



DOI:10.14188/j.ajsh.2018.04.001

微生物农药资源挖掘技术研究进展

王开梅,张志刚,刘晓艳,闵 勇,万中义

(湖北省生物农药工程研究中心,湖北 武汉 430064)

摘要: 微生物农药因其环境相容性受到了广泛重视。作为微生物农药研究开发的最早的环节,微生物农药资源的挖掘显得尤为重要。本文从基于生物活性、农药活性化合物及功能基因三个方面对微生物农药资源的快速挖掘技术进行了综述。针对不同的微生物农药产品开发目标,将以上技术进行整合,可实现微生物农药资源的快速挖掘,为微生物农药产业的发展提供丰富的资源,为微生物农药产业的发展提供支撑。

关键词: 微生物农药资源;定向筛选;高通量筛选;化学筛选;基因筛选;基因组挖掘;宏基因组

中图分类号: S476

文献标识码: A

文章编号: 2096-3491(2018)04-0293-08

Advances of techniques in bioprospecting microbial pesticide resources

WANG Kaimei, ZHANG Zhigang, LIU Xiaoyan, MIN Yong, WAN Zhongyi

(Hubei Biopesticide Engineering Research Centre, Wuhan 430064, Hubei, China)

Abstract: Microbial pesticide has played an important role in sustainable agriculture because of its eco-compatibility. As the primary step of research and development of microbial pesticides, it is very important to bioprospect the microbial resources for pesticidal activities. In this review, the techniques applied in the screening process to accelerate the discovery of potent microbial strains or their active metabolites, such as the activity-targeted screening, active compound-targeted screening and functional gene-targeted screening are summarized. For the different purposes of development of microbial pesticides, the techniques above or their combinations could be used to speed up the process of product development. It is estimated that more microbes with pesticidal activities will be found and boost the whole industry of microbial pesticides.

Key words: microbial pesticide resource; targeted screening; high throughput screening; chemical screening; gene screening; genome mining; metagenomics

0 引言

化学农药在保障粮食生产安全中发挥了重要的作用,但其带来的一系列的负面影响,如:农药残留、病虫草害的抗药性及病虫害的再猖獗等,已严重影响到人类的食品安全、环境及健康^[1]。这也迫使人们寻找新的、安全有效的病虫害防治途径。微

生物源农药,主要包括活体微生物农药及代谢产物农药,以其环境相容性受到了广泛重视^[2]。

具有农药活性的微生物农药资源广泛存在于自然界,如何快速进行微生物农药资源的挖掘与开发是微生物农药研究开发工作者面临的重要课题。具有农药活性的微生物资源,其活性主要涉及到:(1)通过位点或营养的竞争来抑制植物病原微生物

收稿日期:2018-04-20 修回日期:2018-05-17

作者简介:王开梅(1969-),男,研究员,硕士,研究方向为微生物农药及微生物天然产物研究与开发。E-mail:kaimei.wang@nberc.com

基金项目:国家重点研发计划课题(2017YFD0201205);湖北省农业科技创新基金项目(2016-620-000-039)

引用格式:Wang K M, Zhang Z G, Liu X Y, *et al.* Advances of techniques in bioprospecting microbial pesticide resources [J]. Biotic Resources, 2018, 40(4): 293-300.

王开梅,张志刚,刘晓艳,等. 微生物农药资源挖掘技术研究进展[J]. 生物资源, 2018, 40(4): 293-300.

物;(2)通过产生酶直接侵入动物(昆虫、线虫及螨等)、病原微生物或杂草体内;(3)产生具有杀虫、杀菌或除草活性的次生代谢产物、蛋白或酶;(4)诱导植物产生抗性来抵御昆虫的取食或病原菌的入侵^[3-5]。微生物农药资源的快速挖掘,主要涉及到微生物本身、其农药活性、与农药活性相关的化合物或基因等。

如何针对研究开发的目标,建立快捷有效的微生物农药资源挖掘的手段与方法,是微生物农药研发工作面临的重要问题。本文聚焦微生物农药资源挖掘的技术手段,以期对微生物农药资源的开发利用提供一些参考。

1 基于生物活性的微生物农药资源挖掘

1.1 基于生物活性的微生物农药资源定向筛选

基于活性的定向筛选是快速获得具有农药活性微生物资源的有效手段。具有杀虫活性的微生物资源可利用自然罹病的昆虫虫体进行分离或采用健康的昆虫从土壤中定向富集。具有杀虫活性的微生物可直接从染病的昆虫体内分离得到。1911年德国昆虫病理学家Berliner于德国苏云金的一个面粉厂的患病地中海粉螟幼虫中分离到产生伴胞晶体蛋白的芽胞杆菌,将其定名为苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis* Berliner)^[6]。杨自文^[7]从自然死亡昆虫幼虫中分离得到高毒力苏云金芽胞杆菌MP-342菌株,实现了其产业化。有研究者通过将昆虫虫体埋于野外或采集的土壤样品中,进行虫生真菌的定向富集,分离到了多株昆虫病原真菌^[8,9]。而昆虫病毒资源主要通过野外及田间采集的罹病虫体进行分离得到^[10]。针对不同的植物病害防治对象,可定向筛选具有生防活性的微生物资源。用于防治叶部病害的微生物筛选,一般定向筛选可在植物叶部定殖能力较好的微生物;而针对土传病害或根部病害,一般可定向筛选植物根际具有抑菌活性的微生物。杂草病原菌的定向分离与筛选是微生物除草剂开发的一个捷径。研究者通过对杂草病原微生物的定向分离筛选与评价,发现了大量具有除草活性的微生物菌株,部份菌株已作为生物除草剂进行开发^[11]。我国开发防治菟丝子的“鲁保一号”、美国开发的Devine[®]、Collego[®]以及日本开发的Camperico[®]都利用了杂草的病原菌并将其商业化。此外,还可根据某些化合物的生物活性特征进行其产生菌株的定向筛选。井冈霉素目前仍然是防治水稻纹枯病最为有效的药剂,上海农

药所利用水稻纹枯病菌对从井冈山采集的土样中分离到的链霉菌进行定向筛选,获得了产生井冈霉素的吸水链霉菌井冈变种,并实现了井冈霉素的产业化^[12,13]。

1.2 基于生物活性的微生物农药资源的常规筛选与高通量筛选

农药活性的筛选是农药开发的重要环节。据报道,目前一个化学农药的开发需要的化合物数量为十万个左右,涉及到大量的筛选工作,高通量筛选得到了广泛应用^[14]。尽管微生物农药的研究开发投入相对较少,但其筛选工作相对化学农药的筛选更为复杂,难度更大。生物测定是筛选高效生防微生物的有效手段^[15]。微生物资源农药活性的筛选,通常选择一些农业生产上重要的病虫害为靶标,而所选择的靶标必须要有一定的敏感性,并根据不同的开发目标,建立不同的农药活性筛选模型与方法。微生物资源的杀虫活性筛选多以容易获得或可以规模化饲养的害虫为靶标,如棉铃虫、小菜蛾、孑孓、卤虫^[16]或线虫^[17],Fabre等^[18]则直接利用试虫筛选平板放线菌培养物的杀虫活性。供试虫的质量对杀虫活性筛选的结果影响较大。微生物农药资源的杀菌或抑菌活性的测定,多采用植物病原菌的菌丝或孢子,利用平板对峙法、孢子萌发抑制或抑菌圈法进行测定;而对一些专性寄生菌的抑菌活性的筛选,则需要建立基于植物幼苗或组织的测定方法。Abril等^[19]建立了针对几种重要植物病原真菌的微量筛选方法。Handelsman等^[20]利用7日龄的烟草苗在96孔板中建立了快速筛选防治烟草疫病病菌侵染的生物及化学因子的方法。Nelson等^[21]建立了基于24孔组织培养板的小型化快速筛选防治*Pythium aphanidermatum*引起的草坪草猝倒病的细菌。Zanatta等^[22]建立了基于豆子的子叶及初生叶快速筛选防治菜豆普通细菌性疫病的生防因子的方法,从596株细菌中筛选到了一些具有较好活性的菌株。除草活性常规筛选通常以杂草种子或幼苗为对象直接进行抑制种子萌发或幼苗生长的测定。Kida等^[23]建立了利用稗草叶段来筛选微生物来源的,具有抑制淀粉从头合成的除草活性物质的方法,筛选到部份具有除草活性的提取物。基于活体的农药活性常规筛选,作用靶点广泛,能够较为真实地反映药剂与作用对象的关系,有利于各种活性成份的检出,适合筛选规模不大的项目。

在进行具有农药活性的微生物资源的大规模

筛选时,必须要建立具有高度敏感性、高选择性及高效率的筛选模型,并建立小型化、自动化的高通量筛选方法。一般年筛选样品量达到20 000个以上可以称为高通量筛选。在开展微生物资源农药活性高通量筛选时,必须要考虑到所采用的靶标的敏感性,一些微生物菌株所产生的活性化合物的量极低,如果所选择的靶标敏感度不高,可能会产生一些假阴性结果而导致活性资源的遗漏。线虫和卤虫适合于杀虫活性高通量筛选^[16,17]。杀菌活性的高通量筛选,通常采用以常见植物病原真菌的孢子、菌丝体或细菌菌体为筛选靶标,测定微生物菌株或其代谢物对病原微生物生长或孢子萌发的抑制。除草活性的高通量筛选主要利用小型植株,如拟南芥^[24]、一些低等植物,如浮萍或藻类等,以及植物愈伤组织^[25]进行微生物资源除草活性的快速筛选。我们在进行微生物源农药活性先导化合物发现研究时,建立了一些小型化、快速高效的高通量杀虫、杀菌及除草活性测定方法^[24,26~28],年筛选样品达到5万个以上,获得了大量具有农药活性的微生物资源。基于分子靶标的高通量筛选多用于化学合成的化合物的活性筛选,所采用的靶标主要包括乙酰胆碱酯酶、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、 NADH 、乙酰辅酶A羧化酶及谷氨酰胺合成酶等^[14]。微生物提取物成份复杂,采用靶标酶测定时会受到非活性化合物的影响,可能会产生大量的假阳性或假阴性的结果,给筛选结果带来巨大的不确定性。

2 基于活性化合物的微生物农药资源挖掘

在开展微生物源农药活性化合物筛选研究时,研究者经常会碰到已知的化合物或不感兴趣的化合物。为了避免不必要的人力、物力及财力的浪费,研究者应尽可能在研究的早期对微生物粗提物中的化合物进行初步鉴别,排除其中的已知化合物或重复化合物。快速筛选已知化合物或重复的活性化合物的化学方法主要包括薄层层析、液相色谱-紫外联用、液相色谱-质谱联用、液相色谱-核磁共振联用或多种分析方法的结合使用。Zahner等^[29]建立了一个基于薄层层析的微生物天然产物的快速筛选方法,并应用于微生物天然产物的筛选,大大提高了发现新的微生物天然产物的机率。但是,基于薄层层析的化学筛选,依赖于化合物库的数量,且分辨率不高,自动化水平不高,对未知化合物缺乏有效的鉴别手段。随着仪器技术的进步,液相色谱、紫外检测器、质谱甚至核磁共振等成为天然产

物研究的通用装备,利用现代仪器进行农药活性化合物的快速鉴别成为了可能。Fredenhagen等^[30]建立了以液相色谱-离子阱质谱仪联用来快速有效地鉴定微生物提取物中原来已分离鉴定的农药活性化合物的方法。采用液质联用对微生物发酵提取物中的化合物进行分析,通过与该数据库中已知天然产物的母离子质谱数据进行比较,基本上可以确定微生物发酵提取物中是否含有已知的农药活性化合物。但是由于质谱仪本身的局限性,其所得到的结构信息还不足以满足化合物结构鉴定的需要。此外,不同的化合物的离子化条件存在差异。因此,单纯依赖液质联用仍不能解决微生物天然产物的早期鉴别与去重复等问题。有研究者利用液相色谱与核磁共振联用,可实现微克级及以下的微生物源生物活性化合物的结构鉴别^[31]。液相色谱(包括超高效液相色谱)与紫外、质谱及高分辨质谱、核磁共振技术或多种广谱技术的联用,也可用于微生物源农药活性化合物的快速筛选^[32]。近年来,我们利用液相色谱及超高效液相色谱,与紫外及质谱联用,开展了具有农药活性的微生物资源所产生的活性化合物的挖掘,发现了大量的具有农药活性的微生物源农药活性化合物(未发表资料),部份化合物已经进入了开发程序;最近,还利用高分辨质谱及超低温探头核磁共振,对基于活性导向分离的微克级的农药活性化合物进行了结构的早期鉴定,大大提高了发现新农药活性化合物的速度。

3. 基于功能基因的微生物农药资源的挖掘

3.1 基于PCR的微生物农药资源挖掘

微生物农药资源的农药活性,与其所产生的特定的酶、蛋白质或次生代谢产物相关。采用PCR可快速鉴别与农药活性相关的酶、蛋白质或次生代谢产物的生物合成基因,可实现农药活性微生物资源的快速挖掘。苏云金芽胞杆菌的主要杀虫剂活性成份为伴胞晶体蛋白,一般由位于质粒上的基因所编码^[33],许多编码伴胞晶体蛋白的基因被鉴定^[34]。利用对苏云金芽胞杆菌所产生的毒素蛋白基因的保守序列设计引物,研究者可直接利用PCR进行苏云金芽胞杆菌杀虫晶体毒素蛋白基因的快速鉴别^[35~37]。根据菌株的基因组成,就能预测菌株的杀虫活性,结合生物测定方法,可以快速进行高毒力菌株的筛选。此外,苏云金芽胞杆菌及其它式芽胞杆菌中的营养期杀虫蛋白也可采用PCR方法进行鉴定。Yu等^[38]采用PCR-限制性长度多态性从

蜡样芽胞杆菌中鉴定出1个新的 *vip-1* 基因 *vip1Ac1*。Shingote等^[39]采用PCR对苏云金芽胞杆菌 PDKV-01-28的 *vip1/vip2* 基因进行了鉴定,并进一步克隆了 *vip1/vip2* 基因。我们通过PCR基因筛选与生物测定相结合,从保存的3 000余株苏云金芽胞杆菌菌株中快速筛选到具有良好杀线虫活性的菌株NBIN-863(未发表资料),该菌株还表现出良好的促进植物生长活性,并能够在蕃茄根际长期存活^[40]。

植物促生根际细菌也可作为微生物农药进行开发,它们主要通过产生植物激素、噬铁素、胞外多糖、HCN、吩嗪酸或脂肽类抗生素达到防病促生的作用^[41]。有研究者利用这些化合物生物合成基因的保守序列设计引物,利用PCR对相关化合物的生物合成基因进行鉴别,实现具有农药活性的根际促生菌的快速挖掘。Mora等^[42]采用PCR对183株芽胞杆菌的抗菌肽类化合物的生物合成基因进行了快速鉴别,发现了芽胞杆菌菌株中最常见的肽类生物合成基因的组成,为快速筛选植物病害生物防控因子提供了可能。

微生物次生代谢产物的生物合成基因通常成簇排列^[43]。目前研究较多的主要为聚酮类抗生素及非核糖体编码的肽类抗生素的生物合成,可利用PCR对具有农药活性的微生物次生代谢产物进行快速鉴别。Wu等^[44]采用PCR可对PKS I、PKS II及NRPS的生物合成基因进行快速筛选。Ju等^[45]利用PCR对10 000株放线菌中含磷酸的天然产物生物合成的基因 *pepM* 进行了盲筛,从中发现了278个阳性菌株,其中就包括了产生已知除草活性化合物磷霉素(fosfomycin)及phosalacine等的菌株。通过基因筛选,尽管可以快速发现与农药活性相关的基因,但目标基因可能是沉默的,其产物并不表达,需要通过其它手段来激活或表达,其活性还需要生物测定来确定。

3.2 基于功能基因组的微生物农药资源挖掘

随着测序技术的发展,基因组测序将会变得越来越容易。通过对产生已知抗生素的微生物菌株的基因组的分析,结合其它的分析技术及沉默基因的诱导表达,有可能发现新的活性化合物。Van der Voort等^[46]通过对根际细菌假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) SH-C52菌株基因组的挖掘,从中发现6个NRPS基因簇,这其中仅有2个为原来报道过的脂肽类抗生素 thanamycin 和 brabantamide 的生物合成基因簇;结合质谱分析,从该菌株的代谢产物中发

现了 thanapeptin 及其类似物;他们还从剩余的4个基因簇中发现了一个基因簇可能合成一个未知的含8个氨基酸的脂肽。Aleti等^[47]通过基于网络的预测工具,对发表的芽胞杆菌属及近缘属的一些具有抗菌活性的菌株的基因组草图中聚酮类及脂肽类化合物的生物合成基因进行了挖掘,发现了一些新的脂肽类及聚酮类抗生素的生物合成基因簇。Ye等^[48]对从21个苏云金杆菌菌株得到的富集的混合质粒基因组进行挖掘,从中发现了3个编码新Cry蛋白的全长基因。Bi等^[49]通过基因组挖掘从苏云金芽胞杆菌的基因组中发现了新的对蛴螬具有高毒力的 *Vip1/Vip2* 二元毒素及Cry8毒素蛋白基因。Maansson等^[50]将代谢组学及基因组挖掘技术相结合,比较了13个不同来源的假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas luteoviolacea*)菌株的次生代谢产物合成潜力,并从中鉴定了一个吡啶毒素的生物合成基因簇。Esmaeel等^[51]通过对48株伯克霍尔德菌(*Burkholderia* spp.)菌株的基因组的挖掘,揭示了部份菌株产生新的噬铁素及新的脂肽类抗生素。亢文佳等^[52]通过对链霉菌 *Streptomyces* sp. TP-A0365的基因组挖掘,发现了新的吡嗪酮类化合物 provalin。利用基因组挖掘所发现的微生物次生代谢产物的生物合成基因簇的数量大大超过采用常规手段所发现的微生物次生代谢产物的数量,因此通过基因组挖掘有机会大大提升发现微生物来源的农药活性物质的潜力。

3.3 基于宏基因组的微生物农药资源挖掘

宏基因组技术的应用使得未培养微生物的研究成为可能。未培养微生物将进一步丰富微生物农药研究开发的资源。未培养微生物可能产生具有农药活性的物质,如次生代谢产物、蛋白质、蛋白酶及几丁质酶等,通过对宏基因组文库的构建和农药活性的筛选,可能获得新的农药活性物质。罗坤等^[53]从构建的西藏米拉山高寒草甸土壤宏基因组粘粒文库中筛选得到了两个聚酮生物合成酶基因的阳性克隆,其中一个阳性克隆K99对南方根结线虫表现出较好的活性。Courtois等^[54]对构建的环境宏基因组文库中可能存在的I型PKS进行PCR筛选,并对克隆的抗细菌活性进行筛选,发现至少8个克隆中存在新的PKS I型基因,至少有5个克隆能够合成异源的化合物,并从中分离到6个相关的化合物,其中两个为脂肪二烯醇。Brady等^[55]从构建的土壤宏基因组柯斯质粒文库中筛选到的一个具有抗细菌作用的克隆中发现了13个生物合成基

因簇开放阅读框(ORF),该克隆可产生两个新的天然产物类群。MacNeil等^[56]从构建的土壤宏基因组细菌人工染色体文库中发现了一个可产生包括indirubin及与其相关的几个小分子活性化合物的克隆。Chung等^[57]从构建的森林土壤宏基因组 Fosmid文库中筛选到一个具有抗真菌活性的克隆,但未分离到活性化合物;对该克隆的DNA序列分析表明,其中含有与聚酮生物合成相关的核心基因。Gillespie等^[58]从早期构建的一个宏基因组文库发现了三个产生深褐色色素的克隆,从其中的一个克隆中发现了两个具有广谱抗菌活性的抗生素 turbomycin A 和 turbomycin B。赵志祥等^[59]利用从温室黄瓜根线虫发生地的土壤构建了粘粒宏基因组文库,通过蛋白酶活性的筛选及以根结线虫为靶标进行生物测定,筛选到一个含有杀线虫蛋白酶活性的克隆,进一步的基因结构分析发现该蛋白酶为分泌型蛋白酶。宏基因组中农药活性物质的挖掘,必须要与快速高效的农药活性筛选方法相结合。筛选技术的进步和筛选通量的提升必将推动基于宏基因组的未培养微生物所产生的新型农药活性物质的发现。

4 结 语

尽管相对化学农药的开发来讲,微生物农药的研发投入相对较少,但微生物农药的开发仍是一个较为长期的过程。微生物农药资源的挖掘,只是微生物农药研发流程中最初的一个环节,后续的研究与开发仍然漫长。如何加速微生物农药资源的挖掘,缩短微生物农药的研发周期是研究者及行业迫切需要解决的问题。微生物农药资源的挖掘,可将本文所谈到的生物活性、化合物及基因层面的技术实现有效地整合,加快资源挖掘的速度。化学筛选技术通常要与常规筛选或高通量筛选技术相结合,通过活性导向实现活性化合物的分离纯化。基于基因的筛选同样也要与生物测定相结合,快速挖掘与农药活性相关的基因或与基因相关的化合物。特别是随着新一代高通量测序技术的发展及测序成本的快速下降,可以预计,利用基因筛选与农药活性相关的基因将变得更加容易。可以预测,随着技术的进步,越来越多的微生物农药资源(包括微生物本身、微生物产生的农药活性物质及其生物合成基因等)会被发现,并为微生物农药的研究与开发提供丰富的物质基础。

参考文献

[1] Felsot A, Rack K. Chemical pest control technology:

benefits, disadvantages, and continuing roles in crop production systems [C]//ACS Symposium Series, 2007 947:1-18.

- [2] Berg G, Zachow C, Mueller H, *et al.* Next-generation bio-products sowing the seeds of success of sustainable agriculture [J]. *Agronomy*, 2013, 3(4): 648-656.
- [3] Senthil-Nathan S. A review of biopesticides and their mode of action against insect pests[M]. In: *Environmental Sustainability*, Thangavel P, Sridevi G (eds). New Delhi: Springer India, 2015.
- [4] Hubbard M, Hynes R, Erlandson, *et al.* The biochemistry behind biopesticide efficacy [J]. *Sustainable Chemical Processes*, 2014, 2(1): 18.
- [5] Pieterse C, Zamioudis C, Berendsen R, *et al.* Induced systemic resistance by beneficial microbes [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2014, 52: 347-375.
- [6] Berliner E. Uber de schlafsucht der Mehlmotenraupe [J]. *Zeitschrift fur das Gesamtstadt*. 1911, 252: 3160-3162.
- [7] Yang Z W. Studies on fermentation bioengineering of *Bacillus thuringiensis*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 1997.
杨自文. 苏云金芽胞杆菌发酵工程研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 1997.
- [8] Gao S, Nong X Q, Deng C S. Using the “Galleria bait method” for isolation of entomopathogenic fungi from soil [J]. *Chin J Biol Con* 1995, 11(3): 142-143.
高松, 农向群, 邓春生. 利用大蜡螟诱集法从封中分离昆虫病原真菌[J]. *中国生物防治*, 1995, 11(3): 142-143.
- [9] Jia C S, You S J, Gao W T. *Tenebrio molitor* as bait for isolation of entomopathogenic fungi from soil [J]. *Chin Bul Entomol*, 2006, 43(2): 260-261.
贾春生, 由士江, 高文韬. 利用黄粉虫分离土壤昆虫病原真菌[J]. *应用昆虫学报*, 2006, 43(2): 260-261.
- [10] Wang Y X, Lu N, Liang D R, *et al.* Several insect virus resources discovered in Yunnan Province [J]. *J Southwest Foresry College*, 1993, 13(3): 171-176.
王用贤, 卢南, 梁东瑞, 等. 云南发现的几种昆虫病毒资源[J]. *西南林学院学报*, 1993, 13(3): 171-176.
- [11] Zhang H, Wang K Y. Progress of microbial herbicides [J]. *Weed Sci*, 2010 (2): 1-8.
仇欢, 王开运. 微生物除草剂研究进展[J]. *杂草科学*, 2010 (2): 1-8.
- [12] Shen Y C. Research and development of Jinggangmycin for 25 years [J]. *Plant Prot*, 1996(4): 44-45.
沈寅初. 井冈霉素研究开发25年[J]. *植物保护*, 1996 (4): 44-45.
- [13] Shen Y C. The development of agricultural antibiotic-

- Jinggangmycin [J]. *Chin J Antibiot*, 1981, 6(1): 58-62.
- 沈寅初. 农用抗生素—井冈霉素开发研究[J]. *中国抗生素杂志*, 1981, 6(1): 58-62.
- [14] Qiu L H, Zhang W J, Wang C J. High-throughput and its application in pesticide innovation [J]. *Pest Sci Admin*, 2002, 23(5): 20-25.
- 邱立红, 张文吉, 王成菊, 等. 高通量筛选在新农药创制研究中的应用[J]. *农药科学与管理*, 2002, 23(5): 20-25.
- [15] Spurr H. Bioassays — critical to biocontrol of plant disease [J]. *J Agric Entomol*, 1985, 2(1): 117-122.
- [16] Hu Z Y, Qian S Z, Huang H, *et al.* A rapid screening assay for insecticidal antibiotic produced by marine actinomycetes [J]. *Mari Sc Bull*, 2000, 19(4): 36-41.
- 胡志钰, 钱三震, 黄浩, 等. 海洋放线菌杀虫抗生素的一种快速筛选模型[J]. *海洋通报*, 2000, 19(4): 36-41.
- [17] Ootoguro K, Liu Z, Fukuda K, *et al.* Screening for new nematocidal metabolites of microbial origin by a new method using the pine wood nematode [J]. *J Antibiot*, 1988, 41(4): 573-575.
- [18] Fabre B, Armu E, Etienne G, *et al.* A simple screening method for insecticidal substances from actinomycetes [J]. *J Antibiot*, 1988, 41(2): 212-219.
- [19] Abril M, Curry K, Smith B, *et al.* Improved microassays used to test natural product-based and conventional fungicides on plant pathogenic fungi [J]. *Plant Disease*, 92(1): 106-112.
- [20] Handelsman J, Nesmith W, Raffel S. Microassay for biological and chemical control of infection of tobacco by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* [J]. *Curr Microbiol*, 1991, 22(5): 317-319.
- [21] Nelson E, Craft C. A miniaturized and rapid bioassay for the selection of soil bacteria suppressive to *Pythium* blight of turfgrasses [J]. *Phytopathol*, 1992, 82(2): 206-210.
- [22] Zanatta Z, Moura A, Maia L, *et al.* Bioassay for selection of biocontroller bacteria against bean common blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) [J]. *Braz J Microbiol*, 2007, 38: 511-515.
- [23] Kida T, Takano S, Ishikawa T, *et al.* A simple bioassay for herbicidal substances of microbial origin by determine *de novo* starch synthesis in leaf segments [J]. *Agric Biol Chem*, 1985, 49(5): 1299-1303.
- [24] Zhang Z G, Yang Z W, Wang K M, *et al.* Screening lead compounds of herbicide from microorganism with *Arabidopsis thaliana*. *Hubei Agri Sci*, 2014, 53(23): 5731-5733.
- 张志刚, 杨自文, 王开梅, 等. 拟南芥用于除草剂先导化合物筛选的研究[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(23): 5731-5733.
- [25] Souissi T, Kremer R. A rapid microplate callus bioassay for assessment of *Rhizobacteria* for biocontrol of leafy spurge (*Euphorbia esula* L.) [J]. *Biocon Sci Tech*, 1998, 8(1): 83-92.
- [26] Zhang Z G, Yang Z W, Wang K M, *et al.* Study on artificial inoculation of broadbean rust on leafdisc and screening of lead compounds from microorganism [J]. *Hubei Agri Sci*, 2009, 48(12): 3037-3040.
- 张志刚, 杨自文, 王开梅, 等. 蚕豆锈病的离体叶片人工接种技术研究及微生物源先导化合物筛选[J]. *湖北农业科学*, 2009, 48(12): 3037-3040.
- [27] Zhang Z G, Yang Z W, Wang K M, *et al.* Studies on screening of lead compounds of fungicide from microorganism [J]. *Hubei Agri Sci*, 2015, 54(23): 5896-5899.
- 张志刚, 杨自文, 王开梅, 等. 微生物源杀菌剂先导化合物筛选研究[J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(23): 5896-5899.
- [28] Zhang Z G, Yang Z W, Wang K M, *et al.* Study on bioassay of wheat powdery mildew on leaf-dish [J]. *Hubei Agri Sci*, 2012, 51(24): 5643-5645.
- 张志刚, 杨自文, 王开梅, 等. 小麦白粉病离体叶片法生物测定技术研究[J]. *湖北农业科学*, 2012, 51(24): 5643-5645.
- [29] Zahner H, Drautz H, Weber W. Novel approaches to metabolite screening [M]//Bullock J, Nisbet L, Winstanley D (eds). *Bioactive microbial products: search and discovery*, New York: Academic Press, 1982: 51-70.
- [30] Fredenhagen A, Derrien C, Gassmann E. An MS/MS library on an ion-trap instrument for efficient dereplication of natural products. Different fragmentation patterns for $[M + H]^+$ and $[M + Na]^+$ ions [J]. *J Nat Prod*, 2005, 68(3): 385-391.
- [31] Abel C, Lindon J, Noble D, *et al.* Characterization of metabolites in intact *Streptomyces citricolor* culture supernatants using high-resolution nuclear magnetic resonance and directly coupled high-pressure liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Anal Biochem*, 1999, 270(2): 220-230.
- [32] Corcoran O, Spraul M. LC - NMR - MS in drug discovery [J]. *Drug Disc Today*, 2003, 8(14): 624-631.
- [33] Gonzalez J, Brown B, Carlton B. Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, 79(22): 6951-6955.
- [34] Crickmore N, Zeigler D, Schnepf E, *et al.* *Bacillus*

- thuringiensis* toxin nomenclature [DB / OL]. 2016, [2018-04-20] http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/toxins2.html.
- [35] Carozzi N, Kramer V, Warren G, *et al.* Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, 57(11): 3057-3061.
- [36] Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E, *et al.* Extended screening by PCR for seven *cry*-group genes from field collected strains of *Bacillus thuringiensis* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(12): 4883-4890.
- [37] Shu C, Liu D, Zhou Z. *et al.* An improved PCR-RFLP method for the identification of *cryI*-type genes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 9(21): 6706-6711.
- [38] Yu X, Liang X, Tang C, *et al.* Rapid detection of *vip1*-type genes from *Bacillus cereus* and characterization of a novel *vip* binary toxin gene [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, 325(1): 30-36.
- [39] Shingote P, Moharil M, Dhumale D, *et al.* Screening of *vip1/vip2* binary toxin gene and its isolation and cloning from local *Bacillus thuringiensis* isolates [J]. *ScienceAsia*, 2013, 39(6): 620-624.
- [40] Huang D Y, Ye L J, Liu X Y, *et al.* Studies on controlling effect of *Bacillus thuringiensis* NBIN863 strain on tomato root knot nematodes and its growth-promoting effect on tomato [J]. *Chin Veget*, 2015, 1(10): 57-60.
黄大野, 叶良阶, 刘晓艳, 等. 苏云金芽孢杆菌 NBIN863 菌株对番茄根结线虫的防治效果和促生作用[J]. *中国蔬菜*, 2015, 1(10): 57-60.
- [41] Maksimov I V, Abizgil'dina R R, Pusenkova L I. Plant growth promoting rhizobacteria as alternative to chemical crop protectors from pathogens [J]. *Appl Biochem Microbiol*, 2011, 47(4): 333-345.
- [42] Mora I, Cabrefiga J, Montesinos E. Antimicrobial peptide genes in *Bacillus* strains from plant environments [J]. *Intl Microbiol*, 2011, 14(4): 213-223.
- [43] Bai L Q, Deng Z X. Secondary metabolic pathway genes and new drug discovery [J]. *Chin J Antibiot*, 2006, 31(2): 80-87.
白林泉, 邓子新. 微生物次级代谢产物生物合成基因簇与药物创新[J]. *中国抗生素杂志*, 2006, 31(2): 80-87.
- [44] Wu Y, Lu C, Qian X, *et al.* Diversities within genotypes, bioactivity and biosynthetic genes of endophytic actinomycetes isolated from three pharmaceutical plants [J]. *Curr Microbiol*, 2009, 59(4): 475-482.
- [45] Ju K, Gao J, Doroghazi J, *et al.* Discovery of phosphonic acid natural products by mining the genomes of 10,000 actinomycetes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(39): 12175-12180.
- [46] Van Der Voort M, Meijer H, Schmidt Y, *et al.* Genome mining and metabolic profiling of the rhizosphere bacterium *Pseudomonas* sp. SH-C52 for antimicrobial compounds [J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 693. doi: 10.3389/fmicb.2015.00693.
- [47] Aleti G, Sessitsch A, Brader G. Genome mining: prediction of lipopeptides and polyketides from *Bacillus* and related Firmicutes [J]. *Comp Struc Biotech J*, 2015, 13: 192-203.
- [48] Ye W, Zhu L, Liu Y, *et al.* Mining new crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* on the basis of mixed plasmid-enriched genome sequencing and a computational pipeline [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(14): 4795-4801.
- [49] Bi Y, Zhang Y, Shu C, *et al.* 2015. Genomic sequencing identifies novel *Bacillus thuringiensis* Vip1/Vip2 binary and Cry8 toxins that have high toxicity to *Scabaeoidea larvae* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015, 99(2): 753-760.
- [50] Maansson M, Vynne N G, Klitgaard A, *et al.* An integrated metabolomic and genomic mining workflow to uncover the biosynthetic potential of bacteria [J]. *Msystems*, 2016, 1(3): e000028-15.
- [51] Esmaeel Q, Pupin M, Kieu N P, *et al.* *Burkholderia* genome mining for nonribosomal peptide synthetases reveals a great potential for novel siderophores and lipopeptides synthesis [J]. *MicrobiologyOpen*, 2016, 5(3): 512-526.
- [52] Kang W J, Wu S, Hua H M, *et al.* Discovery of a new pyrazine natural product by genome mining [J]. *Chin J Org Chem*, 2016, 36: 1696-1699.
亢文佳, 吴晟, 华会明, 等. 基于基因组挖掘的一个新的吡嗪酮类天然产物的发现[J]. *有机化学*, 2016, 36: 1696-1699.
- [53] Luo K, Zhao Z X, Lu X F, *et al.* Screening for PKS gene from soil metagenomics library and identification of the actives against root-knot nematodes [J]. *Plant Prot*, 2010, 36(5): 38-42.
罗坤, 赵志祥, 芦晓飞, 等. 拮抗南方根结线虫 PKS 基因的筛选及活性评价[J]. *植物保护*, 2010, 36(5): 38-42.
- [54] Courtois S, Cappellano C, Ball M, *et al.* Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 49-55.
- [55] Brady S, Chao C, and Clardy J. New natural product

- families from an environmental DNA (eDNA) gene cluster [J]. *J Am Chem Soc*, 2002(124): 9968-9969.
- [56] MacNeil I, Tiong C, Minor C, *et al.* Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2001 (3): 301-308.
- [57] Chung E, Lim H, Kim J, *et al.* Forest soil metagenome gene cluster involved in antifungal activity expression in *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2008, 74(3): 723-730.
- [58] Gillespie D, Brady S, Bettermann A, *et al.* Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(9): 4301-4306.
- [59] Zhao Z X, Lu X F, Chen G H, *et al.* Construction of microbial metagenomic library and screening of a nematocidal protease in greenhouse cucumber soil infested with root-knot nematodes [J]. *Acta Microbiol Sinica*, 2010, 50(8): 1072-1079.
- 赵志祥, 芦晓飞, 陈国华, 等. 温室黄瓜根结线虫发生地土壤微生物宏基因组文库的构建及其一个杀线虫蛋白酶基因的筛选[J]. *微生物学报*, 2010, 50(8): 1072-1079.
-