



地黄内生放线菌的分离及地黄轮纹病拮抗菌 *Streptomyces folium* leaf-16 的新种鉴定

黄家锐¹, 杜鹏强², 李文均³, 陶航天¹, 郑晓珂^{1*}, 何海荣^{1*}

- 1 河南中医药大学药学院, 河南 郑州 450046
- 2 河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450046
- 3 中山大学生命科学学院, 广东 广州 510275

黄家锐, 杜鹏强, 李文均, 陶航天, 郑晓珂, 何海荣. 地黄内生放线菌的分离及地黄轮纹病拮抗菌 *Streptomyces folium* leaf-16 的新种鉴定. 微生物学报, 2022, 62(12): 4953–4963.

Huang Jiarui, Du Pengqiang, Li Wenjun, Tao Hangtian, Zheng Xiaoke, He Hairong. Isolation of endophytic actinomycetes from *Rehmannia glutinosa* and identification of a new species *Streptomyces folium* leaf-16 resistant to *Phoma herbarum*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(12): 4953–4963.

摘要: 药用植物内生放线菌具有合成天然活性化合物的潜力, 放线菌新种是寻找新型抗生素先导化合物的一个重要来源。【目的】挖掘药用植物地黄内生放线菌资源, 并对地黄轮纹病拮抗菌株 leaf-16 进行新种鉴定。【方法】本研究采用五步消毒法分离河南道地药材地黄的内生放线菌, 以地黄轮纹病原真菌草茎点霉(*Phoma herbarum*)为指示菌, 采用平板对峙法筛选对该病菌有抑制作用的菌株, 16S rRNA 基因测序发现一株抗地黄轮纹病的放线菌新种 leaf-16。通过形态、生理生化、细胞壁化学组分和分子生物学等特征对菌株 leaf-16 进行多相分类学鉴定。【结果】经平板对峙实验得到 8 株抗地黄轮纹病的放线菌, 其中菌株 leaf-16 经 16S rRNA 基因测序、形态比较、生理生化、化学组分和分子生物学以及 DNA-DNA 杂交分析, 确定菌株 leaf-16 为 1 株链霉菌新种, 并命名为 *Streptomyces folium*。【结论】菌株 leaf-16 为 1 株链霉菌新种, 具有抑制地黄轮纹病原真菌的活性, 为进一步分离新型抗地黄轮纹病的生物制剂奠定物质基础。

关键词: 地黄; 放线菌; 链霉菌; 鉴定; 地黄轮纹

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31901918)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31901918)

*Corresponding authors. E-mail: ZHENG Xiaoke, zhengxk.2006@163.com; HE Hairong, hehairongshte1314@163.com

Received: 31 March 2022; Revised: 20 May 2022; Published online: 21 June 2022

Isolation of endophytic actinomycetes from *Rehmannia glutinosa* and identification of a new species *Streptomyces folium* leaf-16 resistant to *Phoma herbarum*

HUANG Jiarui¹, DU Pengqiang², LI Wenjun³, TAO Hangtian¹, ZHENG Xiaoke^{1*}, HE Hairong^{1*}

1 College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, Henan, China

2 College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450046, Henan, China

3 School of Life Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, Guangdong, China

Abstract: Endophytic actinomycetes of medicinal plants have the potential to synthesize natural active compounds, and new species of actinomycetes are an important source for discovering new compounds.

[Objective] To explore the resources of endophytic actinomycetes of the medicinal plant *Rehmannia glutinosa*, and identify a new strain leaf-16 with the activity against the pathogenic fungus causing the ring rot of *R. glutinosa*. **[Methods]** In this study, we used five-step sterilization method to isolate the endophytic actinomycetes of *R. glutinosa* in Henan Province. *Phoma herbarum*, the pathogenic fungus causing the ring rot of *R. glutinosa*, was used as the indicator fungus to screen the antagonistic strains via the plate confrontation assay. For the antagonistic strains, 16S rRNA gene sequencing revealed a new actinomycete strain leaf-16, which was then identified based on the morphological, physiological, biochemical, and molecular characteristics, as well as cell wall components and DNA-DNA hybridization. **[Results]** We obtained eight actinomycete strains resistant to *P. herbarum* by plate confrontation assay. Among them, strain leaf-16 was identified as a new species of *Streptomyces* and named *Streptomyces folium*. **[Conclusion]** Strain leaf-16 is a new species of *Streptomyces* and has the activity of inhibiting the pathogenic fungus caused ring rot disease of *R. glutinosa*. This new species lays a material foundation for further isolation of new bioactive substances against the ring rot of *R. glutinosa*.

Keywords: *Rehmannia glutinosa*; actinomycetes; *Streptomyces*; identification; ring rot of *Rehmannia glutinosa*

放线菌能够产生丰富的次级代谢产物，是开发新型药物先导化合物的重要来源^[1]。临床应用的大部分抗生素都是由链霉菌产生的，如免疫抑制剂(雷帕霉素和他克莫司)、抗肿瘤药物(阿霉素和放线菌素 D)、抗菌类药物(四环素和卡那霉素)及杀虫药物(米尔贝霉素和阿维菌素)等。随着细菌性病原体耐药性的出现及真菌感染数量的增加，急需寻找新的活性化合物以制备新型抗生素，从而抑制新的病原菌。半个世纪以来，随着对常见链霉菌菌株的大量筛

选，导致出现了已知活性化合物重复分离、新的活性化合物筛选困难的现象^[2]。因此，挖掘新菌种、寻找新基因、新产物是解决以上困难的重要途径^[2-4]。

植物内生放线菌即生活在健康植株的根、茎、叶、花、种子和果实等组织中的放线菌，这些放线菌与植物进行化学物质交换，进而促进植物的生长，并抵御病原菌的侵害。药用植物能够产生多种活性化合物，药用植物内生菌与宿主之间长期共存，并与宿主植物形成“协同进化”的关

系, 进而使植物内生菌能够产生与宿主相同或者相似的代谢产物^[5]。因此, 从药用植物内生放线菌筛选活性化合物具有极大的可能。

地黄(*Rehmannia glutinosa*)是我国传统的大宗中药材, 具有滋阴补肾、生精补髓、清热生津、防癌、降血糖、抗炎免疫和抗肝损害等功效, 在国内多个省份均有种植。其中以旧称“怀庆府”的河南焦作地区产出的地黄被冠以“怀地黄”之称, 是我国著名的“四大怀药”之一^[6]。地黄不仅是我国重要的药物资源, 而且是中国重要的创汇产品之一, 远销东南亚及日本等国家。因此, 地黄具有重要的药用价值和经济价值。地黄轮纹病是一种重要的叶部病害, 发病时叶缘上卷、叶片焦枯, 严重时叶片穿孔造成死亡^[7]。在河南, 地黄产区 100% 的地块均有轮纹病发生, 严重影响地黄的产量和品质^[7]。目前, 主要通过化学农药进行地黄轮纹病的防治。然而, 化学农药防治地黄轮纹病不仅防治效果较差, 还会引发农药残留问题。随着人们食品安全意识的提高, 中药材农药残留问题引起了广泛关注。因此, 为了开发和利用地黄内生放线菌资源, 挖掘抗地黄轮纹病原真菌的生防菌, 本研究分离了药用植物地黄内生放线菌, 通过平板对峙方法寻找具有抗地黄轮纹病原真菌拮抗活性的生防菌, 并对其进行分类学鉴定, 为寻找新型的抗地黄轮纹病的活性化合物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和菌株

本研究所用的地黄植株采集地点为河南中医药大学药用植物园。链霉菌 leaf-16 分离自地黄的叶部, 并保存于河南中医药大学药学院生物化学实验室。大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自全式金生物科技有限公司, 菌株 *Streptomyces*

mayteni YIM 60475^T 和 *Streptomyces hainanensis* YIM47672^T 来自中山大学李文均课题组, 地黄轮纹病原真菌草茎点霉(*Phoma herbarum*)来自河南省农科院。

1.2 主要培养基、试剂和仪器

1.2.1 培养基

放线菌分离培养基。高氏一号培养基(g/L): 可溶性淀粉 20.0, K₂HPO₄·3H₂O 0.5, NaCl 0.5, KNO₃ 1.0, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.01, 琼脂 20.0, pH 7.2–7.4。腐殖酸培养基(HV, g/L): KCl 1.7, 腐殖酸 1.0, FeSO₄·7H₂O 0.1, 复合维生素 100 μ L/L, MgSO₄·7H₂O 0.5, Na₂HPO₄ 0.5, CaCO₃ 0.02, 琼脂 20, pH 7.2–7.4。复合维生素(g/L): 硫胺素(B₁) 0.5, 核黄素(B₂) 0.5, 肌醇 0.5, 泛酸(B₃) 0.5, 对氨基苯甲酸 0.5, 生物素(B₇) 0.25, 维生素(B₆) 0.5, 烟酸(B₃) 0.5。

放线菌培养基。ISP 3 培养基(g/L): 燕麦 2, MgSO₄ 0.02, KNO₃ 0.02, K₂HPO₄·3H₂O 0.05, 琼脂 2, 燕麦煮 30 min 后取滤液, 溶解无机盐, 定容至 100 mL

细菌培养基。LB 培养基(g/L): 酵母膏 5, 胰蛋白胨 10, NaCl 5。

病原真菌活性检测培养基。PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20。V8 培养基(g/L): V8 蔬菜汁 100 mL/L, CaCO₃ 1.5, 琼脂 20。

1.2.2 试剂

细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化(北京)生物科技有限公司; PCR 及载体构建等试剂购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(Thermo Fisher Scientific)。

1.2.3 仪器

PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司; Eppendorf mini spin 离心机购自 Eppendorf 公司; Tanon 2500R 全自动数码凝胶成像分析系统

购自上海天能科技有限公司；生物显微镜(ML11-II)购自广州市明美电技术有限公司；二元高压液相色谱仪和(G+C)%含量测定仪购自苏州岛津仪器设备有限公司；DNA杂交仪购自上海百傲科技有限公司。

1.3 微生物分离和纯化

采集到的地黄样品经五步消毒法进行消毒，分别为：(1) 5% NaClO 溶液浸洗 5 min；(2) 2.5% Na₂S₂O₃ 溶液浸洗 10 min；(3) 75%乙醇溶液浸洗 5 min；(4) 无菌水冲洗 3 遍；(5) 10% NaHCO₃ 浸洗 10 min；处理后，将其分为根部、茎部和叶部，分别进行研磨，取 200 μL 研磨液涂布到含放线菌酮(50 mg/L)和萘啶酮酸(20 mg/L)的高氏一号和 HV 分离培养基上，28 °C 培养 1–5 周，挑取长出的单菌落并转接到纯化培养基 ISP 3 上进行纯化培养。

1.4 抗病原真菌活性测试

采用平板对峙法测定待测菌株对地黄纹病原真菌(*Phoma herbarum*)的拮抗作用，把待测菌株点接到培养皿中距离原点 1/2 半径处，待菌落长出后，将真菌的菌饼倒置在另一侧对称的位置，于 28 °C 培养箱培养 7–14 d，观察抑菌效果。

1.5 微生物培养和形态比较

形态特征的鉴定在 ISP 2-7 培养基^[8]和察氏培养基^[9]上 28 °C 培养 14 d，并进行颜色统计。菌株孢子丝的电子显微形态是通过革兰氏染色观察的。首先，将放线菌菌落(带培养基切下)倒置于载玻片的中央，轻轻按压后移除菌落。经火焰固定后制片，具体方法为：(1) 结晶紫染色 30 s，用无菌水冲洗染液；(2) 加碘液染色 30 s，无菌水冲洗；(3) 95%乙醇溶液脱色至无紫色脱落，无菌水冲洗；(4) 沙黄染色液复染 30 s，无菌水冲洗；(5) 载玻片晾干后镜检。

1.6 生理生化特征

生长温度测定将菌株接种到 ISP 3 培养基上，并在相应温度(4、10、18、22、28、32、35、37 °C)下培养 14 d 后统计结果；将菌株接种到液体 ISP 2 培养基中进行 pH (pH 5–12)和氯化钠(0–12%，W/V)耐受实验，菌株在温度 28 °C、转速 220 r/min 的条件下培养 7 d 后统计结果；将菌株接种到基础培养基上进行碳氮源利用实验，28 °C 培养 14 d 后统计结果；牛奶凝固与胨化、纤维素水解、硝酸盐还原、明胶液化、淀粉水解、氧化酶、过氧化氢酶、脲酶、酯酶、H₂S 产生等测试参照文献^[10]进行。

1.7 化学分类分析

化学分类实验中所需的菌丝体通过 ISP 2 液体培养基于 28 °C、转速 250 r/min 的条件下培养 7 d 后离心并冷冻干燥获得。细胞壁中氨基酸、水解糖、磷酸类脂、甲基萘醌等化学组分分析实验步骤参照文献^[10]。

1.8 分子生物学分析

菌株基因组提取纯化^[11]后利用通用引物对 16S-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 16S-R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')扩增菌株 16S rRNA 基因，PCR 扩增体系为 50 μL，包含 10× KOD Buffer 5 μL，dNTPs (2.5 mmol/L each) 4 μL，DMSO 3 μL，引物 16S-F 和 16S-R (均为 10 μmol/L)各 2 μL，MgSO₄ 2 μL，DNA 模板 1 μL，KOD DNA 聚合酶 0.5 μL，无菌蒸馏水 30.5 μL。PCR 反应扩增程序为 94 °C 4 min；94 °C 1 min，58 °C 30 s，68 °C 1.5 min，31 个循环；68 °C 10 min。PCR 产物纯化后连接到 pMD-19T 载体上，送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行一代测序，将测序结果在 EzBioCloud (<https://www.ezbiocloud.net/identify>) 网站上进行相似性比对，选取其相似性较高的典型菌株利用 MEGA 7.0 软件进行系统进化发

育树的构建。

(G+C)%含量通过热变性的方法进行测定, 并以大肠杆菌 JM 109 做对照菌株; DNA-DNA 杂交实验采用复性率方法进行测定, 其公式如下:

$$\text{DNA 同源性}(\%) = [4V_m - (V_A + V_B)] / [2 \times (V_A \times V_B)^{1/2}] \times 100$$

其中, V_A 、 V_B 分别为 2 个样品的复性速率, V_m 为 2 个样品混合液的复性速率, 计算样品间的 DNA 同源性。

2 结果与分析

2.1 地黄内生放线菌的分离

对地黄样品的内生放线菌进行分离, 共获得菌株 65 株, 其中根部分离 31 株、茎部 18 株、叶部 16 株。首先, 根据形态对 65 株放线菌进行分类, 其中 25 株菌株具有典型的链霉菌特征, 并归类为链霉菌属(*Streptomyces*), 其余 40 株根据形态可认定为稀有放线菌属。对剩余的 40 株菌株进行 16S rRNA 基因测序, 测序结果在 EzBioCloud 上分析, 结果表明这 40 株菌株分布于 9 个放线菌属, 分别为原小单孢菌属(*Promicromonospora*) 2 株、野野村菌属(*Nonomuraea*) 6 株、小单孢菌属(*Micromonospora*) 13 株、游动放线菌属(*Actinoplanes*) 4 株、诺卡氏菌属(*Nocardia*) 5 株、放线孢菌属(*Actinomycetospora*) 3 株、链孢囊菌属(*Streptosporangium*) 5 株和马杜拉菌属(*Actinomadura*) 2 株, 其数量统计及分离位置如表 1 所示。从表 1 可以看出, 地黄的根、茎和叶部的内生放线菌在种类上没有明显差异, 但根部的放线菌数量明显多于茎部和叶部, 这可能是因为根部与根系土壤相互接触, 促进了微生物在根内的定殖^[12]。

表 1 所分离放线菌的种类和分布

Table 1 Species and distribution of the isolated actinomycetes

Genus/origin	Root	Stem	Leaf	Total
<i>Streptomyces</i>	13	7	5	25
<i>Promicromonospora</i>	1	0	1	2
<i>Nonomuraea</i>	4	1	1	6
<i>Micromonospora</i>	4	4	5	13
<i>Actinoplanes</i>	2	1	1	4
<i>Nocardia</i>	4	1	0	5
<i>Actinomycetospora</i>	1	2	0	3
<i>Streptosporangium</i>	2	1	2	5
<i>Actinomadura</i>	0	1	1	2
Total	31	18	16	65

2.2 地黄内生放线菌的抗地黄轮纹病病原真菌活性

对所分离的 65 株地黄内生放线菌进行抗地黄轮纹病病原 *Phoma herbarum* 的活性测试, 结果发现 8 株菌株具有拮抗活性, 如图 1 所示。

2.3 *Streptomyces folium leaf-16* 的鉴定

对具有抗地黄轮纹病的拮抗菌株进行 16S rRNA 基因测序, 其在 NCBI 上的 GenBank 序列编号为 MK809368。将菌株 leaf-16 的 16S rRNA 基因序列在 EzTaxon-e (<https://www.ezbiocloud.net/>) 上进行比对, 发现菌株 leaf-16 的最高相似性菌株

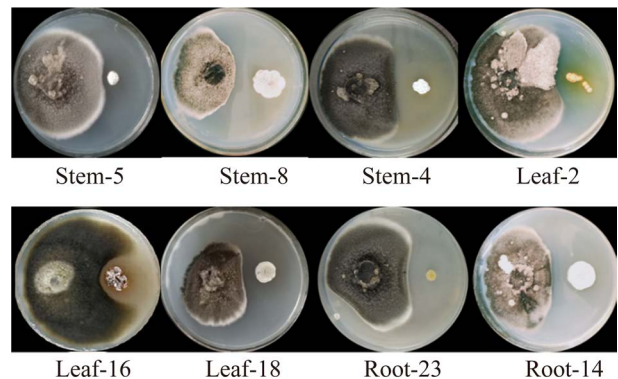


图 1 抗草茎点霉活性菌株

Figure 1 The active strains against *Phoma herbarum*.

为 *Streptomyces mayteni* YIM 60475^T (99.49%)^[13], 其他相似性较高的菌株分别为 *Streptomyces hainanensis* YIM47672^T (98.82%)^[14]、*Streptomyces manganisoli* MK44^T (97.29%)^[15]、*Streptomyces specialis* GW41-154^T (97.03%)^[16]和 *Streptomyces hoynatensis* KCTC 29097^T (97.03%)^[17]。对菌株

leaf-16 进行系统发育分析(图 2), 发现菌株 leaf-16 与其相似性较高的菌株 *S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM47672^T 在同一个分支上, 说明菌株 leaf-16 为链霉菌属, 且与菌株 *S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM47672^T 亲缘关系比较近。

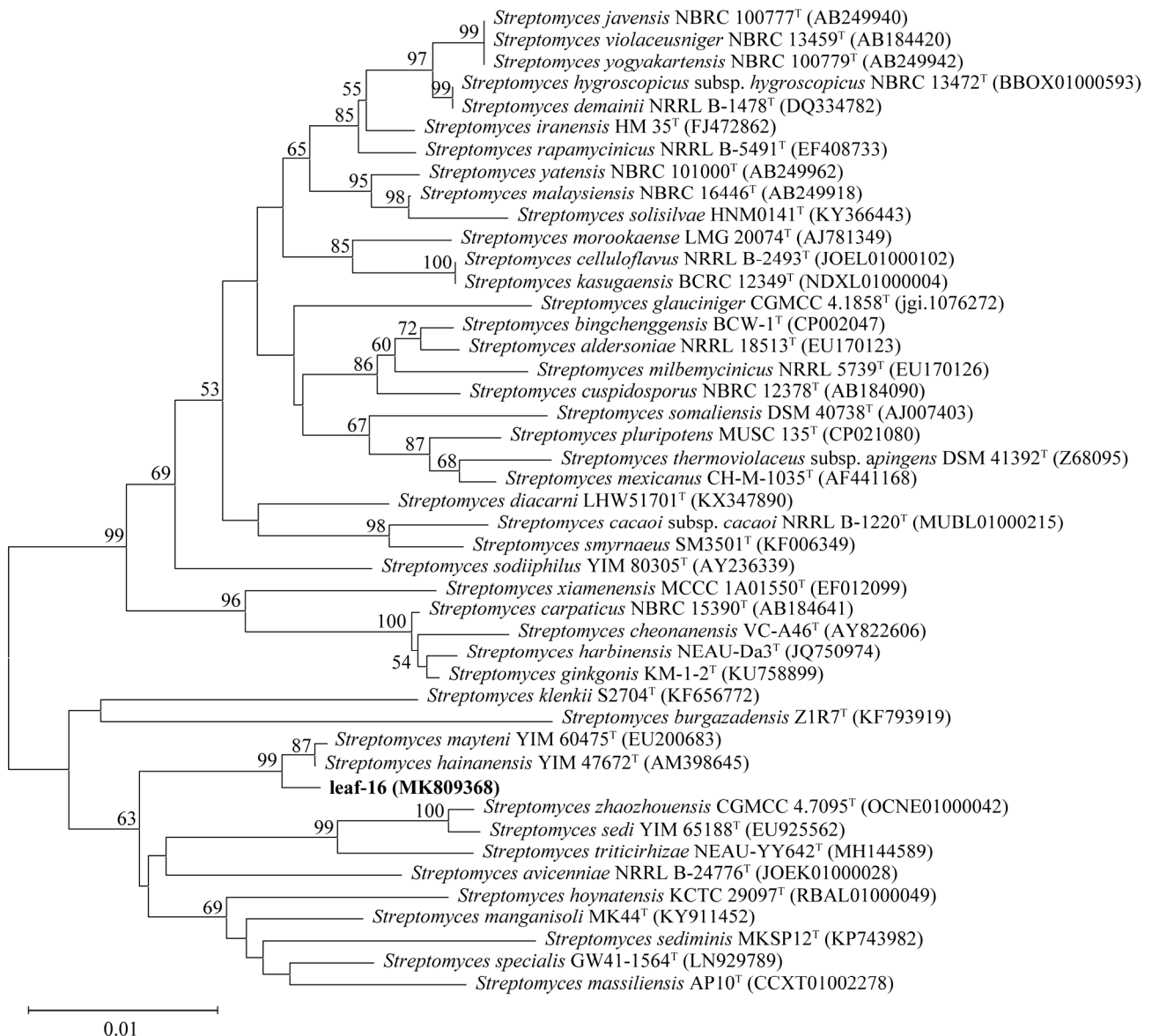


图 2 菌株 leaf-16 的系统进化发育树

Figure 2 Neighbour-joining tree showing the phylogenetic position of strain leaf-16 and related taxa based on 16S rRNA gene sequences. Bootstrap values >50% (based on 1 000 replications) are shown at branch points. Bar: 0.005 substitutions per nucleotide position.

2.3.1 *Streptomyces folium* leaf-16 的形态分析

将菌株 leaf-16 在 ISP 系列培养基和察氏培养基上进行培养, 观察其形态, 菌株颜色范围从白色到橘红色, 在 ISP 2、ISP 3、ISP 7 和察氏培养基上生长良好; 但是在 ISP 4、ISP 5、ISP 6 培养基上生长状态较差, 其中在 ISP 3 培养基上可以产生可溶性色素(表 2)。

将菌株 leaf-16 与其同源关系较近的 2 株菌株 *S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM47672^T 进行形态学比较, 结果表明菌株 leaf-16 在形态上与 *S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM47672^T 有明显差异, 在 ISP 2、ISP 3、ISP 4、ISP 5 上差异最为显著, 如图 3 所示。

将菌株 leaf-16 在 ISP 3 培养基上培养 10 d 后, 在电子显微镜下观察菌株 leaf-16 的孢子丝

和孢子形态, 结果发现, 菌株 leaf-16 的气生菌丝分化形成直线或者弯曲的孢子链, 孢子呈圆柱形, 如图 4 所示。

2.3.2 *Streptomyces folium* leaf-16 的生理生化特征

将菌株 leaf-16 接种到 ISP 3 培养基上, 并在 4、10、18、22、28、32、35、37 °C 温度下培养 14 d, 结果菌株 leaf-16 在 4、10、18、37 °C 温度下不生长, 在 22、28、32、35 °C 温度下可生长, 其中最适生长温度为 28 °C; 将菌株 leaf-16 接种到 ISP 2 液体培养基中, 调节 pH 值为 5–12 (pH 值梯度为 1) 以及添加 NaCl 浓度为 0–10% (W/V), 浓度梯度为 1%, 28 °C、220 r/min 培养 1 周后发现, pH 在 7–9 间菌株生长, 且 pH 为 7 时状态最好; 最大 NaCl 耐受浓度为 9%。

表 2 菌株 leaf-16 的生长形态特征

Table 2 Growth and cultural characteristics of strain leaf-16

Agar medium	Growth	Aerial mycelium	Substrate mycelium	Diffusile pigment
Yeast extract/malt extract (ISP2)	Good	White	White	Dark green
Oatmeal (ISP3)	Good	White	White	Light green
Inorganic salts/starch (ISP4)	Good	Reddish orange	Yellow	None
Glycerol/asparagine (ISP5)	Good	Yellowish white	Yellow	None
Peptone/yeast extract/iron (ISP6)	Poor	None	Translucent white	None
Tyrosine (ISP7)	Poor	white	White	None
Czapek's	Good	None	Yellowish white	None

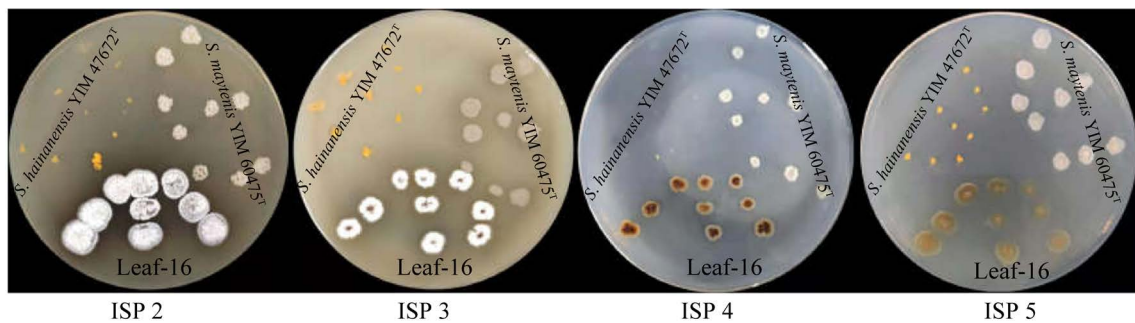


图 3 菌株 leaf-16、*S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM 47672^T 在 ISP 2–5 上的形态差异

Figure 3 Pictures showing the different morphology of strain leaf-16, *S. mayteni* YIM 60475^T and *S. hainanensis* YIM 47672^T on ISP 2–5 at 28 °C for 14 d.



图 4 菌株 leaf-16 的孢子链及孢子形态

Figure 4 Spore chain and spore morphology of strain leaf-16 on ISP 3 at 28 °C for 10 d.

菌株 leaf-16 在淀粉水解、七叶苷分解、脲酶产生和硝酸盐还原实验中呈阳性，而在纤维素分解、明胶液化、硫化氢产生、牛奶凝固与液化、过氧化氢产生以及脂酶产生实验中呈阴性，具体实验方法及结果判定参考文献[10]。

菌株 leaf-16 的碳氮源利用实验在基础培养基中加入 0.2% 的碳源和 0.5% 的氮源(设阴性对照)后接种菌株 leaf-16，28 °C 培养 14 d 后统计结果，发现菌株 leaf-16 可以利用的碳源为葡萄糖、半乳糖、甘露糖、麦芽糖、山梨醇、鼠李糖、甘露醇、阿拉伯糖、肌醇和蔗糖，不能利用的碳源为棉子糖、木糖、果糖和核糖；可以利用的氮源为精氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、苏氨酸、丙氨酸、丝氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和肌氨酸，不能利用的氮源为甘氨酸和谷氨酸。

对菌株 leaf-16 与菌株 *S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM 47672^T 进行生理生化比较，结果表明，菌株 leaf-16 的 pH 生长范围、NaCl 耐受以及碳、氮源利用与其相似性最高且进化树在同一分支的 2 株放线菌有明显差异，菌株 leaf-16 与其最高相似性的 2 株菌的生理生化实验结果如表 3 所示。

表 3 菌株 leaf-16 与最高相似性菌株的表型特征比较

Table 3 Differential phenotypic properties of strain leaf-16 and the most closely related *Streptomyces* species

Characteristic	1	2	3
Diffusible pigment (on ISP 2 medium)	Dark green	–	–
NaCl tolerance	9	3	10
Decomposition of cellulose	–	–	+
H ₂ S production	–	+	+
Utilization of:			
Sorbitol	+	–	–
D-ribose	–	+	–
D-fructose	–	+	–
Inositol	–	–	+
L-asparagine	+	–	–
Whole-cell hydrolysates	Glucose, ribose	Galactose, glucose, xylose	Galactose, xylose.
Phospholipid	DPG, PE, PI, PL, GL	DPG, PG, PE, PI	DPG, PE

Strains: 1: leaf-16; 2: *S. mayteni* YIM 60475^T; 3: *S. hainanensis* YIM 47672^T; Physiology and biochemistry data for *S. mayteni* YIM 60475^T and *S. hainanensis* YIM 47672^T are from this study, chemotaxonomy data are from study 13 and 14. +: positive; –: negative.

2.3.3 *Streptomyces folium* leaf-16 的化学分类特征

菌株 leaf-16 细胞壁氨基酸成分和甾组成分通过 HPLC 分析得到, 结果显示菌株 leaf-16 的细胞壁含有甘氨酸和 2,6-二氨基庚二酸; 甾组成分为 MK-9(H₄) (16.7%)、MK-9(H₆) (29.3%)、MK-9(H₈) (43.4%) 和 MK-10(H₆) (10.6%)。水解糖和磷酸类脂成分的分析通过薄板层析得到, 结果分析表明菌株 leaf-16 的全细胞糖为葡萄糖和核糖; 磷酸类脂主要为双磷脂酰甘油(diphosphatidyl glycerol, DPG)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)、磷脂酰肌醇(phosphatidyl inositol, PI)、3 个未知磷脂(phospholipids, PLs)和 3 个未知糖脂(glycolipids, GLs) (图 5)。

2.3.4 *Streptomyces folium* leaf-16 的分子生物学特征

经热变性法测定, 菌株 leaf-16 的(G+C)%

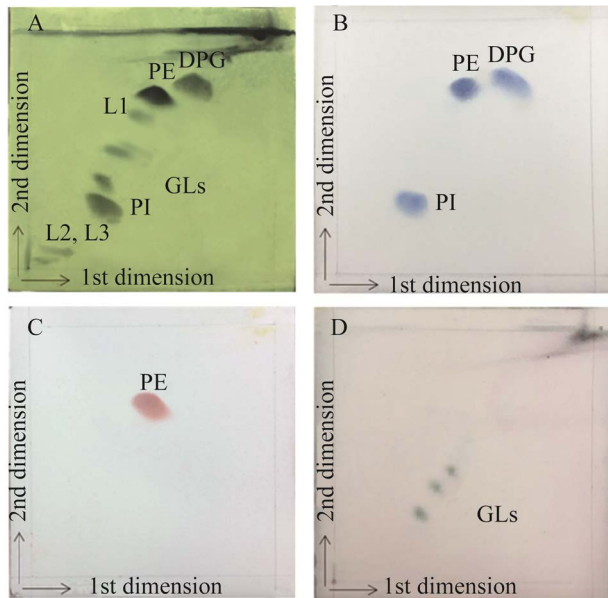


图 5 菌株 leaf-16 的磷酸类脂成分

Figure 5 Phospholipid compositions of strain leaf-16. A: using molybdophosphoric acid reagent; B: using molybdenum blue reagent; C: ninhydrin reagent; D: using anisaldehyde reagent. Abbreviations: DPG: diphosphatidylglycerol; PE: phosphatidylethanolamine; PI: phosphatidylinositol; PL: unidentified phospholipid; GL: glycolipid.

含量为 73.32%。菌株与其相似性最高且在一个分支上的 2 株菌 *S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM47672^T 的杂交结果分别为 50.06% 和 45.59%。

3 讨论与结论

本研究从中药材地黄中分离得到 65 株放线菌, 其中 8 株菌株对地黄轮纹病原真菌有较好的抑菌活性, 16S rRNA 基因测序发现菌株 leaf-16 为潜在的新菌种。经系统进化发育树分析, 该菌株与相似性最高的 2 株菌 *S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM47672^T 在同一个分支上, 其亲缘关系比较近(图 2)。首先, 从形态上比较, 菌株 leaf-16 与 *S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM47672^T 在 ISP 2-5 培养基上具有完全不同的形态, 表明菌株 leaf-16 与这 2 株菌不同(图 3)。其次, 菌株 leaf-16 在生理生化性质和细胞壁成分上与其相似性最高, 且亲缘关系较近的 2 株菌具有显著差异(表 3)。此外, 菌株 leaf-16 的细胞壁含有甘氨酸和 2,6-二氨基庚二酸, 磷酸类脂属于 II 型, 主要甾组成分为 MK-9(H₄)、MK-9(H₆)、MK-9(H₈) 和 MK-10(H₆) 以及其 DNA 的(G+C)% 为 73.32%, 以上特征均属于链霉菌分类特征^[18]。最后, 在分子水平上分析发现, 菌株 leaf-16 与 *S. mayteni* YIM 60475^T 和 *S. hainanensis* YIM 47672^T 的 DNA-DNA 杂交结果分别为 50.06% 和 45.59%, 均小于基因组种属鉴定的阈值 70%^[19]。综上所述实验结果表明菌株 leaf-16 为链霉菌的新种, 并将菌株命名为 *Streptomyces folium*, 其典型菌株为 leaf-16。

植物内生菌能够产生多种促进植物生长的因子并且能够抑制多种植物病原菌生长, 达到“以菌促生长”“以菌治菌”的效果, 大大降低了农药化肥的使用率, 减少了化学物质对环境造

成的影响。植物内生放线菌可产生多种多样的次生代谢产物,如蛇藤内生放线菌 *Streptomyces* sp. NRRL 30562 中筛选获得 munumbicin A–E, 这类抗生素可以抗革兰氏阳性菌如炭疽杆菌 *Bacillus anthracis* 和结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis*^[20]。Igarashi 等从美丽相思子内生放线菌 *Micromonospora* sp. GMKU326 中分离得到一个新的 4-羟乙酸乙酰内脂类多聚酮类化合物 maklamicin, 该抗生素可以在浓度为 0.2、1.7、6.5、13.0 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制黄体微球菌、枯草芽孢杆菌、黑头芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌的生长^[21]。药用植物蕨菜重的类链霉菌属菌株 K12-0794 中分离得到 2 个新型抗生素 hamuramicins A 和 B^[22]。

链霉菌(*Streptomyces*)具有十分复杂的形态发育过程,并在形态发育过程中伴随着初级和次级代谢产物的产生^[23]。研究表明,链霉菌能够产生比迄今报道的所有链霉菌次级代谢物多约 15 万种生物活性化合物,是挖掘生物活性天然产物、药用化学用品和新型药物先导物的重要来源^[24]。链霉菌菌株 leaf-16 表现出对地黄轮纹病原真菌的抑菌活性,表明其具有特异性的抗地黄轮纹病原真菌的代谢产物。因此,在后续实验中,将进行菌株 leaf-16 的全基因组测序以及新型活性化合物分离和鉴定,以挖掘能够特异性抑制地黄轮纹病原真菌的天然活性产物,为寻找高效低毒的新型抗轮纹病的抗生素奠定物质基础。

参考文献

- [1] Kim JH, Lee N, Hwang S, Kim W, Lee Y, Cho S, Palsson BO, Cho BK. Discovery of novel secondary metabolites encoded in actinomycete genomes through coculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2021, 48(3/4): kuaa001.
- [2] Li JW, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science*, 2009, 325(5937): 161–165.
- [3] Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 2009, 325(5944): 1089–1093.
- [4] Ramadhar TR, Beemelmanns C, Currie CR, Clardy J. Bacterial symbionts in agricultural systems provide a strategic source for antibiotic discovery. *The Journal of Antibiotics*, 2014, 67(1): 53–58.
- [5] 魏宝阳,曹亮,李顺祥,黄丹,周晋,魏小翊. 内生菌与药用植物的关系及对次生代谢产物的影响. 中国农学通报, 2011, 27(19): 83–88.
Wei BY, Cao L, Li SX, Huang D, Zhou J, Guo XY. The role of endophytes in medical plants and the effect of endophytes on secondary metabolites. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(19): 83–88. (in Chinese)
- [6] 杜权,谢小龙,田梦平,马梦雨,吴廷娟,冯卫生. 17 份地黄种质资源轮纹病的田间抗性评价. 中药材, 2021, 44(8): 1818–1820.
Du Q, Xie XL, Tian MP, Ma MY, Wu TJ, Feng WS. 17 parts of ground yellow germinated resource rotor-based field resistance evaluation. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2021, 44(8): 1818–1820. (in Chinese)
- [7] 王飞. 地黄轮纹病原学及防治研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2012.
- [8] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1966, 16(3): 313–340.
- [9] Waksman SA. The *Actinomycetes*. A summary of current knowledge. *American Scientist*, 1967, 55(4): 535A–536A.
- [10] 徐丽华,李文均,刘志恒. 放线菌系统学: 原理、方法及实践. 北京: 科学出版社, 2007.
- [11] Kieser T, Bibb MJ, Chater KF, Butter MJ, Hopwood DA, Bittner M. *Practical Streptomyces Genetics: A Laboratory Manual*. Britain: John Innes Foundation, 2000.
- [12] Sokol NW, Slessarev E, Marschmann GL, Nicolas A, Blazewicz SJ, Brodie EL, Firestone MK, Foley MM, Hestrin R, Hungate BA, Koch BJ, Stone BW, Sullivan MB, Zablocki O, Trubl G, McFarlane K, Stuart R, Nuccio E, Weber P, Jiao Y, Zavarin M, Kimbrel J, Morrison K, Adhikari D, Bhattacharaya A, Nico P, Tang J, Didonato N, Paša-Tolić L, Greenlon A, Sieradzki ET, Dijkstra P, Schwartz E, Sachdeva R, Banfield J, Pett-Ridge J, Consortium LSM. Life and

- death in the soil microbiome: how ecological processes influence biogeochemistry. *Nature Reviews Microbiology*, 2022. DOI: 10.1038/s41579-022-00695-z.
- [13] Chen HH, Qin S, Lee JC, Kim CJ, Xu LH, Li WJ. *Streptomyces mayteni* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a Chinese medicinal plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2009, 95(1): 47–53.
- [14] Jiang Y, Tang SK, Wiese J, Xu LH, Imhoff JF, Jiang CL. *Streptomyces hainanensis* sp. nov., a novel member of the genus *Streptomyces*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(pt 11): 2694–2698.
- [15] Mo P, Zhao J, Li K, Tang X, Gao J. *Streptomyces manganisoli* sp. nov., a novel actinomycete isolated from manganese-contaminated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2018, 68(6): 1890–1895.
- [16] Kämpfer P, Huber B, Buczolits S, Thummes K, Grün-Wollny I, Busse HJ. *Streptomyces specialis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 11(58): 2602–2606.
- [17] Veyisoglu A, Sahin N. *Streptomyces hoynatensis* sp. nov., isolated from deep marine sediment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(pt 3): 819–826.
- [18] Lechevalier MP, Bievre CD, Lechevalier H. Chemotaxonomy of aerobic *Actinomycetes*: phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1977, 5(4): 249–260.
- [19] Wayne LG. International Committee on systematic bacteriology: announcement of the report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to bacterial systematics. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie, Und Hygiene Series A, Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 1988, 268(4): 433–434.
- [20] Castillo UF, Strobel GA, Ford EJ, Hess WM, Porter H, Jensen JB, Albert H, Robison R, Condron MAM, Teplov DB, Stevens D, Yaver D. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology: Reading, England*, 2002, 148(pt 9): 2675–2685.
- [21] Igarashi Y, Ogura H, Furihata K, Oku N, Indananda C, Thamchaipenet A. Maklamicin, an antibacterial polyketide from an endophytic *Micromonospora* sp. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(4): 670–674.
- [22] Suga T, Kimura T, Inahashi Y, Iwatsuki M, Nonaka K, Také A, Matsumoto A, Takahashi Y, Ōmura S, Nakashima T. Hamuramicins A and B, 22-membered macrolides, produced by an endophytic actinomycete *Allostreptomyces* sp. K12-0794. *The Journal of Antibiotics*, 2018, 71(7): 619–625.
- [23] Boruta T. A bioprocess perspective on the production of secondary metabolites by *Streptomyces* in submerged co-cultures. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2021, 37(10): 1–15.
- [24] Lacey HJ, Rutledge PJ. Recently discovered secondary metabolites from *Streptomyces* species. *Molecules: Basel, Switzerland*, 2022, 27(3): 887.