



抗马铃薯晚疫病菌的粘细菌菌株 X6-II-1 的分离鉴定、拮抗活性及发酵条件的优化

武志华 郭维维 董晔 郭子文 王雪寒 刘惠荣*

内蒙古农业大学 生命科学学院, 呼和浩特 010018

*通讯作者, huirong_liu@imau.edu.cn

摘要 马铃薯晚疫病(potato late blight)是马铃薯(*Solanum tuberosum*)最为严重的病害,其病原菌为致病疫霉(*Phytophthora infestans*)。为了从土壤样品中筛选出对马铃薯晚疫病具有拮抗作用的粘细菌,本实验利用大肠杆菌(*Escherichia coli*)划线诱导法从土样中分离菌株,通过平板对峙法筛选具有抗马铃薯晚疫病菌活性的粘细菌,结合形态观察、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析确定菌株的分类地位。采用称重法测定菌株生长曲线,滤纸片法确定活性物质的分布,并通过单因素分析与正交优化相结合的方法对菌株的发酵参数进行了研究。共从土壤样品中共分离得到 5 株粘细菌,其中有 3 株对致病疫霉表现出拮抗活性,菌株 X6-II-1 的拮抗活性最强,致病疫霉菌丝生长边缘与菌株 X6-II-1 菌饼最短距离可达到 5 mm,经鉴定为叶柄粘球菌(*Myxococcus stipitatus*)。该菌株可以杀死并溶解大肠杆菌,且可以抑制枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的生长。拮抗致病疫霉的活性物质主要存在于细胞外,产活性物质的最适发酵条件为:接种量 10%,摇床转速 180 r/min,培养温度为 30 ℃,发酵时间为 7 d。粘细菌菌株 X6-II-1 能够产生抗马铃薯晚疫病菌的活性物质,具有开发成抗马铃薯晚疫病生物农药的潜在价值。本研究为活性物质的分离鉴定以及抗马铃薯晚疫病农药的研发提供基础数据。

关键词 粘细菌,分离鉴定,马铃薯晚疫病,叶柄粘球菌,正交优化

Isolation and Identification of Myxobacterial Strain X6-II-1 Resistant to *Phytophthora infestans* and Its Antibiotic Activity and Optimal Fermentation Condition

WU Zhi-Hua GUO Wei-Wei DONG Ye GUO Zi-Wen WANG Xue-Han LIU Hui-Rong*

College of Life Sciences, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China

*Corresponding author, huirong_liu@imau.edu.cn

Abstract Potato late blight is the most serious disease of *Solanum tuberosum*, and its pathogen is *Phytophthora infestans*. In order to screen culturable myxobacteria resistant to the pathogen of potato late blight from soil samples, myxobacteria were isolated from the soil sample by *Escherichia coli* inducing method in this study. The strains resistant to the pathogen of potato late blight were screened by plate confrontation assay and identified by morphological observation, physiological and biochemical characteristics, and the 16S rRNA sequence analysis. Then, the antimicrobial activities of the strain were determined by plate confrontation method. Then, the growth curve of the target strain was determined by the weighing method and the distribution of antibiotic substances was measured by filter paper disc method. The fermentation

parameters were studied by the combination of univariate analysis and orthogonal optimization. Five strains were isolated in this experiment and 3 of them presented antagonistic activity against *Phytophthora infestans*. The activity of strain X6-II-1 was the strongest among them and the shortest distance from the edge of mycelia of *Phytophthora infestans* to the edge of colony of strain X6-II-1 was 5 mm. The identification results showed that this strain belonged to *Myxococcus stipitatus*. The strain could kill and dissolve *E. coli* and inhibit the growth of *Bacillus subtilis*. The antibiotic substances against *Phytophthora infestans* were mainly present in the extracellular matrix. The optimal fermentation conditions of strain X6-II-1 were as follows: Inoculum size 10%, shaking speed 180 r/min, incubation temperature 30 °C, incubation time 7 d. The strain X6-II-1 can produce antibiotic substances against the pathogen of potato late blight, which has the potential value for developing biological pesticides resistant to potato late blight. These findings may lay a foundation for isolation and identification of the antibiotic substances and the development of new pesticides resistant to potato late blight.

Keywords Myxobacteria, Isolation and identification, Potato late blight, *Myxococcus stipitatus*, Orthogonal optimization

马铃薯(*Solanum tuberosum*)是世界上仅次于水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)的第四大粮食作物,也是我国的第四主粮。我国是世界上马铃薯第一生产大国,在云贵、华北、东北等气候相对较凉的地区种植。马铃薯最为严重的病害是晚疫病(potato late bright),其病原菌为致病疫霉(*Phytophthora infestans*)(Fry, 2008)。*P. infestans*主要通过侵害植株的叶、茎以及薯块从而使马铃薯茎叶死亡和块茎腐烂(Haas et al., 2009)。

由于受致病疫霉病原菌的致病机理、生殖调控机理以及相关调控物质等基本科学问题认知水平的限制,目前仍未找到可以有效防治马铃薯晚疫病的方法,其已严重阻碍了马铃薯的生产以及产业化发展(任兴波等, 2016)。目前,马铃薯晚疫病仍以化学防治为主,常用药剂有甲霜灵锰锌、瑞毒霉、杀毒砒、薯瘟消等,但是农药的大量使用不仅破坏了环境,而且导致致病疫霉的抗药性也在逐渐增强。王文娇等(2012)利用叶盘漂浮法检测了从北方五省马铃薯田块病叶上分离得到的380株马铃薯晚疫病菌中的222株对甲霜灵的敏感性,发现其半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect, EC₅₀)值分布在0.028 4~815.361 8 μg/mL之间,平均值为106.29 μg/mL,对甲霜灵产生抗性的菌株可达到73.5%。因此,研发高效无害的防治马铃薯晚疫病的农药迫在眉睫。而兼具有效性与安全性的生物防治目前已成为研究热点,主要包括两种方法,分别为利用外源物质诱导马铃薯植株对病原菌产生抗性以及利用有益的微生

物对病原菌产生拮抗作用。植物抗病诱导是一个非常具有前途的研究领域,许多化学物质和一些物理因子,以及微生物和植物提取物均可以诱导马铃薯产生抗病性,如蒋继志等(2010)利用放线菌(*Actinomycetes*)发酵液诱导处理马铃薯块茎切片从而激活植物天然防御机制达到抗马铃薯晚疫病的功效。而从微生物产生的具有生物活性的次级代谢产物中开发能够抗马铃薯晚疫病的新生物农药也成为目前的研究热点之一。一些细菌的发酵液以及叶围和根围真菌对致病疫霉的生长表现出了直接的抑制作用,如Fakhouri等(2001)从*Pseudomonas fluorescens* G308发酵液中分离得到了一种新型抗生素N-mercapto-4-formylcarbostyryl,其可在体外对*Phytophthora infestans*的孢子萌发及菌丝生长起到抑制作用。

粘细菌(Myxobacteria)是一种革兰氏阴性细菌(Gram negative bacteria),其具有社会性行为、复杂多细胞行为以及形态发生(张琦, 2005),具有非常显著的社会特征,例如能够在细胞之间通过信号进行传导、感应,协同摄食、滑行运动和形成颜色鲜艳的子实体,因此粘细菌被研究者认为是高等的原核生物(李越中等, 2000)。粘细菌是很好的天然药物筛选资源,已经成为一大类具有极大应用研究开发潜力的微生物类群(Diez et al., 2012)。而且粘细菌的生物合成潜力巨大,50%~100%的粘细菌均可合成具有生物活性的次级代谢产物(Wenzel et al., 2009)。在原核生物中,按照已经发现的具有生物活性的物质的数量,粘细菌仅仅排在放

线菌(*Actinomyces*)和芽胞杆菌(*Bacillus*)之后(王德韬等, 2010),而其具有抑菌活性的阳性菌的比率要高于放线菌。由于粘细菌产生的次级代谢产物具有结构新颖、种类多样、产生菌比率高、作用水平层次多、作用机制多样等多种特点,因此有关粘细菌的研究工作日益受到重视(Weissman et al., 2009)。

本研究从采集自内蒙古自治区锡林郭勒盟苏尼特右旗赛罕高毕苏木乡牧区草地的土壤样品中筛选出一株对马铃薯晚疫病菌具有显著抑制作用的粘细菌菌株(实验室编号为X6-II-1),并通过其形态特征、生理生化特征以及16S rRNA基因序列分析对该菌株进行分类鉴定,并对其进行抗细菌与抗真菌活性的分析以及通过正交实验优化其发酵条件。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤样品的采集与处理

土壤样品采集自内蒙古自治区锡林郭勒盟苏尼特右旗赛罕高毕苏木乡牧区草地,位于北纬44.029 23°、东经112.070 31°,属淡棕钙土,利用五点采样法对表层1~10 cm处土壤进行采集。后将土样自然风干,过60目筛后于室温下干燥保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

蔗糖(广西凤塘生化股份有限公司);FeCl₃、NaNO₃、K₂HPO₄、CaCl₂、MgSO₄等(天津风船化学试剂科技有限公司);Beckman DU800型紫外分光光度计(美国Beckman公司);PYX-DHS型电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);YX280A型高压蒸汽灭菌器(上海三申医疗仪器有限公司);电子pH计(意大利HANNA仪器)。

1.1.3 培养基

菌株的分离纯化所需培养基有VY/2固体培养基(小牛浸液肉汤酵母抽提物琼脂培养基, Veal infusion broth and yeast extract agar medium)、LB液体培养基(Luria-Bertani liquid medium)、WCX固体培养基(水琼脂固体培养基, water agar solid medium)、CAS液体培养基(酪蛋白液体培养基, casein peptone liquid medium)(武志华, 2014),菌株生理生化检测所需的培养基参考《常见细菌系统鉴定手册》

(东秀珠, 蔡妙英, 2001),菌株的抗菌活性检测用到的培养基有牛肉膏蛋白胨液体培养基、牛肉膏蛋白胨固体培养基、YPD液体培养基(酵母浸出粉胨葡萄糖培养基, yeast extract peptone dextrose liquid medium)、土豆培养基、黑麦固体培养基等。

1.1.4 抗菌活性测定菌株

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CMCC26003)、大肠杆菌(*Escherichia coli* DH5 α)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis* 3-1)、马铃薯晚疫病菌(*Phytophthora infestans* HQK8-3)、酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* C2-2),均由本实验室提供。

1.2 菌株的诱导、纯化及保存

1.2.1 菌株的诱导

将预处理后的土壤样品放置于无菌的150 mm培养皿中,打开盖子后置于烘箱中于58 °C下烘烤30 min,以便除去不耐热的杂菌。取大约30 g烘烤后的土壤样品,将其置于无菌的90 mm培养皿之中。将10 mg/mL的放线菌酮溶液用无菌水稀释至终浓度为100 μ g/mL,并用其将培养皿内的土样于室温下浸泡12 h,以便除去部分不耐药的霉菌以及酵母菌。用移液器将*E. coli* DH5 α 菌液20 μ L接入装有200 mL事先灭菌的LB液体培养基的三角瓶内,37 °C、180 r/min于摇床上震荡过夜。次日将处于对数生长期的*E. coli* DH5 α 菌液于5 000 r/min离心10 min,于超净工作台内弃掉上清液并收集菌体沉淀,将其在WCX固体培养基上划出三条均匀且厚的平行线,并晾干。用无菌的蓝色枪头挑取黄豆大小的经放线菌酮浸泡后的土壤样品放置于三条平行线的一端,封口膜封口,置于30 °C培养箱中恒温培养。

1.2.2 菌株的纯化

通过形态特征识别粘细菌,用无菌的接菌针直接挑取具有粘细菌特征性菌落的边缘或子实体的头部于新鲜的VY/2固体培养基上以便除去部分较大且不具有运动特性的杂菌(Guo, Tao, 2007),于30 °C恒温培养观察。该法并不能通过一次操作达到纯化的目的,需要反复转接,直至肉眼观察无其他杂菌。

1.2.3 菌株的验纯及保存

用无菌的接菌针挑取经过观察没有其他杂菌

污染的菌株的子实体,并将其接种于无菌的CAS液体培养基内,30℃、180 r/min摇瓶震荡培养36 h,观察CAS液体培养基是否澄清。因为粘细菌具有在营养较丰富的培养基内生长缓慢的特点,而其他杂菌则可在其内快速生长,故可以通过观察CAS液体培养基在接种培养后是否澄清来判定菌株是否已被纯化,若培养基依然澄清,则可认为菌株已纯。将已纯化的菌株用20% 无菌的甘油置于-80℃冰箱中长期保存。

1.3 拮抗致病疫霉菌株的筛选

采用平板对峙法(李丽艳等, 2011),检测菌株对致病疫霉的拮抗活性。将已培养7 d的马铃薯晚疫病菌事先接入黑麦培养基内培养3 d,再将培养8 d后的纯菌菌株的琼脂块用无菌牙签接于距致病疫霉菌饼约2 cm处,并将无菌的VY/2固体培养基制成菌饼接种于同一个黑麦固体培养基内作为空白对照,封口膜封口,将其置于18℃恒温培养箱中黑暗培养,8 d之后观察抑菌圈的大小。

1.4 菌株的鉴定

1.4.1 形态观察

将已纯化的菌株转接于新鲜的VY/2固体培养基上,待其子实体生长成熟后,通过参照《伯杰细菌鉴定手册》第八版中的分类标准(Boone, Castenholz et al., 2004),用Sony数码相机和Nikon SMZ745体视显微镜对其菌落形态以及子实体的结构进行观察并拍照。

1.4.2 生理生化特征检测

按照《伯杰细菌鉴定手册》(Boone, Castenholz et al., 2004)中对粘细菌一些属种的生理生化特征的描述,将已纯化的菌株进行LB液体培养、刚果红实验、大肠杆菌利用、明胶液化、Tween 80利用、纤维素水解、脲酶利用、淀粉水解、硝酸盐还原、牛奶的凝固与酪化以及抗生素敏感性检测等实验。

1.4.3 分子鉴定

本研究采用了石英砂及溶菌酶共同破壁法对粘细菌的染色体DNA进行提取(周小玲等, 2004),并利用细菌16S rRNA基因通用引物进行PCR扩增(Jiang et al., 2008):

27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';

1495R:5'-CTACGGCTACCTTGTTACGA-3'。

PCR的反应体系(20 μL):10×PCR buffer 2 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.6 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各0.2 μL, *Taq* DNA聚合酶(5 U/μL) 0.1 μL, DNA模板(80 ng/μL) 1 μL, 无菌水 14.9 μL。PCR扩增热循环程序:94℃变性30 s, 55℃退火45 s, 72℃延伸90 s, 设置30个循环,之后于72℃补充延伸5 min。将扩增出来的PCR产物进行回收纯化后送往北京六合华大基因科技股份有限公司测序,利用NCBI软件中的BLAST对实验菌株的16S rRNA基因序列与GenBank数据库中的已知菌株的序列进行同源性比较。

1.5 菌株X6-II-1的抗菌谱检测

将菌株X6-II-1转接于新鲜的VY/2固体培养基上,30℃恒温培养7 d,待其长满平皿后备用。然后将用20%甘油保存于-80℃冰箱中的大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌菌液分别接入事先已灭菌且冷却到室温的牛肉膏蛋白胨液体培养基中,37℃、180 r/min摇瓶震荡过夜。第二天将这三种菌的液体培养物于5 000 r/min离心10 min后,在超净工作台内弃掉上清液并收集菌体沉淀,取三种菌的菌体沉淀并将其分别均匀地涂布于牛肉膏蛋白胨固体培养基上,并晾干。将保存的酿酒酵母菌液事先接入无菌的YPD液体培养基内并培养18 h,将其均匀涂布在土豆固体培养基上。用无菌的蓝色枪头扎取VY/2培养基上已纯化的菌株制成菌饼,将其分别倒扣接种于涂布有不同指示菌的培养基上,同样大小的VY/2培养基作为空白对照,封口膜封口,于37℃培养箱中恒温培养,2 d后观察抑菌情况。

1.6 菌株X6-II-1生长曲线的测定

将固体培养基上已生长成熟的菌株制成菌饼转接到含有100 mL的VY/2液体培养基的三角瓶中,于30℃、180 r/min摇床上震荡培养3 d后,使用无菌转子以及磁力悬浮搅拌将菌块打碎,然后以10%的接种量转接到含有100 mL无菌的VY/2液体培养基的三角瓶中,30℃、180 r/min震荡培养。每隔24 h收集一次菌体,菌液于8 000 r/min离心10 min,弃掉上清液,用去离子水洗涤菌体,再次8 000 r/min离心10 min后去上清。将菌体沉淀放置在恒温烘箱中于50℃烘干直到恒重。测量菌体干重且每次平行测3次,并根据菌体干重绘制菌株的生长曲线(唐少军等, 2014)。

1.7 菌株 X6-II-1 活性物质的分布

将固体培养基上的菌株制成菌饼转接到含有 100 mL 的 VY/2 液体培养基的三角瓶中,于 30 ℃、180 r/min 摇床上震荡培养 3 d 后,使用无菌转子和磁力悬浮搅拌将菌块打碎,然后以 10% 的接种量转接到含有 100 mL 无菌的 VY/2 液体培养基的三角瓶中,30 ℃、180 r/min 震荡培养 7 d。将发酵液于 8 000 r/min 离心 20 min,使上清液和菌体沉淀分离。将上清液用滤膜过滤后,用滤纸片法检测其对马铃薯晚疫病菌的拮抗活性。用无菌水将菌体沉淀洗涤 3 次,再用超声波细胞粉碎机隔离箱将其破碎,将破碎的菌体沉淀离心,滤膜过滤,用滤纸片法检测其抗马铃薯晚疫病菌的活性。

1.8 菌株 X6-II-1 抗菌活性发酵条件的优化

1.8.1 接种量的影响

将菌株 X6-II-1 接入种子培养基中,30 ℃、180 r/min 震荡培养 3 d,然后分别以 5%、8%、10%、12%、15% 的接种量接入发酵培养基,30 ℃、180 r/min 震荡培养 7 d,用滤纸片法测定发酵上清液的抗菌活性。

1.8.2 摇床转速的影响

将菌株 X6-II-1 接入种子培养基中,于 30 ℃、180 r/min 摇床上震荡培养 3 d,然后按 10% 的接种量转接到发酵培养基中,分别在 150、160、170、180、190 r/min 条件下于 30 ℃摇床培养 7 d,滤纸片法检测发酵上清液的抗菌活性。

1.8.3 发酵温度的影响

将菌株 X6-II-1 接入种子培养基中,于 30 ℃、180 r/min 摇床上震荡培养 3 d,然后按 10% 的接种量转接到发酵培养基中,分别在 25、28、30、32、35 ℃条件下于 180 r/min 摇床培养 7 d,滤纸片法检测发酵上清液的抗菌活性。

表 1 $L9(3^3)$ 正交实验因素和水平

Table 1 Factors and levels of $L9(3^3)$ orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors		
	接种量/% Inoculum size	发酵温度/℃ Incubation temperature	发酵时间/d Incubation time
1	8	28	7
2	10	30	8
3	12	32	9

1.8.4 发酵周期的影响

将菌株 X6-II-1 接入种子培养基中,于 30 ℃、180 r/min 摇床上震荡培养 3 d,然后按 10% 的接种量转接到发酵培养基中,于 30 ℃、180 r/min 摇床震荡分别培养 5、6、7、8、9 d,滤纸片法检测发酵上清液的抗菌活性。

1.8.5 发酵条件的正交实验

将菌株 X6-II-1 接入种子培养基中,30 ℃、180 r/min 震荡培养 3 d,根据单因素实验结果确定对致病疫霉拮抗活性影响较大的因素及水平范围,将接种量设为 8%、10%、12%,发酵温度设为 28、30、32 ℃,发酵周期设为 7、8、9 d,采用 $L9(3^3)$ 正交设计表 1 进行 3 因素 3 水平正交优化实验,180 r/min 摇床震荡,滤纸片法检测发酵上清液的抗菌活性。

2 结果与分析

2.1 致病疫霉拮抗菌株的筛选

通过大肠杆菌诱导以及子实体反复转接等方法从土壤样品中经分离纯化共得到 5 株粘细菌,其中有 3 株菌对马铃薯晚疫病病原菌致病疫霉表现出拮抗活性,菌株 X6-II-1 的拮抗活性相对较强,菌饼距致病疫霉菌丝生长边缘约为 5 mm,其抗致病疫霉活性如图 1 所示。

2.2 菌株 X6-II-1 的鉴定

2.2.1 形态鉴定

对已生长 8 d 的菌株 X6-II-1 进行形态学鉴定,结果如图 2 所示。该菌株在 VY/2 培养基上可以形成边缘不规则的薄膜状菌落,向四周扩散。子实体呈不规则点状分布,黄白色,椭圆形或球形,具有柄状结构,具有折光性,基部有褶皱。粘孢子被孢子囊包裹,而且在孢子囊的外围有透明粘液产生。

2.2.2 生理生化特征检测

通过对菌株 X6-II-1 进行生理生化特征的检测,发现该菌株不能在 LB 液体培养基内生长且不能降解纤维素,但可以利用活的大肠杆菌以及吐温 80,并使明胶液化,水解淀粉,吸附刚果红,生理生化特征与《伯杰细菌鉴定手册》第八版(Boone, Castenholz et al., 2004)中所描述的粘球菌属的特征相符,结合其形态特征可初步认为该菌株属于粘球菌属。具体的生理生化特征如表 2 所示。

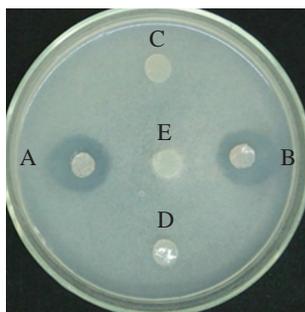


图1 菌株X6-II-1对致病疫霉的拮抗活性

Figure 1 Antagonistic activity of strain X6-II-1 to *Phytophthora infestans*

A/B: 菌株X6-II-1; C/D: 空白对照; E: 马铃薯晚疫致病菌
A/B: The strain X6-II-1; C/D: Blank control; E: *P. infestans*

2.2.3 分子鉴定

经PCR扩增和序列测定,获得X6-II-1菌株16S rRNA基因片段,长度为1 356 bp。经BLAST在线比对后,利用MEGA 5.0软件以Neighbor-Joining Tree算法与相近菌株构建系统发育树,进行系统发育分析(图3)。系统发育树表明,X6-II-1菌株为粘球菌属*Myxococcus*,与叶柄粘球菌*Myxococcus stipitatus* DSM 14675(登录号为DQ768118.1)的相似性最高,为100%,且聚在同一个系统进化分支上,与BLAST数据结果一致。结合菌株X6-II-1的形态特征与生理生化特征,最终确定该菌株为叶柄粘球菌(*M. stipitatus*)。

表2 菌株X6-II-1的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain X6-II-1

生理生化特征	结果	生理生化特征	结果
Physiological and biochemical characteristics	Results	Physiological and biochemical characteristics	Results
过氧化氢酶 Catalase	+	硝酸盐还原 Nitrates reduction	-
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	纤维素降解 Hydrolysis of cellulose	-
淀粉水解 Amylohydrolysis	+	吐温80利用 Hydrolysis of Tween 80	+
刚果红利用 Stained with Congo red	+	酪蛋白水解 Casein hydrolysis	+
LB液体培养 LB	-	大肠杆菌利用 Using of <i>Escherichia colia</i>	+
脲酶 Urease	-	H ₂ S的产生 H ₂ S	-
卡那霉素 Kanamycin	-	环丙沙星 Ciprofloxacin	-
庆大霉素 Gentamicin	-	青霉素 Penicillin	-
四环素 Tetracycline	-	链霉素 Streptomycin	-
罗红霉素 Roxithromycin	-	多粘菌素B Polymyxin B	+
氯霉素 Chloramphenicol	-	红霉素 Erythromycin	-

+: 阳性反应; -: 阴性反应

+: Positive; -: Negative

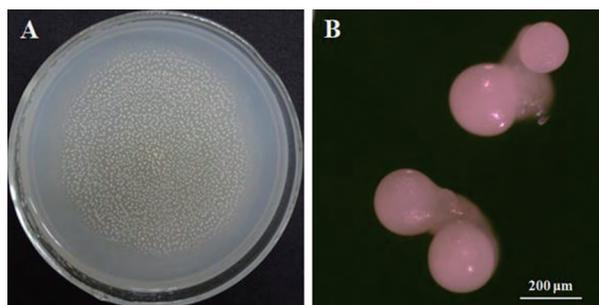


图2 菌株X6-II-1的形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of strain X6-II-1

A. 菌落形态; B. 子实体形态
A. Colony; B. Fruiting bodies

2.3 菌株X6-II-1的抗菌谱活性

菌株X6-II-1的抗细菌与抗真菌活性检测结果如表3所示。菌株X6-II-1能够杀死并溶解大肠杆菌,且可以抑制枯草芽胞杆菌的生长,但是对金黄色葡萄球菌和酿酒酵母菌并未表现出拮抗抗性。

2.4 菌株X6-II-1的生长曲线

由于粘细菌在液体培养基中贴壁且成团块生长的特殊性,因此不易通过吸光值测定法来检测粘细菌的生长量,所以本研究采用了称重法。如图4所示,菌株X6-II-1在接种后经过短时间的迟缓期在4 d时菌体重量以相对较快的速度增加,在7 d时菌体重量达到最大,进入平稳期,但平稳期的时间相对较短,在9 d时菌株生物量开始减少,进入衰亡期。

2.5 菌株 X6-II-1 活性物质的分布

将菌株发酵培养后,滤纸片法分别检测其胞内物及胞外物对马铃薯晚疫病菌的抗性。结果如图 5 所示,菌株 X6-II-1 的胞外物对马铃薯晚疫病菌的生长表现出一定的抑制作用,但并未检测到胞内物的抑菌活性,可初步说明菌株 X6-II-1 的抗马铃薯晚疫病菌活性物质主要存在于细胞外。

2.6 菌株 X6-II-1 抗菌活性发酵条件的优化

2.6.1 接种量的影响

将培养 3 d 的种子液以不同接种量转接到发酵培养基中,通过测量致病疫霉菌丝生长边缘与滤纸片最近的距离来测定不同的接种量对发酵上清液抑菌活性的影响,结果见图 6A。随着接种量的增加,发酵上清液对马铃薯晚疫病菌的拮抗活性呈先上升后下降的趋势,当接种量为 10% 时,其抑菌活性最高,菌丝生长边缘距离滤纸片为 3 mm。因此,

表 3 菌株 X6-II-1 的抗菌谱

Table 3 The antibiotic spectrum of the strain X6-II-1

指示菌	抑菌圈直径/mm	抑菌活性
The indicator microorganism	Diameter of inhibition zone	The antibiotic activity
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	20±1.73	++
枯草芽胞杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	12±1.53	+
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	-	-
酿酒酵母菌 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-

++: 抑制活性较强;+: 抑制活性适中;-: 没有抑制活性

++: Strong inhibition; +: Medium inhibition; -: No inhibition

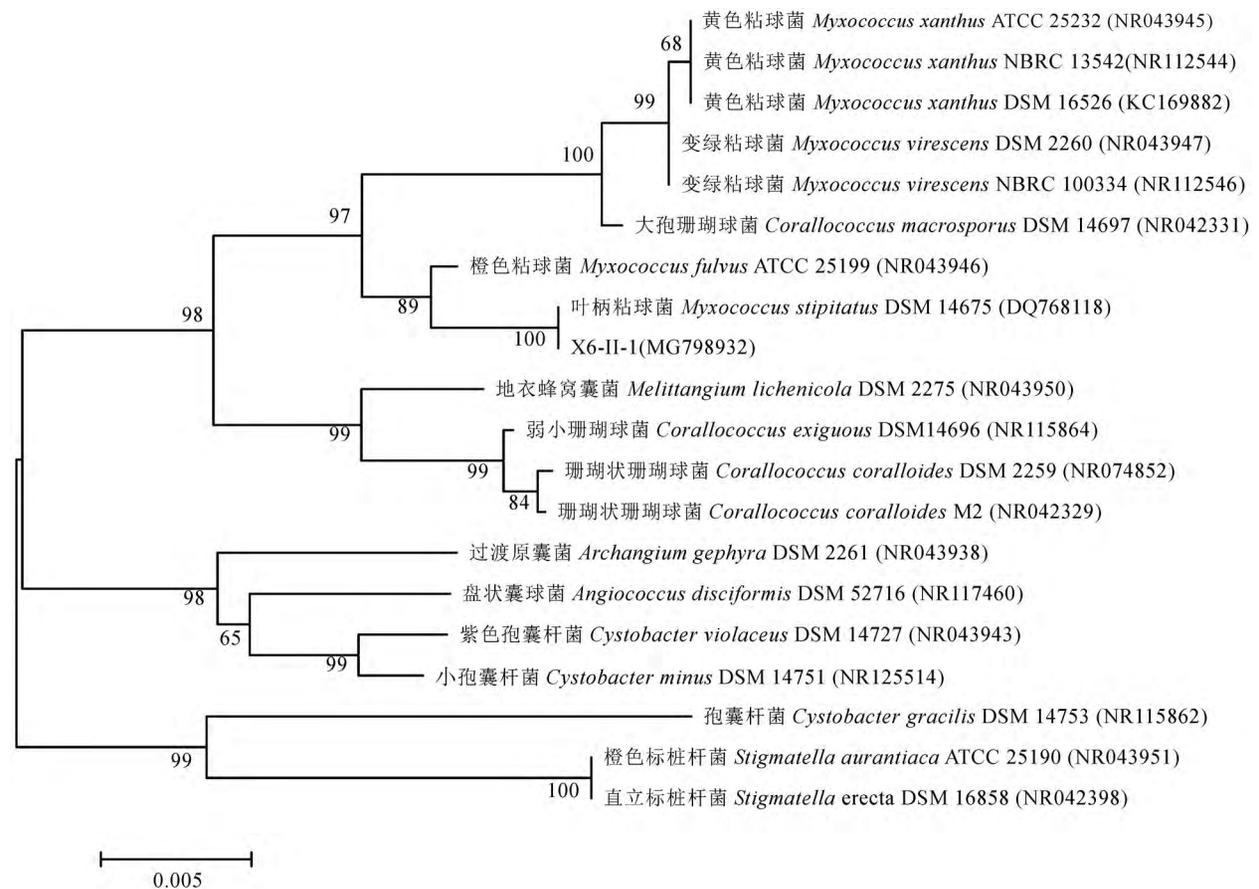


图 3 X6-II-1 菌株基于 16S rRNA 基因序列的系统发育进化树

Figure 3 The phylogenetic tree of the strain X6-II-1 based on 16S rRNA gene sequence

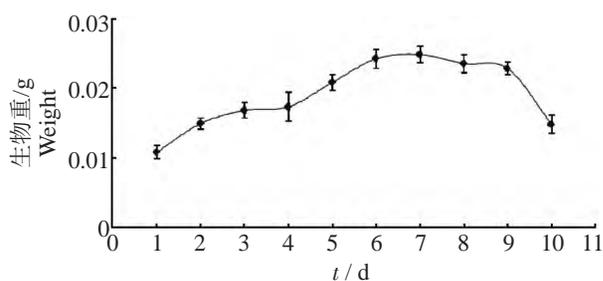


图4 X6-II-1菌株的生长曲线

Figure 4 The growth curve of the strain X6-II-1

本实验选择10%为菌株X6-II-1最适接种量。

2.6.2 摇床转速的影响

在菌株X6-II-1发酵培养的过程中,不同转速对发酵上清液抑菌活性的影响不是十分明显。如图6B所示,在转速为150~180 r/min范围内,抑菌活性总体呈上升趋势,当转速达到180 r/min时,发酵上清液对马铃薯晚疫病菌的拮抗活性最高,在180~190 r/min时,抑菌活性达到平稳,因此,确定最佳转速为180 r/min。

2.6.3 发酵温度的影响

如图6C所示,在温度范围为25~30℃时,菌株X6-II-1的发酵上清液抑菌活性随着温度的升高逐渐增强,30℃时抑菌活性达到最高,致病疫霉菌丝生长边缘与滤纸片的最短距离达到3 mm,之后随着温度的增高抑菌活性出现下降的趋势,这说明温

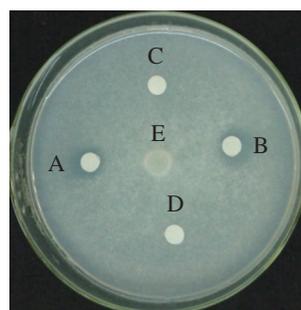


图5 活性物质的分布

Figure 5 Distribution of active substances

A/B: 胞外物质; C: 胞内物质; D: 空白对照; E: 马铃薯晚疫致病病菌

A/B: Extracellular substances; C: Intracellular substances; D: Blank control; E: *Phytophthora infestans*

度偏高或偏低都不利于菌株X6-II-1活性物质的产生,故选择30℃为菌株X6-II-1最佳发酵温度。

2.6.4 发酵时间的影响

将菌株X6-II-1在VY/2发酵培养基中30℃震荡培养不同时间后,滤纸片法测定其发酵上清液对马铃薯晚疫病菌的拮抗活性,结果见图6D。菌株X6-II-1发酵4 d后的抑菌活性还比较低,但是随着发酵时间的延长抑菌活性逐渐增强,培养至7 d时抑菌活性达到最高,在7 d到8 d之间,抑菌活性达到平稳,9 d时开始出现下降的趋势,最终确定最佳发酵时间为7 d。

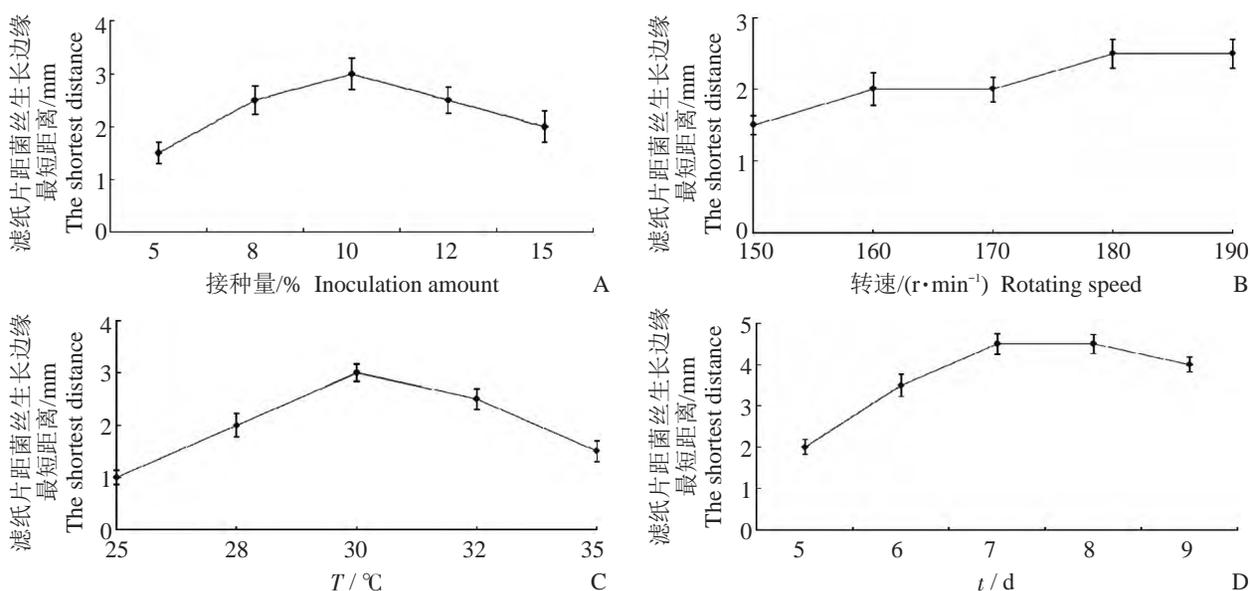


图6 不同接种量(A)、转速(B)、温度(C)和培养时间(D)对发酵上清液抑菌活性的影响

Figure 6 Effect of inoculum size (A), shaking speed (B), incubation temperature (C) and incubation time (D) on the anti-biotoxic activity of fermentation supernatant

表 4 菌株 X6-II-1 正交实验设计与结果

Table 4 Orthogonal experiment design and results of the strain X6-II-1

实验编号 Test number	因素 Factors			滤纸片距致病疫霉菌丝边缘最短距离(均值)/mm The shortest distance between the edge of the filter paper disk and the mycelia of <i>Phytophthora infestans</i> (Average)
	温度/℃ Temperature	时间/d Incubation time	接种量/% Incubation amount	
	1	28	7	
2	30	7	10	4.7
3	32	7	12	3.8
4	28	8	10	3.5
5	30	8	12	3.8
6	32	8	8	3.5
7	28	9	12	2.7
8	30	9	8	3.0
9	32	9	10	3.7
K1	3.1	3.8	3.2	$\bar{K}=3.5$
K2	3.8	3.6	4.0	
K3	3.7	3.1	3.4	
R	0.7	0.7	0.8	

K1, K2, K3: 相应列表的平均值; \bar{K} : K1、K2、K3 的平均值; R: 极差

K1, K2, K3: The average values of the corresponding list; \bar{K} : The average values of K1, K2 and K3; R: Range

表 5 菌株 X6-II-1 正交优化结果的方差分析

Table 5 Variance analysis of orthogonal optimization result of the strain X6-II-1

方差来源 Source of variance	离均差平方和 The square sum of the mean squared	自由度 Degrees of freedom	均方 Mean square	F	P
温度 Temperature	0.976	2	0.488	15.679	0.060
时间 Incubation time	0.762	2	0.381	12.250	0.075
接种量 Incubation amount	0.996	2	0.498	16.000	0.059
误差 Deviation	0.062	2	0.031		

2.6.5 发酵条件正交优化

在以上单因素实验结果的基础上,选取对菌株 X6-II-1 发酵上清液抑菌活性影响比较大的 3 个因素,接种量、发酵温度以及发酵时间,进行正交实验。对 3 个因素分别取 3 个水平进行实验设计,方案及结果见表 4。叶柄粘球菌 X6-II-1 经不同时间、温度、以及接种量发酵产生的上清液对马铃薯晚疫病病原菌致病疫霉的拮抗作用并不同。该菌株产生抑制致病疫霉生长的具有生物活性的次级代谢产物的最优发酵条件为:温度 30 ℃、时间 7 d,接种量 10%。从极差大小分析可知,影响该菌株发酵上清液拮抗致病疫霉活性的顺序为:接种量 > 温度 = 时间。

利用极差计算的实验结果是无法对误差进行定量分析的,因而不能确定各因子水平之间的差异是由实验误差导致的,还是各个因素各个水平之间确实存在实质性的不同。为了能够进一步反映各个因子各个水平之间的差异,以优化叶柄粘球菌 X6-II-1 产生抑制致病疫霉生长的活性物质的最佳发酵条件,故增加方差分析对正交实验结果进行进一步的分析,结果如表 5 所示。其中,温度、时间及接种量三因素的 P 值均小于 0.1,即此三因素对实验结果都有一定影响,再通过方差分析比较 F 值的大小,从而进一步确定接种量对菌株 X6-II-1 发酵产生的次级代谢产物的活性的影响略高于温度,二者均明显大于时间。

3 讨论

通过利用有益微生物从而达到制约有害微生物的效果,是防治植物病害中最有潜力的有效途径之一,也是目前开发、利用微生物资源的重要研究领域之一(蒋继志等, 2011)。自 Malajczuk 等(1983)首次报道对马铃薯晚疫病病原菌致病疫霉的生长与繁殖具有抑制活性的微生物以来,来自不同国家的诸多研究学者便开始尝试利用拮抗微生物及其发酵产生的次级代谢产物来抑制致病疫霉的生长与繁殖或者是诱导马铃薯以增强其自身对致病疫霉的抗性。Yan 等(2002)和蒋继志等(2013)通过各自的研究发现假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)不仅可以抑制致病疫霉菌丝的生长还可以抑制其孢子的萌发;Abbas 等(2009)从木霉菌(*Trichoderma*)中分离出多种能够明显抑制植物病原体的次级代谢产物;Daayf 等(2003)研究发现枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)也可以对致病疫霉产生抗性,且能明显地降低病害的发生。这些研究表明,从微生物产生的具有生物活性的次级代谢产物中开发防治马铃薯晚疫病的生物农药具有非常大的潜力。

目前已经从不同属种的粘细菌菌株发酵产生的次级代谢产物中发现了 600 多种具有生物活性的物质,其具有抗细菌、抗真菌、抗病毒、抗癌甚至溶栓等活性。这些活性物质的结构新颖,作用水平层次多,作用机制独特。例如 Chivosazol (Irschik et al., 1995)能够破坏真菌细胞壁的完整性与稳定性;Soraphen (Vahlensieck et al., 1994)可以抑制真菌脂类合成当中的乙酰辅酶 A 羧化酶,从而起到阻止细胞膜合成的作用;Myxochelin (Silakowski et al., 2000)主要干扰细菌和一些真菌对金属离子的运输;Disorazol (Mohamed et al., 2006)能够作用于微管蛋白,从而抑制细胞骨架的形成;Myxovalargin (Irschik et al., 1983)可以干扰真核或原核生物蛋白质的合成;Myxopyronin (Audrey et al., 2009)主要通过抑制细菌的 RNA 多聚酶活性从而抑制核酸的合成。

本研究从采集自内蒙古自治区锡林郭勒盟苏尼特右旗赛罕高毕苏木乡牧区草地的土壤样品中筛选出一株对马铃薯晚疫病病原菌致病疫霉具有显著抑制作用的菌株 X6-II-1,并通过该菌株的形态特征、生理生化特征以及 16S rRNA 基因序列分

析对其进行分类鉴定,发现该菌株属于叶柄粘球菌(*Myxococcus stipitatus*)。叶柄粘球菌的次生代谢产物越来越受到人们的关注,尤其是在抑制肿瘤细胞方面,Sasse 等(1993)从 *M. stipitatus* DSM 6807 中分离得到的活性物质 Rhizopodin 通过干扰蛋白质磷酸化系统而使细胞发生形变以达到抑制肿瘤细胞的作用;雷良欢等(2016)发现菌株 *M. stipitatus* STXZ77 的发酵产物对小鼠(*Mus musculus*)乳腺癌细胞 4T1、人宫颈癌细胞 HeLa、人(*Homo sapiens*)肝癌细胞 SMMC-7721 以及人结肠癌细胞 SW480 等多种肿瘤细胞表现出较好的细胞毒性作用。此外,Trowitzsch-Kienast 等(1992)从 *M. stipitatus* Mx s40 中分离得到了 HIV-1 抑制剂 Phenalamides;李娜(2015)从大兴安岭筛选出的叶柄粘球菌 8-I-2 对酿酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)具有一定的抗性。但是截止到目前为止,有关于叶柄粘球菌及其发酵产生的具有生物活性的次级代谢产物对植物病害特别是马铃薯晚疫病的预防与防治作用鲜少见报道。已有的相关报道则多数为其他种属,例如:陶龙鑫等(2012)分离得到的对马铃薯晚疫病菌具有一定抑制作用的菌株 H-1 为黄色粘球菌(*Myxococcus xanthus*);刘沛生等(2014)分离到的具有较强的抗马铃薯晚疫病菌活性的 Xt-2 为橙色粘球菌(*Myxococcus fulvus*);任兴波等(2016)分离出的抗马铃薯晚疫病菌的菌株 YR-35 则为变绿粘球菌(*Myxococcus virescens*)。本研究首次发现分离到的叶柄粘球菌菌株 X6-II-1 具有比较强的抗马铃薯晚疫病菌的活性,进一步拓宽了粘细菌在该领域应用的筛选范围。此外,菌株 X6-II-1 可以杀死并溶解大肠杆菌,且可以抑制枯草芽胞杆菌的生长,说明该菌株在这些方面的应用也具有一定的潜力,需要今后进一步深入研究。

尽管粘细菌发酵产生的具有生物活性的物质具有种类多、抗性广、结构新等多种特点,但是由于其粘液的大量分泌以及胞外酶导致自溶等自身的一些遗传特点都使其在生物活性物质的发酵生产方面有非常大的局限性。微生物发酵条件的优化主要包括发酵温度、转速、时间、补料及通风等多种因素,这些因素通常都不是单一地影响菌株的发酵,而是通过各个因素各个水平之间的交互作用共同影响(张宜涛, 2011)。谢风行等(2017)应运正交设计优化了植物乳杆菌 r13(*Lactobacillus plantarum* r13)的发酵参数,提高了菌液生物量及

有效活菌浓度;冯志彬等(2016)通过正交试验将特基拉芽胞杆菌 PanD37(*Bacillus tequilensis* PanD37)的发酵配方和培养条件进行了系统优化,使其产生的L-天冬氨酸 α -脱羧酶的活力有了较大地提升。本研究通过单因素分析发现接种量、发酵温度与发酵时间对菌株X6-II-1产生的次级代谢产物的抑菌活性影响较大,对三个因素分别取三个水平进行正交实验优化,发现该菌株最适发酵条件为:接种量10%,摇床转速180 r/min,培养温度为30℃,发酵时间为7 d。在上述优化培养条件下,用滤纸片法检测其发酵上清液的抑菌活性,发现致病疫霉菌丝生长边缘距滤纸片可达4.7 mm。但是该菌株的活性物质为哪类物质以及其拮抗致病疫霉的作用机理、大田应用等问题都有待于今后进一步分析。

为了提高粮食的产量以供日益增长的人口所需,越来越多的化肥和农药被用于耕种中,但其毒性一般都较高,因此每年因为农药造成的中毒事件也经常发生。马铃薯仅次于小麦、玉米和水稻,是世界上四大粮食作物之一,但每年都会因块茎腐烂而造成产量大幅减少。马铃薯晚疫病是由致病疫霉引起的马铃薯的茎叶死亡和块茎腐臭的一种具有毁灭性的病害。因此,研发高效无毒的防治马铃薯晚疫病的生物农药迫在眉睫。本实验从采集自内蒙古自治区锡林郭勒盟苏尼特右旗赛罕高毕苏木乡牧区草地的土壤样品中分离纯化出一株具有较强的抑制马铃薯晚疫病病原菌生长繁殖的活性的菌株X6-II-1,并通过单因素分析与正交实验相结合的方法优化了该菌株产生活性物质的发酵条件,为今后具有抗致病疫霉的活性物质的进一步提取、分离、纯化及鉴定提供基础数据,并对内蒙古地区粘细菌的深入研究以及防治马铃薯晚疫病生物农药的研发具有比较实际的指导意义。

4 结论

本研究从土壤样品中共分离得到5株粘细菌,其中有3株对致病疫霉表现出拮抗活性,菌株X6-II-1的拮抗活性最强,鉴定为叶柄粘球菌(*Myxococcus stipitatus*)。该菌株可以杀死并溶解大肠杆菌,且可以抑制枯草芽胞杆菌的生长。拮抗致病疫霉的活性物质主要存在于细胞外,通过单因素分析与正交优化相结合的方法确定产活性物质的最适发

酵条件为:接种量10%,摇床转速180 r/min,培养温度为30℃,发酵时间7 d。有关叶柄粘球菌拮抗马铃薯晚疫病菌的研究还未见报道,本研究尚属首次。粘细菌菌株X6-II-1能够产生抗马铃薯晚疫病菌的活性物质,具有开发成抗马铃薯晚疫病生物农药的潜在价值。

参考文献

- 东秀珠,蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 科学出版社,北京. pp. 358-364. (Dong X Z, Cai M Y. 2001. Common bacterial system identification manual[M]. Science Press, Beijing. pp. 358-364.)
- 冯志彬,张娟,陈国忠,等. 2016. 产L-天冬氨酸 α -脱羧酶细菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学报, 56(1): 44-55. (Feng Z B, Zhang J, Chen G Z, et al. 2016. Isolation, identification and fermentation optimization of *Bacillus tequilensis* PanD37 producing L-aspartate α -decarboxylase[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 56(1): 44-55.)
- 蒋继志,孙琳琳,郭会婧,等. 2010. 几种微生物提取物诱导马铃薯抗晚疫病及机理的初步研究[J]. 植物病理学报, 40(2): 173-179. (Jiang J Z, Sun L L, Guo H J, et al. 2010. Resistance and its mechanisms in potato against late blight induced by some microbial extracts[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40(2): 173-179.)
- 蒋继志,赵雨坤,史娟,等. 2011. 几种真菌发酵液对致病疫霉的抑制作用[J]. 微生物学通报, 28(2): 55-59. (Jiang J Z, Zhao L K, Shi J, et al. 2011. Inhibition of fungal fermented filtrates on *Phytophthora infestans*[J]. *Microbiology China*, 28(2): 55-59.)
- 蒋继志,梁廷银,王怀远. 2013. 致病疫霉拮抗菌荧光假单胞菌的筛选及离体防病作用[J]. 河北农业大学学报, 36(3): 72-76. (Jiang J Z, Liang T Y, Wang H Y. 2013. Screening of antagonistic *Pseudomonas fluorescens* against *Phytophthora infestans* and disease control *in vitro*[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 36(3): 72-76.)
- 李越中,李健,周璐. 2000. 我国粘细菌(Myxobacteria)资源的分离与鉴定[J]. 微生物学报, 40(6): 652-656. (Li Y Z, Li J, Zhou L. 2000. Isolation and identification of Myxobacteria[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 40(6): 652-656.)
- 李娜. 2015. 内蒙古大兴安岭地区粘细菌多样性及其生物活性[D]. 硕士学位论文,内蒙古农业大学,导师:刘惠荣. (Li N. 2015. Diversity and antibiotic activity of myxobacteria in the Daxing'anling mountains Forest

- Region of Inner Mongolia[D]. Master's Thesis, Inner Mongolia Agricultural University, Supervisor: Liu H R.)
- 雷良欢, 黄同龙, 魏慧, 等. 2016. 叶柄粘球菌 STXZ77 的分离鉴定及抗肿瘤活性[J]. 中国生物工程杂志, 36(11): 7-15. (Lei L H, Huang T L, Wei H, et al. 2016. Screening, identification and antitumor activity of *Myxococcus stipitatus* STXZ77[J]. China Biotechnology, 36(11): 7-15.)
- 李丽艳, 蒋继志, 郭文. 2011. 致病疫霉拮抗细菌的筛选及抑菌作用研究[J]. 安徽农业科学, 39(24): 14671-14675. (Li L Y, Jiang J Z, Guo W. 2011. Screening of antagonistic bacteria against *Phytophthora infestans* and its inhibition effect[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 39(24): 14671-14675.)
- 刘沛生, 李娜, 冯福应, 等. 2014. 一株抗马铃薯晚疫病病菌的黏细菌鉴定及其活性分析[J]. 科学技术与工程, 14(21): 40-45. (Liu P S, Li N, Feng F Y, et al. 2014. Identification of a myxobacterium strain against *Phytophthora infestans* and its activity analysis[J]. Science Technology and Engineering, 14(21): 40-45.)
- 任兴波, 张子良, 赵璞钰, 等. 2016. 马铃薯晚疫病病菌拮抗粘细菌 YR-35 的分离鉴定及其代谢产物稳定性[J]. 中国生物防治学报, 32(3): 379-387. (Ren X B, Zhang Z L, Zhao P Y, et al. 2016. Isolation and identification of the strain YR-35 resistant to *Phytophthora infestans* and its metabolites[J]. Chinese Journal of Biological Control, 32(3): 379-387.)
- 唐少军, 肖蓉, 文也, 等. 2014. 粘细菌 STXZ54 的分离鉴定及其抗肿瘤活性[J]. 微生物学报, 54(5): 532-542. (Tang S J, Xiao R, Wen Y, et al. 2014. Isolation and identification of Myxobacteria strain STXZ54 with anti-tumor activities[J]. Acta Microbiologica Sinica, 54(5): 532-542.)
- 陶龙鑫, 刘沛生, 冯福应, 等. 2012. 一株粘细菌 H-1 的分离鉴定及抗菌活性分析[J]. 内蒙古农业大学学报, 33(3): 44-51. (Tao L X, Liu P S, Feng F Y, et al. 2012. Isolation and identification of a myxobacterium strain H-1 and its antibiotic activity analysis[J]. Journal of Inner Mongolia Agriculture University, 33(3): 44-51.)
- 武志华. 2014. 内蒙古凉城地区粘细菌的分离鉴定及活性分析[D]. 硕士学位论文, 内蒙古农业大学, 导师: 刘惠荣. (Wu Z H. 2014. Isolation and identification of myxobacteria from the soil samples in Liangcheng, Inner Mongolia and study on their antibiotic activity[D]. Master's Thesis, Inner Mongolia Agricultural University, Supervisor: Liu H R.)
- 王文桥, 王丽, 韩秀英. 2012. 北方五省(区)马铃薯晚疫病病菌对甲霜灵和精甲霜灵的敏感性检测[J]. 植物保护, 38(3): 116-121. (Wang W Q, Wang L, Han X Y. 2012. Detection of sensitivity of *Phytophthora infestans* to metalaxyl and metalaxyl-M in five provinces in northern China [J]. Plant Protection, 38(3): 116-121.)
- 王德韬, 马中良. 2010. 黏细菌的分子生物学[J]. 生命的化学, 30(5): 779-782. (Wang D T, Ma Z L. 2010. The molecular biology of myxobacterium [J]. Chemistry of Life, 30(5): 779-782.)
- 谢凤行, 张峰峰, 周可, 等. 2017. 水质净化乳酸菌的分离鉴定及发酵参数优化[J]. 微生物学报, 57(2): 304-314. (Xie F X, Zhang F F, Zhou K, et al. 2017. Isolation, identification and fermentation optimization of lactic acid bacteria for aquaculture water purification[J]. Acta Microbiologica Sinica, 57(2): 304-314.)
- 周小玲, 沈微, 饶志明. 2004. 一种快速提取真菌染色体 DNA 的方法[J]. 微生物学通报, 31(4): 89-92. (Zhou X L, Shen W, Rao Z M. 2004. A rapid method for preparation of fungal chromosome DNA[J]. Microbiology China, 31(4): 89-92.)
- 张宜涛. 2011. 橙色黏球菌的分离鉴定及其抑菌活性研究[D]. 硕士学位论文, 河南工业大学, 导师: 惠明. (Zhang Y T. 2011. The studies on isolation, identification and antibacterial activity of *Myxococcus fulvus*[D]. Master's Thesis, Henan University of Technology, Supervisor: Hui M.)
- 张琦. 2005. 粘细菌的分离、鉴定及活性研究[D]. 硕士学位论文, 上海师范大学, 导师: 袁萍. (Zhang Q. 2005. Isolation, identification and activity of myxobacteria[D]. Master's Thesis, Shanghai Normal University, Supervisor: Yuan P.)
- Abbas E H, Frank W, Jochen S. 2009. Detection of viridiofungin A and other antifungal metabolites excreted by *Trichoderma harzianum* active against different plant pathogens[J]. European Journal of Plant Pathology, 124(3): 457-470.
- Audrey T, Maxime G, Konstantin B. 2009. Myxopyronin: A punch in the jaws of bacterial RNA polymerase[J]. Future Microbiology, 4(2): 145-149.
- Boone D R, Castenholz R W. 2004. Bergey's manual systematic bacteriology[M]. Springer-Verlag, New York. pp. 134-137.
- Daayf F, Adam L, Fernando W G. 2003. Comparative screening of bacteria for biological control of potato late blight (strain US-8), using in-vitro, detached-leaves, and whole-plant testing systems[J]. Canadian Journal Plant Pathology, 25(3): 276-284.

- Diez J, Martinez J P, Mestres J, et al. 2012. Myxobacteria: natural pharmaceutical factories[J]. *Microbial Cell Factories*, 30(4): 11-52.
- Fakhouri W, Walker F, Vogler B, et al. 2001. Isolation and identification of N-mercapto-4-formylcarbostyryl, an antibiotic produced by *Pseudomonas fluorescens*[J]. *Phytochemistry*, 58(8): 1297-1303.
- Fry W. 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer[J]. *Molecular Plant Pathology*, 9(3): 385-402.
- Guo W J, Tao G J. 2007. A myxobacterium strain *Sorangium cellulosum* AHB125 producing epothilone B and other anticancer substances[J]. *Natural Product Research*, 21(14): 1256-1265.
- Haas B J, Kamoun S, Zody M C, et al. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*[J]. *Nature*, 461(7262): 393-398.
- Irschik H, Jansen R, Gerth K. 1995. Chivosazol A, a new inhibitor of eukaryotic organisms isolated from myxobacteria[J]. *Journal of Antibiotics*, 48(9): 962-966.
- Irschik H, Gerth K, Kemmer T. 1983. The myxovalgins, new peptide antibiotics from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales). I. Cultivation, isolation and some chemical and biological properties[J]. *Journal of Antibiotics*, 36(1): 6-12.
- Jiang D M, Zhao L, Zhang C Y, et al. 2008. Taxonomic analysis of *Sorangium* strains based on HSP60 and 16S rRNA gene sequences and morphology [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(11): 2654-2659.
- Malajczuk N, Boughton T J, Campbell. 1983. Interaction between the fungicide metalaxyl and soil microorganisms on survival of *Phytophthora cinnamomi*[J]. *Annals of Applied Biology*, 103(1): 57-61.
- Mohamed W, Khalil, Florenz S. 2006. Mechanism of action of tubulysin, an antimetabolic peptide from myxobacteria [J]. *ChemBioChem*, 7(4): 678-683.
- Sasse F, Steinmetz H, Hofle G. 1993. Rhizopodin, a new compound from *Myxococcus stipitatus* (myxobacteria) cause formation of rhizopodia-like structure in animal cell cultures. Production, isolation, physico-chemical and biological properties[J]. *Journal of Antibiotics (Tokyo)*, 46(5): 741-748.
- Silakowski B, Kunze B, Nordsiek G. 2000. The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sga15[J]. *The FEBS Journal*, 267(21): 6476-6485.
- Trowitzsch-Kienast W, Forche E, Wray V, et al. 1992. Antibiotika aus gleitenden bakterien, 45. Phenalamide, neue HIV-1-inhibitoren aus *Myxococcus stipitatus* Mx s40[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 7: 659-664.
- Vahlensieck H F, Pridzun L, Reichenbach H. 1994. Identification of the yeast ACC1 gene product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide soraphen A[J]. *Current Genetics*, 25(2): 95-100.
- Wenzel S C, Müller R. 2009. Myxobacteria-'microbial factories' for the production of bioactive secondary metabolites[J]. *Molecular Biosystems*, 5(6): 567-574.
- Weissman K J, Müller R. 2009. A brief tour of myxobacterial secondary metabolism[J]. *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 17(6): 2121-2136.
- Yan Z, Reddy M S, Ryu C M. 2002. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. *Phytopathology*, 92(12): 1329-1333.

(责任编辑 任立刚)