

# 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)在植物病害生物防治中的研究及展望

李潇潇, 师桂英, 张立彭, 史贵红, 于彦琳, 苏国礼, 王文珠

(甘肃农业大学园艺学院, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**生物防治已经成为目前植物病害防治研究的热点之一。荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)是一类重要的植物根际促生菌(PGPR),其主要作用是抑制病原菌,促进植物生长。本文综述了荧光假单胞菌的分离鉴定方法、生防机制,及其解磷菌株、解钾菌株的应用现状和酚酸类物质对荧光假单胞菌的化感效应。荧光假单胞菌可以通过产生抗生素、水解酶和诱导系统抗性,提高植物抗病性;通过产生铁载体、解钾菌和解磷菌,促进寄主植物对环境中的不溶性铁、钾、磷元素的吸收和利用,这在农业生产方面具有巨大的应用价值。除此之外,利用生物技术筛选培育荧光假单胞菌高效菌株,优化其生物及化学调控技术和应用技术,利用高通量测序等技术,开展该菌株与土壤病原微生物、植物根系分泌物互作关系的理论研究,是该领域未来的重要研究方向。

**关键词:**荧光假单胞菌;生防机制;植物病害;化感作用

**中图分类号:**S476 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-5500(2021)05-0148-09

**DOI:** 10.13817/j.cnki.cyycp.2021.05.021

随着人们需求的逐渐增加,在有限的土地上生产出更多绿色健康的农产品是目前急需解决的问题之一。但是,随着大量施用农药、化肥,不仅使农产品品质下降及环境污染,同时也会威胁到人类身体健康。因此,在提高产量的情况下,生产出高品质的农产品是现在研究的热点。近年来,国内外学者研究发现,有益微生物及其代谢产物不仅可以控制植物病害<sup>[1]</sup>,还能促进植物生长<sup>[2]</sup>,且对环境无污染<sup>[3-4]</sup>。在众多有益微生物中,科学界将这类生活在植物根际或根际土壤中,且有助于植物生长的细菌称为植物根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria,简称 PG-PR)<sup>[5-6]</sup>。20世纪70年代末,Vessey等<sup>[7]</sup>第1次使用

植物根际促生菌这一术语。PGPR的促生途径可分为直接作用和间接作用。直接作用一方面指PGPR能活化土壤中无效的矿质营养元素,提高植物对土壤矿质元素的吸收利用效率,例如生物固氮<sup>[8]</sup>和磷溶作用<sup>[9]</sup>。另一方面,PGPR可合成和分泌某些对植物生长发育起直接作用的促生物质,如生长素、赤霉素等植物激素<sup>[10-12]</sup>。间接作用是指PGPR能够通过释放一些具有刺激作用的代谢产物,诱导植物体内的抗性系统,提高植物本身对病害或逆境的抗性能力<sup>[13-14]</sup>。

在众多PGPR成员中,假单胞菌属(*Pseudomonas*)成为极具潜力的细菌种属,其可在根际土壤中大量繁殖,抑制病害发生,促进连作栽培中抑菌性土壤的形成<sup>[15]</sup>,并可作为重要的解钾菌<sup>[16]</sup>和解磷菌<sup>[17]</sup>来提高土壤养分利用率,其中荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)最具应用价值。笔者对该类细菌的分离鉴定、功能机理研究、应用现状及研究热点综述如下。

## 1 荧光假单胞菌的分离鉴定

### 1.1 分离培养方法

依据菌落形态、色素、生理生化指标和营养特性等

**收稿日期:**2020-09-24; **修回日期:**2020-12-21

**基金项目:**甘肃农业大学学科建设基金项目(GAU-XKJS-2018-05);国家自然科学基金项目(31860549);兰州市科技计划项目(2017-4-95)

**作者简介:**李潇潇(1996-),女,甘肃庆阳人,硕士研究生。

E-mail:1208508721@qq.com

师桂英为通讯作者。

E-mail:shigy@gsau.edu.cn

特征将荧光假单胞菌分为 5 个生物型: I、II、III、IV 和 G<sup>[18]</sup>。I 型生物是典型的荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*), 可产生荧光色素, 明胶液化、卵黄反应呈阳性; II 型生物可以在含有丁酸、异丁酸、丙二醇、乙醇和正丙醇的培养条件下生长良好, 其中植物致病菌可产生荧光色素, 如边缘假单胞菌 (*P. marginalis*) 和托拉氏假单胞菌 (*P. tolaasii*); III 型生物完全不能在阿拉伯糖、木糖和蔗糖上生长, 可以发生硝化反应, 但对已经出现的成员还没有特殊的种名; IV 型生物可以在含有苯甲酰甲酸、苯乙酸和丁胺的培养条件下生长, 如柠檬假单胞菌 (*P. lemonnieri*); G 型生物是一个临时群体, 缺乏其他生物型的统一性特征, 已鉴定的有斯谷假单胞菌 (*P. schuylkilliensis*) 和弯曲假单胞菌 (*P. geniculata*)<sup>[19]</sup>。

土壤中荧光假单胞菌通常采用平板稀释法于 KB 培养基上进行分离、培养<sup>[20]</sup>。菌落微微隆起, 表面粘稠不透明, 呈灰白色, 容易用接种针挑起, 于紫外线 (365 nm) 斜光照射下可激发黄绿色荧光<sup>[21]</sup>。采用无菌操作将标记荧光的菌落接种至 KB 培养基上进行纯化, 通过多次划线即可得到纯化的单菌落。还有学者以呋喃妥因作为选择剂, 开发出一种从水中混合菌株中分离假单胞菌的培养基, 于 32℃ 培养 48~72 h, 即可分离得到荧光假单胞菌<sup>[22]</sup>。

## 1.2 鉴定技术

于显微镜下观察, 荧光假单胞菌为杆状、具数根极生鞭毛、具有运动性。其生理生化特性为: 甲基红染色、柠檬酸盐发酵、接触酶反应、过氧化氢试验、明胶水解、吡啉反应均呈阳性; 革兰氏染色、水解淀粉、脂酶反应、二乙酰 (V-P) 反应、蛋白酶试验均呈阴性<sup>[23]</sup>。

荧光假单胞菌通常采用 16S rDNA 基因序列分析法进行分子生物学鉴定: 使用细菌特异性引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增反应<sup>[24]</sup>, 可以鉴定出大多数荧光假单胞菌。也有学者研究发现荧光假单胞菌在其线粒体 16S 特异区域, 存在一对特异性引物 16SPSEfluf (5'-TGCAT-TCAAACTGACTG-3') 和 16SPSER (5'-AATCA-CACCGTGGTAACCG-3'), 利用这对特异性引物对紫外光下的荧光菌株进行 PCR 扩增, 可以鉴定出不易鉴定的荧光假单胞菌类型<sup>[25]</sup>。除此之外, 年洪娟等<sup>[26]</sup>利用扩增核糖体 DNA 限制性分析 (ARDRA) 法, 采用细

菌 16S rDNA 通用引物 F (5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3') 和 16SR (5'-CTACGGCTACCTTGT-TACGA-3') 对分离到的假单胞菌进行了多样性分析, 亦鉴定出荧光假单胞菌。

目前, 对于大多数荧光假单胞菌均采用细菌特异性引物进行鉴定, 且市面上销售的细菌提取试剂盒 (如康为世纪生物科技有限公司生产的 Bacteria Genomic DNA Kit) 所采用的引物大多也是细菌特异性引物。但是, 仍存在一些类型的荧光假单胞菌不能鉴定到种, 说明针对不同种属的鉴定, 确保设计引物的特异性还需进一步研究。

## 2 荧光假单胞菌生防机制

### 2.1 荧光假单胞菌在植物病害生物防治中的作用

荧光假单胞菌作为最具潜力的 PGPR, 在病原菌抑菌方面具有突出贡献。王智荣等<sup>[27]</sup>和 Vallabhaneni 等<sup>[28]</sup>采用平板对峙法发现, 荧光假单胞菌可以抑制采后柑橘绿霉病 (Green mold) 和立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*); 张亮等<sup>[29]</sup>和 Umesha 等<sup>[30]</sup>采用盆栽试验发现, 荧光假单胞菌可以抑制番茄枯萎病 (*Fusarium wilt*) 和珍珠粟霜霉病 (Downy mildew) 的发生; 吴治然<sup>[31]</sup>从野生型荧光假单胞菌 AHK-1 中克隆出致病相关基因 *fliG*, 并构建功能互补菌株, 发现该基因对荧光假单胞菌 AHK-1 的运动性、胞外多糖和生物膜形成能力和对猕猴桃的致病性等均有调控作用; Taswar<sup>[32]</sup>将荧光假单胞菌 CZ 菌株发酵液与 AgNO<sub>3</sub> 反应生成银纳米粒子 (AgNPs), 结果发现喷施 AgNPs 可以有效地控制烟草花叶病毒 (TMV), 其局部病变抑制率为 92.70%。

多数研究表明, 荧光假单胞菌和其他 PGPR 相互作用, 可以提高植物生长和防御性能<sup>[33-35]</sup>。然而, 由于不同微生物之间存在不亲和性, 并不是所有的混合制剂都能提高生物防治效果, 有些情况下, 其作用效果反而会有所下降<sup>[36]</sup>, 诸多外界因素如作物种类及土壤微生物等的影响, 使其大田应用效果受到限制<sup>[37]</sup>。因此, 这方面的研究是今后突破的重点。

### 2.2 荧光假单胞菌防治病害的作用机制

现有研究发现, 荧光假单胞菌对病害的生防机制包括对土传病害的防治和对地上部病害的防治。土传病害的防治主要是产生抗生素、水解酶、噬铁素和有效根际定殖, 地上部病害的防治主要与诱导系统抗性有

关<sup>[13-14]</sup>。

目前已鉴定的荧光假单胞菌所产生的抗生素主要包括:2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-diacetylphloroxyl-ic,DAPG)、吩嗪(phenazine-1-carboxylic acid,PCA)、藤黄绿脓菌素(pyoverdinin,PLT)、环脂肽(cyclic lipopeptide,CLP)和氰化氢(Hydrogen cyanide,HCN)等,这些抗生素都具有特异性和专一性,可以选择性地抑制植物病害的发生<sup>[38]</sup>。Yang等<sup>[39]</sup>利用基因操纵子在荧光假单胞菌 HC1-07 中合成了吩嗪和环脂肽,发现重组菌株可以抑制小麦全蚀病;同时 Roxane 等<sup>[40]</sup>发现荧光假单胞菌产生的吩嗪能够在体外与植物互作抑制马铃薯晚疫病菌的生长和发育,进而控制块茎上病斑的产生。

荧光假单胞菌除产生抗生素代谢物外,还能分泌多种水解酶类,这些水解酶可以保护植物免受病原菌的侵袭,并且加速植物对有机物的利用。Dukare 等<sup>[41]</sup>研究发现,荧光假单胞菌能够以附着在病原菌菌丝的形式对其直接寄生,一些还可以分泌一种或多种胞外水解酶,如几丁质酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和蛋白酶等,从而裂解病原菌细胞壁或菌丝体,抑制病原菌孢子萌发和芽管伸长。

铁载体(Pvd)又称噬铁素、铁螯合剂,是一种低分子量的  $Fe^{3+}$  的配位化合物。许多 PGPR 通过合成 Pvd 吸收铁元素,首次,Pvd 在细胞质中合成,在周质空间进一步修饰后分泌到细胞外,细胞膜外的 Pvd 与  $Fe^{3+}$  结合后,由外膜转运蛋白(FpvA)转运至周质空间。而  $Fe^{3+}$  又可还原为  $Fe^{2+}$  进入细胞质,使得 Pvd 被重新分泌到细胞外循环利用<sup>[42]</sup>。王平等<sup>[43]</sup>从油菜根际土壤中分离筛选到一株荧光假单胞菌 P13,发现其产生的 Pvd 对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)有较强抑制作用,但随着  $Fe^{3+}$  浓度的增加,Pvd 分泌量却减少、抑制作用减弱,由此说明 Pvd 主要通过竞争影响病原菌的生长。除此之外,Pvd 还能与土壤重金属发生化学作用,影响植物对其吸收。晋银佳等<sup>[44]</sup>通过平板实验证实荧光假单胞菌产生的 Pvd 能够与  $Cd^{2+}$  络合,将  $Cd^{2+}$  固定,使得油麦菜对  $Cd^{2+}$  的吸收减少。

PGPR 的根际定殖是指其侵入寄主或周围土壤后,能够在根际生存并在宿主植物特定部位建立种群和种群扩展的过程。PGPR 在植物体内、体表及周围土壤中定殖,可有效预防和干扰病原菌对植物体的侵

染,降低植物病原菌的致病能力,从而提高植物的抗病性。张亮等<sup>[29]</sup>将荧光假单胞菌 PEF-5 # 18 定殖于番茄根际土壤后,发现其可扩展到根内和茎内,显著抑制病原菌的生长,其中根际土壤中细菌数量最多。此外,荧光假单胞菌接种在植物根际后很快消耗由种子和根系分泌的营养物质,从而抑制病原孢子萌发、菌丝伸长和其他生理过程<sup>[45]</sup>。本课题组利用 80'S Special<sup>TM</sup>微生物土壤改良剂(荧光假单胞菌为其重要成分),针对兰州百合种球进行种子播种前生物引发处理,结果发现与传统种子表面消毒处理方法相比,百合种球发芽时间、发芽率及发芽势得到了显著改善<sup>[46]</sup>。

植物的诱导抗性主要是指通过适当的刺激来增强植物对各种病害的防御能力,包括诱导系统抗性(induced systemic resistance,ISR)和系统获得性抗性(systemic acquired resistance,SAR)<sup>[47]</sup>。通常报道的 SAR 是由水杨酸信号通路和 NPR1(Nonexpresser of PR genes)基因诱导产生的,并基于植物病程相关蛋白(Pathogenesis-related proteins,PRP 或 PRs)的诱导而发挥作用<sup>[48]</sup>。而 ISR 通常是由植物局部感染引起的,不涉及病程相关蛋白的积累,受茉莉酸(JA)信号途径和乙烯(ET)信号途径调控<sup>[49]</sup>。目前,PGPR 及其挥发性化合物诱导的植物抗病性大多报道为 ISR 类型。Jayamohan 等<sup>[50]</sup>用荧光假单胞菌防御番茄枯萎病(*Fusarium Wilt*),发现在病原体侵入时,植物具有良好的早期氧化信号,由此说明,荧光假单胞菌可以降低宿主的氧化应激反应,导致过氧化氢和脂质过氧化的减少及相应的过氧化物酶水平升高。张亮<sup>[51]</sup>等发现荧光假单胞菌 PEF-5 # 18 可以依赖 JA 和 ET 路径诱导番茄病程蛋白基因 PRs (*PR1*、*PR4*、*PR5*、*PR6*)与 GR、POX、PAL 等相关防卫基因的表达进行上调。Kumar 等<sup>[52]</sup>发现在接种荧光假单胞菌 24 h 内的番茄叶片中有水杨酸产生,能明显抑制番茄早期枯萎病菌丝的生长。Nishant 等<sup>[53]</sup>以水杨酸(SA)、脱落酸(ABA)两种抗性诱导剂和一株促进植物生长的荧光假单胞菌 PBAT-2(Psf)为材料,研究发现 SA、ABA 和 Psf 显著降低了番茄早疫病(*Alternaria blight*)的发病程度,其中与发病有关的基因 PR-1 和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(GLU)在 Psf 处理的植物中没有表达,这证实了 SA 和 ABA 在系统获得性抗性中的作用。

### 2.3 荧光假单胞菌解钾菌与解磷菌的应用研究

荧光假单胞菌具有促进植物持续生长的潜力,其

作用通常通过两种途径来实现:一是间接作用,通过防止植物病原微生物的有害影响;二是直接促进作用,表现为增加土壤中的养分、提高养分利用率,其功能是通过产生生长素、细胞分裂素、赤霉素、乙烯和脱落酸等植物激素来实现<sup>[10-12]</sup>。目前荧光假单胞菌对土壤养分利用的正向效应主要集中在解钾菌与解磷菌菌株的应用研究。

钾元素是植物生长过程中必不可少的营养元素,虽然土壤中钾元素含量丰富,但大多以矿物钾和固定钾的形式存在,不能被植物根系直接吸收。然而钾细菌可以分解土壤中的硅铝酸盐等矿物质,将难溶性钾、磷、硅转化为可溶性物质供植物吸收利用<sup>[54]</sup>。近年来,有关胶质芽孢杆菌(*B. mucilaginosus*)、环状芽孢杆菌(*B. circulans*)和土壤芽孢杆菌(*Bacillus edaphicus*)等钾细菌的研究较为成熟<sup>[55]</sup>。同时,研究者也发现,荧光假单胞菌解钾菌株不仅可以提高土壤中钾的利用率,而且能够促进植物的生长<sup>[56]</sup>。

磷元素是继氮元素后植物生长发育所需的第二大元素,土壤(有机和无机形态)中含量丰富,但只有 0.1% 的总磷可供植物利用。同样,磷细菌可以将难溶性或不溶性磷转化为可溶性磷供植物吸收和利用,提高土壤利用率,减少化肥施用。因此,通过微生物修复土壤环境是提高作物产量、解决土壤有效磷短缺的重要途径之一<sup>[57]</sup>。Richardson 等<sup>[58]</sup>研究发现荧光假单胞菌表现出明显的植酸酶活性,在没有或存在阿拉伯糖作为额外碳源的情况下,可从肌醇六磷酸酯(inositol hexaphosphate, IHP)中释放高达 81% 的磷酸,而非荧光假单胞菌菌株只有存在阿拉伯糖的情况下才能释放磷酸。

土壤中有很多具有解磷和解钾效应的有益微生物,主要有假单胞菌属(*Pseudomonas*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)等<sup>[59]</sup>,用这些有益微生物制成的解磷、解钾肥是近年来解决土壤中有效磷、有效钾缺失的重要措施之一。

### 3 酚酸类物质对荧光假单胞菌的化感作用研究

荧光假单胞菌的化感作用研究是作物土传病害生物防治的重要内容及研究热点。化感作用是指植物通

过地上部淋溶挥发、根系分泌等途径向环境释放化学物质而对周围植物或微生物产生影响<sup>[60]</sup>。其中,酚酸类化合物是植物根系分泌物中一种重要的次生代谢有机物,是主要的化感物质,其主要通过莽草酸途径在植物体内合成<sup>[61]</sup>,因此在高等植物组织中较为常见。在农业生态系统中,酚酸类物质通过破坏作物的防御机制与结构,降低作物本身的抗性,使病原菌更易入侵,最终导致土传病害的发生<sup>[62]</sup>。同时,酚酸类物质可以造成土壤中微生物区系和种群发生变化,真菌数量逐渐增多,细菌数量逐渐减少。Eeva 等<sup>[63]</sup>研究发现,荧光假单胞菌 PC18、PC20 和 PC24 组成的微生物菌群,可对渗滤液和油污污染微环境中的酚类化合物进行生物降解。Tewar 等<sup>[64]</sup>发现荧光假单胞菌可以去除有机污染物邻苯二酚,也可以在体外降解儿茶酚。除此之外,李敏等<sup>[65]</sup>发现荧光假单胞菌对香豆酸有降解作用。

目前,荧光假单胞菌降解酚酸类物质的报道较少。本课题组前期针对甘肃特色蔬菜兰州百合连作障碍发生严重,连作田微生物区系劣化理论研究空白的现状进行初步探究,于连作田中分离得到百合枯萎病镰刀菌(*Fusarium*)<sup>[66]</sup>,并通过兰州百合根系自毒作用研究,证明邻苯二甲酸丁酯、2,4-二叔丁基苯酚等为兰州百合化感自毒物质<sup>[67]</sup>,并检测到苯甲酸、肉桂酸等 11 种酚酸类物质,证明其中一些酚酸类物质与连作年限紧密相关<sup>[68]</sup>。在此基础上,开展酚酸类物质、致病镰刀菌及寄主植物的互作关系研究,证明 2,4-二叔丁基苯酚、棕榈酸等酚酸类物质通过化感作用对镰刀菌产生促进或抑制作用<sup>[69]</sup>,并且 2,4-二叔丁基苯酚对尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)和茄病镰刀菌(*F. solani*)浸染所引起的百合枯萎病的发生具有协同作用,加重病害的发生<sup>[70]</sup>。连作栽培影响植物根系生理状态、根系分泌物的种类及数量,从而对植物根际微生物种群形成了新的选择压,导致其群落结构发生变化<sup>[71]</sup>。课题组前期研究 0~9 年兰州百合连作土壤中微生物群落的变化发现,土壤中镰刀菌属真菌的积累是引起百合连作障碍的原因之一,而 *Pseudomonas* 可能是百合连作障碍形成的另一关键土壤微生物因子<sup>[72]</sup>,该结论与苹果连作障碍成因研究一致<sup>[73]</sup>。但是,有科学家通过连作土壤肥力调查和土壤消毒试验,证明 *Pseudomonas* 在作物连作障碍形成中并未发挥重要作用<sup>[74-75]</sup>。基于上述研究,课题组将酚酸类物质对 *Pseudomonas* 的

化感作用研究确定为重要的研究方向之一,尝试从兰州百合连作土壤中分离具有降解酚酸类物质和对致病镰刀菌具有拮抗作用的 *Pseudomonas* 菌株,以期为酚酸类物质介导的 *Pseudomonas* 等 PGPR 与致病镰刀菌互作关系的研究提供物质基础。

另有诸多研究发现,某些化学物质可以破坏荧光假单胞菌的生长。郭茹鑫等<sup>[76]</sup> 研究发现邻苯二甲酸二甲酯(DMP)可以破坏荧光假单胞菌的细胞壁和细胞膜,影响细菌正常生长。杨胜平等<sup>[77]</sup> 研究发现牛至精油破坏荧光假单胞菌细胞膜,导致细胞内容物外渗,降低对细胞膜流动性的调节能力。舒慧珍等<sup>[78]</sup> 发现柠檬烯可破坏荧光假单胞菌的细胞形态和结构,导致细胞严重破裂和塌陷,使细胞内蛋白及 ATP 含量降低、膜电位及 SDH 酶活性降低,影响其抗菌活性。上述研究结果显示,荧光假单胞菌的功能及作用效果受到复杂的外源化学物影响,它们不仅对荧光假单胞菌产生化感促进作用,也可产生化感抑制作用。因此,研究荧光假单胞菌的外源化感效应是提高其使用价值的重要途径。

## 4 今后研究的方向

虽然荧光假单胞菌的研究已经取得了许多成果,但是其应用技术中还存在一些问题,主要涉及其混合制剂作用效果及其大田应用效果的稳定性。PGPR 能够发挥有效作用的前提条件是其能在土壤及植物体内稳定定殖,这对其后期功能的研究具有重要意义, Yu 等<sup>[79]</sup> 证明类黄酮芹菜素和根皮素增强了荧光假单胞菌 2P24 的群集运动和纤维素和卷曲的产生,并采用无标记定量蛋白质组学方法发现芹菜素和根皮素能显著降低抗真菌代谢物 2,4-DAPG 的生物合成,也鉴定了一种新的黄酮类敏感的 TetR 调节因子 PhIH。发现植物源性黄酮类化合物可以被荧光假单胞菌 2P24 中的 TetR 调节因子 PhIH 所感知,并作为重要的信号分子,加强植物与非共生有益根细菌之间的互利互作。

另外,在病害治理中,植物根系分泌物对根际生物环境的影响日益受到重视,尤其是对病原菌的影响,其中根系分泌的自毒物质与病原菌间的相互作用已在玉米、马铃薯等作物上得到证实<sup>[80]</sup>。 *Pseudomonas* 作为重要的植物根际促生菌,通过对病原微生物起拮抗作用,提高植物养分利用能力,促进植物生长,在门、属分类水平上可以作为土壤健康性评价指标<sup>[81]</sup>。但是,根

系分泌的自毒物质对植物根际微生物促生菌的作用研究报告非常少。因此,聚焦植物根系分泌物与包括病原菌及 *Pseudomonas* 等 PGPR 的互作关系,对于全面深刻地理解植物、土壤、微生物所组成的农田土壤生态系统,以及促进 PGPR 应用研究具有重要意义。

综上所述,认为未来对荧光假单胞菌的研究应围绕以下方向展开:

1) 持续筛选培育荧光假单胞菌高效菌株,提高其对病原菌的拮抗能力、对植物的促生作用和对环境有害物质生物的降解功能;利用生物技术构建多功能菌株,使其在应用环境中发挥多种作用。

2) 优化荧光假单胞菌的生物或化学调控技术,提高其应用效率。可在土壤或微生物制剂中添加外源化感物质或营养物质,促进 *Pseudomonas* 的增殖,消解其拮抗菌和化感抑制剂生物活性,为其提供稳定的生存条件;或研究 *Pseudomonas* 与多种 PGPR 配合施用的生物复配技术。

3) 寻找可以使 *Pseudomonas* 有效定殖的物质或途径,研究其在大田环境下的定殖效果。

4) 高通量测序技术为土壤微生物宏基因组学分析提供了有效的手段<sup>[82]</sup>, 基因转录组 qPCR 技术、次生代谢产物 HPLC 分析技术等,为植物根系分泌物介导的土壤微生物研究提供了有效的方法<sup>[83]</sup>。利用上述新的技术手段,深入研究植物根系分泌物、PGPR 和土壤病原菌之间的互作关系,为荧光假单胞菌在农田生态系统中的应用提供理论依据。

### 参考文献:

- [1] Ahmid D H, Ahmid D H, Ismail S M. Effectiveness evaluation of Trichozone for *Trichoderma harzianum* and Fulzyme for *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* in curbing causes of charcoal rot disease on the watermelon plant[J]. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2020, 553(1): 012017.
- [2] Wu Y, Ma L Y, Liu Q, et al. *Pseudomonas fluorescens* promote photosynthesis, carbon fixation and cadmium phytoremediation of hyperaccumulator *Sedum alfredii* [J]. Science of the Total Environment, 2020, 726: 138554.
- [3] Guyer A, Vrieze M D, Bönisch D. The anti-phytophthora effect of selected potato-associated *Pseudomonas* strains: from the laboratory to the field[D]. Frontiers in Microbiology, 2015: 1309.

- [4] 石莹莹,赵盼,宋双伟,等. 马铃薯疮痂病拮抗菌 YN-2-2 的分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2020, 47(8): 2425—2435.
- [5] Widawati S,Suliasih. The Effect of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) on Germination and Seedling Growth of *Sorghum bicolor* L. Moench[J]. Iop Conference, 2018, 166(1): 012022.
- [6] Afaque M,Zahoor A,John S A, *et al.* Suppression of Bacterial Wilt of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) by Plant Growth Promoting Rhizobacteria[J]. International Journal of Plant Research, 2017, 30(special): 429.
- [7] Vessey J K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers[J]. Plant and Soil, 2003, 255 (2): 571—586
- [8] 李建宏. 优良植物根际促生菌 *Bacillus mycoides* Gny1 特性研究及全基因组测序分析[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2017.
- [9] 焦子伟,吴文良,郭岩彬. 不同碳源条件下 GDH 对植物促生菌 HX2 溶解无机磷影响的研究[J]. 新疆农业科学, 2015(2): 268—274.
- [10] Mondal R,Jain D,Myo E M, *et al.* Beneficial soil bacteria and fungi helps in plant growth promotion[M]. Microbial Resources for Sustainable Agriculture, 2019: 34—40.
- [11] Alemu F, Alemu T. *Pseudomonas fluorescens* isolates used as a plant growth promoter of faba bean (*Vicia faba*) in vitro as well as in vivo study in ethiopia[J]. American Journal of Life Sciences, 2015, 3(2): 100—108.
- [12] GroKinsky D K,Tafner R,Moreno, *et al.* Cytokinin production by *Pseudomonas fluorescens* G20-18 determines biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 23310.
- [13] Raza W,Ling N,Yang L, *et al.* Response of tomato wilt pathogen *Ralstonia solanacearum* to the volatile organic compounds produced by a biocontrol strain *Bacillus amyloliquefaciens* SQR-9 [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24856.
- [14] Müller T, Behrendt. *Fluorescent Pseudomonads* in the Phyllosphere of Wheat; Potential Antagonists Against Fungal Phytopathogens [J]. Current Microbiology, 2016, 72(4): 383—389.
- [15] Wafa H, Mohamed N, Hanene C, *et al.* *Pseudomonas rhizophila* S211, a New Plant Growth-Promoting Rhizobacterium with Potential in Pesticide-Bioremediation [J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 34.
- [16] Velázquez E, Silva L R, Ramirez-Bahena M, *et al.* Diversity of Potassium-Solubilizing Microorganisms and Their Interactions with Plants[M]. Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture, 2016: 99—110.
- [17] Ali M A, Ajaz M M, Rizwan M, *et al.* Effect of biochar and phosphate solubilizing bacteria on growth and phosphorus uptake by maize in an Aridisol[J]. Arabian Journal of Geosciences, 2020, 13(9): 1—9.
- [18] Stanier R Y, Palleroni N J, Doudoroff M. The aerobic Pseudomonads; a taxonomic study[J]. Journal of General Microbiology, 1966, 43(2): 159.
- [19] Bu K N R E, Ji B S N E. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th Chinese edn[M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [20] 彭珺. 荧光假单胞菌的分离、鉴定及遗传多样性研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2006.
- [21] 魏荷芬, 韩保安, 王田野, 等. 一株荧光假单胞杆菌的分离鉴定与反硝化特性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(8): 1679—1689.
- [22] Krueger C L, Sheikh W. A new selective medium for isolating *Pseudomonas* spp. from water[J]. Applied & Environmental Microbiology, 1987, 53(4): 895—897.
- [23] 赵圣明, 赵岩岩, 马汉军, 等. 1 株广谱抗菌活性菌株的筛选鉴定及其抗菌蛋白的分离纯化[J]. 食品科学, 2018, 39(2): 170—176.
- [24] 娄海博, 王晓冰, 陈俊, 等. 拮抗青枯劳尔氏菌的荧光假单胞菌 SN15-2 分离鉴定及其生防能力分析[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(3): 12—18.
- [25] Mauro S, Laura F, Galli Antoniëtta. Development of PCR assay to identify *Pseudomonas fluorescens* and its biotype[J]. FEMS Microbiology Letters, 2004(2): 2.
- [26] 年洪娟, 张杰, 樊利强, 等. ARDRA 方法在荧光假单胞菌分离鉴定中的应用[J]. 中国农业科学, 2007(1): 92—98.
- [27] 王智荣, 梅小飞, 杜木英, 等. 荧光假单胞菌 ZX 对采后锦橙绿霉病的防治及其抑菌机制[J]. 微生物学报, 2019, 59(5): 950—964.
- [28] Vallabhaneni D, Subhashini. Biocontrol of Rhizoctonia solani in Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Seed Beds Using *Pseudomonas fluorescens* [J]. Agricultural Research, 2016, 5(2): 137—144.
- [29] 张亮, 盛浩, 袁红, 等. 荧光假单胞菌 PEF-5 # 18 防控番茄枯萎病的定殖机理[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(5): 658—666.
- [30] Umesha S, Dharmesh S M, Shetty S A, *et al.* Biocontrol

- of downy mildew disease of pearl millet using *Pseudomonas fluorescens*[J]. Crop Protection, 1998, 17(5):390—392.
- [31] 吴治然. 荧光假单胞 AHK-1 的全基因组测序及候选致病相关 fliG 基因的功能分析[D]. 合肥:安徽农业大学, 2019.
- [32] Ahsan T. Biofabrication of silver nanoparticles from *Pseudomonas fluorescens* to control tobacco mosaic virus[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2020, 30(1):2—4.
- [33] Guyasa I M, Sadimantara G R, Khaeruni A, et al. Isolation of *Bacillus* spp. and *Pseudomonas fluorescens* from upland rice rhizosphere and its potential as plant growth promoting rhizobacteria for local upland rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Bioence Research, 2018, 15(4):3231—3239.
- [34] P. R. Y, Senthil K P, Sunita V, et al. Formulation and combinatorial effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus coagulans* as biocontrol agents[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020, 30:101868.
- [35] Huu N N, Patricia T, Sandra V, et al. *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* trigger common and distinct systemic immune responses in arabidopsis thaliana depending on the pathogen lifestyle[J]. Vaccines, 2020, 8(3):2—18.
- [36] 毛忠顺, 马青云, 黄琼, 等. 细菌分离物不同比例混合对镰刀菌的拮抗作用[J]. 云南农业大学学报, 2005(1):20—22.
- [37] 霍宪起, 陈京元. 4 种荧光假单胞菌拮抗菌株对湿地松猝倒病病原菌的抑制效果[J]. 东北林业大学学报, 2010, 38(9):108—109+115.
- [38] 吴琼, 王东凯, 王雷, 等. 荧光假单胞菌抗生素代谢产物的研究进展[J]. 黑龙江科学, 2017, 8(2):58—59.
- [39] Yang M, Mavrodi D V, Mavrodi O V, et al. Construction of a recombinant strain of *Pseudomonas fluorescens* producing both phenazine-1-carboxylic acid and cyclic lipopeptide for the biocontrol of take-all disease of wheat [J]. European Journal of Plant Pathology, 2017.
- [40] Roxane R, Amy N, Tanya A, et al. Transcriptome alteration in phytophthora infestans in response to phenazine-1-carboxylic acid production by *Pseudomonas fluorescens* strain LBUM223[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1):474.
- [41] Dukare A S, Paul S, Nambi V E, et al. Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits; a review[J]. Critical Reviews in Food Science & Nutrition, 2018, 59(2):1—16.
- [42] Edgar R J, Hampton G E, Garcia G P C, et al. Integrated activities of two alternative sigma factors coordinate iron acquisition and uptake by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Molecular Microbiology, 2017, 106(6):891—904.
- [43] 王平, 李慧, 邱译莹, 等. 荧光假单胞菌株 P13 分泌铁载体抑制油菜菌核病菌[J]. 上海师范大学学报(自然科学版), 2010, 39(2):200—203.
- [44] 晋银佳, 刘文, 朱跃, 等. 荧光假单胞菌产铁载体对油菜菜吸收砂基和水基中镉的影响[J]. 环境工程学报, 2016, 10(1):415—420.
- [45] Marie-Francoise N G, Shalaka S, Larsen P E, et al. Dynamics of aspen roots colonization by *Pseudomonads reveals* strain-specific and mycorrhizal-specific patterns of biofilm formation[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9:853.
- [46] 史贵红. 兰州百合种球浸种剂筛选试验[D]. 兰州:甘肃农业大学, 2020.
- [47] Van Loon, Bakker L C. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria [J]. Annu Rev Phytopathol, 1998(36):453—483.
- [48] Kachroo A, Venugopal S C, Lapchyk L, et al. Oleic acid levels regulated by glycerolipid metabolism modulate defense gene expression in Arabidopsis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(14):5152—5157.
- [49] Lam E, Kato N, Lawton M. Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response[J]. Nature, 2001, 411(6839):848—853.
- [50] Jayamohan N S, Patil S V, Kumudini B S. Reactive oxygen species (ROS) and antioxidative enzyme status in *Solanum lycopersicum* on priming with fluorescent *Pseudomonas* spp. against *Fusarium oxysporum*[J]. Biologia, 2018.
- [51] 张亮, 盛浩, 袁红, 等. 荧光假单胞菌诱导番茄抗枯萎病的 ISR 研究[J]. 土壤, 2018, 50(5):1055—1060.
- [52] Kumar A, Gond S K, Mishra A, et al. Salicylic acid and its role in systemic resistance induced by *Pseudomonas fluorescens* to early blight Disease of tomato[J]. International Journal of Plant Research, 2015, 28(3):12.
- [53] Prakash N, Vishnavat K, Khan G T, et al. SA, ABA and *Pseudomonas fluorescens* elicit defense responses in tomato against *Alternaria* blight[J]. Journal of Plant Bio-

- chemistry and Biotechnology,2020.
- [54] Encarna Velázquez, Luis R. Silva, Martha-Helena Ramírez-Bahena, *et al.* Diversity of potassium-solubilizing microorganisms and their interactions with plants[M]. Potassium Solubilizing Microorganisms for Sustainable Agriculture,2016,99-100.
- [55] 张爱民,李乃康,赵钢勇,等. 土壤中解磷、解钾微生物研究进展[J]. 河北大学学报(自然科学版),2015,35(4):442-448.
- [56] Rai, Anuradha, Pradeep, *et al.* Characterization of phosphate solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of Aloe vera (L.) [J]. Archives of Agronomy & Soil Science,2018.
- [57] 上官亦卿,常帆,吕睿,等. 解磷菌的分离、筛选、鉴定及解磷能力研究[J]. 湖北农业科学,2019,58(1):30-34.
- [58] Richardson A E, Hadobas P A. Soil isolates of *Pseudomonas* spp. that utilize inositol phosphates[J]. Canadian Journal of Microbiology,1997,43(6):509-516.
- [59] 张云霞,雷鹏,许宗齐,等. 一株高效解磷菌 *Bacillus subtilis* JT-1 的筛选及其对土壤微生物生态和小麦生长的影响[J]. 江苏农业学报,2016,32(5):1073-1080.
- [60] 陈玲,董坤,杨智仙,等. 连作障碍中化感自毒效应及间作缓解机理[J]. 中国农学通报,2017,33(8):91-98.
- [61] Li Z H, Wang Q, Ruan X, *et al.* Phenolics and plant allelopathy[J]. Molecules,2010,15(12):8933-8952.
- [62] 谢星光,陈晏,卜元卿,等. 酚酸类物质的化感作用研究进展[J]. 生态学报,2014,34(22):6417-6428.
- [63] Eeva H, Merike M, Signe V, *et al.* Biodegradation efficiency of functionally important populations selected for bioaugmentation in phenol and oil-polluted area [J]. Fems Microbiology Ecology,2004(3):3.
- [64] Tewari L, Malviya P. Biodegradation of catechol by fluorescent *Pseudomonas* for sustainable environment[J]. Journal of Scientific & Industrial Research,2002,61(1):70-74.
- [65] 李敏,张丽叶,张艳江,等. 酚酸类自毒物质微生物降解转化研究进展[J]. 生态毒理学报,2019,14(3):72-78.
- [66] 边小荣. 兰州百合枯萎病病原鉴定及病原菌生物学特性研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2016.
- [67] 陈君良. 兰州百合根系分泌物自毒作用的研究及化感物质的 GC-MS 分析[D]. 兰州:甘肃农业大学,2016.
- [68] 孙鸿强. 连作对兰州百合生理特性及土壤环境效应的影响[D]. 兰州:甘肃农业大学,2017.
- [69] 牟晓玲. 兰州百合根系分泌物对枯萎病病原菌增殖的影响[D]. 兰州:甘肃农业大学,2017.
- [70] 黄炜. 2,4-二叔丁基苯酚与镰刀菌在兰州百合枯萎病发生过程中的协同作用研究[D]. 甘肃:甘肃农业大学,2018.
- [71] Zhang B, Li X Z, Wang F P, *et al.* Assaying the potential autotoxins and microbial community associated with *Rhizomania glutinosa* replant problems based on its 'auto-toxic circle'[J]. Plant and Soil,2016.
- [72] Shi G Y, Sun H Q, Alejandro Calderón-Urrea, *et al.* Soil fungal diversity loss and appearance of specific fungal pathogenic communities associated with the consecutive replant problem (CRP) in Lily[J]. Frontiers in Microbiology,2020,11:1649.
- [73] Mazzola M, Andrews P K, Reganold J P, *et al.* Frequency, virulence, and metalaxyl sensitivity of *Pythium* spp. isolated from apple roots under conventional and organic production systems[J]. Plant Disease,2002,86(6):669-675.
- [74] Franke-Whittle I H, Manici L M. Rhizosphere bacteria and fungi associated with plant growth in soils of three replanted apple orchards[J]. Plant and Soil,2015,395(1-2):317-333.
- [75] Bakker, Matthew G, Otto-Hanson, *et al.* Plant monocultures produce more antagonistic soil streptomyces communities than high-diversity plant communities[J]. Soil Biology & Biochemistry,2013,65:304-312.
- [76] 郭茹鑫,王志刚,王春龙,等. 邻苯二甲酸二甲酯对荧光假单胞菌的损伤研究[J]. 农业环境科学学报,2019,38(7):1476-1481.
- [77] 杨胜平,章缜,程颖,等. 牛至精油对荧光假单胞菌的抑制作用及其对冷藏三文鱼品质的影响[J]. 食品科学,2020,41(1):215-222.
- [78] 舒慧珍,唐志凌,刘雪,等. 柠檬烯对荧光假单胞菌抑菌活性及机理研究[J]. 食品工业科技,2019,40(12):134-139.
- [79] Yu X Q, Yan X, Zhang M Y, *et al.* Flavonoids repress the production of antifungal 2,4-DAPG but potentially facilitate root colonization of the rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens*. [J]. Environmental microbiology,2020.
- [80] 明,邱慧珍,张春红,等. 马铃薯根系分泌物成分鉴别及其对立枯丝核菌的影响[J]. 应用生态学报,2015,26(3):859-866.
- [81] Bao Y J, Xu Z, Li Y, *et al.* High-throughput metagenomic analysis of petroleum-contaminated soil microbiome re-



- veals the versatility in xenobiotic aromatics metabolism [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2017, 56(6): 25–35.
- [82] Trivedi P, Delgado-Baquerizo M, *et al.* Response of soil properties and microbial communities to agriculture: implications for primary productivity and soil health indicators[J]. *Front Plant Sci*, 2016, 7:990.
- [83] Wu L, Wang J, Huang W, *et al.* Plant-microbe rhizosphere interactions mediated by *Rehmannia glutinosa* root exudates under consecutive monoculture[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5:15871.

## Application of *Pseudomonas fluorescens* in biological control of plant disease and its prospects

LI Xiao-xiao, SHI Gui-ying, ZHANG Li-peng, SHI Gui-hong, YU Yan-lin,  
SU Guo-li, WANG Wen-zhu

(College of horticulture, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

**Abstract:** Biological control is one of the research hotspots in plant disease management. As an important plant growth promoting bacteria (PGPR) in rhizosphere, *Pseudomonas* plays important roles in inhibiting pathogens and promoting plant growth. This review summarized the isolation and identification methods of *Pseudomonas*, its biocontrol mechanisms, the application status of potassium and phosphorus solubilizing strains, and the allelopathy of phenolic acids on *Pseudomonas*. *Pseudomonas* could improve plant disease resistance by producing antibiotics, hydrolases and inducing systemic resistance. It could also promote the absorption and utilization of insoluble iron, potassium and phosphorus in the environment by host plants, through producing siderophores, potassium and phosphorus solubilizing bacteria. This would have great application value in agricultural production. Important research directions in the future include using biotechnology to screen and cultivate high-efficiency *Pseudomonas* strains; optimizing its biological and chemical technology; and undertaking theoretical research on the interaction between *Pseudomonas* strains and soil pathogenic microorganisms, and plant root exudates by using high-throughput sequencing technology and other advanced technology.

**Key words:** *Pseudomonas fluorescens*; biocontrol mechanism; plant disease; allelopathy