



绿针假单胞菌的研究进展及农业应用潜力

张春媚, 徐明洁, 李雪威, 邢珂, 秦盛*

江苏师范大学生命科学学院, 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116

张春媚, 徐明洁, 李雪威, 邢珂, 秦盛. 绿针假单胞菌的研究进展及农业应用潜力. 微生物学报, 2022, 62(2): 391–402.

Zhang Chunmei, Xu Mingjie, Li Xuewei, Xing Ke, Qin Sheng. Recent research advances and application potential in agriculture of *Pseudomonas chlororaphis*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 391–402.

摘要: 绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)是目前研究较多的生防菌种之一。19 世纪初被 Miguela 首次分离, 将其鉴定为假单胞菌(*Pseudomonas*), 并将机会性病原菌绿脓杆菌作为其模式菌株, 而后 Peix 于 2007 年重新将其分类为绿针假单胞菌(*P. chlororaphis*)。目前该菌种已报道有 4 个亚种, 均可产生有颜色的吩嗪类化合物抗生素。该种的菌株多分离自植物根际, 对植物抵抗病原菌、线虫等的侵染起到保护作用。本文结合我们分离获得的功能研究、基因组分析及相关文献资料, 系统描述了绿针假单胞菌的分类学特征、基因组特点、代谢产物功能及其应用开发前景等, 以期绿针假单胞菌在活性代谢产物发掘、基因功能研究及其农业应用等方面提供借鉴。

关键词: 绿针假单胞菌; 生防; 次生代谢产物; 农业应用

Recent research advances and application potential in agriculture of *Pseudomonas chlororaphis*

ZHANG Chunmei, XU Mingjie, LI Xuewei, XING Ke, QIN Sheng*

Key Laboratory for Biotechnology on Medicinal Plants of Jiangsu Province, School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China

Abstract: *Pseudomonas chlororaphis* is one group of the most studied biocontrol strains. Since the

基金项目: 国家自然科学基金(31900110); 江苏高校“青蓝工程”项目(2019)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31900110) and by the Qing Lan Project of Jiangsu Province (2019)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-516-83403515; E-mail: shengqin@jsnu.edu.cn

Received: 26 March 2020; Revised: 28 May 2021; Published online: 3 June 2021

beginning of the 19th century, it was firstly isolated and identified as *Pseudomonas* by Miguela, and then it was reclassified as *P. chlororaphis* by Peix in 2007. At present, four subspecies affiliated to this species have been reported, which can produce colored phenazine antibiotics. Most of the strains were isolated from the rhizosphere of plants, which play a protective role in plants against the infection of pathogens and nematodes. In this paper, based on the genomic and functional analysis of a new obtained *Pseudomonas chlororaphis* strain by our group and related literatures, we systematically summarized the taxonomic characteristics, genomic characteristics, functions of metabolites, and application prospects of *Pseudomonas chlororaphis*. This review will provide reference for the discovery of active metabolites, gene function research and agricultural application of *Pseudomonas chlororaphis* strains in the future.

Keywords: *Pseudomonas chlororaphis*; biological control; secondary metabolites; agricultural application

土壤环境一直被视为微生物资源开发的天然宝库, 土壤中存在很多具有促进植物生长、抑制植物病原菌活性的微生物^[1]。这些具有生防功能的根际促生菌, 在维持植物正常生长、抵抗病原生物等方面发挥了至关重要的作用。假单胞菌(*Pseudomonas*)作为普通生境优势细菌属之一, 广泛活跃于植物周围(包括植物根际与叶面), 其属内很多菌株为植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR), 这些菌株定殖于植物根际, 帮助植物抵御病害并促进植物的生长^[2-3]。作为生防领域最具应用潜力的菌株, 假单胞菌属主要从以下 3 个方面发挥其生防功能: (1) 合成抗生素抑制病原生物。生防假单胞菌可分泌多种类型的抗生素, 其代表为吩嗪类抗生素, 如吩嗪-1-羧酸(phenazine-1-carboxylic acid, PCA)、绿脓菌素(pyocyanin, PYO)等^[3,4]; (2) 部分假单胞菌具有合成和分泌铁载体能力, 可将土壤中的 Fe^{3+} 转化成为可被细胞吸收的 Fe^{2+} 的形式, 以促进植物生长。另外, 菌株可以通过对铁元素竞争, 从而抑制病原菌生长^[2,4]。(3) 存在诱导因子, 诱导植物产生系统抗性(induced systemic resistance, ISR)。如荧光假单胞菌 WCS358 存在多个诱导因子, 均能使拟南芥产生 ISR^[2,5-6]。

绿针假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)是公认的环境友好型植物促生菌, 该菌株分布范围广, 对生态环境具有较强适应能力。大多数绿针假单胞菌是从植物根际分离获得, 菌株的代谢产物对植物具有一定的保护作用, 具有生防的潜力与应用前景, 因此该菌株获得生防领域的广泛关注^[7-8]。本文拟在绿针假单胞菌分类学特征、活性代谢产物、菌株生防功能的基础上, 发掘其农业上的开发应用前景, 结合目前实验室的科学方法和技术, 为进一步揭示其基因功能和调控机理提供借鉴。

1 绿针假单胞菌的分类地位与基本特征

19 世纪初, Miguela 首次分离获得绿针假单胞菌, 并将其鉴定为假单胞菌^[8]。绿针假单胞菌的分类鉴定较为复杂。起初, 菌株 *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas aureofaciens* 和 *Pseudomonas aurantiaca* 均被认为是假单胞菌属中独立的种。直到 1989 年, Johnson 和 Palleroni 基于 DNA 同源性及其表型等特点, 提议将 *P. aureofaciens* 作为 *P. chlororaphis* 同种异型菌株^[9]。2005 年, 在第二版的伯杰氏系统细菌学手册中 Palleroni 等将 *P. aureofaciens*

和 *P. chlororaphis* 合并为 *P. chlororaphis*, 但此时 *P. aurantiaca* 仍然被许多研究者作为独立的种在使用^[9-11]。2007年, Peix 等基于菌株的表型特征及分子生物学的相关数据, 将绿针假单胞菌的相关菌株重新分类, 将其命名为 *P. chlororaphis*, 并包含 3 个亚种, 分别为 *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*、*P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* 和 *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*^[10] (图 1)。2010年, 绿针假单胞菌增加一个新的分支——绿针假单胞菌双鱼亚种 (*P. chlororaphis* subsp. *piscium*)^[12-13], 该菌株分离自鱼的肠道内。之前研究较多的、分离自番茄根际的菌株 PCL1391, 也属于该亚种^[8]。

本实验室之前在番茄根际土壤中分离获得

菌株 SPS-41, 经 16S rRNA 测序比对, 鉴定为绿针假单胞菌致金色亚种 *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41^[14] (图 1), 该菌株可产生挥发性物质抑制黑斑病病菌的生长, 并对秀丽隐杆线虫具有高效毒杀活性^[14-15]。

绿针假单胞菌是革兰氏阴性菌, 好氧, 可运动, 菌体呈绿色、黄色或橙色的 γ 变形菌纲^[8]。典型的绿针假单胞菌株具有定殖于植物的能力, 并具有抑制植物病原菌的活性^[1]。Peix 等也讨论了绿针假单胞菌亚种之间的一些可变表型, 比如潜在的反硝化能力, 以阿拉伯糖或葡萄糖酸盐作为碳源的潜能^[10,13]。绿针假单胞菌在营养丰富的培养基上生长时, 不同亚种之间存在一些可视的识别特征即色素, 这些

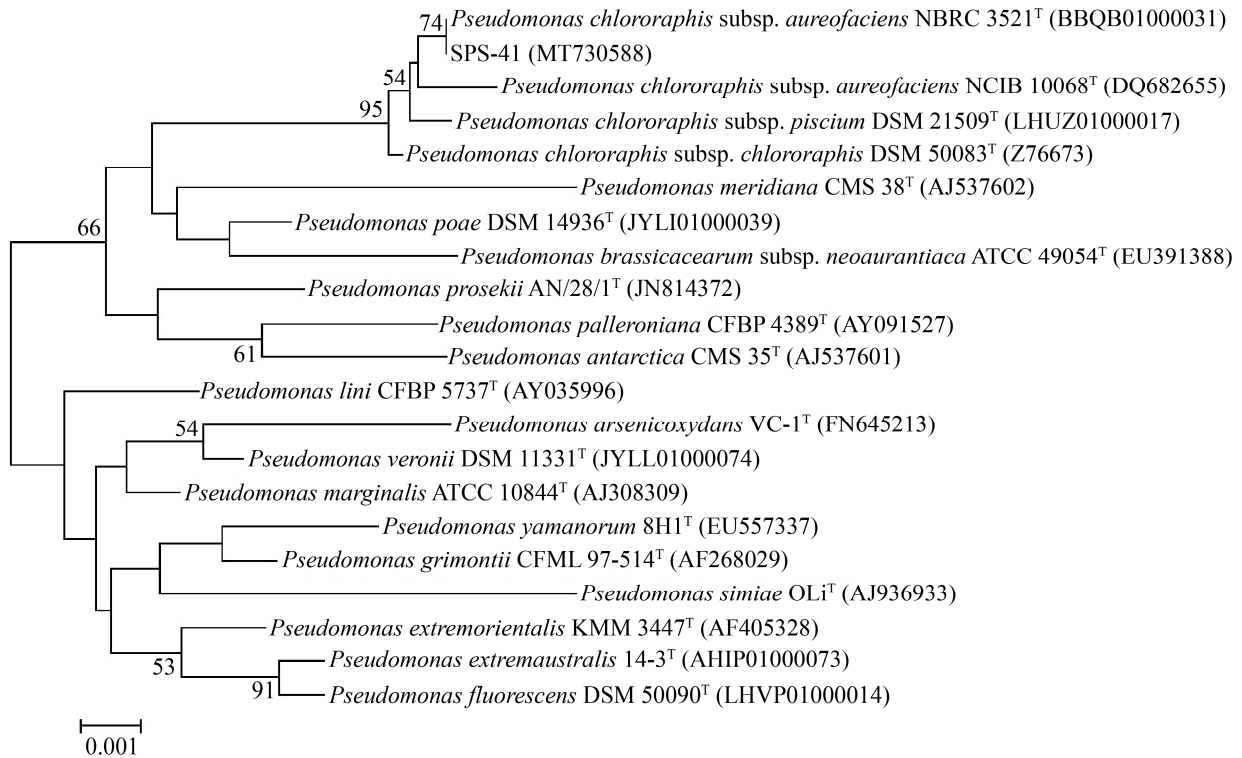


图 1 基于 16S rRNA 基因构建的绿针假单胞菌系统发育进化树^[14]

Figure 1 A maximum-likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences showing the position of strain SPS-41 among members of the genus *Pseudomonas*^[14]. Only values >50% are shown in the tree. Bar, 0.001 changes per nucleotide position.

色素的产生与绿针假单胞菌产生的抗真菌类物质吩嗪(phenazines)有关。菌株 SPS-41 产生的次级代谢产物主要介导了对病原生物的拮抗作用, 这些次级代谢产物是受双组分调控体系 GacS-GacA 调节^[1]。

2 绿针假单胞菌的活性代谢产物研究

2.1 绿针假单胞菌产生的抗生素

绿针假单胞菌可以合成多种拮抗病原菌的抗生素(吩嗪衍生物、HCN、铁载体等), 而这些代谢产物的特性决定了绿针假单胞菌的生防潜质及应用前景。绿针假单胞菌可产生特征性色素, 其中 *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* 呈现出绿色, *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 产生金黄色色素, *P. chlororaphis* subsp.

aurantiaca 呈现出橙色, *P. chlororaphis* subsp. *piscium* 可产生绿色与橙色 2 种色素。在产生抗生素的种类方面, 不同的亚种之间也有明显的区别, *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 和 *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* 产生的抗生素种类类似, 主要有吩嗪-1-羧酸、2-羟基-吩嗪-1-羧酸(2-hydroxy phenazine 1-carboxylic acid, 2-OH PCA)、硝吡咯菌素(pyrrrolnitrin, Prn)、2-hexyl、5-propylresorcinol^[16]; *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* 产生的抗生素主要有吩嗪-1-甲酰胺(phenazine 1-carboxamide, PCN)、吩嗪-1-羧酸、2-羟基-吩嗪-1-羧酸、硝吡咯菌素、2-hexyl、5-propylresorcinol^[17]; *P. chlororaphis* subsp. *piscium* 产生的抗生素种类相对较少, 主要为吩嗪-1-甲酰胺和吩嗪-1-羧酸(表 1)。

表 1 绿针假单胞菌产生的主要活性代谢产物

Table 1 Bioactive metabolites produced by *Pseudomonas chlororaphis* strains

Bioactive metabolites	Pa	Pe	Pc	Pp
Pigment				
Green (chlororaphin)	NR	NR	+	+
Orange (phenazine 1-carboxylate)	+	+	NR	+
Antibiotics				
Phenazine 1-carboxamide (PCN)	-	-	+	+
Phenazine 1-carboxylic acid (PCA)	+	+	+	+
2-hydroxy phenazine 1-carboxylic acid (2-OH PCA)	+	+	+	NR
Pyrrrolnitrin (Prn)	+	+	+	NR
2-hexyl, 5-propylresorcinol	+	+	+	NR
Volatile organic compounds				
2,3-butanediol	+	+	+	NR
Hydrogen cyanide	+	+	+	+
The type strain	NCIMB 10068 ^T (=ATCC 33663 ^T = CIP106718 ^T)	DSM 6698 ^T (=ATCC 13985 ^T =NCIMB 9030 ^T)	DSM 50083 ^T (=ATCC 9446 ^T = NCIMB 9392 ^T)	NCIMB 14478 ^T = DSM 21509 ^T
References	[1,8]	[1,7-8]	[1,8,10]	[1,8,10,13]

* Reference strains published are included. Pa: *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca*; Pe: *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens*; Pc: *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis*; Pp: *P. chlororaphis* subsp. *piscium*. +: positive; -: negative; NR: no reported.

2.2 吩嗪类化合物的特点和功能

自然界中, 天然的吩嗪化合物为色彩丰富的含氮次生代谢产物, 合成于细胞生长的稳定期, 这类化合物对植物细胞的生长发育无显著影响, 但本身具有广谱抗菌性, 可用于防治植物真菌性病害^[18-19]。有研究表明, 产吩嗪类化合物的微生物对环境具有更好的适应性。绿针假单胞菌在富营养的培养基上生长时, 可产生色素, 这也是分离鉴定该菌种的一个标志性特征, 而这种色素的产生主要归因于该种菌株产生三环含氮物质——吩嗪, 吩嗪具有抗菌的功能, 能影响细胞的信号^[20]。假单胞菌是最早被发现的吩嗪类物质产生菌, 在很长一段时间内, 假单胞菌被认为是唯一产生天然吩嗪类化合物的菌属, 其中荧光假单胞菌通常只合成一种吩嗪类化合物(吩嗪-1-羧酸), 而其他的假单胞菌则可以产生 2 种或以上的吩嗪类物质^[3,21-22]。绿针假单胞菌株 PCL1319、GP72 和 HT66 等, 均可高效合成吩嗪类化合物。吩嗪类化合物在菌株与植物互作过程中发挥了重要的作用^[20]。例如菌株 PCL1319 产生的吩嗪对尖孢镰刀菌具有较高的抗真菌活性^[23]。吩嗪类化合物作为高效的抗菌剂, 对环境友好, 具有良好的农业应用与开发前景。

假单胞菌合成的吩嗪化合物主要具有 3 种功能: (1) 抑制植物病原微生物和线虫的侵染, 保护植物^[3]; (2) 菌株在产生吩嗪类化合物和形成生物膜过程中, 可促使植物的根际分泌可被菌体利用的营养物质, 二者互利共生^[3]; (3) 可诱导番茄和大豆等植物的系统抗性。此外, 吩嗪类化合物还能够改变环境的理化性质^[3,24]。

2.3 硝吡咯菌素和间苯二酚的抗菌作用

除吩嗪之外, 绿针假单胞菌还可以产生其他代谢产物帮助植物抵抗微生物病原菌, 如: 硝吡咯菌素和间苯二酚^[7], 这些物质在植物本

身的抗病体系中发挥了重要的作用。硝吡咯菌素是含有吡咯环的化合物, 对多种真菌具有抑制作用, 这一类抗生素在人类医药和农用杀菌剂领域都有商业化应用^[25]。菌株 PCL 1606 虽然也能产生吩嗪, 但是其产生的 2-hexyl-5-propyl resorcinol 是防治鳄梨白腐病的关键物质。而绿针假单胞菌 PA23 产生的吡咯硝酸盐是其控制油菜白腐病的主要抗菌物质, 而非吩嗪。菌株 G05 产生的吡咯硝酸盐是抑制赤霉病菌的主要代谢产物^[26]。因此, 硝吡咯菌素和间苯二酚在绿针假单胞菌协助植物抵抗病原菌的过程中也发挥了重要的作用。

2.4 氰化氢的杀虫功能

绿针假单胞菌能够产生氰化氢(HCN)—由甘氨酸组成的一种简单的水溶性挥发物质。绿针假单胞菌 PA23 的杀线虫活性与其产生的硝吡咯菌素和氰化氢均有着密切的关系^[27]。另外, Zhai 等对绿针假单胞菌 PCL1391 的研究显示, 氰化氢是该菌株毒杀线虫幼虫的关键组分, 而非吩嗪或吡咯菌素^[28], 绿针假单胞菌株 O6 产生的氰化氢可导致线虫^[29]和蚜虫细胞死亡^[30]。

2.5 挥发性有机物(volatile organic compounds, VOCs)的生防功能

目前, 微生物产生的挥发性有机物的功能研究吸引了很多学者的关注, 研究表明挥发性有机物可以通过长距离扩散从而保护植物。由于微生物代谢的多功能性, 一些自然界中原本不存在的挥发性物质, 很可能在微生物生长的过程中被释放出来, 从而具有一些特殊的功能。已有报道绿针假单胞菌可产生挥发性物质帮助植物抵抗病原菌, 例如, 致金色绿针假单胞菌 SPS-41 可以产生挥发性物质 2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇和苯乙醇, 对甘薯黑斑病菌有抑制作用, 该菌株产生的挥发性物质辛酸乙酯对秀丽隐杆线虫 *C. elegans* 具有高效毒杀作

用^[14-15]。绿针假单胞菌 O6 和 KNU17PcI 可以产生碳氢化合物和十一烷；在菌株 O6 和 M71 的代谢产物中，也检测到了含硫的化合物组分，例如硫化氢、二甲基硫醚和甲硫醇等^[31]。这些代谢物一方面可能直接抑制植物病原菌，另一方面可能与诱导植物防御反应有关。在微生物定殖于植物或其他寄主的条件下，产生的多种挥发性有机物，可以建立一种信号或一种鸡尾酒式的 VOC 混合物的作用模式，对于进一步研究绿针假单胞菌的生防机制具有深层次的意义。

3 绿针假单胞菌基因组与功能基因簇研究

绿针假单胞菌作为根际共生细菌，其能影响植物生长，并在控制植物病害和提高作物产量等方面具有广阔的应用前景，因而对于该菌株的研究也逐步深入。绿针假单胞菌的主要研究方向包括菌株产活性物质的分离筛选、代谢途径的研究、菌株生物膜的形成、群体感应体系、双组分调节系统，而这一系列的研究都与菌株的基因组学关系紧密，基因组学的研究也成为构建该菌株基因资源库的理论支撑。近年来，绿针假单胞菌基因组数据不断完善，为该菌株的基因组改造的实施奠定了基础^[16]。

本实验室筛选获得的菌株 SPS-41，已测得全

基因组序列。菌株 SPS-41 基因组为 6 757 898 bp，GC 含量为 63.10%，包括 5 951 个编码基因，67 个 tRNA 基因，16 个 rRNA 基因，该基因组结果显示，其包含有吩嗪化合物及铁载体合成的基因簇，具有开发应用的潜能^[32]。比较了本实验室的基因组数据与之前已报道的绿针假单胞菌基因组数据，总结了 10 株绿针假单胞菌的基因组普遍特征(表 2)，从这些数据中可以看出，绿针假单胞菌的基因组大小约 6.37–7.30 Mb，其 GC 含量为 60.50%–64.01%，其基因组中 rRNA 基因为 5–19 个，tRNA 基因 57–71 个，编码蛋白的基因 5 473–6 455 个。之前有研究报道，对已经测序的 46 株绿针假单胞菌进行泛基因组分析，分析结果显示绿针假单胞菌的 4 个亚种都可以产生吡咯菌素和绿脓菌素^[33]。在次级代谢产物合成基因簇预测中，共发掘 27 类、643 个基因簇，其中 4 个亚种共有的次级代谢基因簇有 10 种，4 个亚种均能够分泌细菌素、吩嗪、铁载体、丁内酯等。*P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* 特有的基因簇类型有 6 个，这也说明该亚种具有分泌更多的其他潜在生物活性物质的潜能^[33]。

菌株 SPS-41 的基因组分析显示，该菌株同其他绿针假单胞菌一样，具有产生多种代谢产物途径的相关基因簇，比如吩嗪类化合物产生的相关基因簇、铁载体的相关基因簇、调节这

表 2 绿针假单胞菌菌株基因组特征

Table 2 General features of *P. chlororaphis* strains

Features	HT66	GP72	30-84	O6	PCL1606	PCL1601	UFB2	189	Lzh-T5	SPS-41
Genome size/Mb	7.30	6.66	6.67	6.89	6.66	6.76	6.36	6.84	6.83	6.76
G + C/%	62.60	62.89	62.90	62.80	64.01	64.00	62.03	62.74	63.06	63.10
rRNAs	12	7	19	10	16	17	5	16	16	16
tRNAs	57	61	69	60	71	68	65	71	67	67
Protein-coding genes	6 455	6 091	5 869	6 236	6 107	5 897	5 473	5 934	6 116	5 951
Other RNA genes	78	20	68	72	70	–	12	–	–	–
References	[21]	[21]	[21]	[21]	[33]	[43]	[44]	[45]	[46]	[32]

–: negative.

些代谢产物的双组分调控体系(GacS-GacA)、QS 群体感应(quorum sensing)体系等,这些基因簇与绿针假单胞菌定殖根际,并具有显著的生防功能有着密切的联系。在菌株 HT66 中,基因 *psrA* 和 *rpeA* 的失活,会导致吩嗪-1-甲酰胺产量的增加,显示了 *psrA* 和 *rpeA* 在吩嗪-1-甲酰胺生物合成过程中具有抑制作用^[34]。

双组分调控体系(two-component regulatory system, TCS),是存在于细菌内的信号转导系统,细菌通过感知环境信号,从而调控细菌产生相应应答机制^[35]。GacS/GacA 双组分信号转导系统普遍存在于革兰氏阴性细菌中,主要由感应激酶(GacS)和反应调控子(GacA)组成,其中 GacA 具有高度保守性,但 Gac 系统调控的功能随着菌属、菌株生长环境的不同,都表现出明显的差异性^[36]。在 *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* G5 中,基因 *gacA* 突变导致菌株 N 酰化高丝氨酸内酯(N-acylhomoserine lactones, AHLs)和吩嗪的产生出现缺陷^[37]。菌株 30-84 中,基因 *gacA* 的突变导致吩嗪合成的相关基因显著下调^[38],而在其他一些绿针假单胞菌中,*gacA* 突变同样会导致一些生物因子,比如吩嗪、氰化氢和抗真菌活性物质的产生出现缺陷^[37],这也说明双组分调控系统在绿针假单胞中调节其次生代谢产物的产生。

QS 群体感应体系是一种参与绿针假单胞菌生物学行为的调控系统,与生物膜的形成、抗菌物质及一些胞外酶的分泌密切相关。QS 是一种细胞间信号传导机制,通过分泌可扩散的信号分子使细菌群体产生协同行为。在植物益生菌菌株中,参与合成吩嗪基础环结构形成的基因簇(*phzA*, *phzB*, *phzC*, *phzD*...*phzG*)和基因顺序是高度保守的,而这些基因是受上游的调节基因(如 *phzI* 和 *phzR*)调节^[20]。菌株 30-84 通过 QS 体系:*phzR/phzI* 调节抗生素吩嗪-1-羧酸、

2-羟基-吩嗪-1-羧酸,和 2-羟基-吩嗪的产生^[39],在绿针假单胞菌 M71 中, QS 体系通过激活操纵子 *phz* 的表达,从而调节吩嗪的合成^[40-41]。无论是双组分调控体系,还是 QS 群体感应体系,都与菌株定殖生长及活性代谢物的产生具有密切的关系,而绿针假单胞菌基因组的研究为其抗菌抗病机制的研究提供依据,也为农业生防技术的管理与发展提供新的切入点。

4 绿针假单胞菌的应用研究现状

绿针假单胞菌可以合成多种抗生素,具有抵抗病原生物的作用,绿针假单胞菌还具有较强的植物根际促生能力,使其在农业和园艺领域得以广泛应用^[47]。绿针假单胞菌对多种植物有防病促生作用^[48],能增强植物的抗逆性^[49-50]、对环境友好、对生物无致病性^[51]。例如,防治番茄枯萎病^[52]、烟草疫霉病^[53]、辣椒疫霉病^[54]、柏树溃疡病^[48]和豆类炭疽病^[55]等,同时对几种农业重要病原细菌有明显的抑制作用,如莱壳伯克霍尔德菌(*Burkholderia glumae*)、解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)、密执安棒杆菌(*Clavibacter michiganensis*)、胡萝卜果胶杆菌(*Pectobacterium carotovora*)、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)等^[56]。

绿针假单胞菌中的很多菌株已被广泛且深入研究。菌株 30-84 可合成吩嗪-1-羧酸、2-羟基-吩嗪-1-羧酸和 2-羟基-吩嗪等抗生素,可以有效抑制小麦全蚀病^[57]。而菌株 PCL1391 合成吩嗪-1-羧酸和吩嗪-1-甲酰胺,可有效抑制番茄病原菌尖孢镰刀菌和可可棕榈病原菌群结腐霉^[58]。菌株 O6 能合成藤黄绿菌素、吩嗪-1-羧酸、2-羟基-吩嗪-1-羧酸和 2-羟基-吩嗪等物质抑制病原菌,同时可以诱导系统抗性,维持烟草叶和黄瓜叶的健康生长^[59]。菌株 GP72 可以

合成吩嗪-1-羧酸、2-羟基-吩嗪-1-羧酸和 2-羟基-吩嗪 3 种吩嗪化合物。菌株 PA23 产生的硝吡咯菌素和氰化氢具有杀线虫活性^[27]。菌株 SPS-41 产生的挥发性有机物辛酸乙酯和乙酸乙酯等具有高效的杀线虫活性^[14]。

绿针假单胞菌产生的代谢产物具有多样性，而其作为根际细菌具有防治病原菌、杀虫等功效，其产生的挥发性物质在果蔬采后的保存过程中，也具有重要作用^[15]，菌株 SPS-41 产生的挥发性气体 3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇和苯乙醇对甘薯黑斑病病菌有显著的拮抗作用，克服了化学农药在防治甘薯采后黑斑病中存在的污染环境、毒素残留、威胁人类健康、催生抗药菌等问题，在果蔬的采后保存中具有潜在的应用价值^[15,60]。

根际细菌可以通过产生或降解植物激素，从而影响植物的生长发育。*P. chlororaphis* GP72 和 O6 可以通过 3-吡啶乙酰胺途径，合成吡啶乙酸，从而促进植物生长^[21]。本实验室分离获得的菌株 SPS-41 具有明显的促进植物生长的作用(结果未发表)。除此之外，绿针假单胞菌还可以产生 3-羟基苯甲酸酯(3-hydroxybenzoate)，而羟基苯甲酸及其衍生物广泛应用于食品、药物、化妆品等领域，用于防腐保鲜，或作为单体合成生物活性化合物^[61-63]，绿针假单胞菌也可降解芳香族化合物^[64]，因此，绿针假单胞菌在工业生产上也具有广阔的应用价值。

5 结语和展望

绿针假单胞菌作为生防细菌资源应用在农业及食品业具有显著的优势。一方面，绿针假单胞菌来源方便，广泛分布于普通土壤环境及植物根际；另一方面，这类菌株是环境友好型微生物，菌株无毒性无污染，不会对人体造成伤害，也不会污染环境，应用于农业及食品业

具有安全性。美国环保局认证了绿针假单胞菌为非人体、野生动物及环境病原菌，部分相关的商业产品已经应用^[1]。除此之外，绿针假单胞菌可分泌抗生素和铁载体，并且在特定的环境下可以诱导系统抗性以及促进植物生长，这些优势都为绿针假单胞菌的广泛应用奠定了基础。

目前，国际上研究报道较多的是利用绿针假单胞菌防治真菌和卵菌病害。绿针假单胞菌在生防制剂的商业应用主要包括代谢产物的应用和菌株细胞的应用。在代谢产物应用方面，绿针假单胞菌基因组学、转录组及代谢组学的研究成果，为该菌的基因修饰从而高效产生特定代谢产物提供了理论依据。绿针假单胞菌的基因组学分析显示，4 个亚种共挖掘到 27 类、643 个基因簇，而 4 个亚种共同的基因簇只有 10 个，说明绿针假单胞菌中还有大量未开发的次级代谢产物。绿针假单胞菌可产生多种高效抗生素抑制病原生物，产生吡啶乙酸促进植物生长，产生应用于食品工业的羟基苯甲酸及其衍生物，这些都是可以进一步发掘的资源。针对不同的需求，可通过对菌株的代谢途径进行合理设计和遗传学修饰，改造细胞特性从而应用于实际生产中。该菌在代谢产物方面的应用潜力，可以从以下几个方向深入发掘：(1) 通过分离代谢产物，发掘其产生的功能型抗生素；(2) 高通量筛选抗生素高产菌株，为菌株的生防和工业应用提供资源；(3) 以最小基因组方法，设计工程菌株，从而在节省资源的基础上并高效获得代谢产物；(4) 克隆表达抗生素合成的基因簇，构建工业生产菌株，高效表达抗生素。

菌株细胞主要可应用于农业，作为生防制剂使用，以达到对植物的抗病促生作用，同时克服了化学农药的弊端，从而成为真正的绿色农药。在生物防治领域，绿针假单胞菌代谢产

物具有多样性, 可高效合成吩嗪、氢化氰及挥发性有机化合物, 对病原微生物、昆虫和线虫具有拮抗作用; 菌株本身可形成生物膜, 有利于其在植物根际的定殖, 发挥促生防病功能。总之, 绿针假单胞菌具有的促进植物生长、生物防治病虫害, 以及产生丰富活性次生代谢产物的能力, 使其在农业应用上具有较好的开发前景。

参考文献

- [1] Arrebola E, Tienda S, Vida C, de Vicente A, Cazorla FM. Fitness features involved in the biocontrol interaction of *Pseudomonas chlororaphis* with host plants: the case study of PcPCL1606. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 719.
- [2] Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, Van Der Voort M, Schneider JHM, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PAHM, Raaijmakers JM. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 2011, 332(6033): 1097–1100.
- [3] 刘洋. 高产吩嗪化合物绿针假单胞菌HT66的异常表型变异株研究及 2-羟基—吩嗪高产菌株的高通量筛选方法构建. 上海交通大学博士学位论文, 2018.
- [4] Duijff BJ, Bakker PAHM, Schippers B. Ferric pseudobactin 358 as an iron source for carnation. *Journal of Plant Nutrition*, 1994, 17(12): 2069–2078.
- [5] van Peer R. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of *Fusarium* wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*, 1991, 81(7): 728.
- [6] Meziane H, VAN DER Sluis I, VAN Loon LC, Höfte M, Bakker PA. Determinants of *Pseudomonas putida* WCS358 involved in inducing systemic resistance in plants. *Molecular Plant Pathology*, 2005, 6(2): 177–185.
- [7] Biessy A, Novinscak A, Blom J, Léger G, Thomashow LS, Cazorla FM, Josic D, Filion M. Diversity of phytobeneficial traits revealed by whole-genome analysis of worldwide-isolated phenazine-producing *Pseudomonas* spp.. *Environmental Microbiology*, 2019, 21(1): 437–455.
- [8] Anderson AJ, Kim YC. Insights into plant-beneficial traits of probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 2020, 69(3): 361–371.
- [9] Johnson JL, Palleroni NJ. Deoxyribonucleic acid similarities among *Pseudomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1989, 39(3): 230–235.
- [10] Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, Ramírez-Bahena MH, Mateos PF, Santa-Regina I, Rodríguez-Barrueco C, Martínez-Molina E, Velázquez E. Reclassification of *Pseudomonas aurantiaca* as a synonym of *Pseudomonas chlororaphis* and proposal of three subspecies, *P. chlororaphis* subsp. *chlororaphis* subsp. nov., *P. chlororaphis* subsp. *aureofaciens* subsp. nov., comb. nov. and *P. chlororaphis* subsp. *aurantiaca* subsp. nov., comb. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(6): 1286–1290.
- [11] Palleroni NJ. The *Pseudomonas* story. *Environmental Microbiology*, 2010, 12(6): 1377–1383.
- [12] Al Baki MA, Jung JK, Maharjan R, Yi H, Ahn JJ, Gu XJ, Kim Y. Application of insulin signaling to predict insect growth rate in *Maruca vitrata* (Lepidoptera: Crambidae). *PLoS ONE*, 2018, 13(10): e0204935.
- [13] Burr SE, Gobeli S, Kuhnert P, Goldschmidt-Clermont E, Frey J. *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *piscium* subsp. nov., isolated from freshwater fish. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(12): 2753–2757.
- [14] Zhang CM, Xu MJ, Gong Y, Li XW, Huang JJ, Zhou SF, Xing K, Qin S. Identification and characterization of nematicidal activity of organic volatiles from a *Pseudomonad* rhizobacterium. *Rhizosphere*, 2020, 16: 100244.
- [15] Zhang Y, Li TJ, Liu YF, Li XY, Zhang CM, Feng ZZ, Peng X, Li ZY, Qin S, Xing K. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 as biological fumigants to control *Ceratocystis fimbriata* in postharvest sweet potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(13): 3702–3710.
- [16] 沈雪梅. 根际促生假单胞菌的比较基因组学研究及绿针假单胞菌优势小基因组菌株的构建. 上海交通大学博士学位论文, 2016.
- [17] 张力群, 张俊威. 假单胞菌产物的抗生素. *中国生物防治学报*, 2015, 31(5): 750–756. Zhang LQ, Zhang JW. Antibiotics produced by *Pseudomonas* spp.. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31(5): 750–756. (in Chinese)

- [18] Mavrodi DV, Parejko JA, Mavrodi OV, Kwak YS, Weller DM, Blankenfeldt W, Thomashow LS. Recent insights into the diversity, frequency and ecological roles of phenazines in fluorescent *Pseudomonas* spp.. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(3): 675–686.
- [19] Pierson LS, Pierson EA. Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 86(6): 1659–1670.
- [20] Biessy A, Fillion M. Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(11): 3905–3917.
- [21] Chen YW, Shen XM, Peng HS, Hu HB, Wang W, Zhang XH. Comparative genomic analysis and phenazine production of *Pseudomonas chlororaphis*, a plant growth-promoting rhizobacterium. *Genomics Data*, 2015, 4: 33–42.
- [22] Shen XM, Hu HB, Peng HS, Wang W, Zhang XH. Comparative genomic analysis of four representative plant growth-promoting rhizobacteria in *Pseudomonas*. *BMC Genomics*, 2013, 14: 271.
- [23] Chin-A-woeng TF, Bloemberg GV, Mulders IH, Dekkers LC, Lugtenberg BJ. Root colonization by phenazine-1-carboxamide-producing bacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 is essential for biocontrol of tomato foot and root rot. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(12): 1340–1345.
- [24] O'Malley YQ, Reszka KJ, Spitz DR, Denning GM, Britigan BE. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin directly oxidizes glutathione and decreases its levels in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2004, 287(1): L94–L103.
- [25] Ligon JM, Hill DS, Hammer PE, Torkewitz NR, Hofmann D, Kempf HJ, Pée KHV. Natural products with antifungal activity from *Pseudomonas* biocontrol bacteria. *Pest Management Science*, 2000, 56(8): 688–695.
- [26] Huang R, Feng ZB, Chi XY, Sun XQ, Lu Y, Zhang BS, Lu RY, Luo WT, Wang YH, Miao J, Ge YH. Pyrrolnitrin is more essential than phenazines for *Pseudomonas chlororaphis* G05 in its suppression of *Fusarium graminearum*. *Microbiological Research*, 2018, 215: 55–64.
- [27] Nandi M, Selin C, Brassinga AKC, Belmonte MF, Fernando WGD, Loewen PC, de Kievit TR. Pyrrolnitrin and hydrogen cyanide production by *Pseudomonas chlororaphis* strain PA23 exhibits nematocidal and repellent activity against *Caenorhabditis elegans*. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0123184.
- [28] Zhai YL, Shao ZZ, Cai MM, Zheng LY, Li GY, Huang D, Cheng WL, Thomashow LS, Weller DM, Yu ZN, Zhang JB. Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from Antarctic soil against *Meloidogyne incognita*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 253.
- [29] Kang BR, Anderson AJ, Kim YC. Hydrogen cyanide produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6 exhibits nematocidal activity against *Meloidogyne hapla*. *The Plant Pathology Journal*, 2018, 34(1): 35–43.
- [30] Kang BR, Anderson AJ, Kim YC. Hydrogen cyanide produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6 is a key aphicidal metabolite. *Canadian Journal of Microbiology*, 2019, 65(3): 185–190.
- [31] Tägele SB, Lee HG, Kim SW, Lee YS. Phenazine and 1-undecene producing *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aurantiaca* strain KNU17Pc1 for growth promotion and disease suppression in Korean maize cultivars. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 29(1): 66–78.
- [32] Zhang CM, Xu MJ, Li XW, Gong Y, Xing K, Qin S. Complete genome sequence of the biological agent *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2021, 34(7): 839–841.
- [33] 肖蓉, 邓舒, 张春芬, 曹秋芬. 绿针假单胞菌泛基因组分析及次级代谢通路挖掘. *山西农业科学*, 2020, 48(11): 1711–1717.
- Xiao R, Deng S, Zhang CF, Cao QF. Pan-genome analysis and secondary metabolic pathway mining of *Pseudomonas chlororaphis*. *Journal of Shanxi Agricultural Sciences*, 2020, 48(11): 1711–1717. (in Chinese)
- [34] Peng HS, Zhang PY, Bilal M, Wang W, Hu HB, Zhang XH. Enhanced biosynthesis of phenazine-1-carboxamide by engineered *Pseudomonas chlororaphis* HT66. *Microbial Cell Factories*, 2018, 17(1): 117.
- [35] 郎晨晓, 罗欣, 朱立贤, 张一敏, 韩广星, 董鹏程. 双组分调控系统及其对细菌诱导性耐酸响应调控机理的研究进展. *食品科学*, 2019, 40(15): 359–366.
- Lang CX, Luo X, Zhu LX, Zhang YM, Han GX, Dong PC. Two-component regulatory system and its mechanism of action in regulating bacterial acid

- tolerance response: a review. *Food Science*, 2019, 40(15): 359–366. (in Chinese)
- [36] 李军. 比较蛋白组学解析绿针假单胞菌 G5 菌株 GacA 功能. 江苏大学博士学位论文, 2016
- [37] Li J, Yang Y, Dubern JF, Li H, Halliday N, Chernin L, Gao KX, Cámara M, Liu XG. Regulation of GacA in *Pseudomonas chlororaphis* strains shows a niche specificity. *PLoS ONE*, 2015, 10(9): e0137553.
- [38] Wang DP, Lee SH, Seeve C, Yu JM, Pierson III LS, Pierson EA. Roles of the Gac-Rsm pathway in the regulation of phenazine biosynthesis in *Pseudomonas chlororaphis* 30–84. *MicrobiologyOpen*, 2013, 2(3): 505–524.
- [39] Maddula VSRK, Zhang Z, Pierson EA, Pierson LS. Quorum sensing and phenazines are involved in biofilm formation by *Pseudomonas chlororaphis* (*aureofaciens*) strain 30–84. *Microbial Ecology*, 2006, 52(2): 289–301.
- [40] Arseneault T, Filion M. Phenazine-producing *Pseudomonas* spp. as biocontrol agents of plant pathogens. *Microbial Inoculants in Sustainable Agricultural Productivity*. New Delhi: Springer India, 2016: 53–68.
- [41] Raio A, Brilli F, Baraldi R, Neri L, Puopolo G. Impact of spontaneous mutations on physiological traits and biocontrol activity of *Pseudomonas chlororaphis* M71. *Microbiological Research*, 2020, 239: 126517.
- [42] Calderón CE, Ramos C, de Vicente A, Cazorla FM. Comparative genomic analysis of *Pseudomonas chlororaphis* PCL1606 reveals new insight into antifungal compounds involved in biocontrol. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(3): 249–260.
- [43] Vida C, de Vicente A, Cazorla FM. Draft genome sequence of the rhizobacterium *Pseudomonas chlororaphis* PCL1601, displaying biocontrol against soilborne phytopathogens. *Genome Announcements*, 2017, 5(14): e00130-17.
- [44] Deng P, Wang XQ, Baird SM, Lu SE. Complete genome of *Pseudomonas chlororaphis* strain UFB2, a soil bacterium with antibacterial activity against bacterial canker pathogen of tomato. *Standards in Genomic Sciences*, 2015, 10: 117.
- [45] Town J, Audy P, Boyetchko SM, Dumonceaux TJ. Genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* strain 189. *Genome Announcements*, 2016, 4(3): e00581-16.
- [46] Li ZH, Li XM, Zeng QC, Chen M, Liu D, Wang JH, Shen L, Song F. Genome sequence of *Pseudomonas chlororaphis* lzh-T5, a plant growth-promoting rhizobacterium with antimicrobial activity. *Genome Announcements*, 2018, 6(18): e00328-18.
- [47] Paulitz TC, Bélanger RR. Biological control in greenhouse systems. *Annual Review of Phytopathology*, 2001, 39(1): 103–133.
- [48] Raio A, Puopolo G, Cimmino A, Danti R, Della Rocca G, Evidente A. Biocontrol of cypress canker by the phenazine producer *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* strain M71. *Biological Control*, 2011, 58(2): 133–138.
- [49] Cho SM, Kang BR, Han SH, Anderson AJ, Park JY, Lee YH, Cho BH, Yang KY, Ryu CM, Kim YC. 2R, 3R-butanediol, a bacterial volatile produced by *Pseudomonas chlororaphis* O6, is involved in induction of systemic tolerance to drought in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(8): 1067–1075.
- [50] Egamberdieva D. *Pseudomonas chlororaphis*: a salt-tolerant bacterial inoculant for plant growth stimulation under saline soil conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34(2): 751–756.
- [51] Anderson JA, Staley J, Challender M, Heuton J. Safety of *Pseudomonas chlororaphis* as a gene source for genetically modified crops. *Transgenic Research*, 2018, 27: 103–113.
- [52] Puopolo G, Raio A, Pierson L, Zoina A. Selection of a new *Pseudomonas chlororaphis* strain for the biological control of *Fusarium oxysporum f.s. radicislycopersici*. *Phytopathologia Mediterranea*, 2011, 50(2): 228–235.
- [53] 王远山, 王平, 胡正嘉. 绿针假单胞菌 PL9 菌株对烟草疫霉的拮抗作用研究. 华中农业大学学报, 2002, 21(3): 248–251.
Wang YS, Wang P, Hu ZJ. Screening of rhizobacteria antagonistic to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, pathogen of disease of tobacco black shank. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2002, 21(3): 248–251. (in Chinese)
- [54] 何延静, 刘海明, 胡洪波, 许煜泉, 张雪洪, 蒋海霞. 一株拮抗辣椒疫霉的假单胞菌的分离与鉴定. 微生物学报, 2006, 46 (4): 516–521.
He YJ, Liu HM, Hu HB, Xu YQ, Zhang XH, Jiang HX. Isolation and characterization of a new *Pseudomonas* strain against *Phytophthora capsici*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2006, 46 (4): 516–521. (in Chinese)
- [55] Bardas GA, Lagopodi AL, Kadoglidou K, Tzavella-Klonari K. Biological control of three

- Colletotrichum lindemuthianum* races using *Pseudomonas chlororaphis* PCL1391 and *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Biological Control*, 2009, 49(2): 139–145.
- [56] 刘邮洲, Shi-En Lu, Sonya M. Baird, 乔俊卿, 杜艳. 绿针假单胞菌 YL-1 抗细菌活性相关基因的克隆和分析. *植物病理学报*, 2015, 45(3): 307–316.
Liu YZ, Lu SE, Baird S, Qiao JQ, Du Y. Cloning the genes of *Pseudomonas chlororaphis* YL-1 dedicated to antibacterial activities against microbial phytopathogens. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2015, 45(3): 307–316. (in Chinese)
- [57] Pierson III LS, Thomashow LS. Cloning and heterologous expression of the phenazine biosynthetic. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 1992, 5(4): 330–339.
- [58] Tambong JT, Höfte M. Phenazines are involved in biocontrol of *Pythium myriotylum* on cocoyam by *Pseudomonas aeruginosa* PNA1. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, 107(5): 511–521.
- [59] Park JY, Oh SA, Anderson AJ, Neiswender J, Kim JC, Kim YC. Production of the antifungal compounds phenazine and pyrrolnitrin from *Pseudomonas chlororaphis* O6 is differentially regulated by glucose. *Letters in Applied Microbiology*, 2011, 52(5): 532–537.
- [60] Zhang Y, Li TJ, Xu MJ, Guo JH, Zhang CM, Feng ZZ, Peng X, Li ZY, Xing K, Qin S. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas chlororaphis* subsp. *aureofaciens* SPS-41 on oxidative stress and mitochondrial dysfunction of *Ceratocystis fimbriata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2021, 173: 104777.
- [61] Wang SW, Bilal M, Hu HB, Wang W, Zhang XH. 4-hydroxybenzoic acid—a versatile platform intermediate for value-added compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(8): 3561–3571.
- [62] Shen YY, Sun F, Zhang L, Cheng YJ, Zhu HR, Wang SP, Jiao WH, Leadlay PF, Zhou YJ, Lin HW. Biosynthesis of depsipeptides with a 3-hydroxybenzoate moiety and selective anticancer activities involves a chorismatase. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(16): 5509–5518.
- [63] Wang SW, Fu C, Liu KQ, Cui JJ, Hu HB, Wang W, Zhang XH. Engineering a synthetic pathway for gentisate in *Pseudomonas chlororaphis* P3. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2021, 8: 622226.
- [64] Potrawfke T, Timmis KN, Wittich RM. Degradation of 1,2,3,4-tetrachlorobenzene by *Pseudomonas chlororaphis* RW71. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(10): 3798–3806.

(本文责编 张晓丽)