	2660			
PHZ1	GGCGACATGGTCAACGG	64.7	52.4	3428	1408	PCA	45
PHZ2	CGGCTGGCGGCGTATTC	70.6	57.3	4836			

\* 序列顺序从 5' 到 3' Sequence from 5' to 3'.

引物对分离得到的细菌 DNA 进行 PCR 检测,取得了非常好的筛选结果(表 2). 同样对 *Bacillus* 研究中, Giacomodona<sup>[17]</sup>也设计了一对引物,采用 PCR 方法直接检测分离到大豆根圈产生多肽类(Peptide)拮抗物质的芽孢杆菌.

利用不同的引物对分离细菌的 DNA 进行 PCR 扩增,并结合 Southern 杂交技术可从植物根围和叶围区分产生不同拮抗物质细菌的分离比率,有助于直观地了解不同生防菌株在植物表面的定植生存情况. Raaijmakers<sup>[37]</sup>将 *Phl*<sup>+</sup> *Pseudomonas* spp. 和 *PCA*<sup>+</sup> *Pseudomonas* spp. 分别接种在小麦种子上,然后播种在 6 种不同土壤(4 种感病土, 2 种抑病土),连续种植 4 茬,调查这两种菌株在根际的定植效果,结果表明,在 2 种抑病土中 *Phl*<sup>+</sup> *Pseudomonas* spp. 的检出数在  $5.1 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^6$  CFU·g<sup>-1</sup> 根土,而在感病土中的 *Phl*<sup>+</sup> *Pseudomonas* spp. 没有被检出,或者其数量比抑病土中低 40 倍,而 *PCA*<sup>+</sup> *Pseudomonas* spp. 无论在抑病土或是感病土中基本上没有检测出来. 荧光假单胞杆菌在供试的 6 种土壤中分离总数变化不大,介于  $5.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$  CFU·g<sup>-1</sup> 根土之间,但在抑病土中 *Phl*<sup>+</sup> *Pseudomonas* spp. 占荧光假单胞杆菌的分离比率(Phl/Flu)在 3.0%~12% 之间,而感病土中的 Phl/Flu 小于 0.1%. 该试验结果进一步验证了产生 DAPG 的 *Phl*<sup>+</sup> *Pseudomonas* spp. 数量上升是导致小麦全蚀病抑病土产生的主要原因.

产生同一种拮抗物质的细菌菌株之间存在着表现型和基因型的多样性. Gardener<sup>[15]</sup>从美国和荷兰小麦根际土中分离出 138 株产生 DAPG 的 *Pseudomonas* spp., 对这些菌株采用 BOX-PCR、ERIC-PCR 和 ARDRA 分析证明, *Phl*<sup>+</sup> *Pseudomonas* 具有基因多态性. 采用 BOX-PCR 将所有菌株划分为 13 个型, ERIC-PCR 划分为 15 个型,而利用 ARDRA 将所有菌株划分为 3 个型,其中一种多态型包括了 87% 的供试菌株. 另外,供试菌株在表现型方面也存在差异,用 Biolog SF-N 平板测试菌株利用底物碳源表明,培养 3 d 有 7 种表现型出现,而培养 7 d 有 4 种表现型出现. Mavrod<sup>[31]</sup>对从 6 处美国土壤和 6 处世界其它地区土壤中获得 123 株 *Phl*<sup>+</sup> *Pseudomonas* spp. 基因型研究也表明,不论采用 RAPD 还是 PCR-RFLP 分析方法,上述菌株均表现出基因多态性. 生防菌基因型的差异与环境因素变化及土壤微生物演替有着密切的关系. 即使同一块土壤,由于前茬不同,也影响到后茬土壤中的生防菌的基因型,了解产生拮抗物质的生防菌基因多样性,对我们分离出具有特殊生态特点的生防菌株,提高菌株的生防效果具有重要的意义.

## 7 结 语

研究表明,生防细菌从实验室走向田间是一个复杂的过程. 首先是菌剂的研制. 阻碍许多生防菌田间应用的一个重要问题是菌剂的货架储藏期短,特别是由 *Pseudomonas* 制成的生防菌剂,这一问题表现的更为突出. 对于此类菌剂的研制,可以将它制成干粉剂型,以延长菌剂的储藏期,而由 *Bacillus* 制成的菌剂明显地优于 *Pseudomonas*, 因为它能够产生耐热抗逆的芽孢,便于菌剂的研制和剂型的加工,这也是市场上由 *Bacillus* 开发的菌剂较多的一个主要原因;其次是生防菌生态学的研究. 要运用分子生物学技术,了解生防菌株在植物根围或叶围的定植情况,运用先进的分析测试手段,检测生防细菌产生的拮抗物质防治病害发生发展的作用阈值,生防菌的应用效果才更具有说服力;第三,避免植物病原菌对生防细菌的拮抗物质产生抗性. 在自然界,病原菌的抗药性广泛存在,要避免病原菌抗性产生,最好采用混合菌株研制生防菌剂,如我国大面积推广应用的增产菌系列产品就是由多种芽孢杆菌组成的混合菌剂,在全国推广应用多年,累计应用面积超过  $16.675 \times 10^6$  hm<sup>2</sup>, 取得良好的抗菌防病效果<sup>[6]</sup>. 因此,今后在利用生防细菌防治植物病害的研究中应重视对混合菌剂的研制.

## 参考文献

- 1 Anjaiah V, Koedam N, Nowak-Thompson B, et al. 1998. Involvement of phenazines and anthranilate in the antagonism of *Pseudomonas aeruginosa* PNA1 and Tn5 derivatives toward *Fusarium* spp. and *Pythium* spp. *Mol Plant-Microbe Interact*, 11:847~854
- 2 Bender CL, Rangaswamy V, Loper JE. 1999. Polyketide production by plant-associated pseudomonads. *Annu Rev Phytopathol*, 37:175~196
- 3 Bonsall RF, Weller DM, Thomashow LS. 1997. Quantification of 2, 4-diacetylphloroglucinol produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. *in vitro* and in the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol*, 63:951~955
- 4 Broderick NA, Goodman RM, Raffa KF, et al. 2000. Synergy between zwittericin A and *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* against gypsy moth. *Environ Ent*, 29:101~107
- 5 Burkhead KD, Schisler DA, Slininger PJ. 1994. Pyrrolnitrin production by biological-control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes. *Appl Environ Microbiol*, 60:2031~2039
- 6 Chen Z-Y (陈中义), Zhang J (张 杰), Huang D-F (黄大防). 2003. Research progress on antimicrobial mechanism and genetic engineering of *Bacillus* for plant diseases biocontrol. *Acta Phytopathol Sin* (植物病理学报), 33(2):97~103(in Chinese)
- 7 Chernin I, Brandis A, Ismailov Z, et al. 1996. Pyrrolnitrin production by an *Enterobacter agglomerans* strains with broad spectrum activity towards fungal and bacterial phytopathogens. *Curr Micro-*

- biol, 33:208~2122
- 8 Chin-A-Woeng TFC, Bloemberg GV, Van der Bij AJ, et al. 1998. Biocontrol by phenazine-1-carboxamide producing *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 of tomato root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Mol Plant-Microbe Interact*, 10:79~86
  - 9 Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, et al. 1997. Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol pseudomonad strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Appl Environ Microbiol*, 63:1357~1361
  - 10 Duffy BK, Defago G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. *Appl Environ Microbiol*, 58:2429~2438
  - 11 Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, et al. 1992. Exploitation of genes involved in 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Appl Environ Microbiol*, 58:3873~3878
  - 12 Fravel DR. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant disease. *Annu Rev Phytopathol*, 26:75~91
  - 13 Gaffney TD, Lam ST, Ligon JM, et al. 1994. Global regulation of expression of antifungal factors by *Pseudomonas fluorescens* biological control strain. *Mol Plant-Microbe Interact*, 7:455~463
  - 14 Gamard P, Sauriol F, Benhamou N, et al. 1997. Novel butyrolactones with antifungal activity produced by *Pseudomonas aureofaciens* strain 63-28. *J Antibiot*, 50:742~749
  - 15 Gardener BBM, Schroeder KL, Kaloger, et al. 2002. Genotypic and phenotypic diversity of *phlD*-containing *Pseudomonas* strains isolated from the rhizosphere of wheat. *Appl Environ Microbiol*, 66:1939~1946
  - 16 Georgakopoulos D, Hendson M, Panopoulos NJ, et al. 1994. Cloning of a phenazine biosynthetic locus of *Pseudomonas aureofaciens* PGW12 and analysis of its expression *in vitro* with the ice nucleation reporter gene. *Appl Environ Microbiol*, 60:2931~2938
  - 17 Giacomodonato MN, Pettinari MJ, Souto G1, et al. 2001. A PCR-based method for the screening of bacterial strains with antifungal activity in suppressive soybean rhizosphere. *World J Micr Bioech*, 17:51~55
  - 18 Gutterson NI, Layton TJ, Ziegler JS, et al. 1986. Molecular cloning and genetic determinants for inhibition of fungal growth by a fluorescent pseudomonad. *J Bacteriol*, 165:696~703
  - 19 Handelsman J, Stabb EV. 1996. Biocontrol of soilborn plant pathogens. *Plant Cell*, 8:1855~1869
  - 20 Hokeberg M, Wright SAI, Svensson M, et al. 1988. Mutants of *Pseudomonas chlororaphis* defective in the production of an antifungal metabolite express reduced biocontrol activity. *Abstract Proceedings ICPP98*, Edinburgh, Scotland.
  - 21 Howell CR, Stipanovic RD. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*, 69:480~482
  - 22 Kalbe C, Marten P, Berg G. 1996. Strains of the genus *Serratia* as beneficial rhizobacteria of oilseed rape with antifungal properties. *Microbiol Res*, 151:433~439
  - 23 Kang YW, Carlson R, Tharp W, et al. 1998. Characterization of genes involved in biosynthesis of a novel antibiotic from *Burkholderia cepacia* BC11 and their role in biological control of *Rhizoctonia solani*. *Appl Environ Microbiol*, 64:3939~3947
  - 24 Keel C, Schneider U, Maurhofer M, et al. 1992. Suppression of root diseases of by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Mol Plant-Microbe Interact*, 5:4~13
  - 25 Keel C, Weller DM, Natsch A, et al. 1996. Conservation of the 2, 4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. *Appl Environ Microbiol*, 62:552~563
  - 26 Kim KK, Kang JG, Moon SS, et al. 2000. Isolation and identification of antifungal N-butylbenzylsulfonamide produced by *Pseudomonas* sp. AB2. *J Antibiotics*, 53:131~136
  - 27 Kloepper JW, Leong J, Teintze M, et al. 1980. *Pseudomonas siderophores*: A mechanism explaining disease suppressive soils. *Curr Microbiol*, 4:317~320
  - 28 Levy E, Gough FJ, Berlin KD, et al. 1992. Inhibition of *Septoria tritici* and other phytopathogenic fungi and bacteria by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotics. *Plant Pathol*, 41:335~341
  - 29 Ligon JM, Hill DS, Hammer PE, et al. 2000. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Manage Sci*, 56:688~695
  - 30 Maurhofer M, Keel C, Haas D, et al. 1995. Influence of plant species on disease suppression by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 with enhanced antibiotic production. *Plant Pathol*, 44:44~50
  - 31 Mavrodi OV, Gardener BBM, Mavrodi DV, et al. 2001. Genetic diversity of *phlD* from 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 91:35~43
  - 32 Milner JL, Silo-Suh L, Lee JC, et al. 1996. Production of Kanosamine by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol*, 62:3061~3065
  - 33 Nakayama T, Homma Y, Hashidoko Y, et al. 1999. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Appl Environ Microbiol*, 55:4334~4339
  - 34 Nielsen MN, Sorensen J, Fels J, et al. 1998. Secondary metabolite- and endochitinase dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl Environ Microbiol*, 64:3563~3569
  - 35 Nishida M, Matsubara T, Watanabe N. 1965. Pyrrolnitrin, a new antifungal antibiotic: Microbiological and toxicological observations. *J Antibiotics*, 18:211~219
  - 36 Pierson LS, Thomashow LS. 1992. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic locus from *Pseudomonas aureofaciens* 30-84. *Plant-Microbe Interact*, 5:330~339
  - 37 Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS. 1997. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments. *Appl Environ Microbiol*, 63:881~887
  - 38 Raaijmakers JM, Bonsall RF, Weller DM. 1999. Effect of population density of *Pseudomonas fluorescens* on production of 2, 4-diacetylphloroglucinol in the rhizosphere of wheat. *Phytopathology*, 89:470~475
  - 39 Raaijmakers JM, Weller DM. 2001. Exploiting genotypic diversity of 2, 4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas* spp. characterization of superior root-colonizing *P. fluorescens* strain Q8r1-96. *Appl Environ Microbiol*, 67:2545~2554
  - 40 Rosales AM, Thomashow LS, Cook RJ, et al. 1995. Isolation and identification of antifungal metabolites produced by rice-associated antagonistic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*, 85:1028~1032
  - 41 Sarniguet A, Kraus J, Henkels MD, et al. 1995. The sigma factor sigma(s) affects antibiotic production and biological control activity of *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:12255~12259
  - 42 Sarniguet A, Lucas P, Lucas M, et al. 1992. Relationship between take-all, soil conduciveness to the disease, populations of fluorescent pseudomonads and nitrogen fertilizer. *Plant Soil*, 145:17~27
  - 43 Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, et al. 1992. Isolation of 2, 4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Appl Environ Microbiol*, 58:353~358
  - 44 Silo-Suh LA, Lethbridge BJ, Raffel SI, et al. 1994. Biological activities of 2 fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl Environ Microbiol*, 60:2023~2030
  - 45 Souza JT. 2002. Distribution, diversity, and activity of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. PhD thesis. Wageningen University, The Netherlands.
  - 46 Trejo-Estrada SR, Paszcaynski A, Crawford DL. 1998. Antibiotics and enzymes produced by the biocontrol agent *Streptomyces violaceusniger* YCED-9. *J Indust Microb Biotech*, 21:81~90
  - 47 Vincent MN, Harrison LA, Brackin JM, et al. 1991. Genetic analysis of the antifungal activity of a soilborn *Pseudomonas aureofaciens* strain. *Appl Environ Microbiol*, 57:2928~2934
  - 48 Wang G-H(王光华), Zhou K-Q(周克琴), Zhang Q-Y(张秋英), et al. 2003. Antagonism of *Bacillus* strain BRF-1 against plant pathogenic fungi. *Chin J Biol Control* (中国生物防治), 19(2):73~77(in Chinese)
  - 49 Weller DM. 1983. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology*, 73:1548~1553
  - 50 Wright SAI, Zumoff CH, Schneider L, et al. 2001. *Pantoea agglomerans* strain EH318 produces two antibiotics that inhibit *Erwinia amylovora* *in vitro*. *Appl Environ Microbiol*, 67:284~292
  - 51 Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T, et al. 2001. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 91:181~187

作者简介 王光华,男,1966年生,在职博士生,副研究员,主要从事作物生理生态、环境微生物生态学研究,发表论文30多篇。Tel:0451-6602745;E-mail:guanghuawang@hotmail.com