生防解淀粉芽胞杆菌的研究进展

刘昆昂，郝 楠，李海立，黄亚丽*，贾振华

（河北省科学院 生物研究所，河北 石家庄 050081）

摘 要 解淀粉芽胞杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）因能抑制植物病害和促进植物生长而被广泛研究。随着测序技术的不断发展，解淀粉芽胞杆菌菌株的全基因组序列陆续被测定，综述了其拮抗作用相关的功能基因、生防机制及植物-病原物-生防菌的相互作用，并对后续研究趋势进行了展望，为解淀粉芽胞杆菌的深入研究及其更好的应用提供理论参考

关键词 芽胞杆菌；解淀粉芽胞杆菌；生物防治；生防机制；基因组测序

中图分类号 Q78；S476 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021（2017）05-0098-005

doi：10.3969/j.issn.1005-7021.2017.05.017

Advances in *Bacillus amyloliquefaciens* for Biocontrol

LIU Kun-ang，HAO Nan，LI Hai-li，HUANG Ya-li，JIA Zhen-hua

（*Inst. of Biology，Hebei Acad. of Sci.*，*Shijiazhuang* 050081）

Abstract *Bacillus amyloliquefaciens* has been widely studied for its capability of inhibition against plant diseases and enhance plant growth. Following the development of sequencing technology，complete genome of several *B. amyloliquefaciens* strains have been sequenced. The functional genes relevant to antagonism，mechanism involved in disease control and the interaction among plant-pathogen-biocontrol organism are reviewed. Moreover，further research focuses are set forth. The review will provide theoretical references for further study and better application of *B. amyloliquefaciens*.

Keywords *Bacillus*；*Bacillus amyloliquefaciens*；biocontrol；biocontrol mechanism；genome sequencing

解淀粉芽胞杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）是一种与枯草芽胞杆菌亲缘关系很近的革兰阳性细菌，属于芽胞杆菌属（*Bacillus* sp.）[1]。因其能产生丰富的次级代谢产物，并具有广谱的抗真菌、细菌活性，多作为生防菌剂在农作物病害的防治中被广泛使用；同时又是一种植物根际促生菌，对植物的生长具有促进作用。植物根际促生菌（Plant growth-promoting rhizobacteria，PGPR）是指能够促进植物生长、防治病害、增加作物产量的根际微生物[2]。解淀粉芽胞杆菌在营养缺乏或其他逆境条件胁迫下，能够形成对高温、紫外线、干燥、电离辐射及有毒化学物质具有抗性的芽胞。通过在生长过程中与病原菌竞争营养和侵染位点、分泌抗菌物质和诱导植物产生系统抗病性来达到生物防治的目的[3]。关于解淀粉芽胞杆菌的前期研究主要集中在菌株的筛选、鉴定和抑菌物质的种类、作用、产生条件和分离纯化等方面。随着测序技术的逐渐发展，尤其是高通量测序技术的广泛应用，使利用基因组学尤其是功能基因组学，包括转录物组学、蛋白质组学、代谢物组学、比较基因组学来研究生防菌的生防机制及其调控网络成为热点[4-5]。

基金项目：河北省科学院青年创新项目（16308）；河北省科学院科技攻关项目（16304）

作者简介：刘昆昂 女，助理研究员，硕士。从事植物病害的生物防治。Tel：0311-83014618，E-mail：liukunang@163.com

* 通讯作者。女，研究员，博士，硕士生导师。从事植物病害的生物防治。E-mail：huangyali2291@163.com

收稿日期：2016-12-22

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　解淀粉芽胞杆菌的全基因组序列

1997 年 Kunst 等[6] 发布了枯草芽胞杆菌的全基因序列,这是第一个得到全基因序列的革兰阳性细菌。基因组大小为 4 214 810 bp,编码 4 100 个基因。2007 年 Chen 等[7] 发布了解淀粉芽胞杆菌 FZB42 的全基因序列,基因组大小为 3 918 589 bp,编码 3 693 个基因,G + C 的含量为 46.4%,tRNA 基因序列 89 个,rRNA 操作子 10 个,同时与其他 5 种芽胞杆菌: 枯草芽胞杆菌(*B. subtilis* 168) 、地衣芽胞杆菌(*B. licheniformis*) 、克劳氏芽胞杆菌(*B. clausii*) 、嗜碱芽胞杆菌(*B. halodurans*) 和蜡样芽胞杆菌(*B. cereus*) 的基因组序列进行了比较,发现 FZB42 有 214 个基因是其独有的,全基因组分析表明其可产生多种对有害病原菌和线虫具有抑制作用的次生代谢产物。

2　与生防作用相关的次级代谢产物的基因和基因簇

对 FZB42 基因组中与编码次级代谢产物相关的基因分析表明,代表超过 9% 基因组的 11 个基因簇都致力于合成抗菌代谢产物。这 11 种具有生防活性的次级代谢产物共分为 5 类,分别为非核糖体合成的脂肽类化合物、非核糖体合成的聚酮化合物、核糖体合成的细菌素、核糖体合成和修饰的肽以及挥发性物质[8] 。其中,以非核糖体合成的聚酮化合物、非核糖体合成的脂肽化合物和核糖体合成的细菌素为主。

2.1　非核糖体合成的聚酮化合物

解淀粉芽胞杆菌产生的非核糖体合成的聚酮化合物主要包括 Bacillaene、Macrolactin 和 Difficidin,编码这三种代谢产物的基因簇大小近 200 kb,在 FZB42 基因组编码次级代谢产物的基因中是最大的[8] 。虽然 Macrolactin 和 Bacillaene 也具有抑菌活性,但是 Difficidin 是 FZB42 中最有效的抗菌化合物。研究表明,Difficidin 在抑制引起果树火疫病的植物病原细菌 *Erwiniaamylovora* 是非常有效的[9] 。非核糖体合成的聚酮化合物是由聚酮合成酶(PKS) 催化形成的,PKS 是一类复杂的多酶体系,多以类似脂肪酸的合成形式,以脂酰 ACP 或脂酰 CoA 为底物,通过多次重复的脱羧缩合过程产生线性聚酮化合物、环状的酮内酯以及结构复杂多样的衍生物[10] 。

2.2　非核糖体合成的脂肽化合物

解淀粉芽胞杆菌产生的非核糖体合成的脂肽类化合物主要包括 Surfactin、Bacillomycin D、Fengycin 和 Bacillibactin。其中 Bacillomycin D 是由 7 个氨基酸连接到一个可变长度的 β-氨基脂肪酸链(C14-C17) 上形成的,属于伊枯草菌素家族。Surfactin 由 7 个氨基酸的 C 端与 β-羟基脂肪酸(C12-C16) 连接而成,而 Fengycin 则由 10 个氨基酸残基与 β-羟基脂肪酸链(C14-C18) 连接而成[11] 。

非核糖体合成的脂肽化合物是由非核糖体肽合成酶(NRPS) 催化合成的,NRPS 是由具有选择、激活和结合氨基酸的重复设置的结构域等多个模块组成的[12] 。典型的 NPRS 一般含有 3 个独立的结构域,分别为腺苷酰化结构域(A 结构域) 、肽酰基载体蛋白结构域(PCP 结构域) 也叫巯基化结构域(T 结构域) 及缩合结构域(C 结构域) 。其中 A 结构域 55 kDa,负责选择底物并活化为氨酰-AMP; PCP 结构域为 l0 kDa,位于 A 结构域上游,负责将活化的底物以硫酯的形式固定在其辅酶磷酸泛酰巯基乙胺(4′-phosphopantetheine) 上; C 结构域为 50 kDa,位于 A 结构域和 PCP 结构域之间,负责催化相邻两模块上供体多肽和受体氨基酸的肽键形成。此外,在 NRPS 最后一个模块还有硫酯酶结构域(TE 结构域) ,以水解或环化的方式释放合成完全的多肽,以保证 NRPS 能持续循环合成新的多肽[13] 。

2.3　核糖体合成的细菌素

细菌素是一类在自身核糖体合成,经翻译后修饰形成具有特殊氨基酸的环状多肽,主要包括 Plantazolicin 和 Amylocyclicin。与脂肽和聚酮化合物相比,细菌素合成所涉及的基因相对简单,并且合成过程也很明确,遵循一般蛋白质的核糖体合成过程[14] 。编码 Plantazolicin、Amylocyclicin 等细菌素的基因簇相对较小,分别为 9.96 kb 和 4.49 kb[11] 。最初,B 型羊毛硫抗生素-Mersacidin 在枯草芽胞杆菌 HIL Y85 中被检测到[15] ,但菌株 HIL Y85 后来被鉴定为解淀粉芽胞杆菌[16] 。后来,在解淀粉芽胞杆菌 B9601-Y2 检测到 Mersacidin[17] 。另一个 B 型羊毛硫抗生素,是解淀粉芽胞杆菌 GA1 分泌的 Amylolysin,这类羊毛硫抗生素对大量

21994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的革兰阳性菌，包括李斯特氏菌属（*Listeria* sp.）和耐青霉素的金黄色葡萄球菌（*S. aureus*）具有抑制作用[18]。

3 解淀粉芽胞杆菌的生防机制

3.1 对病原菌生长的直接抑制作用

解淀粉芽胞杆菌可以明显地抑制多种病原菌的生长，主要是对病原菌菌丝及孢子的影响，如菌丝消融、变细，菌丝膜发生破裂，原生质体凝集渗漏，菌丝体扭曲变形，孢子的产生受到抑制等。王英国等[19]从堆肥中分离到 1 株解淀粉芽胞杆菌，其对尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）具有很强的抑制作用。何浩等[20]分离到 1 株解淀粉芽胞杆菌 BaX030 对金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）、白色念珠菌（*Candida albicans*）、酵母菌（*Saccharomycetes*）有较强抑制效果，对水稻稻瘟病菌（*Pyriculariaoryzae*）、辣椒尖胞炭疽病菌（*Chili pointed cell anthrax*）、枇杷炭疽病菌（*Gloeosporium eriobotryaespeg*）、烟草黑胫病菌（*Phytophthora parasitica*）有良好拮抗活性。本实验室筛选到 1 株对番茄灰霉病菌（*Botrytis cinerea*）具有拮抗作用的解淀粉芽胞杆菌 BA-KA3，测定其抑菌谱发现对小麦赤霉病菌（*Fusarium graminearum*）、小麦纹枯病菌（*Rhizoctoniacerealis*）、烟草赤星病菌（*Alternaria alternata*）、辣椒疫霉病菌（*Phytophthora capsici*）、辣椒炭疽病菌（*Pepper anthracnose*）、花生褐斑病菌（*Cercosporaarachidicola hori*）、梨黑斑病菌（*Alternaria alternate*）以及大蒜菌核病菌（*Sclerotiniaallii saw*）都具有较好的拮抗作用。对其抑菌机制进行初步探究，发现其代谢产物及挥发性物质都可使菌丝生长缓慢，菌丝断裂、菌丝直径变小和不产生孢子。对编码解淀粉芽胞杆菌次级代谢产物的基因功能分析，发现它们直接的抗菌活性各有侧重，其中抗真菌活性取决于非核糖体合成的环状脂肽类化合物 Bacillomycin D 和 Fengycin[21]，而抗细菌活性主要取决于非核糖体合成的聚酮化合物 Bacilysin 和核糖体合成的 Bacteriocins[22]。

3.2 对植物根际生态位的竞争作用

根部附着的菌体群落被认为是一种生防菌在固体表面形成的生物膜结构，在定殖过程中，生防菌的吸附和附着能力决定着其定殖情况。研究表明，抗菌物质 Surfactin 与植物根际的定殖能力、丛集运动以及生物膜的形成有关。Fall 等[23]证明了 Surfactin 在芽胞杆菌 6051 在拟南芥根部定殖的作用。Surfactin 在细胞附着和生物膜形成中的作用归根于其自身的三维结构，其有着与其他脂肽类化合物不同的极性分子结构，具有一个紧密的拓扑结构，在水相中和气水界面上呈现马鞍形构象，具有两亲性，能同时溶于水相和有机相，可以降低物质表面张力，有利于微生物的扩展和生物膜的形成。生防菌通过群集效应向具有更多丰富营养物质的根部移动的过程也是一个生防菌生物膜快速形成和覆盖的过程，在很多程度上生物膜的扩展也依赖于生物表面活性物质的参与。

3.3 诱导植株系统抗性（ISR）

植物体系统性抗性的诱导途径主要有两个：一是系统获得性抗性（systemic acquired resistance，SAR）途径，通常由病原物侵染后获得，其未接种部位诱导出对病原物的广谱抵抗力[24]，主要依赖于水杨酸（SA）信号通路；另一个是诱导系统抗性（induced systemic resistance，ISR）途径，主要是指非病原物作用于宿主植物后，激活了该植物自身的物理或化学屏障，从而产生系统抗性的过程[25]，ISR 的信号转导主要依赖于茉莉酸（JA）和乙烯（ET）途径。解淀粉芽胞杆菌与植物的相互作用可诱导植物产生 ISR，使植物抗病性增强。研究表明，解淀粉芽胞杆菌可通过激发依赖 JA 通路的 PDF 1.2 的表达来使油菜抵抗灰霉病菌的侵染[26]。采用实时定量 PCR 对莴苣中防御信号途径相关标记基因进行测定，细菌处理的植物在响应立枯丝核菌接种刺激后，PDF 1.2 表达显著提高，说明解淀粉芽胞杆菌 FZB42 可以提高莴苣对病原真菌的防御反应[27]。Cawoy 等[28]研究也表明，芽胞杆菌产生的 Surfactin 可以明显的激活烟草细胞的 ISR，并且 Surfactin 的含量和诱导活性呈正相关。

4 植物-病原物-生防菌的相互作用

任何植物个体的生长都离不开自己独特的生态环境，要与外界进行物质交流和能量循环。植物个体与外界环境互作中的生物因素，包括益生菌、病原菌以及条件致病菌等在内的微生物与其他个体的相互作用。植物与微生物的互作在植物健康成长的生命进程中扮演着尤为重要的角色。

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生防菌及其代谢产物可防治病害或促进植物生长,而病原菌的存在也可刺激生防菌次级代谢产物的产生。Cawoy 等[29]研究表明,在实验室条件下,解淀粉芽胞杆菌在响应由尖孢镰刀菌和灰霉病病原菌发出信号时可增强 Iturins 和 Fengycins 产生。

另外,植物根系分泌物可促进生防菌生物膜的形成,进而促进其在植物根部的定殖。研究表明,植物根部组织会产生一些小分子或大分子的营养物质和有机化合物,这些物质对于植物根部周围环境微生物群落的生长至关重要,而且有利于周围微生物在根部的定殖。这些根部分泌物有些可能具有诱导植物根际生防菌的移动,即所谓的化学趋化性信号分子。在植物根围的生防菌株能够利用这些根际分泌物质生存扩展,而生防菌所产生的抗生素类物质也在不同程度上参与了生防菌在植物根部的定殖。Zhang 等[30]发现玉米根系分泌物的存在可促进解淀粉芽胞杆菌 SQR9 生物膜的形成,为了研究玉米根系分泌物对 SQR9 根际行为的调控作用机制,尤其是参与诱导生物膜的形成机制,通过 Illumina 对其转录组进行测序,发现在接种 24 h 后,根系分泌物可以刺激代谢相关基因的表达,而在接种 48 h 后,根系分泌物可以激活产细胞外基质的相关基因,表明玉米根系分泌物促进解淀粉芽胞杆菌 SQR9 生物膜的形成可能主要归因于促进细胞生长和诱导细胞外基质的产生。

5　展　望

化学药剂的长期大量使用使植物病原菌耐药性不断增强,因此寻找环境友好型的替代生防菌剂迫在眉睫。解淀粉芽胞杆菌因其生存能力强、抑菌范围广以及对人和环境的安全性等特点,被认为是最具生防潜力的菌株之一。为了更好地进行田间应用,一方面应进一步确定其抑菌调控体系以及抑菌物质在植物、病原物和生防菌三者之间发挥作用的调控机制; 另一方面可通过改良合成抑菌物质的相关基因或使用高表达的宿主菌进行抑菌物质的高效表达,提高目标次级代谢产物的产量。随着生物合成技术的不断发展,通过对已知抑菌物质的结构进行修饰和改造,人工合成抗菌化合物,也可为植物病害的生物防治提供新的物质来源。

参考文献:

[1] 车晓曦,李校堃. 解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的研究进展[J]. 北京农业,2010,(3):7-10.

[2] Kloepper J W, Leong J, Teintze M, et al. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Nature, 1980, 286(2):885-886.

[3] 关晓欢,姜华. 解淀粉芽胞杆菌研究进展[J]. 生物技术世界,2013,(1):4-9.

[4] Magno-Perez C, Martinez-Garcia PM, Hierrezuelo J, et al. Comparative Genomics Within the *Bacillus* Genus Reveal the Singularities of Two Robust *Bacillus amyloliquefaciens* Biocontrol Strains[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2015, 28(10):1102-1116.

[5] Kröber M, Wibberg D, Grosch R, et al. Effect of the strain *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the microbial community in the rhizosphere of lettuce under field conditions analyzed by whole metagenome sequencing[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5:252.

[6] Kunst F, Ogasawara N, Moszer I, et al. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*[J]. Nature, 1997, 390: 249-256.

[7] Chen X H, Koumoutsi A, Scholz R, et al. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Nature Biotechnology, 2007, 25(9):1007-1014.

[8] Chen X H, Koumoutsi A, Scholz R, et al. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(1-2):27-37.

[9] Chen X H, Scholz R, Borriss M, et al. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease[J]. Journal of Biotechnology, 2009, 140(s 1-2):38-44.

[10] 冯健飞,周日成,郭兴庭,等. 聚酮类化合物及其应用[J]. 现代农业科技,2011,(3):24-26.

[11] Chowdhury S P, Hartmann A, Gao X W, et al. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42-A review[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6:780.

[12] Walsh C T, O'Brien R V, Chaitan K. Nonproteinogenic Amino Acid Building Blocks for Nonribosomal Peptide and Hybrid Polyketide Scaffolds[J]. AngewandteChemie International Edition, 2013, 52(28):7098-7124.

[13] 李红玲. 非核糖体肽合成酶结构研究进展[J]. 临床合理用药杂志,2013,(28):180-181.

[14] 陈哲,黄静,赵佳,等. 解淀粉芽孢杆菌抑菌机制的研究进展[J]. 生物技术通报,2015,31(6):37-41.

[15] Chatterjee S, Chatterjee S, Lad S J, et al. Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

and chemical characterization [J]. Journal of Antibiotics, 1992, 45(6): 832-838.

[16] Anna Maria H, Jasmin D, Christiane S, et al. Expression of the lantibioticmersacidin in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Plos One, 2011, 6(7): 474-477.

[17] Pengfei H, Kun H, Jochen B, et al. Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites [J]. Journal of Biotechnology, 2013, 164(2): 281-291.

[18] Arguelles A A, Ongena M, Devreese B, et al. Characterization of Amylolysin, a Novel Lantibiotic from *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 [J]. Plos One, 2013, 8(12): e83037.

[19] 王英国,王军华,权春善,等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究 [J]. 中国生物工程杂志, 2007,27(12): 41-45.

[20] 何浩,朱颖龄,迟立庆,等. 解淀粉芽胞杆菌 BaX030 的分离鉴定及抗菌功能 [J]. 微生物学报, 2015, 55(9): 1133-1143.

[21] Koumoutsi A, Chen X H, Henne A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42 [J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4): 1084-1096.

[22] Scholz R, Molohon K J, Nachtigall J, et al. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin S-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 [J]. Journal of Bacteriology, 2011, 193(1): 215-224.

[23] Fall R, Vivanco J M. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against Infection of Arabidopsis Roots by *Pseudomonas syringae* Is Facilitated by Biofilm Formation and Surfactin Production [J]. Plant Physiology, 2004, 134(1): 307-319.

[24] Ross A F. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants [J]. Virology, 1961, 14(3): 340-358.

[25] Kloepper J W, Tuzun S, Kuc J A. Proposed definitions related to induced disease resistance [J]. Biocontrol Science and Technology, 1992, 2(4): 349-351.

[26] Sarosh B R, Danielsson J, Meijer J. Transcript profiling of oilseed rape (Brassica napus) primed for biocontrol differentiate genes involved in microbial interactions with beneficial *Bacillus amyloliquefaciens* from pathogenic Botrytis cinerea [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 70(1-2): 31-45.

[27] Chowdhury S P, Uhl J, Grosch R, et al. Cyclic Lipopeptides of *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* Colonizing the Lettuce Rhizosphere Enhance Plant Defense Responses Toward the Bottom Rot Pathogen Rhizoctoniasolani [J]. Molecular plant-microbe interactions: MPMI, 2015, 28(9): 1-12.

[28] Cawoy H, Mariutto M, Henry G, et al. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014, 27(2): 87-100.

[29] Cawoy H, Debois D, Franzil L, et al. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens* [J]. Microbial Biotechnology, 2015, 8(2): 281-295.

[30] Zhang N, Yang D, Wang D, et al. Whole transcriptomic analysis of the plant-beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens*, SQR9 during enhanced biofilm formation regulated by maize root exudates [J]. BMC Genomics, 2015, 16(1): 1-20.

欢迎投稿 欢迎订阅

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net