

青海柴达木极端干旱沙地分离芽孢杆菌的 分子鉴定及拮抗活性分析

谢永丽^{1,2} 马莉贞¹ 徐志伟¹ 杜卓² 高学文^{2*}

- (1. 青海大学 农牧学院 高原草地资源与生态省部共建重点实验室 青海 西宁 810016)
(2. 南京农业大学 植物保护学院 农作物生物灾害综合治理农业部重点实验室 江苏 南京 210095)

摘要: 【目的】研究高原极地环境微生物资源。【方法】采用 rep-PCR 指纹图谱分析、*gyrB* 基因及 16S rDNA 基因序列分析等多项分子鉴定技术对分离自青海柴达木极端干旱沙地的 8 株芽孢杆菌菌株进行分类鉴定; 通过平板对峙及接种离体叶片试验检测分离菌株的拮抗活性及对病原菌侵染的防效; 采用 MALDI-TOF-MS 质谱分析生防菌株的活性成分。【结果】8 株分离菌株鉴定为 *Bacillus amyloliquefaciens* (6 株)、*Bacillus axarquiensis* (1 株) 和 *Bacillus atrophaeus* (1 株); 各菌株对油菜菌核病原真菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 均具有显著的拮抗活性; 接种离体叶片试验表明菌株对油菜菌核病菌的侵染具有较好防效; MALDI-TOF-MS 质谱分析结果显示菌株 DGL1 (*B. amyloliquefaciens*) 产生脂肽化合物 Fengycin, 菌株 DGL6 (*B. axarquiensis*) 产生脂肽化合物 Surfactin、BacillomycinsD 和 Fengycin, 菌株 DCD1 (*B. atrophaeus*) 产生脂肽化合物 Surfactin、Fengycin。【结论】为高原干旱沙地极端环境微生物资源研究及生防菌资源开发和应用提供了研究材料。

关键词: 青海柴达木, 极端干旱沙地, 芽孢杆菌, 分子鉴定, 拮抗活性分析

Molecular identification of *Bacillus* strains isolated from extreme dry-sand environment in Qinghai Chaidamu region and its lipopeptide compound analysis

XIE Yong-Li^{1,2} MA Li-Zhen¹ XU Zhi-Wei¹ DU Zhuo² GAO Xue-Wen^{2*}

- (1. College of Agricultural and Animal Husbandry, Qinghai University, Key Laboratory of Altiplano Grassland Resource and Ecology, Province and Education Ministry, Xining, Qinghai 810016, China)
(2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Key Laboratory of Monitoring and Management of Crop Diseases and Pest Insects, Ministry of Agricultural, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: [Objective] Microbe resource research in extreme environment. [Methods] Eight *Bacillus* strains isolated from Chaidamu extreme dry-sand region in Qinghai Province, were identified by polyphasic molecular taxonomy methods including rep-PCR (BOX-PCR and ERIC-PCR) fingerprints, as well as *gyrB* and 16S rDNA partial sequence analysis. Antagonistic activity detection and dual culture method screening were used to check antagonistic activity and bio-control efficacy of isolates. MALDI-TOF-MS were used to analyze lipopeptide compound of strains. [Results] Eight isolates were identified as *Bacillus amyloliquefaciens* (6 isolates), *Bacillus axarquiensis* (1 isolate), *Bacillus atrophaeus* (1 isolate). All of the isolates presented distinct antagonistic activity and bio-control efficacy to *Sclerotinia sclerotiorum*. MALDI-TOF-MS results showed that the strain DGL1 (*B. amyloliquefaciens*) produced Fengycin, strain DGL6 (*B. axarquiensis*) produced Surfactin, BacillomycinsD and Fengycin, while strain DCD1 (*B. atrophaeus*) produced Surfactin and Fengycin. [Conclusion] The research provided *Bacillus* resources for further developing and application of bio-control strains adjusting in dry-sand extreme environment of Qing-Tibet Altiplano.

Keywords: Qinghai Chaidamu, Dry-sand extreme environment, Isolation of *Bacillus*, Molecular identification, Antagonistic activity analysis

高原极地环境微生物资源研究具有广阔的探索和发展前景。芽孢杆菌是目前微生物资源中应用较广的一类微生物资源,因其能产生抗逆芽孢而具有很强的生存适应能力,广泛应用到农业、畜牧业、工业、医学等领域^[1]。芽孢杆菌也是理想的生防菌筛选对象,是生物菌肥和生物农药研发和应用的重要原料^[2]。脂肽化合物是芽孢杆菌作为生防菌产生的最主要抑菌化合物,包括伊枯草菌素(Iturin)、表面活性素(Surfactin)和泛革素(Fengycin)三大类,脂肽类化合物在植物病害生

物防治过程中发挥着重要的作用^[3]。目前,芽孢杆菌的多项鉴定分类体系可对芽孢杆菌进行较为准确的鉴定,利用菌落形态特征、rep-PCR 指纹图谱分析、16S rDNA 及 *gyrB* 基因分子鉴定等多种方法相结合的鉴定手段,可以更准确、快捷地将芽孢杆菌鉴定到种^[4]。

本研究自青海柴达木极端干旱沙地大格勒白刺植物及大柴旦骆驼蓬植物根围土壤中分离筛选并获得几株芽孢杆菌菌株,均表现出较强的对峙病原真菌的拮抗活性。通过 rep-PCR

(BOX-PCR、ERIC-PCR)指纹图谱分析、16S rDNA 及 *gyrB* 基因序列分析鉴定了其种属, 通过 MALDI-TOF-MS 质谱分析其主要抑菌活性物质脂肽类化合物的组成及成分, 为极端干旱沙地适应性芽孢杆菌资源研究及极端环境适应性生防菌株的开发和应用提供了资源。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及供试菌株

芽孢杆菌菌株 DGL1、DGL2、DGL3、DGL4、DGL5、DGL6 分离自柴达木大格勒干旱沙地白刺 (*Nitraria tangutorum* Boar.) 根围土壤, 菌株 DCD1、DCD2 分离自大柴旦干旱沙地骆驼蓬 (*Peganum harmala* L.) 根围土壤。油菜菌核病原真菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 由本实验室保存。细菌培养基: LB 培养基、Landy 培养基参考 Wu 等^[5] 方法配制; 真菌 PDA 培养基参考郝士海^[6] 方法配制; 引物由南京金斯瑞生物技术公司合成; PCR 扩增反应试剂购自 TaKaRa 公司; PCR 产物纯化试剂盒购自爱思进生物技术公司。

1.2 芽孢杆菌分子鉴定

1.2.1 BOX-PCR 及 ERIC-PCR 指纹图谱分析: 基因组 DNA 提取方法参照 Wu 等^[5] 方法。BOX-PCR 扩增引物为 BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3'), 扩增条件为: 95 °C 7 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 65 °C 8 min, 共 34 个循环; 65 °C 16 min。ERIC-PCR 扩增引物为 ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3') 和 ERIC2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'), 扩增条件为: 95 °C 7 min; 94 °C 1 min, 53 °C 1 min, 65 °C 8 min, 共 30 个循环; 65 °C 16 min^[7]。对 rep-PCR 扩增产物进行电泳检测, 在 2.0% (W/V) LE-琼脂糖凝胶中, 85 V 电泳 4 h, 检测扩增效果, 获得凝胶成像图谱。将获得的 rep-PCR 指纹图谱, 通过指纹图谱分析软件 Cross checker 进行分析, 获得 0,1 矩阵。将获得的矩阵

通过 NTSYS-pc2.10 软件包采用非加权对数算术平均法(Unweighted pair group method using averages algorithm, UPGMA)进行聚类分析^[8], 获得系统发育树。

1.2.2 16S rDNA 序列分析鉴定: 16S rDNA 扩增引物为正向引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'), 反向引物 1492R (5'-GGYTACCTGTACGACTT-3')。PCR 扩增条件为: 95 °C 4 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 34 个循环; 72 °C 10 min^[9]。将 16S rDNA 扩增产物回收纯化后测序, 所得序列通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 通过 MEGA 3.1 软件^[10]对分离芽孢杆菌及模式菌序列进行系统发育分析。

1.2.3 *gyrB* 基因序列分析鉴定: *gyrB* 基因扩增引物序列为正向引物 UP1 (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGGNGGNAARTTYGA-3'), 反向引物 UP2r (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCAGCCRTCACRTCNCRCTCNGTCAT-3')。PCR 扩增程序: 95 °C 4 min; 98 °C 10 s, 62 °C 1 min, 72 °C 2 min, 共 30 个循环; 72 °C 8 min^[11]。将 *gyrB* 基因扩增产物纯化测序, 所得序列通过 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 通过 MEGA 3.1 软件^[10]对分离芽孢杆菌及模式菌的序列进行系统发育分析。

1.3 油菜菌核菌拮抗活性检测

在 26 °C 培养箱中活化的油菜菌核菌 PDA 平板边缘打取直径为 0.7 cm 的菌碟, 接种在新的 PDA 平板中央。在距离菌块 2.5 cm 处, 呈“十”字形分布的 4 个接种点, 放上直径 4 mm 的滤纸小圆片, 取发酵 48 h 后菌体浓度为 3×10^{10} CFU/mL 的待测菌液 5 μ L 点在滤纸片中央, 每个处理重复 3 次, 放入 26 °C 恒温培养箱中培养 2-3 d 后, 取出观测并记录抑菌结果。

1.4 油菜离体叶片接种试验

将供试菌株接种于 Landy 培养基中发酵, 发

酵条件参见王帅等^[12]方法, 37 °C、200 r/min 条件下发酵 38 h; 取油菜中下部叶片, 用自来水冲洗干净晾干, 滴加 0.5 mL 的发酵稀释液(稀释 2 倍), 涂抹均匀, 用灭菌去离子水处理叶片作对照。在光照培养箱中 26 °C 培养 3 h 后接种 6 mm 的油菜菌核菌块, 在 26 °C 光照培养箱中保湿培养 2 d, 检查病斑直径, 每个处理重复 8 次即处理 8 个叶片, 计算抑制率^[13]。

1.5 脂肽类化合物粗提及分析

选择供试菌株进行 Landy 培养基发酵, 发酵条件参见王帅等^[12]方法。发酵培养结束后, 将培养物离心取上清, 在上清液中加入 6 mol/L HCl 调 pH 至 2.0, 轻微搅动, 放置 4 °C 冰箱过夜。离心收集沉淀, 加入甲醇后用 1 mol/L NaOH 调 pH 至 7.0, 再用甲醇抽提并将抽提液合并, 获得脂肽类化合物粗提物^[14]。利用基质协助激光解吸离子化-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)分析菌株 Landy 发酵产生的脂肽类化合物种类, 基质为 α -氰-4-羟肉桂酸(α -Cyano-4-hydroxy-cinnamic acid)。

2 结果

2.1 BOX-PCR 及 ERIC-PCR 指纹图谱分析

对分离自大格勒干旱沙地白刺根围及大柴旦骆驼蓬根围的 8 株芽孢杆菌菌株 DGL1、DGL2、DGL3、DGL4、DGL5、DGL6、DCD1、DCD2, 进行 rep-PCR (BOX-PCR 及 ERIC-PCR) 指纹图谱分析。

以菌株基因组 DNA 为模板进行 BOX-PCR 扩增, 扩增到大小在 200 bp 到 5 000 bp 之间的连续条带, 得到 BOX-PCR 指纹图谱(图 1A)。BOX-PCR 指纹图谱分析结果显示: 菌株 DGL1、DGL2、DGL3、DGL4、DGL5、DCD2 具有完全相同的 BOX-PCR 指纹图谱, 为同种芽孢杆菌; 菌株 DGL6、DCD1 的 BOX-PCR 指纹图谱与其

它菌株有差异。同样以 8 株菌株基因组 DNA 为模板进行 ERIC-PCR 扩增, 扩增到大小在 200 bp 到 5 000 bp 之间的连续条带, 得到 ERIC-PCR 指纹图谱(图 1B)。ERIC-PCR 指纹图谱分析结果显示: 菌株 DGL1、DGL2、DGL3、DGL4、DGL5、DCD2 具有完全相同的 ERIC-PCR 指纹图谱, 为同种芽孢杆菌; 菌株 DGL6、DCD1 的 ERIC-PCR 指纹图谱与其它菌株有差异。

通过对 8 株分离菌株的 rep-PCR 指纹图谱分析结果表明: 8 株菌株分类为 3 种芽孢杆菌(图 1), BOX-PCR 和 ERIC-PCR 的分析结果完全一致。

2.2 gyrB 基因序列分析鉴定

排除 rep-PCR 指纹图谱完全相同的菌株, 选择菌株 DGL1、DGL6、DCD1 及 DCD2, 以基因组 DNA 为模板扩增 *gyrB* 基因, 扩增到大小约 1 300 bp 的 PCR 特征性条带, 与芽孢杆菌 *gyrB* 基因的理论值基本相符。将测序结果在 NCBI 中与 GenBank 中已知序列进行 BLAST 比对。比对结果表明(表 1): 菌株 DGL1 与 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 的 *gyrB* 序列相同(或一致性)为 100%; 菌株 DGL6 与 *Bacillus axarquiensis* LNXM78 的 *gyrB* 序列相同(或一致性)为 100%; 菌株 DCD1 与 *Bacillus atrophaeus* BCRC 17530 的 *gyrB* 序列相同(或一致性)为 98%; 菌株 DCD2 与 *B. amyloliquefaciens* FZB42 的 *gyrB* 序列相同(或一致性)为 99%。

2.3 16S rDNA 序列分析鉴定

同上所述, 以菌株 DGL1、DGL6、DCD1 及 DCD2 的基因组 DNA 为模板, 扩增 16S rDNA 片段。扩增到大小约 1 500 bp 的 PCR 特征性条带, 与芽孢杆菌 16S rDNA 的理论值基本相符。将测序结果在 NCBI 中与 GenBank 中已知序列进行 BLAST 比对。比对结果表明(表 1): 菌株 DGL1 与 *B. amyloliquefaciens* JS、菌株 DGL6 与 *B. axarquiensis* LNXM37、菌株 DCD1 与 *B. atrophaeus*

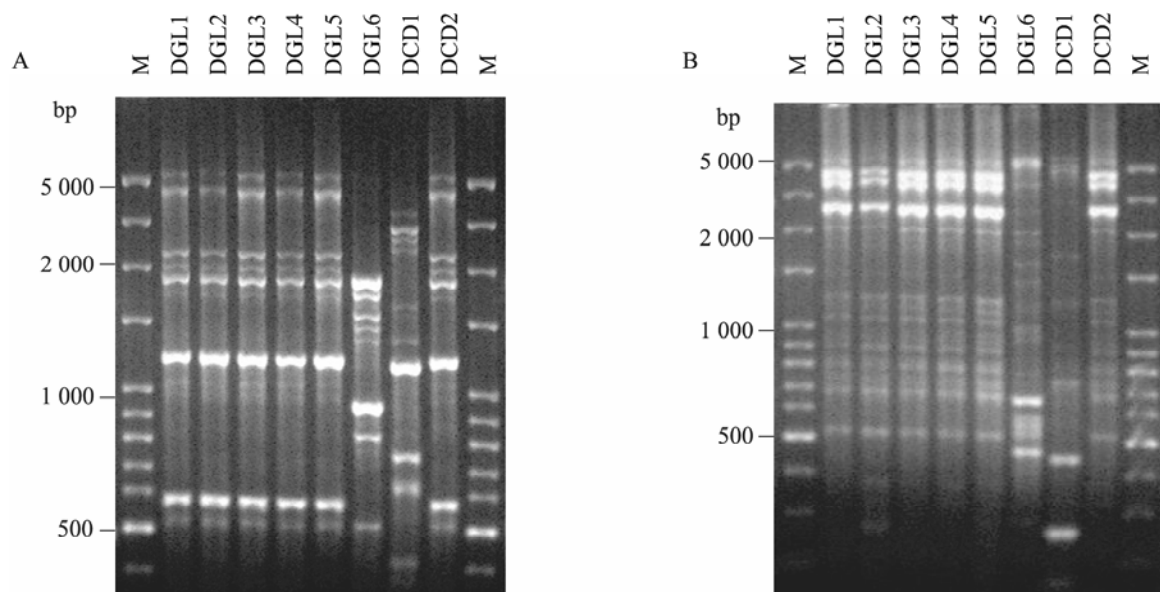


图 1 干旱沙地分离芽孢杆菌菌株 rep-PCR 指纹图谱

Fig. 1 Rep-PCR fingerprint of isolates from dry-sand extreme environment

注: A: BOX-PCR 指纹图谱, 菌株 DGL1, DGL2, DGL3, DGL4, DGL5, DCD2 具有完全相同的 BOX-PCR 指纹图谱; B: ERIC-PCR 指纹图谱, 菌株 DGL1, DGL2, DGL3, DGL4, DGL5, DCD2 具有完全相同的 ERIC-PCR 指纹图谱。

Note: A: Isolates DGL1, DGL2, DGL3, DGL4, DGL5, DCD2 presented identical BOX-PCR fingerprint; B: Isolates DGL1, DGL2, DGL3, DGL4, DGL5, DCD2 presented identical ERIC-PCR fingerprint.

表 1 分离菌株 *gyrB* 和 16S rDNA 序列比对结果表
Table 1 List of isolates closest affiliation to *gyrB* and 16S rDNA gene sequencing

菌株 Strains	<i>gyrB</i> 序列相同(或一致性) <i>gyrB</i> closest match	16S rDNA 序列相同(或一致性) 16S rDNA closest match
DGL1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 (100%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> JS (100%)
DGL6	<i>Bacillus axarquiensis</i> LNXM78 (100%)	<i>Bacillus axarquiensis</i> LNXM37 (100%)
DCD1	<i>Bacillus atrophaeus</i> BCRC 17530 (98%)	<i>Bacillus atrophaeus</i> BKS1-45 (100%)
DCD2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42 (99%)	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Lx-11(100%)

BKS1-45、菌株 DCD2 与 *B. amyloliquefaciens* Lx-11 的 16S rDNA 的序列相同(或一致性)均为 100%。

根据 *gyrB* 基因、16S rDNA 序列比对分析及与模式菌系统进化树分析结果, 最终将菌株 DGL1、DCD2 鉴定为解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* (菌株 DGL1、DGL2、DGL3、DGL4、DGL5 具有完全相同 BOX-PCR 及 ERIC-PCR 指纹图谱, 均鉴定为 *B. amyloliquefaciens*), 将菌株

DGL6 鉴定为 *B. axarquiensis*, 菌株 DCD1 鉴定为 *B. atrophaeus*。

2.4 拮抗活性检测及离体叶片接种防效试验

选择菌株 DGL1 (*B. amyloliquefaciens*)、DGL6 (*B. axarquiensis*)及 DCD1 (*B. atrophaeus*)为供试菌株, 通过平板对峙试验检测其拮抗活性, 结果显示 3 株菌株均对植物病原真菌油菜菌核菌具有较强的拮抗效果, 抑菌圈平均直径均 > 10mm, 表现显著的抑真菌效果(表 2)。对 3 株菌株进行

Landy 发酵, 以发酵液处理油菜离体叶片后接种油菜菌核菌培养, 检测生防菌株对油菜菌核菌侵染的防效, 结果显示 3 株菌株处理后的油菜离体叶片对油菜菌核菌的侵染均具有较好的防效(表 2)。菌株 DGL1 发酵液处理油菜离体叶片 48 h 后没有发病, 菌株 DGL6 和菌株 DCD1 发酵液处理离体油菜叶片 48 h 后, 病斑直径明显小于对照; 在发酵液处理 24 h 时, 菌株 DGL1、DGL6 和菌株 DCD1 对油菜菌核菌侵染的防效分别为 100%、41.93% 和 49.19%, 处理 48 h 后防效分别达到 100%、53.71% 和 52.89%。

2.5 脂肽化合物分析

芽孢杆菌的拮抗活性物质主要为非核糖体途径合成的脂肽类化合物。MALDI-TOF-MS 质谱分析广泛应用于芽孢杆菌脂肽类化合物的检测^[15-16]。选择菌株 DGL1、DGL6 及 DCD1, 通过 Landy 发酵获得脂肽化合物, 对脂肽化合物粗提物进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析。MALDI-TOF-MS 图谱显示: 菌株 DGL1 在 m/z 值为 1 435.828、1 449.849、1 463.867、1 477.879、1 499.852、

1513.876 处有离子峰(簇)出现, 这 6 个离子峰均对应于脂肽化合物 Fengycin 的分子质量(图 2A)。菌株 DGL6 在 m/z 值为 1 030.670、1 044.682、1 058.099 处有离子峰(簇)出现, 这 3 个离子峰均对应于 Surfactin 的质量(图 2B); 在 m/z 值为 1 081.687 处有离子峰(簇)出现, 这个离子峰对应于 Bacillomycins D 的质量(图 2B); 在 m/z 值为 1 471.83、1 485.67、1 513.83 处有离子峰(簇)出现, 这 3 个离子峰均对应于 Fengycin 的质量。菌株 DCD1 在 m/z 值为 1 016.42、1 030.75、1 044.83、1 058.83 处有离子峰(簇)出现, 这 4 个离子峰均对应于 Surfactin 的质量; 在 m/z 值为 1 485.83 处有离子峰(簇)出现, 这个离子峰对应于的 Fengycin 质量。MALDI-TOF-MS 质谱图分析表明: 菌株 DGL1 产生脂肽类化合物 Fengycin, 菌株 DGL6 产生脂肽类化合物 Surfactin、Bacillomycins D 和 Fengycin, 菌株 DCD1 产生脂肽化合物 Surfactin 和 Fengycin。推断分离自极端干旱沙漠地的逆境适应性芽孢杆菌菌株的拮抗活性可能与其脂肽类化合物的合成与分泌有关。

表 2 分离菌株对油菜菌核菌的抑菌活性及对接种油菜离体叶片防治效果
Table 2 Detection of antagonistic activity and bio-control efficacy leaf blight on the detached leaves of *Bacillus* strains

菌株 Strains	油菜菌核抑菌活性 Antagonistic properties to <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	接菌 24 h After 24 h inoculation		接菌 48 h After 48 h inoculation	
		平均病斑直径 Diameter of disease spot (mm)	防治效果 Bio-control efficiency (%)	平均病斑直径 Diameter of disease spot (mm)	防治效果 Bio-control efficiency (%)
Control	0	1.24±0.15	0	2.42±0.22	0
DGL1	+++	0	100b	0	100b
DGL6	+++	0.72±0.11	41.93a	1.12±0.16	53.71a
DCD1	+++	0.63±0.12	49.19a	1.14±0.15	52.89a

注: +: 抑菌圈直径 0-5 mm; ++: 抑菌圈直径 5 mm-10 mm; +++: 抑菌圈直径 10 mm-15 mm; ++++: 抑菌圈直径 >15 mm。表中病斑直径为 8 次重复的平均值, 同列数据后的不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: +: Antagonistic diameter 0-5 mm; ++: Antagonistic diameter 5 mm-10 mm; +++: Antagonistic diameter 10 mm-15 mm; ++++: Antagonistic diameter >15 mm. Diameter of disease spot data are the means of eight replicates. The data in the same column followed by the different letters are significantly different at $P < 0.05$.

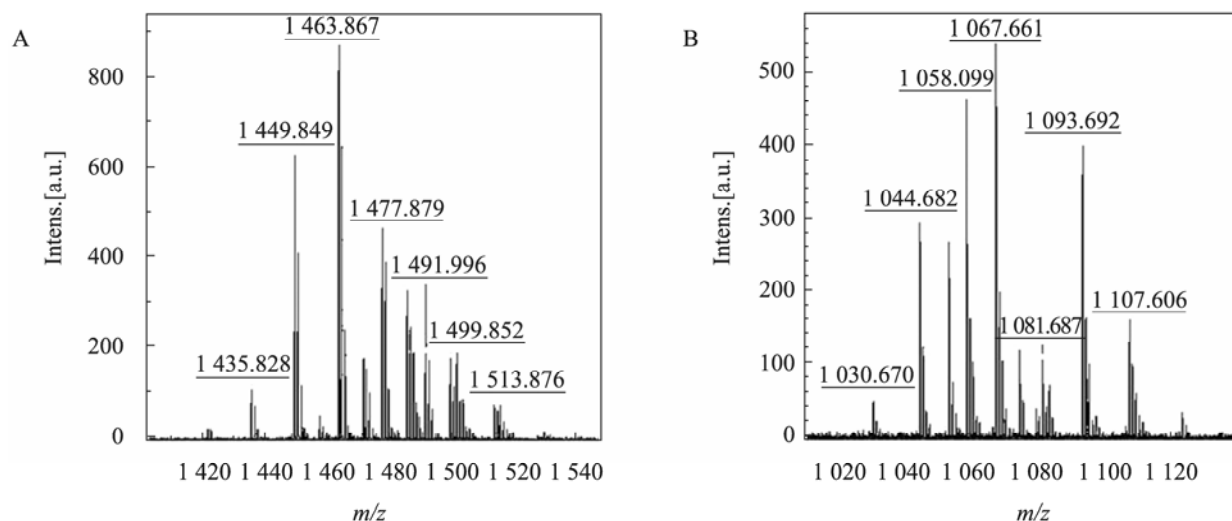


图2 菌株 DGL1 产生的 Fengycin (A) 及 DGL6 产生的 Surfactin 和 Bacillomycins D (B) 的 MALDI-TOF-MS 检测
 Fig. 2 MALDI-TOF-MS analysis of Fengycin (A) produced by strain DGL1, Surfactin and Bacillomycins D (B) produced by strain DGL6

3 讨论

极端环境微生物研究是目前微生物研究的热点, 青藏高原特殊的极地环境为极端微生物资源的研究、开发和应用提供了平台。芽孢杆菌因能产生抗逆性强的芽孢而抵御不良的环境条件, 是目前研究和应用较广的微生物资源, 各种不同的芽孢杆菌资源被广泛开发应用于多种研究领域和应用领域。芽孢杆菌也是理想的生防菌筛选对象, 其生防菌剂在植物病虫害生物防治中被广泛应用。

本研究自青海柴达木大格勒和大柴旦极端干旱沙地植物根围分离到 8 株芽孢杆菌菌株, 分离菌株数量极其有限, 严酷干旱的极端环境限制了芽孢杆菌生存。特殊环境适应性菌株必定具有特殊的适应机制去适应极端的环境条件, 比起其它非逆境环境分离的芽孢杆菌资源, 具备更强的生存适应能力和适应机制, 可为后续的机理机制研究及应用提供优质有效的微生物资源。本研究应用多项鉴定分类体系对分离的芽孢杆菌进行准确快速的鉴定, 首先通过 BOX-PCR 及 ERIC-PCR

指纹图谱分析将菌株归类, 相同指纹图谱的菌株为相同种; 选择指纹图谱有差异的菌株, 进一步通过 *gyrB* 基因序列分析及 16S rDNA 序列分析进行分子鉴定, 综合两种分子鉴定结果, 从而准确而快捷地获得供试菌株的鉴定分类结果, 最终 8 株分离菌株鉴定为 *B. amyloliquefaciens* (6 株)、*B. axarquiensis* (1 株) 和 *B. atrophaeus* (1 株)。

对分离菌株检测其可作为生防菌株的潜力, 结果发现 8 株菌株均具备较强的抑病原真菌能力, 无论是平板对峙检测或接种离体油菜叶片防效试验, 均表现出显著的拮抗油菜菌核菌的活性, 具备作为生防菌株的开发潜力; 在后续研究中, 还可通过将新型生物农药 Harpin 蛋白编码基因转入生防菌株, 创制新一代多功能强适应性生防工程菌株来显著提高生防效果^[5,17]。通过 MALDI-TOF-MS 对拮抗菌株进行脂肽类化合物成分分析, 结果显示菌株 DGL1 产生脂肽类化合物 Fengycin, 菌株 DGL6 产生脂肽类化合物 Surfactin、Bacillomycins D 和 Fengycin, 菌株 DCD1 产生了脂肽类化合物 Surfactin 和 Fengycin。

其中脂肽类化合物 Fengycin、Bacillomycins D 对真菌具有强烈拮抗作用,推断几株干旱沙地分离拮抗菌株的病原真菌拮抗活性可能与其可产生脂肽类化合物 Fengycin 和 Bacillomycins D 有关。

从高原极端干旱沙地分离鉴定干旱适应性芽孢杆菌菌株,对于极端环境微生物资源及干旱适应性芽孢杆菌资源的开发和应用具有重要意义;对分离鉴定的芽孢杆菌菌株探究其作为生防菌资源方面的潜力,为适应干旱环境的生物菌肥和生物农药的研发提供菌株资源;分离鉴定的芽孢杆菌可为后续芽孢杆菌干旱适应机理机制研究、生防菌应用性研究提供资源基础。

参 考 文 献

- [1] 马欣,刘俊,乔俊卿,等.利用转座子 TnYLB-1 构建枯草芽孢杆菌的突变体文库[J].南京农业大学学报,2011,34(6):77-81.
- [2] 刘芳,薛鹏琦,乔俊卿,等.西藏低温适生芽孢杆菌的分离鉴定及其抗菌和促生作用[J].中国生物防治,2010,26(4):453-460.
- [3] Romero D, de Vicente A, Rakotoaly RH, et al. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(4): 430-440.
- [4] Bavykin SG, Lysov YP, Zakhariyev V, et al. Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42(8): 3711-3730.
- [5] Wu HJ, Wang S, Qiao JQ, et al. Expression of HpaG_{Xooc} protein in *Bacillus subtilis* and its biological functions[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(2): 194-203.
- [6] 郝士海.现代细菌学培养基和生化试验手册[M].北京:中国科学技术出版社,1992.
- [7] 谢永丽,徐志伟,马莉贞,等.青海北山林场桦树根围芽孢杆菌分子鉴定及其拮抗活性分析.植物保护学报,2012,39(3):246-252.
- [8] López AC, Alippi AM. Phenotypic and genotypic diversity of *Bacillus cereus* isolates recovered from honey[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 117(2): 175-184.
- [9] Cho SJ, Lee SK, Cha BJ, et al. Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 223(1): 47-51.
- [10] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163.
- [11] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [12] 王帅,高圣风,高学文,等.枯草芽孢杆菌脂肽类抗生素发酵和提取条件[J].中国生物防治,2007,23(4):342-347.
- [13] 薛鹏琦,刘芳,乔俊卿,等.油菜菌核病生防芽孢杆菌的分离鉴定及其脂肽化合物分析[J].植物保护学报,2011,38(20):127-132.
- [14] 高学文,姚仕义,Huong P,等.基因工程菌枯草芽孢杆菌 GEB3产生的脂肽类抗生素及其生物活性研究[J].中国农业科学,2003,36(12):1496-1501.
- [15] Vater J, Kablitz B, Wilde C, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68(12): 6210-6219.
- [16] 许亚伟,陆豪杰,杨芃原.蛋白质组学中基质辅助激光解吸电离的基质研究进展[J].分析化学,2007,35(3):455-460.
- [17] 湛江,杨扬,宁辉,等.载 harpin_{Xooc} 蛋白纳米粒的制备及生物学效应测定[J].南京农业大学学报,2010,33(3):57-61.