

网络出版时间:2015-04-13 12:59

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2015.05.010

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20150413.1259.010.html

溶杆菌属细菌鉴定及生防机制概况

王 娜¹, 武坤毅¹, 崔浪军¹, 章华伟²

(1 陕西师范大学 生命科学学院, 药用植物资源与天然药物化学教育部重点实验室, 陕西 西安 710062;

2 浙江工业大学 药学院, 浙江 杭州 310014)

[摘 要] 溶杆菌属的大部分细菌具有重要的生防前景, 因而受到了高度关注。为了明确目前溶杆菌属细菌的研究现状, 分析了已报道的 26 种溶杆菌属细菌的分布环境及典型的生化特征, 基于 16S rDNA 序列相似性和脂肪酸组成构建了 26 种溶杆菌属细菌的系统进化树, 并辅以 DNA-DNA 杂交结果进行佐证, 阐述了溶杆菌属细菌对病原菌、线虫病害的生物防治物质及其作用机理, 并对其生物安全和应用前景进行了展望。

[关键词] 溶杆菌属; 细菌鉴定; DNA-DNA 同源杂交; 生物防治

[中图分类号] Q93-331

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2015)05-0174-09

Advance in bacteria identification and biocontrol mechanism of *Lysobacter* spp.

WANG Na¹, WU Kun-yi¹, CUI Lang-jun¹, ZHANG Hua-wei²

(1 Key Laboratory of Medicinal Plant Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry (Ministry of Education),
School of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710062, China;

2 School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University of Technology, Hangzhou, Zhejiang 310014, China)

Abstract: Widely attention has been paid to *Lysobacter* species since they can inhibit growth of pathogens. The distribution environment and typical biochemical characteristics of 26 reported *Lysobacter* species were analyzed and their phylogenetic tree was conducted based on 16S rDNA sequence similarity and fatty acid composition. DNA-DNA hybridization results were used as evidence. Then, the biological control of pathogenic bacteria and nematodes of *Lysobacter* species were discussed and the biosafety and application for biological control were introduced.

Key words: *Lysobacter*; bacteria identification; DNA-DNA hybridization; biological control

溶杆菌属(*Lysobacter* spp.)属于变形杆菌门(Proteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gmmaproteobaetria)、黄单胞菌目(Xanthomonadaceae)、黄单胞科(Xanthomonadaeae)。早在 1966 年, 有研究者发现, 有 1 株细菌能产生堆囊黏菌素, 这种堆囊黏菌素是一种吩嗪类抗生素, 对大多数细菌和真菌具有广谱的抑制作用^[1]。在此基础上, 1978 年, Christens-

en 等^[1]在加拿大举行的细菌分类学大会上首次提出溶杆菌属, 该属与假黄色单胞菌属(*Pseudoxanthomonas*)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、热单胞菌属(*Thermomonas*)和木杆菌属(*Xylella*)等的亲缘性较近^[2]。目前已报道的溶杆菌属的大多数细菌对病原真菌、G⁺ 细菌、线虫和绿藻均有突出的拮抗作用^[3]。随着近年来溶杆菌属新种的不断发

[收稿日期] 2013-12-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31101481); 中央高校基本科研业务费项目(GK261001237)

[作者简介] 王 娜(1989—), 女, 陕西宝鸡人, 硕士, 主要从事药用植物内生菌的开发与利用研究。E-mail: shxwangna@163.com

[通信作者] 崔浪军(1977—), 男, 陕西神木人, 副教授, 硕士生导师, 主要从事药用植物内生菌的开发与利用研究。
E-mail: ljcu@snnu.edu.cn

现,该属细菌在生物防治领域巨大的应用前景受到高度关注。本研究就溶杆菌属细菌的主要鉴定特征和生物防治病虫害机制的最新研究进展进行综述,以期为该属细菌的开发利用提供参考。

1 溶杆菌属细菌种类

在溶杆菌属提出之前,大部分细菌新种的分类和鉴定是根据滑动性和溶菌活性将具有相似表型的细菌分开。1978 年,Christensen 等^[1]发现了溶杆菌属细菌,虽然其与黏细菌表型相似,但不具有黏细菌产生子实体的特征,且溶杆菌属细菌 DNA 的 G+C 含量大于 60%,而黏细菌 DNA 的 G+C 含量相对较低^[3]。因此,溶杆菌属作为一个新属被提出。

表 1 1978—2012 年报道的溶杆菌属细菌及来源^[1,2,4-22]

Table 1 Reported <i>Lysobacter</i> spp. during 1978—2012					
细菌种名 Lysobacter species	细菌来源环境(所在地) Source of species	参考文献 Reference	细菌种名 Lysobacter species	细菌来源环境(所在地) Source of species	参考文献 Reference
<i>Lysobacter antibioticus</i>	土壤 Soil (Canadian provinces)	[1]	<i>Lysobacter ginsengisoli</i>	土壤 Soil (Korea)	[19]
<i>Lysobacter brunescens</i>	淡水 Fresh water (Canadian provinces)	[1]	<i>Lysobacter spongiicola</i>	深海海绵 Deep-seasponge (Philippine sea)	[9]
<i>Lysobacter enzymogenes</i>	土壤 Soil (Canadian provinces)	[5]	<i>Lysobacter panaciterrae</i>	土壤 Soil of a ginseng field (Korea)	[14]
<i>Lysobacter gummosus</i>	土壤 Soil (Ontario, Canada)	[1]	<i>Lysobacter oryzae</i>	水稻根际 Rhizosphere of rice (Korea)	[11]
<i>Lysobacter concretionis</i>	上流式厌氧污泥床反应器 Anaerobic granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor (Korea)	[2]	<i>Lysobacter ximonensis</i>	西藏土壤 Soil of Tibet (China)	[13]
<i>Lysobacter daejeonensis</i>	温室土壤 Greenhouse soil (Korea)	[4]	<i>Lysobacter soli</i>	土壤 Soli ginseng field (Korea)	[12]
<i>Lysobacter koreensis</i>	人参土壤 Ginseng field soil (Korea)	[6]	<i>Lysobacter xinjiangensis</i>	γ-辐照砂土壤 Gamma-irradiated sand soil (China)	[16]
<i>Lysobacter yangpyeongensis</i>	土壤 Soil (Korea)	[4]	<i>Lysobacter ruishenii</i>	百菌清污染土壤 Chlorothalonil-contaminated soil (China)	[20]
<i>Lysobacter defluvii</i>	土壤 Soil from municipal land fill (India)	[7]	<i>Lysobacter dokdonensis</i>	土壤 Soil (Korea)	[21]
<i>Lysobacter niabensis</i>	温室土壤 Greenhouse soil (Korea)	[8]	<i>Lysobacter korlensis</i>	新疆土壤 Soil of Xinjiang (China)	[22]
<i>Lysobacter niastensis</i>	温室土壤 Greenhouses oil (Korea)	[8]	<i>Lysobacter bugurensis</i>	新疆土壤 Soil of Xinjiang (China)	[22]
<i>Lysobacter capsici</i>	胡椒根际 Rhizosphere of pepper (Korea)	[10]	<i>Lysobacter arseniciresis-tens</i>	铁富集土壤 Iron-mined soil (China)	[18]
<i>Lysobacter daecheongensis</i>	水系沉积物 Stream sediment (Korea)	[15]	<i>Lysobacter thermophilus</i>	地热土壤 Geothermal soil sample (China)	[17]

2 溶杆菌属细菌的生化特征

溶杆菌属菌株菌体呈杆状,两端钝圆,单生,大小一般为(0. 2~0. 5) μm×(2~70) μm^[23],无鞭毛,但具有滑行能力,表面光滑有规则,好氧性强,革兰氏染色阴性,无芽孢,能够生长的温度为 15~42℃,最适生长温度为 25~40℃,大部分可以在 TSA、NA 和 LB 培养基上生长,菌落颜色有奶油色、淡黄、黄色几种^[1,2,4-22]。细菌不同种之间的表型差异很小,仅凭形态学特征难以区分和鉴别,需要根据

溶杆菌属自 1978 年命名以来,截至 2012 年底,在国际菌种鉴定权威杂志《国际微生物体系分类学》(IJSEM)期刊上命名的溶杆菌属细菌有 26 种^[1,2,4-22]。如表 1 所示,在这 26 种溶杆菌属细菌中,在韩国发现的有 12 种,在中国发现的有 7 种,其余 7 种分别在加拿大、印度和菲律宾被发现;这些细菌中除 5 株是在淡水、胡椒根系、水系沉积物、深海海绵和水稻根系中发现的外,其余 21 株均在不同类型的土壤中被发现。这些土壤类型包括湿度相对较大的温室土壤和人参根际土壤、受强紫外线或地热辐射的干燥土壤、金属矿集区土壤、被厌氧细菌或百菌清严重污染的土壤,其中在湿度相对较大土壤中发现的种类较多,说明溶杆菌属细菌在土壤中有广泛的适应性。

其生理生化指标的差异进行分析与鉴定。
综合前人的研究成果^[1,2,4-22]可知,G+C 含量高(61.7%~70.7%)且含有辅酶 Q-8 是溶杆菌属细菌的 2 个标志性特征。其他特征还有:氧化酶(*L. koreensis*、*L. ximonensis* 除外)、过氧化氢酶(*L. daejeonensis*、*L. yangpyeongensis* 和 *L. panaciterrae* 除外)检测结果为阳性;硝酸盐还原性(*L. daejeonensis*、*L. brunescens* 和 *L. defluvii* 除外)检测结果为阴性;大部分能水解利用七叶树素(*L. daejeonensis*、*L. antibioticus*、*L. concretionis*、*L. nia-*

boensis, *L. niastensis* 和 *L. spongiicola* 除外)和明胶(*L. korlensis* 除外); α -半乳糖苷酶、 α -葡萄糖苷酶、N-乙酰- β -葡萄糖苷酶、 β -半乳糖苷酶和 β -葡萄糖苷酶等细菌代谢关键酶活力大部分检测显示阴性。溶杆菌属细菌对营养要求相对较低,碳源的利用范围广泛,能利用 D-葡萄糖、D-树胶醛酮、D-甘露糖和 N-乙酰氨基葡萄糖等单糖,还可以利用麦芽糖等二糖以及糖原等多糖,也能利用其他碳源,如苹果酸、柠檬酸钠;但其中一部分细菌如 *L. dokdonensis*、*L. ruishenii* 和 *L. daecheongensis* 对碳源的利用情况尚不清楚,还有待进一步研究。这些结果表明,用传统的经典分类方法,仅仅依据形态特征和生理生化特性进行溶杆菌属种的确定是不够的,因此还需要采用其他有效的分析手段对其进行分类研究。

3 基于 16S rDNA 序列的溶杆菌属细菌的进化分析

由于细菌的全基因组数量迅速增加,利用比较

基因组学能更清晰地分析基因组进化。通过基因组分析可以识别噬菌体或其他具有 DNA 的区域,从而预测是否发生基因水平转移,分析相关基因组之间的演变,也可说明距离较远的发育相关细菌之间的关系^[2]。16S rDNA 基因大小 1.5 kb 左右,含有高度保守的基因片段,同时在不同的菌株间也含有变异的核酸片段。通过对其序列的分析,结合完善的数据库,可以简单、快速地对细菌进行分类鉴定,确定细菌在进化中的位置,是细菌分类学中非常重要的方法^[24]。当鉴定同源性较高的细菌时,可用其他方法作为补充。

对表 1 中 26 种溶杆菌属细菌的 16S rDNA 基因序列进行同源比对,并用 MEGA 4.0 软件包中的 Kimura-2-parameter 法计算遗传距离,用 Neighbor-Joining 法构建系统发育树,结果见图 1。由图 1 可知,*L. thermophilus* 和 *L. xinjiangensis* 分成 2 个单独的分支,其他 24 株细菌分成了 4 个单独但相关的集群。

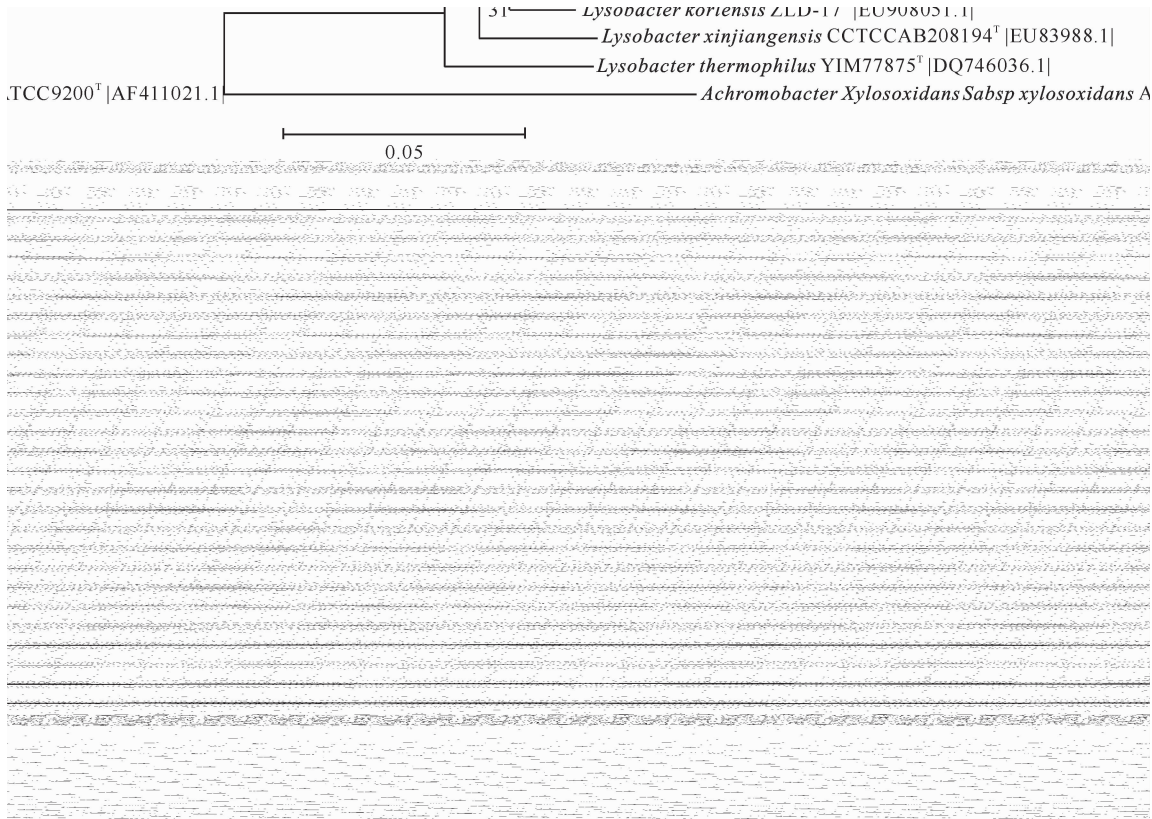


图 1 基于 16S rDNA 序列构建的 26 种溶杆菌属细菌的系统发育树
“0.05”代表每单位核苷酸的变化

Fig.1 Phylogenetic tree of the 26 *Lysobacter* spp. species based on 16S rDNA sequence
“0.05” represents the change of nucleotides per site

由图 1 可知, *L. gummosus*, *L. antibioticus*, *L. capsici*, *L. niastensis*, *L. soli*, *L. enzymogenes*,

L. xinmonensis, *L. dokdonensis*, *L. ginsengisoli*, *L. panaciterrae*, *L. brunescens* 和 *L. daecheongensis* 组成 1 个集群; *L. daejeonensis*, *L. ruishenii*, *L. defluvii*, *L. spongiicola*, *L. concretionis* 和 *L. arseniciresistens* 组成 1 个集群; *L. koreensis*, *L. niabensis*, *L. yangpyeongensis* 和 *L. oryzae* 组成 1 个集群; *L. bugurensis* 和 *L. korlensis* 组成 1 个集群。26 种溶杆菌属细菌中, *L. capsici* 与 *L. gummosus* 和 *L. antibioticus* 16S rDNA 序列的相似百分率为 100%, 三者相似性最高; 其次是 *L. daejeonensis* 与 *L. ruishenii*, 其 16S rDNA 序列相似百分率为 98%, 二者相似性较高。该系统发育进化树清楚地说明了这 26 个溶杆菌属细菌之间的亲缘性关系。

目前, 采用 16S rDNA 测序方法鉴定细菌亲缘关系时主要依靠序列间的相似百分率。Bosshard 等^[25]将 16S rDNA 序列相似百分率大于 99% 的细菌定义为同种内的不同亚种, 相似性在 95%~99% 的则定义为属内相关的种。但随着细菌基因组测序的发展, 发现 16S rDNA 序列相似百分率即使达到 99% 以上, 在分类学上也可能属于不同的种^[26], 说

明对细菌进行系统分类鉴定不能采取单一的标准。如 *L. capsici* 与 *L. gummosus* 和 *L. antibioticus* 的 16S rDNA 序列相似百分率为 100%, 三者之间同源性很高, 但为不同的种。因此, 必须同时结合 DNA 同源杂交、形态特征、生理生化特征、脂肪酸含量测定等多项指标进行综合分析, 才能给予溶杆菌属新种准确的鉴定结论^[27]。

4 基于脂肪酸组成的溶杆菌属细菌的聚类分析

脂肪酸具有结构多样性和较高的生物学特异性, 是特别有效的生物标记物^[28]。通过微生物脂肪酸的组分来鉴定微生物的种属, 分析微生物的多样性, 是一种简便、可靠的分析方法。根据 26 种溶杆菌属细菌脂肪酸含量的百分比可知, 溶杆菌属细菌标志性的脂肪酸主要是 iso-C_{15:0}、iso-C_{16:0} 和 iso-C_{17:1 ω 9c}, 其中 iso-C_{15:0} 的含量相对最高。根据 26 种细菌的脂肪酸含量, 用 SPSS 18.0 中的聚类分析 (*Hierarchical cluster*) 以类间平均连锁法 (*Between-groups linkage*) 进行聚类, 通过平均距离法制图, 结果如图 2 所示。

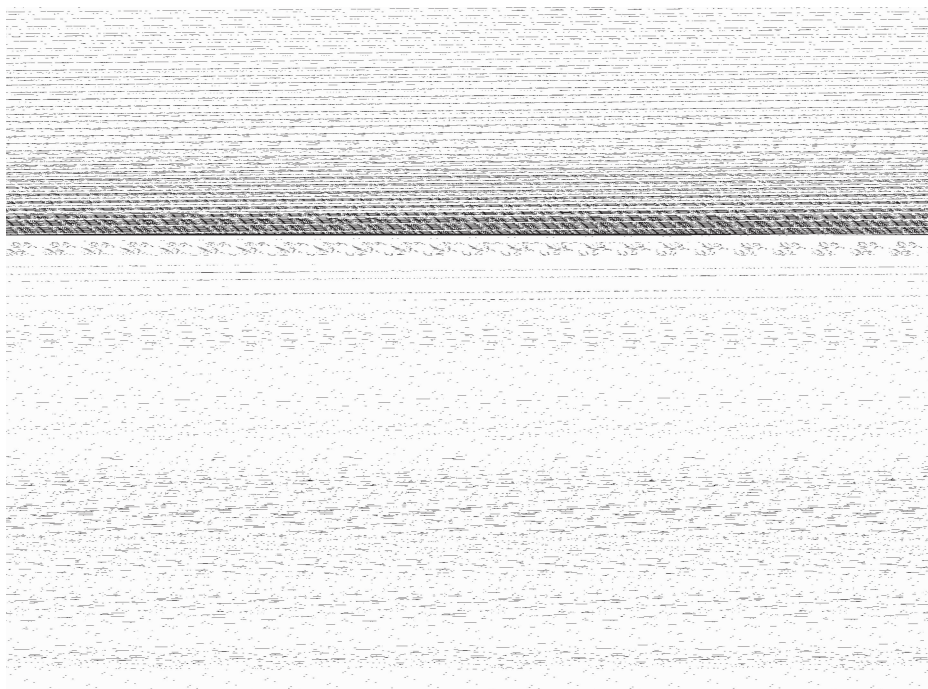


图 2 基于脂肪酸组成的 26 种溶杆菌属细菌的聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of the 26 *Lysobacter* spp. based on fatty acid composition

由图 2 可见, 全部 26 种细菌聚为一类时, 类合并距离尺度为 25; 在距离尺度仅约为 10 时可分为 4 类, 其结果与基于 16S rDNA 序列相似性构建的系

统进化树分类结果保持相对较高的一致性, 这与前人在其他革兰氏阴性菌中的研究结果^[28]一致。在这 26 种细菌中, *L. ruishenii* 与 *L. ginsengisoli* 为 2

个单独的分支, *L. gummosus*、*L. panaciterrae*、*L. soli*、*L. niastensis*、*L. daecheongensis*、*L. enzymogene*、*L. capsici* 和 *L. antibioticus* 组成 1 个集群, *L. bugurensis* 和 *L. korlensis* 组成 1 个集群, 其余的组成 1 个集群。

由图 2 还可知, 具有相似脂肪酸组成的细菌聚合为单一集群, 这些细菌来自相近的环境, 其 16S rDNA 序列具有较近的“亲缘关系”(图 1)。如 *L. daejeonensis*、*L. yangpyeongensis*、*L. dokdonensis* 等均分离自相对潮湿的土壤, 这些细菌在 16S rDNA 序列相似性和脂肪酸组成上保持高度一致。此外, 均分离自中国干旱地热土壤中的 *L. xinjiangensis* 和 *L. thermophilus* 等细菌之间, 也存在 16S rDNA 序列相似性和脂肪酸组成保持高度一致的现象。以上结果有力地说明, 环境因素极可能对脂肪酸组成造成影响, 相似环境下的细菌具有更为相似的脂肪酸组成。

5 溶杆菌属细菌的 DNA-DNA 同源性杂交鉴定

细菌分类学上不同物种之间能进行 DNA 同源杂交, 其基本原理是用 DNA 解链的可逆性和碱基配对的专一性, 将不同来源的 DNA 在体外加热解链, 并在合适条件下使互补的碱基重新配对, 测算杂交百分数。百分数越高, 杂交的 2 个 DNA 碱基线性序列的同源性就越高, 说明其亲缘关系就越近^[29]。因此通过 DNA 同源杂交鉴定物种之间的亲缘关系, 是细菌鉴定中最为重要的证据。按照国际分类委员会的建议, 将 DNA 同源性 70% 作为定种的界限, 即同源性 $\geq 70\%$ 为同一个种群, 同源性 $< 70\%$ 为不同种群^[28]。例如通过 DNA 同源杂交鉴定溶杆菌属新菌株 *L. ginsengisoli* Gsoil357^T、*L. daecheongensis* Dae08^T 和 *L. spongiicola* KMM329^T, 结果表明 *L. ginsengisoli* Gsoil357^T 与 *L. gummosus* DSM6980^T、*L. antibioticus* DSM2044^T 之间的 DNA 同源性分别为 16.3% 和 16.2%^[19], *L. daecheongensis* Dae08^T 与 *L. brunescens* DSM6979^T 之间的 DNA 同源性为 28%^[15], *L. spongiicola* KMM329^T 与 *L. concretionis* KCTC12205^T 之间的 DNA 同源性为 48%^[9], 因此鉴定 *L. ginsengisoli* Gsoil357^T、*L. daecheongensis* Dae08^T 和 *L. spongiicola* KMM329^T 为溶杆菌属中独立的种。但最新的研究表明, 即使溶杆菌属 2 种细菌的 16S rDNA 序列相似率达到 99% 以上, 二者

基因组 DNA 杂交同源性百分数也可能远在 70% 以下^[30-31], 而且其生理生化指标、细胞化学组分等方面的特征也有明显的差异, 在分类鉴定中可命名为不同的种, 这对于新种的确定和细菌不同种的鉴定提供了准确、快速、有效的证据^[27]。如 1978 年, Christensen 和 Cook 提出了 *L. enzymogenes* 细菌的亚种, 命名为 *L. enzymogenes*, 但此亚种的名称在细菌命名中一直未得到批准, 该名称的术语也未被验证^[5]。最新研究报道表明^[26], 此亚种细菌 *L. enzymogenes* PAGU1119^T 与 *L. enzymogenes* DSM2043^T、*L. capsici* YC5194^T 之间 16S rDNA 序列的相似率分别为 97.2% 和 99.4%, 全基因组 DNA 同源杂交百分数分别为 20.7%~26.1% 和 60.9%~62.0%, 这说明与 *L. enzymogenes* DSM2043^T 细菌相比, *L. enzymogenes* PAGU1119^T 与 *L. capsici* YC5194^T 的亲缘关系更近。但进一步的试验分析表明, *L. enzymogenes* PAGU1119^T 与 *L. capsici* YC5194^T 的生化特征、脂肪酸含量等特征差异性较大^[26], 因此 Kawamura 等^[26] 提出, 将 *L. enzymogenes* PAGU1119^T 视为溶杆菌属 1 个独立的新种, 并重新命名为 *L. cookii* sp.。

6 溶杆菌属细菌的生防物质及作用机理

已报道的溶杆菌属的大多数细菌对许多病原菌有显著的拮抗作用^[3]。截至 2012 年底, 溶杆菌属 26 种细菌中, 只有 *L. enzymogenes* C3 等少数几种细菌的胞外主要抑菌物质被分离得到, 这些物质主要有胞外酶、小分子化合物及生物表面活性剂和抗生素 3 大类(表 2)。

6.1 胞外酶

与其他生防菌相比, 溶杆菌属细菌能够分泌几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶等多种胞外酶。如 *L. enzymogenes* C3、*L. enzymogenes* OH11 能大量分泌几丁质酶, 该酶通过水解病原真菌细胞壁抑制其增殖, 从而提高植物的抗真菌能力^[34]。*L. antibioticus* HS124、*L. enzymogenes* OH11 分泌的 β -1, 3-葡聚糖酶通过催化细胞壁中的 β -1, 3-葡聚糖多聚体水解, 将其降解为葡萄糖, 从而抑制真菌的生长及增殖^[47]。*L. enzymogenes* 3.1T8 分泌的 α -水解蛋白酶能降解线虫体壁的蛋白质, 该蛋白酶由前肽区(Pro)和蛋白酶区(Alp)组成, 其中前肽区参与该酶的正常折叠, 影响其水解活性^[36]。

表 2 1978—2012 年报道的 26 种溶杆菌属细菌的拮抗病原菌和抗菌活性物质

细菌种名 <i>Lysobacter</i> species	拮抗的病原菌 Antagonistic pathogen	抗菌物质种类 Antimicrobial substance
<i>Lysobacter</i> ATCC53042 ^[32]	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、万古霉素耐药肠球菌 <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> , <i>Vancomycin-resistant enterococci</i>	缩酚酰胺溶杆菌素 Depsipeptide lysobactin
<i>Lysobacter enzymogenes</i> 3.1T8 ^[33-36]	瓜果腐霉、间型腐霉、辣椒疫霉、茎枯菌、番茄叶霉菌、番茄枯萎菌、立枯丝核菌 <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Pythium Intermedium</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Corynespora cassicola</i> , <i>Cladosporium fulvum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> , <i>Rhizoctonia solani</i>	葡聚糖酶、脂酶、蛋白酶及结构尚未确定的一些小分子量的抗生素和一种生物表面活性剂 Glucanase, Lipase, Protease, Antibiotics, Biosurfactant
<i>Lysobacter enzymogenes</i> C3 ^[37-38]	辣椒疫霉、立枯丝核菌、小麦根腐病菌、菜豆锈病菌、禾谷镰刀菌、线虫、巢曲霉 <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Bipolaris sorokinianum</i> , <i>Uromyces appendiculatus</i> , <i>Fusarium graminearum</i> , <i>Nematode</i> , <i>Aspergillus nidulans</i>	几丁质酶、热稳定抗真菌因子、 β -1,3-葡聚糖酶 Chitinase, HSAF, β -1,3-betaglucanase
<i>Lysobacter antibioticus</i> HS124 ^[39]	辣椒疫霉、番茄枯萎菌、黑点病、灰色梨孢、立枯丝核菌、稻黄单胞菌稻生致病变种 <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> , <i>Diaporthe citri</i> , <i>Pyricularia grisea</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>Oryzae</i>	几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶、脂酶、蛋白酶、4-对羟基苯乙酸 Chitinase, β -1,3-betaglucanase, Lipase, Protease, 4-4-hydroxyphenylacetic acid
<i>Lysobacter</i> sp. SB-K88 ^[40]	瓜果腐霉、螺壳状丝囊霉、终级腐霉菌、立枯丝核菌、腐霉和黑腐丝囊霉 <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Aphanomyces cochlioides</i> , <i>Pythium ultimum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Pythium</i> , <i>Aphanomyces cochlioides</i>	Xanthobaccins A,B,C
<i>Lysobacter gummosus</i> ^[41]	青霉菌、核盘菌 <i>Penicillium notatum</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	2, 4-二乙酰基间苯三酚 2, 4- two acetyl benzene three phenol
<i>Lysobacter</i> sp. BMK333-48F3 ^[42]	许多革兰氏阳性菌 Gram positive bacteria	Tripropeptin E
<i>Lysobacter</i> sp. XL1 ^[43-44]	金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌 <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i>	几丁质酶、葡聚糖酶、中性磷酸酶、溶菌酶 L1-L5Chitinase, Betaglucanase, Neutral phosphatase, Lysozyme L1-L5
<i>Lysobacter enzymogenes</i> OH11 ^[45-46]	辣椒疫霉、匍枝根霉、瓜果腐霉、黄瓜枯萎病菌、腐皮镰刀菌、立枯丝核菌、油菜菌核病菌、卵菌 <i>Phytophthora capsici</i> , <i>Rhizopus stolonifer</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>Oomycetes</i>	α -水解蛋白酶、几丁质酶、 β -1, 3-葡聚糖酶 Alpha protease, Chitinase, β -1, 3- betaglucanase, WAP-8294A2

6.2 小分子化合物

溶杆菌属细菌分泌于胞外的活性小分子物质主要包括 HSAF、WAP-8294A2、Lysobactin、Cephabacins 和 Tripropeptins 等，其中 *L. enzymogenes* C3、*L. enzymogenes* OH11 分泌的热稳定抗真菌因子 (HSAF) 对丝状真菌和卵菌有显著的抑制作用。HSAF 对丝状真菌的作用机制，主要是通过抑制真菌神经酰胺合成酶活性，改变细胞膜中的鞘脂类化合物的组成，最终导致靶标真菌菌丝的去极化^[48]。目前，这些活性小分子物质结构基本都被阐明。

此外，关于 HSAF 与 WAP-8294A2 生物合成关键调控基因的研究报道较多。其中留醇脱氢酶基因 (Sterol desaturase, SD) 是 HSAF 生物合成中的关键基因，SD 基因催化 3-deOH HSAF (3-dehydroxy HSAF) 转化为 HSAF，且铁氧化还原酶基因 (Ferredoxin reductase, FNR) 的参与能够明显增强 SD 基因的催化活性^[49]。WAP-8294A2 生物合成过程中需要酰基转移酶 (Acyl-CoA ligase, ACL) 激活 3-OH 脂肪酸链和酰基转移蛋白，且 WAP-8294A2 已进入临床 I 期试验阶段^[50]。

6.3 生物表面活性剂、抗生素

L. enzymogenes 3.1T8、*L. enzymogen* C3 分泌

的生物表面活性剂，对由立枯丝核菌引起的肯塔基蓝草病害 (*Poa pratensis* L.) 等具有显著的抑制效果，其作用机制是该活性剂能阻止真菌孢子游动及萌发，建立与细菌细胞之间的联系，克服细胞之间的疏水阻力，降低病原菌游动孢子的表面张力，在细胞膜内外膨压的作用下，使游动孢子细胞破裂而死亡^[46]。该属的其他细菌如 *Lysobacter* sp. strain SB-K88 和 *L. enzymogenes* 3.1T8 能产生抗生素，抑制瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum*) 与螺壳状丝囊霉 (*A. cochlioides*) 引起的猝倒病^[51]。虽然这些抗生素的结构尚未得到完全解析，但初步的研究表明，这些抗生素的拮抗机理是使 F-actin (肌动蛋白) 断裂、游走孢子的超微结构破坏、细胞壁水解和包裹萌发受抑制等^[44]。同时，有研究发现，*L. enzymogenes* OH11 可以产生一种黄色素的抗生素使其菌落颜色呈黄色，这些黄色素通过 II 型聚酮合酶 (PKS) 合成，是细菌赖以生存的遮光剂^[52]。

此外，*L. enzymogenes* C3 可以诱导宿主植物产生对镰刀菌引起的赤霉病的抗性，对根腐离蠕孢孢子的萌发和叶点病也有很好的防治作用^[53]。最新的研究显示，*L. enzymogenes* C3 有许多分泌物能引发动物和植物病原菌 G⁺ 的三型分泌系统^[26]，该系

统参与调控 *L. enzymogenes* C3 在靶标真菌菌丝上的有效附着^[54],但其机制相对复杂,尚有待进一步阐明。虽然对该属少数细菌的抑菌机理已有初步了解,但大部分抑菌物质的代谢途径及其详细的抑菌机制仍不明确,还需深入研究。

7 溶杆菌属细菌对线虫的生物防治作用

线虫体壁主要由蛋白质、脂质和碳水化合物组成,卵壳主要由胶原质状的蛋白围绕脂蛋白所组成,而溶杆菌属大部分菌株能分泌几丁质酶和蛋白溶解酶,故溶杆菌属细菌对线虫引起的病害能起到高效的防治作用。*L. enzymogenes* OH11 对南方根结线虫(*M. incognita*)的 2 龄幼虫及其卵化有强烈的抑制作用^[46]。*L. enzymogenes* C3 对爪哇根结线虫(*M. javanica*)的卵化无抑制作用,但对 γ -辐照的卵能起到破坏作用,主要作用机制是细菌可以降解线虫卵壳的几丁质层^[54]。最近的研究显示,*L. enzymogenes* C3 和 *L. antibioticus* 能有效防治甜菜囊肿线虫(*Heterodera schachtii* Schmidt)引起的白菜囊肿和大豆囊肿线虫(*Heterodera glycines*)引起的大豆囊肿,而且 *L. enzymogenes* C3 还可以杀死植物寄生的成年、幼年线虫及培养的线虫^[23]。

8 溶杆菌属的生物安全性及应用前景

应用微生物菌剂进行生物防治之前必须经过严格的风险评估,应权衡其在农业生产中对环境危害的风险系数,以确定该生物菌剂对人体是否有害。溶杆菌属就是一个很好的例子,其在环境中有很高的丰度,且是自然种群,很难受到人为控制。因此,在使用溶杆菌属细菌进行生物防治之前,一定要先进行严格的风险评估^[3]。

Christensen 等^[1]研究表明,溶杆菌属具有独特的滑动性和溶菌活性,这些属性使得溶杆菌属细菌在生物防治病原菌和线虫方面具有很强的优势。目前使用的对溶杆菌属细菌的详细介绍主要是 2001 年 Christensen 的描述。随着溶杆菌属新种不断被发现,对其描述需要大量修改,而且溶杆菌属细菌的一些特殊特征需要通过不同种之间的差异性进行分析,所以必须基于 DNA 的检测方法,结合选择性培养才能更深入地了解溶杆菌属细菌的形态特征、栖息地和多样性^[27]。

溶杆菌属高效、广谱的拮抗作用具有诱人的应用前景,现已成为植物病害生防微生物的重要组成

部分,但与解淀粉芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌等其他生防菌相比,其研究还处于起步阶段,对溶杆菌属相关抗菌物质及其抗菌机理尚不甚了解。近年来,现代生物学技术特别是分离纯化、波谱学等技术的突破,为溶杆菌属的进一步研究提供了强有力的技术手段。因此,今后应该从以下方面加强研究:首先,溶杆菌属细菌数量很多,已发现的数量相对较少,需深入发掘具有广谱抗菌性的新细菌,并在评价其安全性的基础上,研究其生防潜力、作用机制,发掘其具有巨大生防前景的活性分子。其次,需深入研究已发现的具有显著抗菌活性的小分子物质的抑菌机理。陕西师范大学药用植物资源与天然药物化学教育部重点实验室在远志根际分离得到 1 株菌株,经鉴定其为溶杆菌属细菌,并命名为 *L. yanansis* sp. nov.^[27];经研究发现,其胞外抗菌物质主要为蛋白类,在建立该菌胞外和胞内蛋白双向电泳图谱的基础上^[55],进一步分离得到了枯草杆菌蛋白酶、 α 水解蛋白酶和 β 水解蛋白酶 3 种具有抑菌活性的蛋白质,其抑菌效果更强的小肽类物质正在分离纯化中。同时研究还发现,*L. yanansis* 细菌具有较好的定殖能力,能在玉米根部表皮和韧皮部定殖,这为 *L. yanansis* 细菌生物防治机理的研究和开发利用奠定了基础(相关结果另文发表);此外,利用诱变育种、原生质融合及转化技术对菌株进行改良,以提高菌株的抑菌能力;加强细菌活性物质发酵条件的优化,使其规模化、产业化,从而推动其从实验室和温室的小规模研究向大田试验迈进。

[参考文献]

- [1] Christensen P, Cook F D. *Lysobacter*, a new genus of nonfruiting, gliding bacteria with a high base ratio [J]. International Journal of Systematic and Bacteriology, 1978, 28(3): 367-393.
- [2] Bae H S, Im W T, Lee S T, et al. *Lysobacter concretiois* sp. nov., isolated from anaerobic as granules in an upflow anaerobic sludge blanket reactor [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2005, 55(3): 1155-1161.
- [3] Hayward A C, Fegan N, Fegan M, et al. *Stenotrophomonas* and *Lysobacter*: Ubiquitous plant-associated gamma-proteobacteria of developing significance in applied microbiology [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(3): 756-770.
- [4] Weon H Y, Kim B Y, Baek Y K, et al. Two novel species, *Lysobacter daejeonensis* sp. nov. and *Lysobacter yangpyeongensis* sp. nov., isolated from Korean greenhouse soils [J]. International Journal of Systematic and Bacteriology, 2006, 56(5): 947-951.
- [5] Tindall B J, Euzéby J P, Vaughan, et al. *Lysobacter enzymogenes* subsp. *enzymogenes* Christensen and Cook 1978, *L. enzy-*

- mogenes subsp. cookii Christensen 1978 and Streptococcus caseiiflavus(Mundt and Graham 1968) 1978 should have been cited in the approved lists of bacterial names request for an opinion [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2006, 56(11): 2707-2709.
- [6] Lee J W, Im W T, Kim M K, et al. *Lysobacter koreensis* sp. nov., isolated from a ginseng field [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2006, 56(1): 231-235.
- [7] Yassin A F, Chen W M, Hupfer H, et al. *Lysobacter defluvi* sp. nov., isolated from municipal solid waste [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2007, 57(5): 1131-1136.
- [8] Weon H Y, Kim B Y, Kim M K, et al. *Lysobacter niabensis* sp. nov. and *Lysobacter niastensis* sp. nov., isolated from greenhouse soils in Korea [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2007, 57(3): 548-551.
- [9] Romanenko L A, Uchino M, Tanaka N, et al. *Lysobacter spongiicola* sp. nov., isolated from a deep-sea sponge [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2008, 58(2): 370-374.
- [10] Park J H, Kim R, Aslam Z, et al. *Lysobacter capsici* sp. nov., with antimicrobial activity, isolated from the rhizosphere of pepper, and emended description of the genus *Lysobacter* [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2008, 58(2): 387-392.
- [11] Aslam Z, Yasir M, Jeon C O, et al. *Lysobacter oryzae* sp. nov., isolated from the rhizosphere of rice (*Oryza sativa* L.) [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2009, 59(4): 675-680.
- [12] Srinivasan S, Kim M K, Sathiyaraj G, et al. *Lysobacter soli* sp. nov., isolated from soil of aginseng field [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2010, 60(7): 1543-1547.
- [13] Wang Y, Dai J, Zhang L, et al. *Lysobacter ximonensis* sp. nov., isolated from soil [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2009, 59(4): 786-789.
- [14] Ten L N, Jung H M, Im W T, et al. *Lysobacter panaciterrae* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2009, 59(5): 958-963.
- [15] Ten L N, Jung H M, Im W T, et al. *Lysobacter daecheonensis* sp. nov., isolated from sediment of stream near the dae-chung dam in south korea [J]. The Journal of Microbiology, 2008, 46(5): 519-524.
- [16] Liu M, Liu Y F, Wang Y Q, et al. *Lysobacter xinjiangensis* sp. nov., a moderately thermotolerant and alkalitolerant bacterium isolated from a gamma-irradiated sand soil sample [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2011, 61(2): 433-437.
- [17] Wei D Q, Yu T T, Yao J C, et al. *Lysobacter thermophilus* sp. nov., isolated from a geothermal soil sample in Tengchong, south-west China [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2012, 102(4): 643-651.
- [18] Luo G S, Shi Z J, Wang G J, et al. *Lysobacter arseniciresistens* sp. nov., an arsenite-resistant bacterium isolated from iron-mined soil [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2012, 62(7): 1659-1665.
- [19] Hae-Min J, Ten L N, Im W T, et al. *Lysobacter ginsengisoli* sp. nov., a novel species isolated from soil in pocheon province, South Korea [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 18(9): 1496-1499.
- [20] Wang G L, Wang L, Chen H H, et al. *Lysobacter ruishenii* sp. nov., a chlorothalonil-degrading bacterium isolated from a long-term chlorothalonil-contaminated soil [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2011, 61(3): 674-679.
- [21] Oh K H, Kang S J, Jung Y T, et al. *Lysobacter dokdonensis* sp. nov., isolated from soil [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2011, 61(5): 1089-1093.
- [22] Zhang L, Bai J, Wang Y, et al. *Lysobacter korlensis* sp. nov. and *Lysobacter bugurensis* sp. nov., isolated from soil [J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2011, 61(9): 2259-2265.
- [23] 姬广海. 溶杆菌属及其在植物病害防治中的研究进展 [J]. 云南农业大学学报, 2011, 26(1): 124-130.
- Ji G H. Advances in the study on *Lysobacter* spp. bacteria and their effects on biological control of plant diseases [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2011, 26(1): 124-130. (in Chinese)
- [24] 都立辉, 刘芳. 16S rRNA 基因在细菌鉴定中的应用 [J]. 乳业科学与技术, 2006 (5): 207-209.
- Du L H, Liu F. Application of 16SrRNA gene in identification of bacteria [J]. Journal of Dairy Science and Technology, 2006 (5): 207-209. (in Chinese)
- [25] Bosshard P P, Abels S, Zbinden R, et al. Ribosomal DNA sequencing for identification of aerobic gram-positive rods in the clinical laboratory (an 18-month evaluation) [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(9): 4134-4140.
- [26] Kawamura Y, Tomida J, Morita Y, et al. '*Lysobacter enzymogenes* ssp. cookii' Christensen 1978 should be recognized as an independent species, *Lysobacter cookii* sp. Nov. [J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 298(1): 118-123.
- [27] 胡苏莹. 一株具有抗菌活性远志根际细菌的鉴定及其代谢产物的研究 [D]. 西安: 陕西师范大学, 2012.
- Hu S Y. Research and identified the antibacterial activity of *Polygala rhizosphere* bacteria and their metabolites in plant [D]. Xi'an: Shaanxi Normal University, 2012. (in Chinese)
- [28] 刘波. 微生物脂肪酸生态学 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2011: 5-19, 163-168.
- Liu B. Microbial ecology of fatty acid [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2011: 5-19, 163-168. (in Chinese)
- [29] 蔡妙英, 洪俊华. 应用于细菌分类学中的 DNA-DNA 杂交方法 [J]. 微生物学通报, 1984(1): 40-42.

- Cai M Y, Hong J H. DNA-DNA hybridization method used in bacterial taxonomy [J]. Microbiology, 1984 (1): 40-42. (in Chinese)
- [30] 曾 静, 窦岳坦, 王 磊, 等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析 [J]. 微生物学报, 2002, 42 (2): 133-137.
- Ceng J, Dou Y T, Wang L, et al. Analysis of the sequences 16S rDNA and DNA homology region of Xinjiang Saline Lake-moderately halophilic bacterium [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(2): 133-137. (in Chinese)
- [31] Yi X, Xia Z J, Deng A H, et al. Isolation and identification of two xylanase producing extremely alkali tolerant strains of *Bacillus halodurans* from Turpan in China [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2006, 46(6): 951-955.
- [32] Guzman-Martinez A, Lamer R, VanNieuwenhze M S. Total synthesis of lysobactin [J]. Journal of the American Chemical Society, 2007, 129(18): 6017-6021.
- [33] 朱 慧. 产酶溶杆菌 OH11 菌株生防相关基因的克隆和表达 [D]. 南京: 南京农业大学, 1999.
- Zhu H. Cloning and expression of *Lysobacter enzymogenes* strain OH11 in biocontrol genes [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 1999. (in Chinese)
- [34] Postma J, Stevens L H, Wiegiers G L, et al. Biological control of *Pythium aphanidermatum* in cucumber with a combined application of *Lysobacter enzymogenes* strain 3. 1T8 and chitosan [J]. Biological Control, 2009, 48: 301-309.
- [35] Folman L B, Postma J, Veen J, et al. Characterization of *Lysobacter enzymogenes* (Christensen and Cook 1978) strain 3. 1T8, a powerful antagonist of fungal diseases of cucumber [J]. Microbiological Research, 2003, 158(2): 107-115.
- [36] Folman L B, Postma J, Veen J, et al. Production of antifungal compounds by *Lysobacter enzymogenes* isolate 3. 1T8 under different conditions in relation to its efficacy as a biocontrol agent of *Pythium aphanidermatum* in cucumber [J]. Biological Control, 2004, 31(2): 145-154.
- [37] Li S, Jochum C C, Yu F, et al. An antibiotic complex from *Lysobacter enzymogenes* strain C3: Antimicrobial activity and role in plant disease control [J]. Phytopathology, 2008, 98 (6): 695-701.
- [38] Palumbo J D, Yuen G Y, Jochum C C, et al. Mutagenesis of β -1, 3-Glucanase Genes in *Lysobacter enzymogenes* strain C3 results in reduced biological control activity toward bipolaris leaf spot of tall fescue and pythium damping-off of sugar beet [J]. Biological Control, 2005, 95(6): 701-707.
- [39] Ko H S, Jin R D, Krishnan H B, et al. Biocontrol ability of *Lysobacter antibioticus* HS124 against phytophthora blight is mediated by the production of 4-hydroxyphenylacetic acid and several lytic enzymes [J]. Current Microbiology, 2009, 59(6): 608-615.
- [40] Tofazzal Islam M. Mode of antagonism of a biocontrol bacterium *Lysobacter* sp. SB-K88 toward a damping-off pathogen *aphanomyces cochlioides* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(4): 629-637.
- [41] Brucker R M, Baylor C M, Walters R L, et al. The identification of 2, 4-diacetylphloroglucinol as an antifungal metabolite produced by cutaneous bacteria of the salamander *plethodon cinereus* [J]. Journal of Chemical Ecology, 2008, 34(1): 39-43.
- [42] Hashizume H, Hattori S, Igarashi M, et al. Tripropeptin E, a new tripropeptin group antibiotic produced by *Lysobacter* sp. BMK333-48F3 [J]. The Journal of Antibiotics, 2004, 57(4): 394-399.
- [43] Vasilyeva N V, Tsfasman I M, Suzina N E, et al. Secretion of bacteriolytic endopeptidase L5 of *Lysobacter* sp. XL1 into the medium by means of outer membrane vesicles [J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 275(15): 3827-3835.
- [44] Au S, Roy K L, Tigerstrom von R G, et al. Nucleotide sequence and characterization of the gene for secreted alkaline phosphatase from *Lysobacter enzymogenes* [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(15): 4551-4557.
- [45] Qian G L, Hu B S, Jiang Y H, et al. Identification and characterization of *Lysobacter enzymogenes* as a biological control agent against some fungal pathogens [J]. Agricultural Sciences in China, 2009, 8(1): 68-75.
- [46] 姜英华. 一株新型生防菌菌株 OH11 的鉴定和生防效果的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2006.
- Jiang Y H. Research a new strain of biocontrol bacterial strain OH11 identification and biocontrol effect [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [47] 朱 慧, 王云霞, 胡白石, 等. 产酶溶杆菌 OH11 菌株 β -1, 3-葡聚糖酶基因的克隆与表达 [J]. 江苏农业学报, 2008, 24(2): 136-141.
- Zhu H, Wang Y X, Hu B S, et al. Cloning and expression of *Lysobacter enzymogenes* OH11 strain β -1, 3-Glucanase gene [J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2008, 24(2): 136-141. (in Chinese)
- [48] 刘铁儒, 徐菲菲, 钱国良, 等. 产酶溶杆菌 *rpfG* 基因的克隆与功能分析 [J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(2): 45-50.
- Liu Y R, Xu F F, Qian G L, et al. Cloning and functional analysis of *Lysobacter enzymogenes rpfG* gene [J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2013, 36(2): 45-50. (in Chinese)
- [49] Li Y Y, Huffman J, Li Y, et al. 3-Hydroxylation of the polycyclic tetramate macrolactam in the biosynthesis of antifungal HSAF from *Lysobacter enzymogenes* C3 [J]. Medicinal Chemistry Communications, 2012, 3(8): 982-986.
- [50] Zhang W, Li Y Y, Qian G L, et al. Identification and characterization of the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* WAP-8294A2 biosynthetic gene cluster from *Lysobacter enzymogenes* OH11 [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2011, 55(12): 5581-5589.