

内生拮抗放线菌 FRo2 的鉴定及抑菌活性物质的分离

张志斌¹ 敖武^{1,3} 熊瑶瑶¹ 颜日明¹ 汪涯² 朱笃^{1,2*}

- (1. 江西师范大学 生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室 江西 南昌 330022)
- (2. 江西科技师范大学 生命科学学院 江西省生物加工过程重点实验室 江西 南昌 330013)
- (3. 江西博雅生物制药股份有限公司 江西 抚州 344000)

摘要:【目的】鉴定从东乡野生稻根部分离得到的对多种农作物病原真菌具有拮抗活性的内生放线菌株 FRo2, 并对其抑菌活性物质进行分离。【方法】根据 FRo2 形态特征观察、生理生化特性、细胞壁组分和 16S rRNA 基因序列对其进行鉴定。采用管碟法和菌丝生长速率法测定了该菌株的抗菌活性, 活性追踪法结合正相硅胶柱层析及凝胶(Sephadex LH-20)柱层析等技术对抑菌组分进行分离, 并通过 NMR 对抑菌活性物质进行解析。【结果】菌株 FRo2 属于链霉菌属, 与娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*)极为相似。该菌株发酵液对小麦赤霉菌、立枯丝核菌等 7 种主要农作物致病菌具有较好的抑制活性; 从菌株 FRo2 发酵液中分离得到抑菌活性化合物 AW2, 结构鉴定为邻苯二甲酸二丁酯。【结论】研究阐明了内生放线菌 FRo2 抑菌活性物质, 也为该菌今后的农业生防应用提供物质基础。

关键词: 内生放线菌, 菌株鉴定, 抗菌活性, 邻苯二甲酸二丁酯

Identification of antagonistic endophytic actinomycete FRo2 and isolation of its antimicrobial composition

ZHANG Zhi-Bin¹ AO Wu^{1,3} XIONG Yao-Yao¹ YAN Ri-Ming¹ WANG Ya² ZHU Du^{1,2*}

- (1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources of Jiangxi Province, College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang, Jiangxi 330022, China)
- (2. Key Laboratory of Bioprocess Engineering of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang, Jiangxi 330013, China)
- (3. Jiangxi Boya Biopharmaceutical Limited by Share Ltd., Fuzhou, Jiangxi 344000, China)

Abstract: [Objective] Endophytic actinomycete FRo2 with activity against agricultural pathogenic fungi was isolated from the roots of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*). We identified FRo2 and separated its antimicrobial substances. [Methods] Morphological, physiology and biochemistry characteristics, chemotaxonomy analysis and 16S rRNA gene sequences were used to identify FRo2. The bioactivities were determined by tube plate method and mycelium growth inhibition method. According to nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) extrapolation result, one antimicrobial

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31260137); 国家“十二五”重大科技支撑项目(No. 2011BAC13B04); 江西省青年科学基金项目(No. 20132BAB214006); 江西省教育厅科研项目(No. GJJ12208, GJJ14250)

*通讯作者: ✉: zhudu12@163.com

收稿日期: 2013-10-18; 接受日期: 2013-12-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-12-18

substances in the metabolites of FRo2 through normal-phase silica gel column chromatography and gel (Sephadex LH-20) column chromatography with bioassay-guided fractionation was isolated. [Results] FRo2 belonged to *Streptomyces* sp. and was similar to *Streptomyces rochei*. The metabolites had high inhibitory activities against *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani* and other five agricultural pathogenic fungi, and the antimicrobial substances AW2 was elucidated as Dibutyl phthalate. [Conclusion] The material basis of the antibacterial constituents in antagonistic actinomycetes strain FRo2 was further clarified, and strain FRo2 is deserved to develop an biocontrol.

Keywords: Endophytic actinomycetes, Strain identification, Antimicrobial activity, Dibutyl phthalate

放线菌是产生抗生素及多种生物活性物质的重要微生物资源,由链霉菌等放线菌产生的活性物质约占微生物活性药物的 50%^[1]。由于传统研究方法重复发现天然产物的机率不断增加,从普通环境来源的微生物中分离新的活性物质日益困难^[2]。因此,研究者们逐渐将目光投向了研究相对较少的特异生境微生物,如内生菌、海洋微生物和极端环境微生物(高盐碱度、超高温、超低温等环境)等^[3]。近几年人们从水稻、小麦及药用植物等各种植物组织中分离获得大量微生物,植物内生菌作为一类重要的微生物资源已经成为研究的热点^[4-6]。植物内生放线菌作为内生菌的重要类群,在植物中广泛存在,并且可能产生新型活性产物^[7]。因此,从中寻找和发现具有新的分子结构或对有害生物有新作用靶标的化合物,从而开发出新的生物源农药产品,对未来农业上植物病虫害的防治具有重要意义。

东乡野生稻(*Oryza rufipogon*)是我国三大普通野生稻之一,国家二级保护植物,仅分布于海拔 48.6 m 的江西省东乡县岗上积镇庵家山地区(28°14' N、116°36' E),是分布在中国乃至世界最北的珍贵野生稻种质资源^[8]。目前有关东乡野生稻的研究主要集中于种质资源的保护与利用、优良基因的挖掘等方面,而对其内生菌的研究比较缺乏。研究者从普通野生稻(*O. rufipogon*)、宽叶野生稻(*O. latifolia*)、高秆野生稻(*O. alta*)等分离出大量高活性内生菌,并从中发现 *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov.、*Enterobacter oryzae* sp. nov. 与 *Rhizobium oryzae* sp. nov. 等多种内生固氮菌新种^[9-11]。基于此我们对东乡野生稻的根际及内生菌

多样性进行了初步研究,并从中筛选到一些具有生物活性的菌株^[12-13]。本文选择具有抑菌活性内生放线菌 FRo2 为研究对象,从形态学及分子生物学方面对其进行分类鉴定,并对该菌株发酵液抑菌活性产物进行研究,旨在为新型生物农药的研究开发奠定物质基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 参考罗菲等^[13]方法从江西省东乡野生稻植株的根内部分离纯化得到一株编号为 FRo2 的内生放线菌菌株,经初步试验,证明该菌株具有抑菌活性。供试病原细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、伤寒杆菌(*Typhoid bacillus*)均购自于中国典型培养物保藏中心;供试病原真菌小麦赤霉(*Fusarium graminearum*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、油菜菌核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、大豆核盘菌(*Sclerotinia libertiana*)、芝麻枯萎菌(*sesame Fusarium wilt*)、辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)均由江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室保藏。

1.1.2 培养基: 培养基配制方法参照《链霉菌鉴定手册》^[14],放线菌形态观察采用高氏 1 号培养基,菌种鉴定则分别采用高氏 1 号培养基、查氏培养基、无机盐-淀粉琼脂培养基(ISP4)、甘油-天门冬酰胺琼脂培养基(ISP5)、燕麦片琼脂培养基(ISP3)、酵母膏-麦芽膏琼脂培养基(ISP2)和营养琼脂培养

基。拮抗试验培养基分别采用 LB 培养基(细菌)和 PDA 培养基(真菌)。发酵培养基组成为(g/L):玉米粉 22.00, 黄豆饼粉 10.00, 淀粉 17.00, K_2HPO_4 0.25, $CaCO_3$ 6.00, KNO_3 0.35, NaCl 0.50, pH 8.0。

1.2 菌株 FRo2 的鉴定

1.2.1 形态观察: 采用平皿插片法, 将菌株 FRo2 接种于高氏 1 号培养基, 于 32 °C 恒温培养 14–28 d, 期间每隔 5 d 于光学显微镜下观察基内菌丝和气生菌丝的形态、是否产孢等特征。取培养 28 d 的插片按 Williams 等^[15]方法进行扫描电镜样品的制备与观察。

1.2.2 培养特征和生理生化特征: 培养特征观察和生理生化分析参照《链霉菌鉴定手册》^[14]和《放线菌的分类和鉴定》^[16]。将菌株 FRo2 接种于参考的 7 种鉴定培养基中, 32 °C 恒温培养 7–14 d, 观察记录菌丝体的颜色和特征, 是否产可溶性色素。部分生理生化特征指标参照文献^[16]的方法。

1.2.3 细胞壁化学组分类型分析: 菌株 FRo2 细胞壁的制备参照 Lechevalier 等^[17]方法, 纯细胞壁氨基酸及全细胞糖型的化学组分分析参照文献^[18]的方法。

1.2.4 16S rRNA 基因 PCR 扩增及其系统发育分析: 菌株 FRo2 经过 CTAB 法提取总 DNA 后, 采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACT T-3') PCR 扩增其 16S rRNA 基因。反应体系为 25 μ L: 12.5 μ L Taq Buffer Mix 混合物, 正反引物各 2 μ L, 1 μ L DNA 模板, 7.5 μ L ddH₂O。PCR 扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 90 s, 共 34 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物送交上海生物工程技术服务有限公司完成测序。将所测的 16S rRNA 序列利用 EzTaxon 在线比对服务(<http://www.ezTaxon.org>)进行序列相似性搜索。利用 ClustalX 1.83 进行序列同源性比对, 再用 MEGA 4.0 软件邻接法(Neighbour-Joining, NJ 法)构建系统进化树, 从而确定菌株的进化位置。

1.3 活性试验发酵液的制备

采用 250 mL 摇瓶发酵培养法。装液量 100 mL, 接种量 10%, 摇床转速 140 r/min, 28 °C 旋转培养 10 d 后将发酵培养基 8 000 r/min 离心 20 min, 经无菌微孔滤膜(0.22 μ m)滤去菌体得上清液, 备用。

1.4 菌株 FRo2 代谢产物的抗菌谱测定

细菌: 采用管碟法。将 1.1.1 中供试细菌与冷却至 55 °C 适量培养基充分混匀, 倒入培养皿中制成上层混菌平板, 冷却后放上牛津杯, 加入经处理所得的菌株 FRo2 发酵上清液 0.2 mL, 以等量无菌水和 0.025 g/L 氯霉素水溶液分别为阴性和阳性对照, 于 37 °C 恒温培养 24 h, 以抑菌圈直径为指标测定其抑菌活性, 每个处理重复 3 次。

真菌: 采用菌丝生长速率法。将经处理所得的 FRo2 菌株发酵液与融化的 PDA 培养基以 1:9 混匀制成平板, 待培养基凝固后, 将经打孔器(直径 6 mm)制得病原真菌菌饼带菌丝面贴在培养基表面, 以无菌水与 PDA 混合的平板为阴性对照, 每个处理设 3 个重复。28 °C 培养 4–7 d 后, 用十字交叉法测量病原菌菌落直径, 计算抑制率。抑制率(%)=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)] \times 100^[19]。

1.5 抑菌物质的提取分离及结构鉴定

1.5.1 萃取有机溶剂的筛选: 将预处理过的 FRo2 发酵上清液分别用等体积的乙酸乙酯、正丁醇、氯仿及石油醚萃取 3 次, 合并萃取液, 40 °C 减压浓缩至干, 得抑菌物质粗提物。以二甲基亚砷溶解样品, 将 4 份样品调至同浓度, 其使用终浓度为 1 g/L。用菌丝体抑制率法分别测定各组分萃取相的抑菌活性, 每个处理 4 个重复, 以无菌水为阴性对照, 以二甲基亚砷为阳性对照。经抑菌效果测定确定最佳有机溶剂种类。

1.5.2 抑菌物质的提取分离: 菌株 FRo2 发酵产物经预处理得发酵液 32 L。减压浓缩后用氯仿萃取 3 次, 合并萃取液, 减压浓缩得粗提物 11.6 g。氯仿粗提物经 200–300 目的硅胶柱层析, 以石油醚、乙酸乙酯梯度洗脱, 合并得到 11 个组分。采用

TLC-生物自显影法^[20]来确定组分的抑菌活性，结果组分 3 具有较强的抑菌活性。经反复硅胶柱层析和凝胶柱层析(Sephadex LH-20)纯化，用旋转蒸发器 45 °C 减压浓缩，得到 5 个馏分。对所得馏分做生物自显影分析，结果表明化合物 AW2 (95 mg) 具有抑菌活性且纯度较高。

1.5.3 抑菌物质的结构鉴定：对所获得化合物 AW2 进行核磁共振(NMR)，结合数据库对所得纯品进行结构推断。

2 结果与分析

2.1 内生放线菌 FRo2 的鉴定

2.1.1 形态观察：在高氏 1 号培养基上 32 °C 插片

培养 14–28 d 后，在显微镜下进行形态观察。基内菌丝多分枝、无横隔、无断裂；气生菌丝为直或螺旋形的孢子链；扫描电镜下观察，FRo2 孢子链表面褶皱(图 1)，孢子链呈螺旋或直线生长，螺旋大多为 4–6 圈，孢子椭球形。

2.1.2 培养特征：菌株 FRo2 在高氏 1 号生长最快最好，气生菌丝丰茂，呈灰色绒状，基内菌丝微红色至红灰色；在查氏培养基、无机盐-淀粉琼脂培养基(ISP4)和琼脂培养基上生长良好，甘油-天门冬酰胺琼脂培养基(ISP5)生长中等，燕麦片琼脂(ISP3)和酵母膏-麦芽膏琼脂(ISP2)上生长一般。在 7 种培养基上均未产生可溶性色素(表 1)。

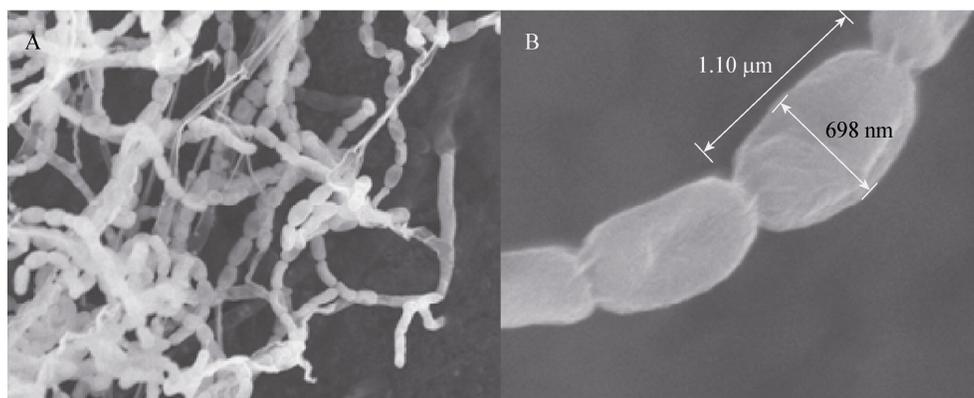


图 1 菌株 FRo2 形态特征

Figure 1 Morphological characteristics of strain FRo2

注：A：孢子丝形态(5 000×，SEM)；B：孢子形态(40 000×，SEM)。

Note: A: Spore chains (5 000×, SEM); B: Spores (40 000×, SEM).

表 1 菌株 FRo2 培养特征				
Table 1 The culture characteristics of strain FRo2				
培养基 Medium	生长 Growth	基内菌丝 Substance mycelium	气生菌丝 Aerial mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
Gause's No.1 agar	Abundant	Puce	Gray	—
Czapek's agar	Abundant	Puce	Gray	—
Nutrient agar	Good	Puce	Gray	—
Yeast extract/malt extract agar (ISP2)	Poor	Gray	White	—
Oatmeal agar (ISP3)	Poor	Gray	White	—
Inorganic salt/starch agar (ISP4)	Good	Gray	Gray	—
Glycerol/asparagine agar (ISP5)	Moderate	Gray	White	—
Gause's No.1 agar	Abundant	Puce	Gray	—

注：—：不产生色素。

Note: —: No pigment produced.

2.1.3 生理生化特性: 菌株 FRo2 革兰氏染色显示为阳性,在琼脂培养基上最适生长温度为 30 °C,最适 pH 8.0,能在含 NaCl 的 ISP2 液体培养基中生长,其耐受范围是 0–12% (质量体积比)。菌株 FRo2 能水解淀粉、液化明胶,能够使牛奶产生胨化现象但不凝固,不还原硝酸盐,能利用纤维素生长,不产黑色素及硫化氢,能利用阿拉伯糖、果糖、蔗糖、葡萄糖、鼠李糖、甘露醇、肌醇、木糖等碳源而不能利用棉子糖(表 2)。根据菌落、菌体形态观察和生理特性测定,菌株 FRo2 属于典型的链霉菌属 (*Streptomyces*)放线菌。

2.1.4 菌株 FRo2 的细胞壁化学成分: 经分析,菌株 FRo2 细胞壁含有 L,L-DAP、谷氨酸、丙氨酸和天门冬氨酸等,其细胞壁化学组分属于 I 型。其全细胞水解物中不含有特征糖,糖型为 C 型。其细胞壁化学组分符合放线菌链霉菌属(*Streptomyces*)的化学分类特性。

2.1.5 菌株 FRo2 的 16S rRNA 基因序列分析: 经测序,菌株 FRo2 的 16S rRNA 基因序列(GenBank 登录号 KC522303)有效长度为 1 336 bp。序列测定

结果提交 EzTaxon 进行序列相似性搜索和比对,发现该菌株序列与链霉菌属(*Streptomyces*)菌株高度相似,为链霉菌属的成员。利用 MEGA 4.0 软件邻接法构建系统发育树,发现该菌株与 *Streptomyces rochei* NBRC 12908(T)的相似度为 100%,它们聚在同一个系统进化分支上(图 2)。由此将该菌株鉴定为娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*)。

2.2 菌株 FRo2 代谢产物的抗菌谱

试验发现,菌株 FRo2 的发酵液除对金黄色葡萄球菌具有很强的抑制作用外(抑菌圈 25 mm 以上),对其他细菌均没有抑制作用(表 3)。然而,FRo2 对常见的农作物病原真菌具有较强的抑制作用,其中对小麦赤霉、水稻纹枯病菌和胶胞炭疽菌抑制作用最强。表明菌株 FRo2 代谢物具有较强的抗农作物病原真菌活性,可以作为潜在的农用抗菌剂。

2.3 放线菌抑菌物质的最佳萃取溶剂

通过用水饱和和正丁醇、乙酸乙酯、氯仿和石油醚进行萃取,经生物活性测试,结果表明氯仿萃取的效果最好(表 4),故上清液的活性成分使用氯仿萃取。

表 2 菌株 FRo2 的生理生化特性及碳源的利用

Table 2 Physiological and biochemical characteristics and use of carbon source of strain FRo2

碳源 Carbon source	试验结果 Test result	理化反应 Physiological and biochemical reaction	试验结果 Test result
D-木糖 D-xylose	+	纤维素水解 Cellulose hydrolysis	+
D-果糖 D-fructose	+	淀粉水解 Amylohydrolysis	+
鼠李糖 Rhamnose	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	+
D-阿拉伯糖 D-arabinose	+	产 H ₂ S H ₂ S formation	-
棉子糖 Raffinose	-	牛奶凝固 Milk solidification	-
D-葡萄糖 D-glucose	+	胨化 Peptonization	+
蔗糖 Sucrose	+	硝酸盐还原 Nitrate deoxidation	-
甘露醇 Mannitol	+		
肌醇 Myoinositol	+		

注: +: 发生反应; -: 没有发生反应。

Note: +: Reaction; -: No reaction.

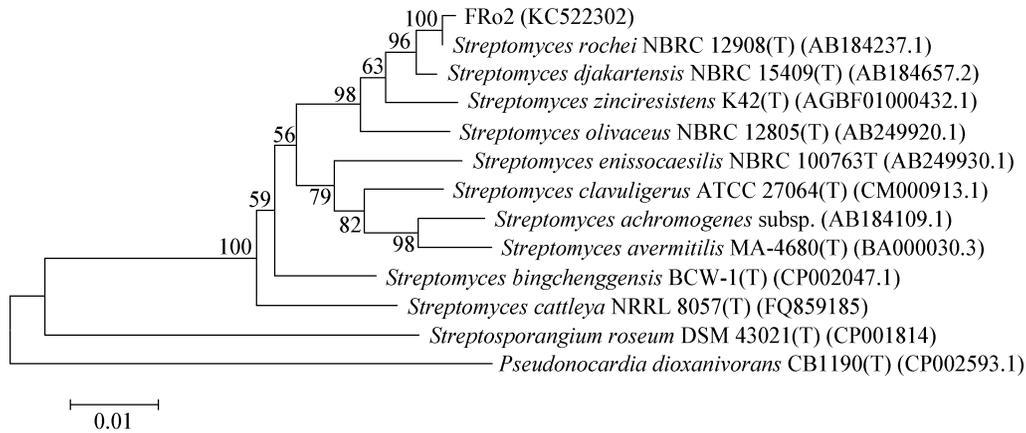


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 FRo2 的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain FRo2 based on the 16S rRNA gene sequences

注：括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号；分支点上的数字表示构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比；标尺或刻度 0.01 代表 1% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those type strains and the new isolates. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications; only values above 50% are shown). The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position with their 16S rRNA gene sequences.

表 3 菌株 FRo2 的抑菌谱
Table 3 Antimicrobial activities of strain FRo2

指示菌 Tested microorganism	抑菌效果 Inhibitory effect
真菌 Fungus	
小麦赤霉 <i>Fusarium graminearum</i>	++
水稻纹枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	++
油菜菌核菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	++
胶胞炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	++
大豆核盘菌 <i>Sclerotinia libertiana</i>	+
芝麻枯萎菌 <i>Sesame fusarium wilt</i>	+
辣椒疫霉菌 <i>Phytophthora capsici</i>	+
细菌 Bacterium	
金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	++
苏云金芽孢杆菌 <i>Bacillus thuringiensis</i>	-
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	-
大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	-
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	-
伤寒杆菌 <i>Typhoid bacillus</i>	-

注：++、+和-：强烈抑制、有抑制和无抑制作用。

Note: ++, + and -: Strong inhibition, inhibition and no inhibition, respectively.

表 4 发酵液有机溶剂萃取后有机相与水相的抑菌作用

Table 4 Inhibition effect of the organic phase and water phase extracted by different solvents

抑菌作用 Bacteriostasis	氯仿 Chloroform	乙酸乙酯 Acetic ether	正丁醇 N-Butyl alcohol	石油醚 Petroleum ether
有机相抑制率 Organic bacteriostatic rate (%)	81.30±0.76	56.04±0.72	50.58±0.58	27.09±0.79
水相抑菌率 Aqueous bacteriostatic rate (%)	38.88±0.67	41.22±0.41	42.56±0.67	73.77±0.53

注：表中数据为平均数±标准差。

Note: Data in the table are $x \pm s$.

2.4 抑菌活性产物 AW2 的纯化鉴定

32 L 发酵液经氯仿粗提, 浓缩后得 11.64 g 油状浸膏。200–300 目层析硅胶干法上样, 按极性从小到大顺序, 用不同梯度的石油醚/乙酸乙酯为洗脱剂进行梯度洗脱, 以 50 mL 为单位收到 208 份洗脱液, 高效薄层层析色谱追踪斑点, 配合 TLC-生物自显影法进行抑菌活性追踪, 将收集产物划分为 11 个组分, 其中第 3 组分显示最强的抑菌活性。546 mg 第 3 部分反复通过正相硅胶柱和柱层析凝胶(Sephadex LH-20)纯化, 从中得到化合物 AW2 (95 mg), 通过生物自显影分析表明 AW2 具有抑菌活性。

化合物 AW2 为无色油状物质, 易溶于乙醇、乙醚、丙酮和苯, 在 254 nm 紫外光照射下显暗斑。核磁共振谱氢谱($^1\text{H NMR}$) (400 MHz, CDCl_3), 主要的氢谱信号化学位移值如下: δ 0.96 (6 H, t, $J=7.4$ Hz, H-4',4''), 1.45 (4 H, m, H-3',3''), 1.72 (4 H, m, H-2',2''), 4.29 (4 H, t, $J=6.8$ Hz, H-1',1''), 7.55 (2 H, dd, $J=3.6, 3.6$ Hz, H-4,5), 7.72 (2 H, dd, $J=3.6, 2.4$ Hz, H-3,6)。核磁共振谱碳谱($^{13}\text{C NMR}$) (100 MHz, CDCl_3), 主要的碳谱信号值如下: δ 13.8 (C-4',4''), 19.2 (C-3',3''), 30.6 (C-2',2''), 65.6 (C-1',1''), 128.8 (C-3,6), 130.9 (C-1,2), 132.3 (C-4,5), 167.8 (C=O)。以上数据与文献[21]报道对比, 推断此物质为邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate), 见图 3。

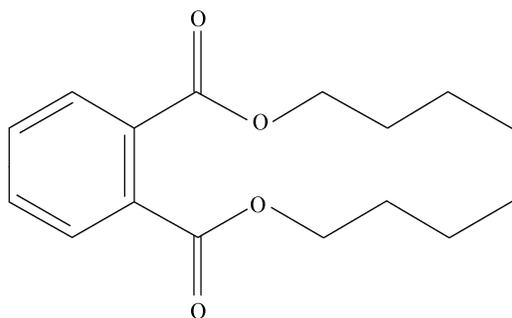


图 3 化合物 AW2 结构式

Figure 3 The structure of compound AW2

3 讨论

植物内生菌是一种潜在的重要微生物资源, 它能促进宿主植物生长、增强植物抗逆性以及增强其抗病虫能力等, 具有开发成植物生长促进剂和生物农药的巨大潜力^[22-23]。本研究采用传统的分类方法, 并结合分子生物学手段对筛选获得的具有抑菌活性的菌株进行了分类鉴定和活性化合物的鉴定。结合形态特征、培养特征、生理生化特性、细胞壁化学组分以及 16S rRNA 基因序列分析, 将从东乡野生稻根内分离筛选出的内生放线菌 FRo2 鉴定为娄彻氏链霉菌(*Streptomyces rochei*)。娄彻氏链霉菌是链霉菌属的一个重要类群, 能够产生种类繁多和丰富的活性化合物。例如, 从辣椒根部分离得到娄彻氏链霉菌的次级代谢产物中的 2,6-二叔丁基对甲酚和 3,5-二叔丁基-4-羟基-苯甲醚对番茄灰霉病菌具有抑制作用^[24]; 从娄彻氏链霉菌 ATCC10739 的发酵液中分离纯化得到的化合物 Borrelidin 具有抗病毒和抗菌活性^[25]。此外, 近年来的研究表明, 娄彻氏链霉菌不仅能够产生多种具有抗菌活性的次级代谢产物, 而娄彻氏链霉菌本身还具有很高的抗农业病原菌、杀虫及除草活性, 并在植物病毒和植物病原真菌的生物防治中都有着广泛的应用^[26-27]。

本研究采用 TLC-生物活性追踪法对一株具有强抑菌活性的东乡野生稻内生放线菌 FRo2 抑菌活性物质进行分离纯化, 最终将该活性化合物鉴定为邻苯二甲酸二丁酯。邻苯二甲酸二丁酯, 又称 DBP, 该物质曾在真菌、放线菌等微生物的次级代谢产物中多次分离得到, 并显示出一定的生物活性^[28-29]。Roy 等^[30]报道了链霉菌 *S. albidoflavus* 产生的 DBP 对 G^+ 细菌、 G^- 细菌及单细胞和丝状真菌都有较强的抑制作用。侯柄竹等^[31]在对桃根癌病菌拮抗放线菌 G-19 发酵产物的小分子活性组分分离纯化中, 获得的活性物质邻苯二甲酸二丁酯对根癌土壤杆菌有较强的抑制活性。本实验室也曾用所分离的邻苯二甲酸二丁酯对小麦赤霉菌、水稻纹枯病菌等多种农作物常见致病菌进行了体外抑制活

性测定, 结果均表现出一定程度的抑制效果(数据未列出), 但菌株 FRo2 及其主要活性产物邻苯二甲酸二丁酯在田间实验的情况还有待于做进一步的研究。综上所述, 东乡野生稻内生娄彻氏链霉菌 FRo2 具有较为显著的抑菌活性, 且具有开发成生物农药的潜能。

参考文献

- [1] Demain AL, Sanchez S. Microbial drug discovery 80 years of progress[J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62(1): 5-16.
- [2] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes and Infection, 2003, 5(6): 535-544.
- [3] 李瑶瑶, 沈月毛. 一些特异生境微生物的化学成分及其抗肿瘤活性研究[J]. 有机化学, 2013, 33: 1135-1143.
- [4] Tian X, Cao L, Tan H, et al. Diversity of cultivated and uncultivated actinobacterial endophytes in the stems and roots of rice[J]. Microbial Ecology, 2007, 53(4): 700-707.
- [5] Reinhold-Hurek B, Hurek T. Living inside plants: bacterial endophytes[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14(4): 435-443.
- [6] Jha P, Kumar A. Characterization of novel plant growth promoting endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* from wheat plant[J]. Microbial Ecology, 2009, 58(1): 179-188.
- [7] Qin S, Xing K, Jiang JH, et al. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89: 457-473.
- [8] 陈家宽, 王海洋, 何国庆. 江西境内珍稀植物普通野生稻和中华水韭产地的考察[J]. 生物多样性, 1998, 6(4): 260-266.
- [9] Zhang GX, Peng GX, Wang ET, et al. Diverse endophytic nitrogen-fixing bacteria isolated from wild rice *Oryza rufipogon* and description of *Phytobacter diazotrophicus* gen. nov. sp. nov.[J]. Archives of Microbiology, 2008, 189: 431-489.
- [10] Peng G, Zhang W, Luo H, et al. *Enterobacter oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from wild rice *Oryza latifolia*[J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2009, 59: 1650-1655.
- [11] Peng G, Yuan Q, Li H, et al. *Rhizobium oryzae* sp. nov., isolated from wild rice *Oryza alta*[J]. International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 2158-2163.
- [12] Zeng QG, Luo F, Zhang ZB, et al. Phosphate solubilizing rhizospherebacterial T21 isolated from Dongxiang wild rice species promotes cultivated rice growth[J]. Applied Mechanics and Materials, 2011, 108: 167-175.
- [13] 罗菲, 汪涯, 曾庆桂, 等. 东乡野生稻根际可培养细菌多样性及其植物促生活性分析[J]. 生物多样性, 2011, 19(4): 476-484.
- [14] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 13-15.
- [15] Williams S, Davies F. Use of a scanning electron microscope for the examination of actinomycetes[J]. Journal of General Microbiology, 1967, 48(2): 171-177.
- [16] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 296-306, 1001-1008.
- [17] Lechevalier MP, Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Bacteriology, 1970, 20(4): 435-443.
- [18] 王平. 测定放线菌菌体中氨基酸和单糖的快速方法——薄层层析法[J]. 微生物学通报, 1986, 13(5): 228-231.
- [19] 杨晓楠, 李杨, 苗建强, 等. 拮抗放线菌 T111菌株鉴定、发酵液理化性质测定及发酵条件优化[J]. 应用与环境生物学报, 2011, 17(4): 541-547.
- [20] Choma IM, Grzelak EM. Bioautography detection in thin-layer chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(19): 2684-2691.
- [21] Liu YB, Cheng XR, Qin JJ, et al. Chemical constituents of *Toona ciliata* var. pubescens[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2011, 9(2): 115-119.
- [22] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(2): 257-268.
- [23] Ryan RP, Germaine K, Franks A, et al. Bacterial endophytes: recent development and applications[J]. FEMS Microbiology Letter, 2008, 278: 1-9.
- [24] 马林, 陈红兵, 韩巨才, 等. 植物内生放线菌 Lj20的鉴定及其抗真菌物质的合成[J]. 微生物学报, 2008, 48(7): 900-904.
- [25] 信艳娟, 艾江宁, 刘亚男, 等. 一株海洋放线菌的分离鉴定及活性研究[J]. 生物技术进展, 2012, 2(5): 354-358.
- [26] 李周, 赵圣印. 娄彻氏链霉菌 ATCC10739 产抗生素 Borrelidin 发酵条件优化及其分离纯化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(7): 1051-1055.
- [27] 陈力力, 高必达. 微生物抗植物病毒活性物的研究进展[J]. 中国生物防治学报, 2006, 22(4): 255-260.
- [28] Savard E, Blais L. Secondary metabolism of penicillium bilaii strain PB-50[J]. Mycopathologia, 1994, 127(1): 19-27.
- [29] El-Naggar MM. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by streptomyces nasri submutant H35[J]. Biomedical Letters, 1997, 55: 125-131.
- [30] Roy RN, Laskar S, Sen SK. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2[J]. Microbiological Research, 2006, 161(2): 121-126.
- [31] 侯柄竹, 王树芳, 马焕普, 等. 桃根癌病菌拮抗放线菌抑菌物质的分离纯化与结构鉴定[J]. 微生物学通报, 2013, 40(7): 1186-1192.