



# 一株李维斯链霉菌的鉴定及其抗病促生性能

黄军<sup>1,2,3</sup>, 唐滢<sup>1,2,3\*</sup>, 黄彬彬<sup>1,2,3</sup>, 李晔<sup>1,2,3</sup>, 张翠央<sup>1,2,3</sup>, 郭照辉<sup>1,2,3</sup>, 刘清术<sup>1,2,3\*</sup>

- 1 湖南省微生物研究院, 湖南 长沙 410009
- 2 湖南省农用微生物应用工程技术研究中心, 湖南 长沙 410009
- 3 国家植保微生物种质资源库(湖南), 湖南 长沙 410009

黄军, 唐滢, 黄彬彬, 李晔, 张翠央, 郭照辉, 刘清术. 一株李维斯链霉菌的鉴定及其抗病促生性能[J]. 微生物学报, 2024, 64(12): 4859-4868.

HUANG Jun, TANG Ying, HUANG Binbin, LI Ye, ZHANG Cuiyang, GUO Zhaohui, LIU Qingshu. Characterization of *Streptomyces levis* L2 with plant disease-inhibiting and growth-promoting effects[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(12): 4859-4868.

**摘要:** 【目的】探究一株李维斯链霉菌的抗病促生性能, 鉴定其抑菌活性成分。【方法】从耐旱稗草根际分离到一株能抑制多种病原真菌及细菌的链霉菌, 采用形态学观察及 16S rRNA 基因序列分析的方法对菌株进行鉴定; 运用液相色谱和高分辨质谱技术鉴定活性物质成分; 利用二代 Illumina 与三代 Nanopore 测序技术进行全基因组测序; antiSMASH 分析该菌株中活性成分的生物合成基因簇。【结果】李维斯链霉菌 L2 的菌体及发酵液能高效抑制革兰氏阳性菌及多种植物病原真菌的生长, 能在铬天青平板(chrome azurol sulphonate, CAS)上产生较大的噬铁圈, 还具有较好的产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)的能力。其抑菌活性成分的  $m/z$  为 537.102 0  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{27}H_{20}O_{12}$ , 537.103 5,  $2.2 \times 10^{-6}$ ), 523.086 3  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{26}H_{18}O_{12}$ , 523.087 8,  $2.9 \times 10^{-6}$ ), 分别与  $\alpha$ -鲁霉素、 $\beta$ -鲁霉素、 $\gamma$ -鲁霉素的精确分子量相符, 误差小于 1/5 000 000, 其高效液相色谱保留时间与鲁霉素标准品一致。该菌基因组总长 8.8 Mb, 预测编码有鲁霉素等 32 个次级代谢产物生物合成基因簇。【结论】李维斯链霉菌 L2 具有较好的抗病促生性能, 适宜进一步开发为生防菌剂, 其抑菌活性成分为鲁霉素。

**关键词:** 李维斯链霉菌; 植物根际促生菌; 鲁霉素; 抗病促生

资助项目: 湖南省自然科学基金(2021JJ40306); 国家自然科学基金(32000047); 长沙市自然科学基金(kq2208130); 湖南省技术攻关“揭榜挂帅”项目(2021NK1040); 湖南中烟工业有限责任公司科技项目(KY2023YC0009)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2021JJ40306), the National Natural Science Foundation of China (32000047), the Changsha Municipal Natural Science Foundation (kq2208130), the Science and Technology Innovation Program of Hunan Province Project of “Open Competition Mechanism to Select the Best Candidate” (2021NK1040), and the Science and Technology Program of China Tobacco Hunan Industrial Co., Ltd. (KY2023YC0009).

\*Corresponding authors. E-mail: LIU Qingshu, liuqingshu2012@126.com; TANG Ying, tyng\_1986@126.com

ORCID: LIU Qingshu (0000-0002-0655-5651); TANG Ying (0000-0003-0378-9150)

Received: 2024-07-17; Accepted: 2024-09-18; Published online: 2024-09-20

# Characterization of *Streptomyces levis* L2 with plant disease-inhibiting and growth-promoting effects

HUANG Jun<sup>1,2,3</sup>, TANG Ying<sup>1,2,3\*</sup>, HUANG Binbin<sup>1,2,3</sup>, LI Ye<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Cuiyang<sup>1,2,3</sup>, GUO Zhaohui<sup>1,2,3</sup>, LIU Qingshu<sup>1,2,3\*</sup>

1 Hunan Institute of Microbiology, Changsha 410009, Hunan, China

2 Agricultural Microbiology Application Engineering and Technology Research Center of Hunan Province, Changsha 410009, Hunan, China

3 National Collection of Plant-associated Microbes (Hunan), Changsha 410009, Hunan, China

**Abstract:** [Objective] To study the plant disease-inhibiting and growth-promoting effects and identify the antimicrobial components of *Streptomyces levis* L2. [Methods] Morphological features and the phylogenetic tree based on the 16S rRNA gene sequences were employed to identify the strain L2 isolated from the rhizosphere of drought-tolerant *Echinochloa crusgalli*. The antimicrobial components produced by the strain were identified by chromatography and high-resolution mass spectrometry. The whole genome of the strain was sequenced by Illumina in combination with Nanopore. antiSMASH was employed to search for the biosynthetic gene clusters. [Results] *Streptomyces levis* L2 and its fermentation broth inhibited the growth of Gram-positive bacteria and phytopathogenic fungi, and the strain produced a large transparent zone on the CAS (chrome azurol sulphonate) plate and could produce indole-3-acetic acid (IAA). The antimicrobial components of the strain showed the  $m/z$  of 537.102 0 [M+H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>, 537.103 5, 2.2×10<sup>-6</sup>) and 523.086 3 [M+H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>O<sub>12</sub>, 523.087 8, 2.9×10<sup>-6</sup>), which were consistent with the exact masses of α-rubromycins, β-rubromycins and γ-rubromycins, with the errors less than parts per 5 million. Their HPLC retention time were in agreement with that of standard rubromycins. The whole genome of L2 had a length of 8.8 Mb and carried 32 biosynthetic gene clusters for secondary metabolites including rubromycins. [Conclusion] *S. levis* L2 exhibited excellent plant disease-inhibiting and growth-promoting properties, thus could be further developed as biocontrol agents. It produces the antimicrobial components rubromycins and its biosynthetic gene clusters contained 6 more modification genes than the previously published gene clusters for rubromycins and several genes with unknown functions.

**Keywords:** *Streptomyces levis*; plant growth-promoting bacteria (PGPB); rubromycin; disease inhibiting and growth promoting

近半个世纪来,我国农业蓬勃发展。农药、化肥的施用虽大幅提高了作物产量,但也带来了一系列环境问题,包括地下水污染、土壤质量下降和生物多样性减少。全球气候变化、人口增长也是当前农业发展面临的新挑战。因此,绿色环

保、可持续发展将是未来农业的发展方向。

作为土壤生态系统的重要组成部分,根际微生物在调节土壤肥力、营养循环和维护植物多样性方面发挥着重要作用。植物根际促生菌(plant growth-promoting bacteria, PGPB)是指自由生活

在土壤中或附生在根系的有益菌类,它们可以促进植物生长,帮助植物应对生物和非生物胁迫。近 10 年来,PGPB 在可持续农业中的应用越来越广泛,商业化的 PGPB 菌株主要分布在农杆菌属(*Agrobacterium*)、固氮螺菌属(*Azospirillum*)、固氮菌属(*Azotobacter*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)<sup>[1]</sup>。大多数 PGPB 可通过一种或多种机制促进植物生长,包括抑制植物病害、产生植物激素及改善营养吸收。研究表明,从根际土壤中分离的微生物具有促进植物生长并为植物提供其他益处的能力<sup>[2]</sup>。

链霉菌属是放线菌门下最大的一个属,现有 722 个种<sup>[3]</sup>,其具有较强的适应能力及丰富的代谢多样性。它们广泛分布于土壤、堆肥、淡水和海水等环境中,并具备多种特性,如促进植物生长、抑制植物病原体、分解有机质、合成活性次生代谢产物等,此外还具有产生多种生物活性物质、酶、维生素的能力。

本研究从耐旱稗草中分离到一株链霉菌,通过基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树,将其确定为李维斯链霉菌。随后,采用对峙培养法初步测定了其抑菌活性及促生性能。基于高分辨质谱技术与标准品保留时间的对比,确定其抑菌活性成分。此外,对该菌株的基因组及活性物质生物合成基因簇进行了详细分析,并建立了其遗传操作体系,为将来开发成生防菌剂奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

2020 年于湖南省长沙县荒弃农田耐旱稗草根际采集土样。菌株分离纯化采用的培养基为 R2A<sup>[4]</sup>。鲁霉素标准品(CAS: 27267-70-5)购自上海臻准生物科技有限公司。菌株培养所使用培养基: MS 平板(黄豆粉 20 g/L,甘露醇 20 g/L,琼

脂 20 g/L)、SV2 培养基(葡萄糖 15 g/L,甘油 15 mL/L,大豆蛋白胨 15 g/L,NaCl 3 g/L,碳酸钙 1 g/L,pH 7.0)、ISP 2 液体培养基(酵母提取粉 4 g/L,麦芽提取物 10 g/L,葡萄糖 4 g/L)、HD1 培养基(黄豆粉 10 g/L,玉米淀粉 10 g/L,可溶性淀粉 5 g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 g/L)。

### 1.2 根际细菌的分离纯化

将 5 g 带有根系的根际土壤放入装有 45 mL 浓度为 0.25% 的无菌 Ringer 洗液的摇瓶中<sup>[5]</sup>,于 30 °C、180 r/min 振荡 30 min。静置后,上清用 0.25% 的 Ringer 洗液稀释至 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>、10<sup>-5</sup>,取 200 μL 涂布平板,每个梯度 3 个重复<sup>[6]</sup>。待出现菌落后,用接种针挑取边缘光滑的单菌落进行平板划线分离。

### 1.3 菌株 L2 抑菌活性的测定

采用对峙培养法<sup>[7]</sup>,将在 PDA 平板上培养 2-3 d 的病原真菌用打孔器在菌丝生长外缘打孔,用接种针将菌丝块取出,放置在一个新的 PDA 平板中央,在距离中央 3 cm 处用牛津杯打孔,接种菌块或加入 100 μL 发酵上清液,28 °C 共培养 3-5 d,观察并测量抑菌圈。将金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌涂布于 LB 平板上,牛津杯打孔,加入 100 μL 发酵上清液,正向置于培养箱中 28 °C 培养 16 h,观察并测量抑菌圈大小。

### 1.4 菌株 L2 的形态特征、全基因组测序及序列分析

将菌株接种于 MS 平板上,培养 2 d 后,肉眼观察菌落形态,并采用蔡司相差显微镜(Zeiss 公司)观察菌株细胞形态。

挑单菌落接种于 SV2 培养基中,培养 2 d 后,收集菌体,无菌去离子水洗涤 1 次后,再次悬浮,取 1 μL 作为菌液 PCR 模板,用细菌通用 16S rRNA 基因扩增引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3')扩增菌株 L2 的 16S rRNA 基因。

PCR 反应体系: PrimeSTAR<sup>®</sup> Max (TaKaRa 公司) 15  $\mu$ L, 上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, 模板 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 12  $\mu$ L。PCR 反应条件: 98  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 15 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 终延伸 10 min。采用 DNA 胶回收试剂盒(上海捷瑞生物工程有限公司),通过琼脂糖凝胶电泳回收目标 PCR 产物,产物送湖南擎科生物技术有限公司测序;测序结果用 EzBioCloud 进行在线比对,经 Clustal Omega 进行多序列比对后,利用软件 MEGA X 进行多序列相似性分析,构建系统发育树。

采用 ISP 2 液体培养基培养 L2, 12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,用 TEN 缓冲液洗涤 1 遍后,再次离心并弃去上清,将菌体寄至武汉贝纳科技服务有限公司,采用 Nanopore 测序技术平台进行全基因组测序。

### 1.5 代谢产物的提取、高分辨质谱及高效液相色谱检测

以 5% 的接种量接种活化的 L2 菌液至 HD1 培养基中, 30  $^{\circ}$ C 培养 72 h 后,添加大孔树脂 Amberlite<sup>®</sup> XAD-16,继续培养 24 h 后,12 000 r/min 离心 5 min 收集菌体及 XAD,弃上清,加入等体积甲醇浸提 30 min,旋转蒸发仪浓缩后溶于 10 mL 甲醇中。

发酵液提取物经 12 000 r/min 转速离心 10 min 后过滤,寄送至湖南中医药大学进行高分辨质谱分析(high resolution mass spectrum, HRMS)。所用仪器为 Agilent 6545 Q-TOF 质谱仪(Agilent 公

司),采用标准电喷雾离子源。色谱柱为 Agilent Eclipse Plus C18 column (2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.8  $\mu$ m)。流动相为含有 0.1% 甲酸的水及乙腈。

高效液相色谱仪为 Agilent 1260 (Agilent 公司),色谱柱型号为 Eclipse XDB-C18 (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu$ m)。流动相为含有 0.1% 甲酸的水及乙腈,流速 1 mL/min。洗脱梯度: 0–2 min, 5% 乙腈; 2–18 min, 5%–95% 乙腈; 18–20 min, 95% 乙腈; 20–21 min, 95%–5% 乙腈; 21–23 min, 5% 乙腈。检测波长 310 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 链霉菌 L2 的分离及其抑菌活性

从耐旱稗草根际中分离到一株对真菌及革兰氏阳性菌具有抑制效果的链霉菌,命名为 L2。其菌体/发酵上清液对水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kuhn)、辣椒炭疽病菌(*Colletotrichum capsici*)、西瓜枯萎病原菌(*Fusarium solani*)、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)的抑制率分别为 37%、17%、13%、45%、48% (图 1)。对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)及枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的抑菌圈直径分别为 14 mm 和 12 mm。

### 2.2 菌株 L2 的形态特征

菌株 L2 在 MS 平板上可形成圆形灰白色菌落、表面光滑、边缘整齐、不透明,随着培养时间的延长可产紫色色素(图 2A)。相差显微镜下菌体为丝状分支(图 2B),革兰氏染色阳性。

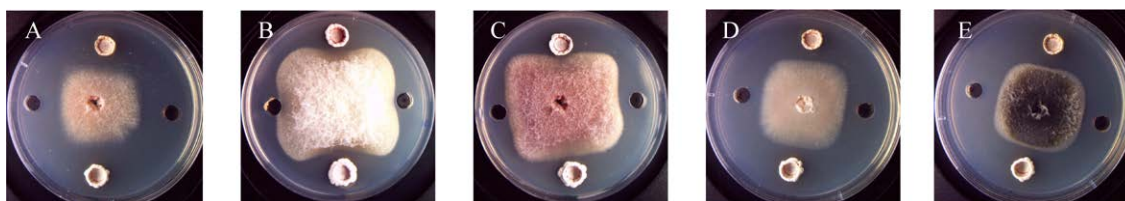


图 1 菌株 L2 对 5 种植物病原真菌的抑菌活性

Figure 1 The inhibitory activity of strain L2 against five phytopathogenic fungi. A: *Rhizoctonia solani* Kuhn, the causative agent of rice sheath blight. B: *Colletotrichum capsici*. C: *Fusarium solani*, the causative agent of cucurbits fusarium wilt. D: *Botrytis cinerea*. E: *Alternaria alternata* (Fr) Keissler.

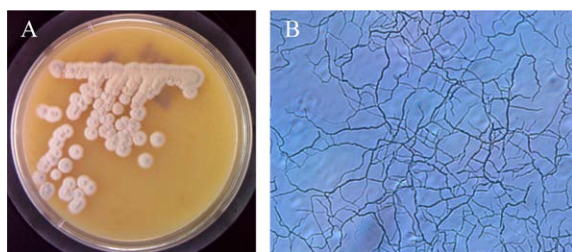


图 2 李维斯链霉菌 L2 的菌落(A)、菌体形态(B) (2 000×)

Figure 2 The colony (A), cell morphology of *Streptomyces levis* L2 (B) (2 000×).

### 2.3 分类地位及基因组分析

以 L2 菌液为模板, 用引物 27F/1492R 成功扩增到了 1.5 kb 左右的条带, 测序得知其大小为 1 373 bp, 该序列已提交至 GenBank, 登录号为 PP905231。将该序列与 EzBioCloud 及 NCBI 数据库中序列进行比对<sup>[8]</sup>, 得知与其序列相似性最高的菌株为 *S. levis* NBRC 15423<sup>T</sup>, 相似性为

99.93%, 远高于新种鉴定阈值 98.70%<sup>[9]</sup>。选取邻近菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树(图 3), 发现链霉菌 L2 与 *S. levis* NBRC 15423<sup>T</sup> 位于同一分支上, 且亲缘距离为 0, 可将其确定为李维斯链霉菌。

全基因组测序测得菌株 L2 的 G+C 含量为 72.11%, 总长度 8.8 Mb。经基因组注释, 预测共有 8 075 个基因, 其中编码蛋白质的基因 7 991 个, 编码 RNA 的基因 84 个。经 antiSMASH 预测其基因组共含有 32 个次级代谢产物生物合成基因簇(biosynthetic gene cluster, BGC), 包括萜类、寡糖类、聚酮、非核糖体肽、羊毛硫肽类等(表 1), 种类丰富、潜力巨大<sup>[10]</sup>。此外, 还含编码有铁载体、色氨酸合成酶等基因<sup>[11]</sup>, 以及无机磷溶解基因(*ppa*、*ppx* 和 *ppk1*)、调控基因(*phoB*、*phoR* 和 *phoU*)、转运基因(*hpaA*、*pit*)<sup>[12]</sup>。

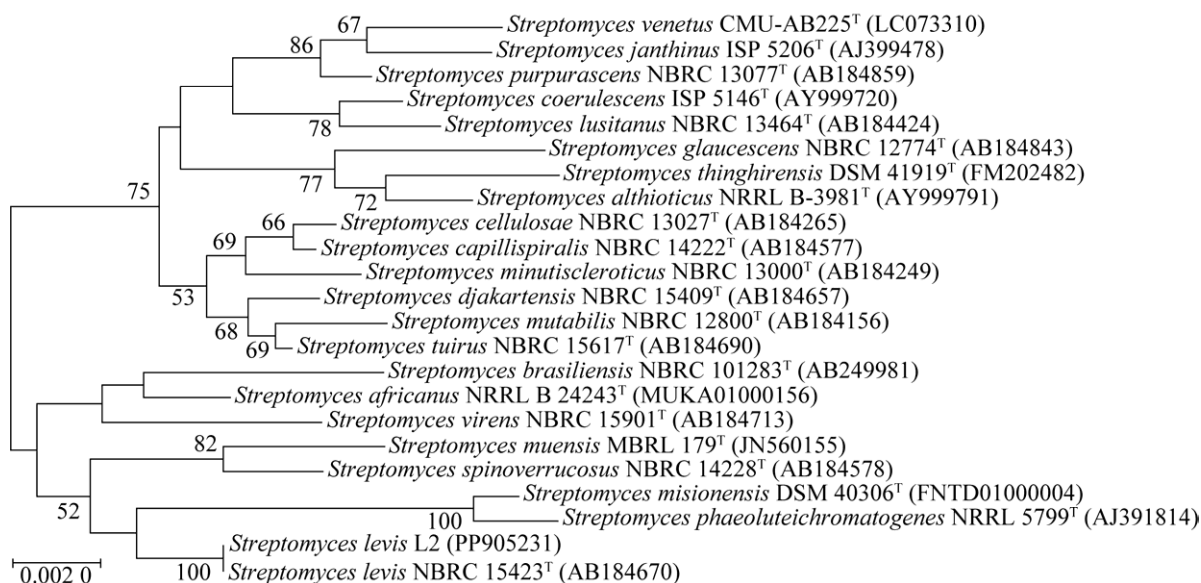


图 3 基于李维斯链霉菌 L2 16S rRNA 基因序列及其相似序列构建的系统发育树(邻位法) 替换模型为 Kimura 2-parameter; 分支处的数值为大于 50% 的步长值(重复 1 000 次); 菌种拉丁名后依次为菌株编号、序列登录号

Figure 3 Neighbor-joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of *Streptomyces levis* L2. Substitution model is Kimura 2-parameter. Bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications) above 50% are shown at the branch points. The strain number, sequence accession number are presented in order after the strain name.

表 1 链霉菌 L2 基因组中预测的次级代谢产物生物合成基因簇

Table 1 Secondary metabolite BGCs predicted in the genome of *Streptomyces levis* L2

Cluster ID	Type	Gene-start	Gene-end	Most similar known cluster	Similarity (%)
Cluster 1	Lasso peptide	165 128	187 685	Citrulassin D	100
Cluster 2	Butyrolactone	429 595	438 519	Lactonamycin	5
Cluster 3	Furan, butyrolactone	1 268 608	1 289 543	Methylenomycin A	23
Cluster 4	Terpene	1 538 646	1 562 978	Isorenieratene	100
Cluster 5	Terpene	1 704 463	1 720 539	Albaflavone	100
Cluster 6	Siderophore	2 285 082	2 296 122		
Cluster 7	RiPP-like	2 497 142	2 508 304	Sisomicin	5
Cluster 8	Terpene	2 536 842	2 557 166	Geosmin	100
Cluster 9	Siderophore	2 738 488	2 751 614	Lividomycin	10
Cluster 10	NRPS	2 754 966	2 870 938	CDA1	87
Cluster 11	Terpene	3 323 316	3 349 246	Hopene	92
Cluster 12	Terpene	3 660 664	3 680 719	Cyphomycin	2
Cluster 13	RiPP-like	3 706 885	3 734 083	Informatipeptin	100
Cluster 14	Indole	3 976 746	3 997 930	7-prenylisatin	60
Cluster 15	NRPS, T1PKS, LAP	4 068 537	4 135 926	Antimycin	100
Cluster 16	Terpene	4 289 115	4 310 158	Phenalinolactone A	11
Cluster 17	NRPS	111 367	157 428	Kutzneride 2	6
Cluster 18	NRPS	236 152	304 654	A54145	11
Cluster 19	T1PKS, NRPS	335 246	386 430	5-isoprenylindole-3-carboxylate- $\beta$ -D-glycosyl ester	19
Cluster 20	NRPS, T1PKS	433 129	482 411	FR-900520	9
Cluster 21	Melanin	652 633	662 301	Melanin	57
Cluster 22	NRPS	885 604	943 293	Amychelin	81
Cluster 23	Terpene	1 116 505	1 137 120	A201a	5
Cluster 24	T3PKS	1 178 015	1 217 185	Herboxidiene	7
Cluster 25	Ectoine	1 914 568	1 924 966	Ectoine	100
Cluster 26	T1PKS, NRPS, T2PKS	2 427 627	2 522 416	Rubromycin (collinomycin)	96
Cluster 27	Terpene	2 666 644	2 687 543	SCO-2138	21
Cluster 28	Melanin	3 012 358	3 022 879	Melanin	100
Cluster 29	Siderophore	3 114 556	3 126 328	Desferrioxamin B/E	83
Cluster 30	T3PKS	3 625 682	3 666 866	Zorbamycin	6
Cluster 31	Terpene, pyrrolidine	250 232	294 299	Anisomycin	69
Cluster 32	Lanthipeptide-class-i	359 254	384 394	Pentostatine/Vidarabine	6

## 2.4 菌株 L2 的抑菌活性物质分析

链霉菌产生的代谢产物活性多样, 结构丰富。常用的抗生素约有 2/3 来源于链霉菌, 此外, 许多抗肿瘤剂、杀虫剂、酶抑制剂也由链霉菌产生。目前, 仅有研究报道了李维斯链霉菌发酵产物的活性, 如能抑制结肠癌细胞系<sup>[13]</sup>及肺炎克雷伯氏菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌<sup>[14]</sup>,

但均未对其活性成分进行鉴定。

当用 HD1 培养基发酵时, 链霉菌 L2 能产生抑制真菌及革兰氏阳性菌的活性代谢产物, 而用 ISP2 培养基发酵时, L2 的发酵液无抑菌活性。取上述活性提取物 2  $\mu$ L, 进行液质联用高分辨质谱分析发现, 与 ISP2 发酵液提取物图谱相比, 具有抑菌活性的提取物在 5.8 min 处多出了一组

峰(图 4A, 蓝色实线框), 其  $m/z$  为 537.102 0  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{27}H_{20}O_{12}$ , 537.103 5,  $2.2 \times 10^{-6}$ ), 523.086 3  $[M+H]^+$  (calcd for  $C_{26}H_{18}O_{12}$ , 523.087 8,  $2.9 \times 10^{-6}$ ), 与  $\alpha/\beta$ -rubromycin、 $\gamma$ -rubromycin 的相对分子质量非常接近, 误差小于 1/5 000 000 (图 4B、图 5、表 2)。

为进一步确认李维斯链霉菌 L2 所产抑菌活性成分是否为鲁霉素, 将  $\beta$ -鲁霉素标准品与 L2

发酵液活性组分一同进行了 HPLC 分析, 结果发现其保留时间一致(图 6)。

鲁霉素具有包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  在内的多个衍生物, 其中  $\alpha$ -鲁霉素又称覆盖霉素(collinomycin), 属于五角多酚类抗生素, 由 II 型聚酮合酶(polyketide synthase, PKS)合成, 苯并螺环缩酮是该类化合物的中心活性结构, 两侧分别为萘茜和异香豆素<sup>[15]</sup>。这类化合物不但能抑菌还能抑制端粒酶及

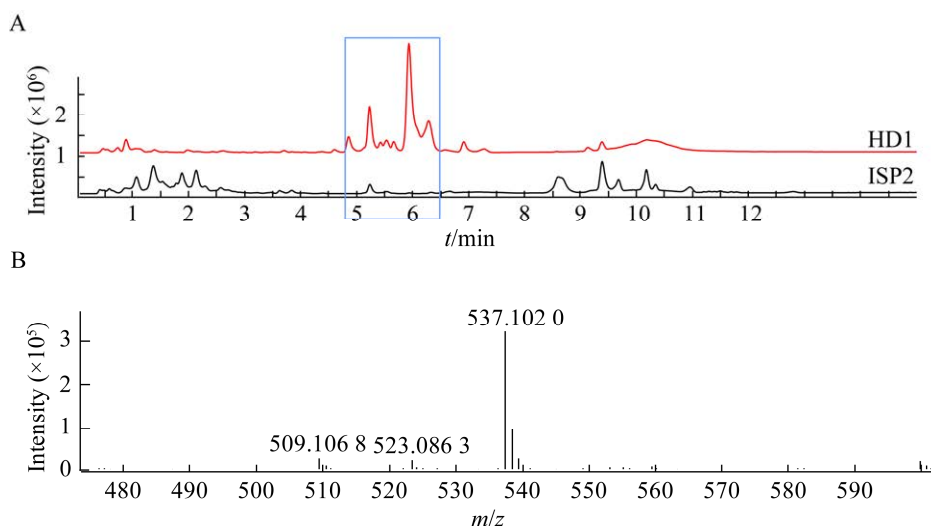


图 4 HD1 及 ISP2 培养基中发酵时菌株 L2 的甲醇提取物的总离子峰对比(A)及在 HD1 培养基中发酵后甲醇提取液在约 5.8 min 处的高分辨质谱(B)

Figure 4 A comparison of the total ion chromatography of the methanol extract of L2 fermented in HD1 and ISP2 (A) and the high resolution mass on round 5.8 min of the methanol extract fermented in HD1 (B).

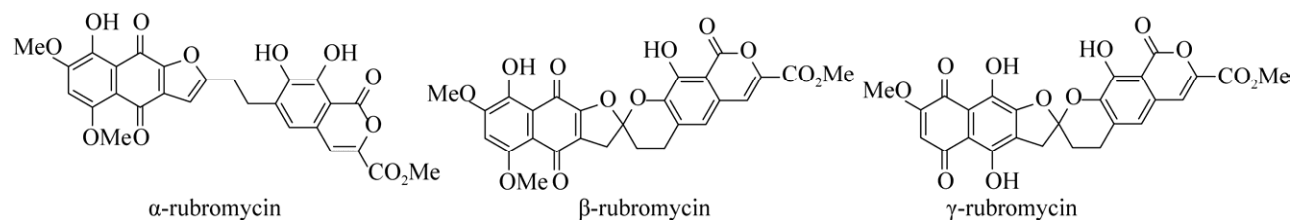


图 5  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -鲁霉素的结构

Figure 5 Structures of  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ -rubromycin.

逆转录酶的活性。其中  $\gamma$ -rubromycin 的抑菌活性最强, 它不仅能抑制真菌, 相比  $\alpha/\beta$ -rubromycin, 其对金黄色葡萄球菌等细菌的最小抑菌浓度 (minimal inhibition concentration, MIC) 也更低<sup>[16]</sup>。李维斯链霉菌 L2 也能抑制真菌及革兰氏阳性菌, 但对革兰氏阴性菌无活性, 与上述报道一致。

表 2 5.8 min 处离子峰的高分辨质谱数值分析

Table 2 An analysis on the HRMS data of for the ion peak at around 5.8 min

Compound	Exact mass	Measured mass	SE
$\alpha/\beta$ -rubromycin	537.103 5	537.102 0	$2.2 \times 10^{-6}$
$\gamma$ -rubromycin	523.087 8	523.086 3	$2.9 \times 10^{-6}$

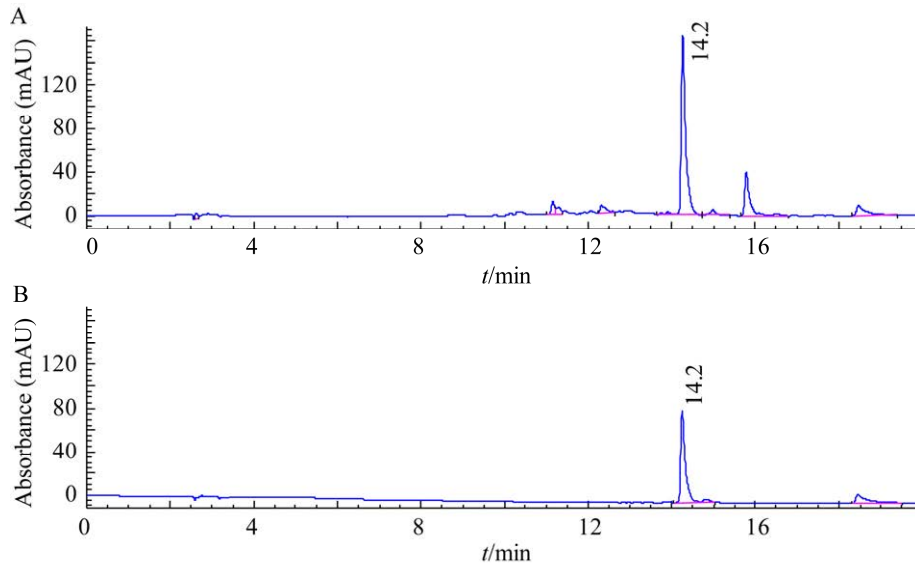


图 6 菌株 L2 活性组分(A)及  $\beta$ -鲁霉素标准品(B) HPLC 分析

Figure 6 HPLC analyzing the antibacterial component L2 (A) and the standard  $\beta$ -rubromycin (B).

## 2.5 鲁霉素生物合成基因簇

进一步分析李维斯链霉菌 L2 的基因组数据,可从中找到合成鲁霉素的全部基因,其成簇存在,共含有 30 个基因,其中功能未知的基因 5 个(*rubQ*、*rubW*、*rubH*、*rubT* 和 *rubZ*)。与 *S. collinus* DSM 2012 中的鲁霉素 BGC 相比, L2 中的 BGC 更长,多了 5 个参与修饰的基因<sup>[17]</sup>,其具体功能有待进一步验证(图 7, 5 个灰色基因),但与 *Streptomyces* sp. CB00271<sup>[18]</sup>中的鲁霉

素 BGC 基本一致。

## 2.6 促进植物生长潜能的测定

对李维斯链霉菌 L2 产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)、溶解有机磷、无机磷、解钾、固氮等能力进行测定,结果表明李维斯链霉菌 L2 具有较强的产铁载体及合成植物生长激素 IAA 的能力(图 8)。地壳中的铁元素含量虽然丰富,但生物体能利用可溶性铁离子占比却非常低。铁载体可螯合环境中的铁离子,并将其转化为生物体

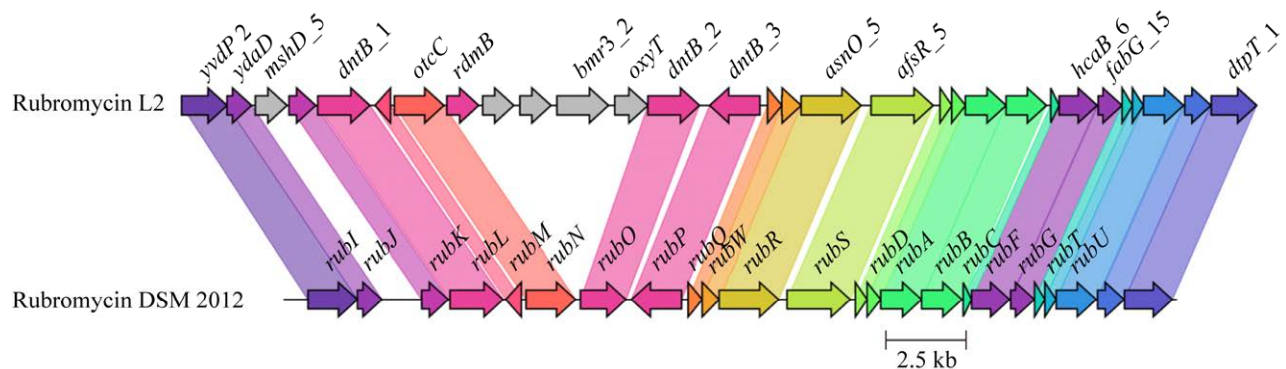


图 7 李维斯链霉菌 L2 及 *Streptomyces collinus* DSM 2012 中鲁霉素基因簇比较

Figure 7 A comparison between the rubromycin BGC from *Streptomyces levis* L2 and *Streptomyces collinus* DSM 2012.



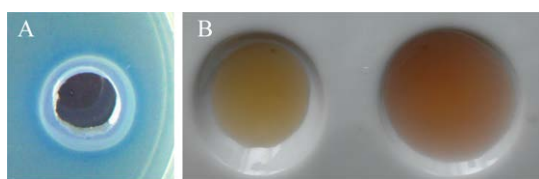


图 8 李维斯链霉菌 L2 在铬天青平板上产生的噬铁圈(A)及产 IAA 能力测定(B)

Figure 8 Color changed zone of *Streptomyces levis* L2 on chrome azurol sulphonate (CAS) plate (A) and the IAA detection (B).

可利用的形式。许多植物可通过其根际微生物产生的铁载体获取铁离子,有些植物甚至能调节根际微生物群落组成,增加产铁载体微生物的丰度。根际细菌产生的铁载体还可与病原菌竞争铁离子,进而抑制其生长,提高植株抗病能力。IAA 可促进植物根系生长。由此可见,李维斯链霉菌 L2 具有较大的促进植物生长潜力。

### 3 结论

植物根际促生菌可从多方面促进植物生长:为植物提供磷、氮、铁、硫、铜等,提高植物对养分的吸收利用;产生植物类激素,如生长素,促进植物生长发育;合成抑菌活性物质,抑制病原微生物生长,保持植物健康。

本研究从旱地稗草根际分离到链霉菌 L2,该菌株能在铬天青平板(chrome azurol sulphonate, CAS)平板上产生较大的噬铁圈,还具有较好的产 IAA 能力,并能合成抑菌活性物质鲁霉素,显示了良好的植物抗病促生潜能。经 16S rRNA 基因序列及系统发育树分析,将该菌株鉴定为李维斯链霉菌。

鲁霉素具有抑菌、抗肿瘤(端粒酶)、抑制反转录酶等活性。经高分辨质谱及高效液相色谱分析,确定  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ -鲁霉素为李维斯链霉菌 L2 的抑菌活性成分。 $\alpha$ 、 $\beta$ -鲁霉素能抑制革兰氏阳性菌, $\gamma$ -鲁霉素还能抑制真菌。 $\alpha$ 、 $\beta$ -鲁霉素 MIC

值相近,说明螺环缩酮并不是抗菌活性基团,但其抑菌机制仍有待进一步探究。 $\beta$ 、 $\gamma$ -鲁霉素结构上的区别在于萘环上羟基、酮基的位置及酮基是否被甲基化。 $\gamma$ -鲁霉素的羟基位于靠近环缩酮一侧,且 2 个酮基均未被甲基修饰,其抑菌活性明显优于  $\alpha$ 、 $\beta$ -鲁霉素,据此我们推测萘环上官能团的位置对此类化合物的抑菌活性至关重要。

与 *S. collinus* DSM 2012 中的鲁霉素 BGC 相比,L2 中的 BGC 更长,多了 5 个参与修饰的基因,但与 *Streptomyces* sp. CB00271 中的 BGC 基本一致。3 个基因簇中均含有多个基因的功能尚未鉴定。与前者相比,链霉菌 L2 接合转移效率更高,能对未知基因进行敲除或过表达。此外,链霉菌 L2 的基因组中还含有其他活性次级代谢产物基因簇,其中 cluster 1、10、13、15 分别与已知化合物 citrulassin D、CDA1、informatipeptin 及 antimycin 的基因簇非常相似。对李维斯链霉菌 L2 中鲁霉素基因簇的序列分析从生物合成的角度印证了该菌具备合成鲁霉素的能力,也为进一步探究鲁霉素生物合成机制、优化其结构、提高其活性及产量奠定了基础。后续试验中,我们将对鲁霉素基因簇中的修饰基因及其他基因簇进行改造,以增强其抗病促生性能,使其在植物真菌病害防治中有更广泛的应用。

### 参考文献

- [1] GLICK BR. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications[J]. Scientifica, 2012, 2012: 963401.
- [2] AMARESAN N, KUMAR K, NAIK JH, BAPATLA KG, MISHRA RK. *Streptomyces* in plant growth promotion[M]//New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering. Amsterdam: Elsevier, 2018: 125-135.
- [3] PARTE AC, SARDÀ CARBASSE J, MEIER-KOLTHOFF JP, REIMER LC, GÖKER M. List of Prokaryotic names with Standing in

- Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2020, 70(11): 5607-5612.
- [4] TANG Y, ZHANG CY, LONG QS, LEI P, GUO ZH, LIU QS. *Sandaracinobacteroides saxicola* sp. nov., a zeaxanthin-producing and halo-sensitive bacterium isolated from fully weathered granitic soil, and the diversity of its ARHDs[J]. *Diversity*, 2022, 14(10): 807.
- [5] BENNDORF R, GUO HJ, SOMMERWERK E, WEIGEL C, GARCIA-ALTARES M, MARTIN K, HU HF, KÜFNER M, de BEER ZW, POULSEN M, BEEMELMANN C. Natural products from *Actinobacteria* associated with fungus-growing termites[J]. *Antibiotics*, 2018, 7(3): 83.
- [6] GARCÍA-FRAILE P, BENADA O, CAJTHAML T, BALDRIAN P, LLADÓ S. *Terracidiphilus gabretensis* gen. nov., sp. nov., an abundant and active forest soil *Acidobacterium* important in organic matter transformation[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2015, 82(2): 560-569.
- [7] 蔡长平, 黄军, 曾艳, 毕世宇, 黄彬彬, 郭照辉, 刘清术. 一株辣椒内生拮抗细菌的筛选及初步鉴定[J]. *湖南农业科学*, 2018(7): 1-4.  
CAI CP, HUANG J, ZENG Y, BI SY, HUANG BB, GUO ZH, LIU QS. Isolation and primary identification of an endophytic antagonistic bacteria from pepper[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2018(7): 1-4 (in Chinese).
- [8] YOON SH, HA SM, KWON S, LIM J, KIM Y, SEO H, CHUN J. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2017, 67(5): 1613-1617.
- [9] KIM M, OH HS, PARK SC, CHUN J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(Pt 2): 346-351.
- [10] BLIN K, SHAW S, AUGUSTIJN HE, REITZ ZL, BIERMANN F, ALANJARY M, FETTER A, TERLOUW BR, METCALF WW, HELFRICH EJN, van WEZEL GP, MEDEMA MH, WEBER T. antiSMASH 7.0: new and improved predictions for detection, regulation, chemical structures and visualisation[J]. *Nucleic Acids Research*, 2023, 51(W1): 46-50.
- [11] TANG JT, LI YK, ZHANG LL, MU JT, JIANG YY, FU HL, ZHANG YF, CUI HF, YU XP, YE ZH. Biosynthetic pathways and functions of indole-3-acetic acid in microorganisms[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(8): 2077.
- [12] SILES JA, STARKE R, MARTINOVIC T, PARENTE FERNANDES ML, ORGIAZZI A, BASTIDA F. Distribution of phosphorus cycling genes across land uses and microbial taxonomic groups based on metagenome and genome mining[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2022, 174: 108826.
- [13] FARAMARZIAN AZIMI MARAGHEH B, FATOURACHI P, MOHAMMADI SM, VALIPOUR B, BEHTARI M, DEHNAD A, NOZAD CHAROUDEH H. *Streptomyces levis* ABRIINW111 inhibits SW480 cells growth by apoptosis induction[J]. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2018, 8(4): 675-682.
- [14] SINGH V, HAQUE S, KHARE S, TIWARI AK, KATIYAR D, BANERJEE B, KUMARI K, TRIPATHI CKM. Isolation and purification of antibacterial compound from *Streptomyces levis* collected from soil sample of north India[J]. *PLoS One*, 2018, 13(7): e0200500.
- [15] ATKINSON DJ, BRIMBLE MA. Isolation, biological activity, biosynthesis and synthetic studies towards the rubromycin family of natural products[J]. *Natural Product Reports*, 2015, 32(6): 811-840.
- [16] WANG XC, ELSHAHAWI SI, PONOMAREVA LV, YE Q, LIU Y, COPLEY GC, HOWER JC, HATCHER BE, KHAREL MK, van LANEN SG, SHE QB, VOSS SR, THORSON JS, SHAABAN KA. Structure determination, functional characterization, and biosynthetic implications of nybomycin metabolites from a mining reclamation site-associated *Streptomyces*[J]. *Journal of Natural Products*, 2019, 82(12): 3469-3476.
- [17] MARTIN R. Isolation and heterologous expression of *Streptomyces collinus* DSM 2012 genes for polyketide biosynthesis: biosynthesis of the novel polyketide antibiotic 6C-R[D]. Geneva: Doctoral Dissertation of University of Geneva, 1998.
- [18] YI LW, KONG JQ, XIONG Y, YI SR, GAN T, HUANG CS, DUAN YW, ZHU XC. Genome mining of *Streptomyces* sp. CB00271 as a natural high-producer of  $\beta$ -rubromycin and the resulting discovery of  $\beta$ -rubromycin acid[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(6): 2243-2254.