

东乡野生稻内生放线菌 *Streptomyces* sp. PRh5 的全基因组测序及序列分析

杨慧林^{1,2} 张志斌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 江西省生物加工过程重点实验室 江西 南昌 330013)

摘要:【目的】*Streptomyces* sp. PRh5 是从东乡野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.)中分离获得的一株对细菌和真菌都具有较强抗菌活性的内生放线菌。为深入研究 PRh5 菌株抗菌机制及挖掘次级代谢产物基因资源,有必要解析 PRh5 菌株的基因组序列信息。【方法】采用高通量测序技术对 PRh5 菌株进行全基因组测序,然后使用相关软件对测序数据进行基因组组装、基因预测与功能注释、直系同源簇(COG)聚类分析、共线性分析及次级代谢产物合成基因簇预测等。【结果】基因组组装获得 290 Contigs,整个基因组大小约 11.1 Mb,GC 含量为 71.1%,序列已提交至 GenBank 数据库,登录号为 JABQ00000000。同时,预测得到 50 个次级代谢产物合成基因簇。【结论】将为 *Streptomyces* sp. PRh5 的功能基因组学研究及相关次级代谢产物的生物合成途径与异源表达研究提供基础。

关键词: 东乡野生稻,内生放线菌,抗菌活性,全基因组测序,生物合成基因簇

Whole-genome sequencing and analysis of an endophytic actinomycete *Streptomyces* sp. PRh5 from Dongxiang wild rice

YANG Hui-Lin^{1,2} ZHANG Zhi-Bin¹ YAN Ri-Ming¹ WANG Ya² ZHU Du^{1,2*}

(1. Jiangxi Normal University, College of Life Sciences, Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropic Plant Resources, Nanchang, Jiangxi 330022, China)

(2. Jiangxi Science & Technology Normal University, Jiangxi Key Laboratory of Bioprocess, Nanchang, Jiangxi 330013, China)

Abstract: [Objective] *Streptomyces* sp. PRh5 is an endophytic actinomycete from Dongxiang wild rice, and shows strong antimicrobial activity *in vitro*. In order to further study *Streptomyces* sp. PRh5 antimicrobial mechanism and secondary metabolites biosynthetic gene clusters, it is necessary to decipher the strain genome. [Methods] The genome was sequenced using high-throughput sequencing, and then analyzed using relevant software for genome assembly, gene prediction and functional annotation, cluster of orthologous group (COG) cluster analysis, synteny analysis and total secondary

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(No. 2011BAC13B04); 国家自然科学基金项目(No. 31260137); 江西省青年科学基金项目(No. 20132BAB214006); 江西省教育厅基金项目(No. GJJ13211, GJJ14250)

*通讯作者: Tel: 86-791-88121934; 信箱: zhudu12@163.com

收稿日期: 2014-08-14; 接受日期: 2014-09-29; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-14

metabolite biosynthesis gene clusters prediction. **[Results]** The whole genome was assembled into 290 contigs, and the genome size is about 11.1 Mb with GC content of 71.1%. This Whole Genome Shotgun project has been deposited at GenBank under the accession JABQ00000000. According to genome sequences analysis, 50 secondary metabolite biosynthetic gene clusters were predicted. **[Conclusion]** The results will provide genome sequences for future functional genomics, biosynthetic pathways and heterologous expression of secondary metabolites on *Streptomyces* sp. PRh5.

Keywords: *Oryza rufipogon*, Endophytic actinomycete, Antimicrobial activity, Whole-genome sequencing, Biosynthetic gene cluster

植物内生菌(Endophyte)是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官内部的微生物,即被它们感染的宿主植物不会或至少暂时不会表现出明显的症状,并可通过组织学方法和严格表面消毒的植物组织中分离或从植物组织内直接扩增出其 DNA^[1-3]。因此,可以把植物内生菌类比于人类肠道中的正常菌群,内生菌与宿主植物协同进化、互惠共生,形成复杂的微生态体系。植物内生菌主要包括植物内生真菌、内生细菌和内生放线菌。

东乡野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.)是迄今所发现的世界上分布最北的野生稻,我国三大普通野生稻之一,被列为国家二级保护植物^[4]。因其具有抗寒、耐旱、耐瘠、抗虫等优良品质,研究者对其进行了广泛的研究^[5-6]。作物的优良性状除了决定于优良遗传基因外,与其内生菌也具有一定的关系^[7-8]。内生菌在植物内特殊生境的长期作用下,可能产生一些具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒、增强免疫力等功效的新型化合物^[9-12]。Nakashima 等^[13]从内生放线菌 *Polymorphospora rubra* K07-0510 中分离得到溶血抑制性化合物 Trehangelins A-C, 其中 Trehangelins A 的 IC_{50} 值为 0.1 g/L。Igarashi 等从泰国植物 *Abrus pulchellus* 中分离得到一批内生放线菌,其中 *Micromonospora* sp. GMKU326 产生抗革兰氏阳性菌抗生素 Maklamicin^[14], 菌株 *Microbispora* sp. GMKU 363 合成含有呋喃酮的聚酮类化合物 Linfuranone A^[15]。

本实验室前期从东乡野生稻中分离获得的一株对细菌和真菌都具有较强抗菌活性的内生放线菌 *Streptomyces* sp. PRh5^[16], 并保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC No. 2013487)^[17]。为了进一

步深入研究 *Streptomyces* sp. PRh5 的抗菌机制,本研究采用高通量测序技术对 PRh5 菌株进行全基因组测序,并对该菌株的次级代谢产物合成基因簇进行预测,相关研究结果将为 PRh5 菌株的功能基因组学研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器: 酵母提取物、麦芽提取物,购自英国 OXOID 公司;葡萄糖、Tris、EDTA、乙醇、CaCO₃、琼脂粉等,国产分析纯试剂。TGL-20M 离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司;ChemiDoc XRS 凝胶成像系统,Bio-Rad 公司;HiSeq 2000 高通量测序仪, Illumina 公司。

1.1.2 菌株和培养基: 内生放线菌 *Streptomyces* sp. PRh5 为本实验室从东乡野生稻中分离得到,保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC No. 2013487);ISP2 培养基(g/L):葡萄糖 4.0,酵母提取物 4.0,麦芽提取物 10.0;固体培养基在 ISP2 培养基中添加 CaCO₃ 2.0 g 和琼脂粉 12.0 g,加水至 1 L, pH 7.2。

1.2 放线菌的培养与基因组 DNA 的提取

Streptomyces sp. PRh5 接种至斜面培养基活化(30 °C, 3-4 d),然后转接至摇瓶液体培养 3-5 d,抽滤收集菌体用于提取基因组 DNA。采用液氮研磨方法裂解细胞壁,然后采用大连宝生物公司的基因组 DNA 提取试剂 DNAiso (Code No. 9770A, 详细步骤见产品说明书)。

1.3 基因组测序、组装及基因组注释

基因组 DNA 提取后进行质量鉴定,在浓度和纯度达到测序要求后进行全基因组测序。构建插入片段约 500 bp 的 PCR-free 测序文库,然后采用

Hiseq2000 测序仪进行测序, 获得约 1 Gb 的原始测序数据。原始数据经过预处理去除接头、引物及低质量数据后, 采用 Velvet 1.2.10 组装软件^[18]进行序列组装, 通过优化参数 Kmer 值获得最好的组装结果。基因预测采用 Glimmer 3.0 软件^[19], 基因功能注释采用 BLAST 软件与 NCBI 的蛋白质数据库(NR) 及 COG 数据库进行比对。

1.4 次级代谢产物合成基因簇分析

次级代谢产物的编码基因通常在基因组中成簇存在, 本研究采用 antiSMASH 软件^[20-21]对 *Streptomyces* sp. PRh5 菌株中的次级代谢产物合成基因簇分析, 并预测可能合成的化合物。

2 结果与分析

2.1 *Streptomyces* sp. PRh5 菌株鉴定

菌株 PRh5 基内菌丝由浅黄色到黄褐色, 有分枝, 不断裂, 气生菌丝白色到灰色, 孢子成螺旋状孢子链, 一般为 2-3 圈, 孢子表面粗糙。基于 16S rRNA 基因序列构建系统进化树显示与菌株 *Streptomyces indonesiensis* DSM 41759^T 在同一个系统分支上。将菌株 PRh5 与 *Streptomyces indonesiensis* DSM 41759^T 基因组进行 DNA-DNA 杂交实验, 结果为 54.6%, 低于 70% 新种界限(表 1), 综合该菌在生理生化特征、16S rRNA 基因同源性和化学指标等方面的实验结果, 确定菌株 PRh5 是链霉菌属中的一个新种, 命名为 *Streptomyces* sp.

PRh5。

2.2 *Streptomyces* sp. PRh5 基因组序列基本分析

2.2.1 *Streptomyces* sp. PRh5 基因组的基本特征:

目前, 已报道完成全基因组测序的链霉菌有 100 多株, 我们选取了与 *Streptomyces* sp. PRh5 相近的紫黑链霉菌(*S. violaceusniger*)、天蓝色链霉菌(*S. coelicolor*)、吸水链霉菌(*S. hygroscopicus*)、雷帕霉素链霉菌(*S. rapamycinicus*)与 PRh5 菌株在基因组基本特征方面进行了比较(表 2), 结果表明上述 5 种链霉菌在 GC 含量、CDS 平均长度、tRNA 数量等方面十分相似, 符合链霉菌基因组的基本特征。

2.2.2 *Streptomyces* sp. PRh5 与 *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113 共线性分析:

通过全基因组范围的 BLAST 比对分析发现, *Streptomyces* sp. PRh5 与 *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113 的同源性最高。因此, 利用 MCSanX 软件对二者的基因组氨基酸序列进行了共线性分析(图 1)。从图 1 中可以看到二者相似性较高, 有着非常保守的基因组结构和共线性关系, 相关结果将为后续 *Streptomyces* sp. PRh5 的缺口修补(Gap filling)提供靶标。

2.2.3 *Streptomyces* sp. PRh5 蛋白质 COG 聚类分析:

基于 Glimmer 3.0 软件, *Streptomyces* sp. PRh5 共预测得到 8 712 个蛋白基因, 然后将预测得到的所有蛋白质序列与 COG 数据库进行 BLASTp 比对分析(E -value $\leq 1e-5$), 其中 6 677 个蛋白基因成功获得 COG 功能注释(图 2)。从图 2 中可以看出, COG

表 1 菌株 PRh5 与 *Streptomyces indonesiensis* DSM 41759^T DNA-DNA 杂交实验

Table 1 The result of DNA-DNA hybridization test between strain PRh5 and *Streptomyces indonesiensis* DSM 41759^T

重复 Repeats	DSM 41759 ^T			PRh5			Relatedness 1	Relatedness 2
	I_{blank}	I_{AA}	I_{AB}	I_{blank}	I_{AA}	I_{AB}		
1	5 676.354	8 316.356	7 057.815	7 137.073	7 708.418	7 459.625	0.523 280 285	0.564 548 565
2	6 457.284	7 416.082	7 013.763	7 210.325	7 989.736	7 616.861	0.580 392 325	0.521 59 387
3	6 088.816	7 912.312	7 172.375	6 699.612	7 089.112	6 892.792	0.594 220 662	0.495 969 191
4	5 929.013	7 313.172	6 718.861	6 917.522	8 030.712	7 496.615	0.570 633 865	0.520 210 386
Average	-	-	-	-	-	-	0.567 131 784	0.525 580 503

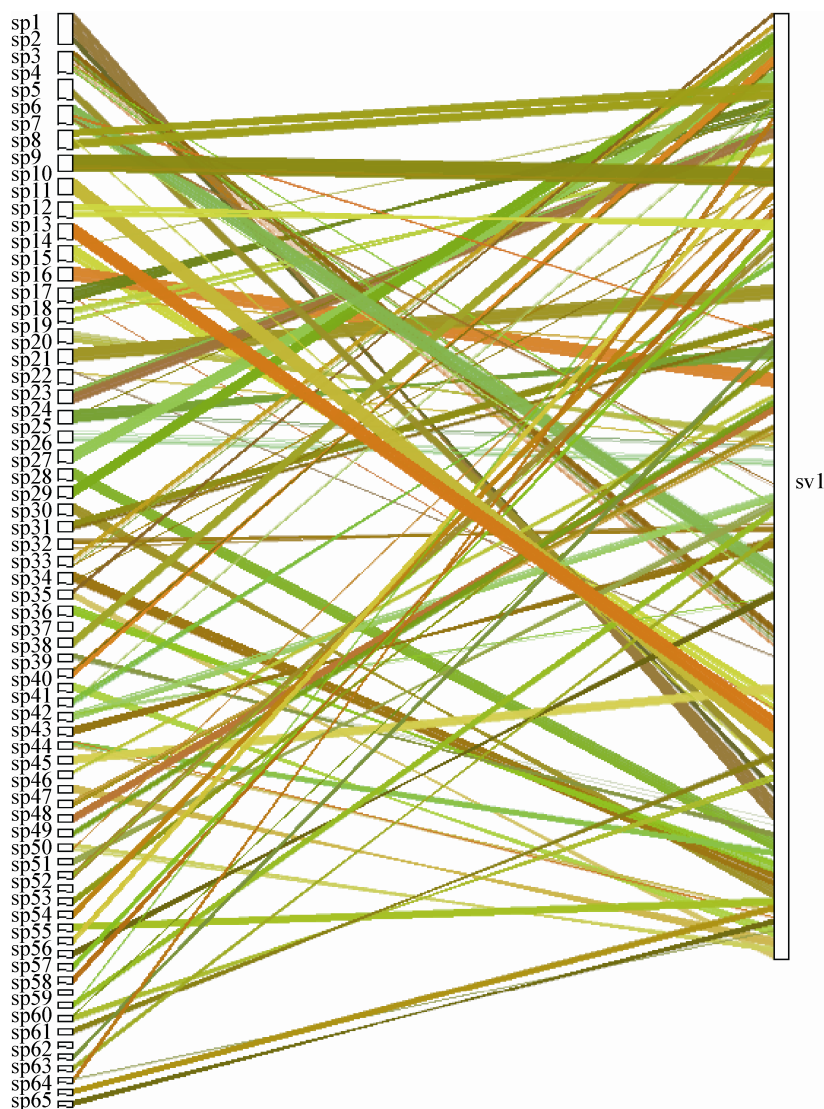
注: I_{blank} : 杂家组合一方与鲑鱼精 DNA 杂交值; I_{AA} : 自交值; I_{AB} : 两两杂交值。

Note: I_{blank} : Hybridization values with salmon sperm DNA; I_{AA} : Self-hybridization values; I_{AB} : Hybridization values.

表 2 链霉菌基因组基本特征比较分析

Table 2 General features of several sequenced *Streptomyces* chromosomes

Features	<i>Streptomyces</i> sp. PRh5	<i>S. violaceusniger</i>	<i>S. coelicolor</i>	<i>S. hygroscopicus</i>	<i>S. rapamycinicus</i>
Length (bp)	11 084 188	10 657 107	8 667 507	10 145 833	12 700 734
Contigs (No.)	290	1	1	1	1
GC content (%)	71.1	71.0	72.1	71.9	69.3
CDS (No.)	8 712	8 482	7 825	8 849	10 002
Average CDS size (bp)	1 062	1 077	991	952	1 034
Coding (%)	83.5	85.7	88.9	83.2	81.5
tRNA (No.)	65	63	63	68	65
GenBank No.	JABQ00000000	NC_015957	NC_003888	NC_017765	NC_022785

图 1 *Streptomyces* sp. PRh5 与 *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113 的共线性分析Figure 1 Synteny analysis of *Streptomyces* sp. PRh5 and *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113

注: sp1–sp65: *Streptomyces* sp. PRh5 的 contig001–contig65; sv1: *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113 基因组 DNA.

Note: sp1–sp65: *Streptomyces* sp. PRh5 contig001–contig65; sv1: *Streptomyces violaceusniger* Tu 4113 genome DNA.

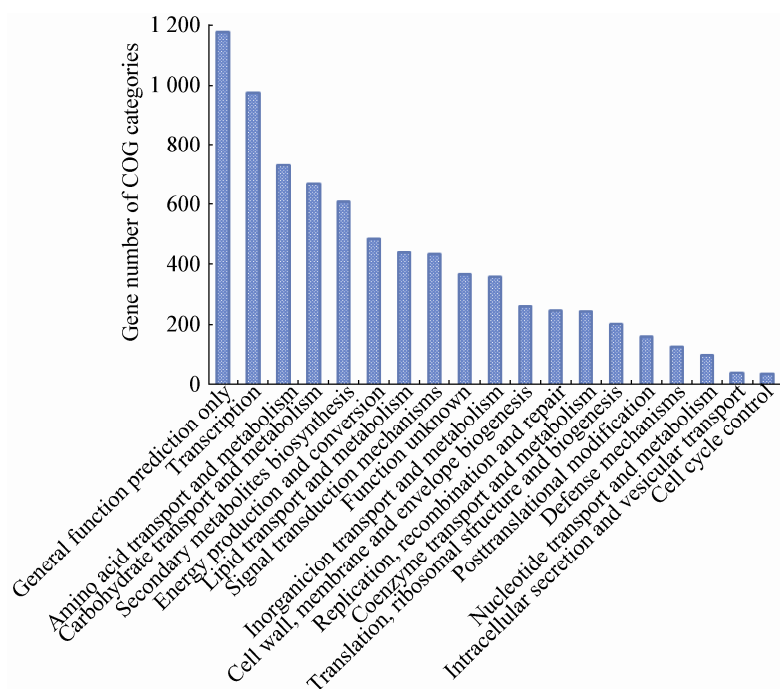


图2 *Streptomyces* sp. PRh5 蛋白质 COG 聚类分析
Figure 2 COG cluster analysis of *Streptomyces* sp. PRh5 proteins

聚类主要集中于一般功能预测、转录相关、氨基酸运输与代谢、碳水化合物运输与代谢、次级代谢产物合成等。值得注意的是,次级代谢产物合成相关基因达 608 个,如此多的次级代谢产物合成基因极有可能是该菌株能够产多种生物活性物质的原因。

2.3 *Streptomyces* sp. PRh5 次级代谢产物合成基因簇分析

次级代谢产物的编码基因通常在基因组中成簇存在,编码具有多种功能的复合酶。其中,研究得最清楚的是 PKS/NRPS 基因簇。本研究采用 antiSMASH 软件对 PRh5 菌株中所有的次级代谢产物合成基因簇进行分析,共预测得到 50 个基因簇,其中 PKS/NRPS 类型基因簇有 35 个,约占总基因簇数量的 70% (表 3)。同时,对基因簇的次级代谢产物进行了预测(图 3),其中包括治疗神经变性病的美力霉素、治疗骨质疏松的雷弗霉素、新型糖肽类抗生素 Mannopectimycin、环脂肽抗生素

Friulimicin 及尼日利亚菌素、利迪链菌素、疏螺旋体素等 20 余种,表明 *Streptomyces* sp. PRh5 具有合成多种生物活性物质的能力。

2.4 尼日利亚菌素基因簇分析

邓映明^[16]从 *Streptomyces* sp. PRh5 的发酵液中分离得到邻苯二甲酸二丁酯、尼日利亚菌素、13-Docosamide 和诺卡胺素共 4 个化合物,其中尼日利亚菌素含量较高。尼日利亚菌素具有抗革兰氏阳性菌和真菌活性,并且生物合成途径已经阐明^[22]。此前文献报道尼日利亚菌素主要存在于菌体细胞内,然而 PRh5 菌株合成的尼日利亚菌素主要存在于胞外发酵液中,表明 PRh5 菌株具有较强的尼日利亚菌素外排能力。通过比较分析 PRh5 和已发表的尼日利亚菌素生物合成基因簇(GenBank accession No. DQ354110)发现,PRh5 的尼日利亚菌素生物合成基因簇多出两个基因(图 4 和表 4),这可能是导致 PRh5 高产且分泌表达尼日利亚菌素的原因。

表3 *Streptomyces* sp. PRh5 次级代谢产物合成基因簇预测
Table 3 Gene clusters involved in synthesis of secondary metabolites in *Streptomyces* sp. PRh5

序号 ID	重叠群 Contig No.	位置 Position (nt)	基因数量 Gene amount	基因簇类型 Gene cluster type	预测化合物 Putative compound
1	contig001	1-30 660	19	t1pks	Concanamycin A/刀豆素 A
2	contig002	150 595-17 2671	21	terpene	Unknown
3	contig002	166 384-211 804	33	t1pks	Unknown
4	contig003	47 506-69 839	20	lant	Unknown
5	contig004	1-28 889	18	t1pks-nrps	Meridamycin/美立霉素
6	contig005	113 535-135 660	18	siderophore	Siderophore/铁载体
7	contig008	82 347-146 391	38	t1pks	Reveromycin/雷弗霉素
8	contig009	48 934-56 250	7	ectoine	Cobalamin/VB12
9	contig010	54 522-78 542	23	siderophore	Vibrioferin/弧菌铁素
10	contig011	89 721-139 750	37	t1pks	Borrelidin/疏螺旋体素
11	contig014	96 236-104 564	8	butyrolactone	Unknown
12	contig016	3-35 562	19	t1pks	Ansamitocin
13	contig016	64 757-95 971	32	t3pks	Unknown
14	contig016	110 527-156 832	31	nrps	Mannopectimycin
15	contig018	125 204-149 847	21	butyrolactone	Lankamycin/lankacidin
16	contig025	381-32 196	24	t1pks	Crocacin
17	contig025	15 928-56 983	32	lant-bcin	Streptolydigin/利迪链菌素
18	contig025	44 224-122 295	36	nrps	Laspartomycin/天冬霉素
19	contig030	9 318-101 595	55	nrps-t1pks	Friulimicin
20	contig032	31 874-99 781	18	t1pks	Monensin/莫能菌素
21	contig035	61 110-97 302	31	t1pks	Rubradirin/红迪菌素
22	contig036	27 375-70 631	39	other	Heboxidiene
23	contig038	44 929-94 905	26	nrps	Melanin/黑色素
24	contig040	1-23 274	18	t1pks	Nigericin(partial)/尼日利亚菌素
25	contig040	29 261-91 923	32	t1pks-nrps	Dihydrochalconomycin
26	contig041	35 638-60 207	21	terpene	Unknown
27	contig042	56 114-90 186	23	t1pks	Chlorothricin/氯丝菌素
28	contig044	1 725-42 506	30	nrps-t3pks	Unknown
29	contig048	58-79 694	45	t1pks-nrps	Skylamycin
30	contig049	1-33 122	15	t1pks	Concanamycin A/刀豆素 A
31	contig050	47 999-79 236	22	siderophore	Unknown
32	contig053	29 198-50 737	15	terpene	Unknown
33	contig069	555-25 526	19	blactam	Clavulanic acid/Cephamicin C
34	contig072	70-39 794	30	t1pks	Unknown
35	contig072	29 307-56 570	18	nrps	Unknown
36	contig073	23 434-54 677	19	nrps	Melanin

(待续)

(续表)

37	contig079	34-25 059	21	nrps	Unknown
38	contig082	23 836-48 823	22	t1pks	Meridamycin/美立霉素
39	contig084	15 469-46 480	28	terpene	Brasilicardin A
40	contig085	20 106-46 105	26	t2pks	Fredericamycin/菲特霉素
41	contig086	2-40 149	21	t1pks	Lankamycin/lankacidin
42	contig087	1-44 039	33	nrps-t3pks	Balhimycin
43	contig090	326-40 131	34	nrps	Unknown
44	contig092	19 050-39 642	19	t1pks	Kanamycin/卡那霉素
45	contig093	3-39 632	10	t1pks	FR-008
46	contig094	16 059-38 232	21	t1pks	Concanamycin A/刀豆素 A
47	contig113	136-27 725	18	terpene-t1pks	Unknown
48	contig121	1-25 237	12	t1pks	Nigericin(partial)/尼日利亚菌素
49	contig123	2-24 747	11	t1pks	Unknown
50	contig125	1-24 065	24	other	Melanin/黑色素

注: t1pks: I 型聚酮合酶; t2pks: II 型聚酮合酶; t3pks: III 型聚酮合酶; nrps: 非核糖体肽; terpene: 萜烯类; lant: 羊毛硫抗生素; siderophore: 铁载体; ectoine: 四氢嘧啶; butyrolactone: 丁内酯; bcin: 细菌素; blactam: β -内酰胺; other: 其他。

Note: t1pks: Type I polyketide synthase; t2pks: Type II polyketide synthase; t3pks: Type III polyketide synthase; nrps: Non ribosomal peptide; terpene: Terpenes; lant: Lantibiotics; ectoine: Four hydrogen pyrimidine; bcin: Bacteriocin; blactam: β -lactam.

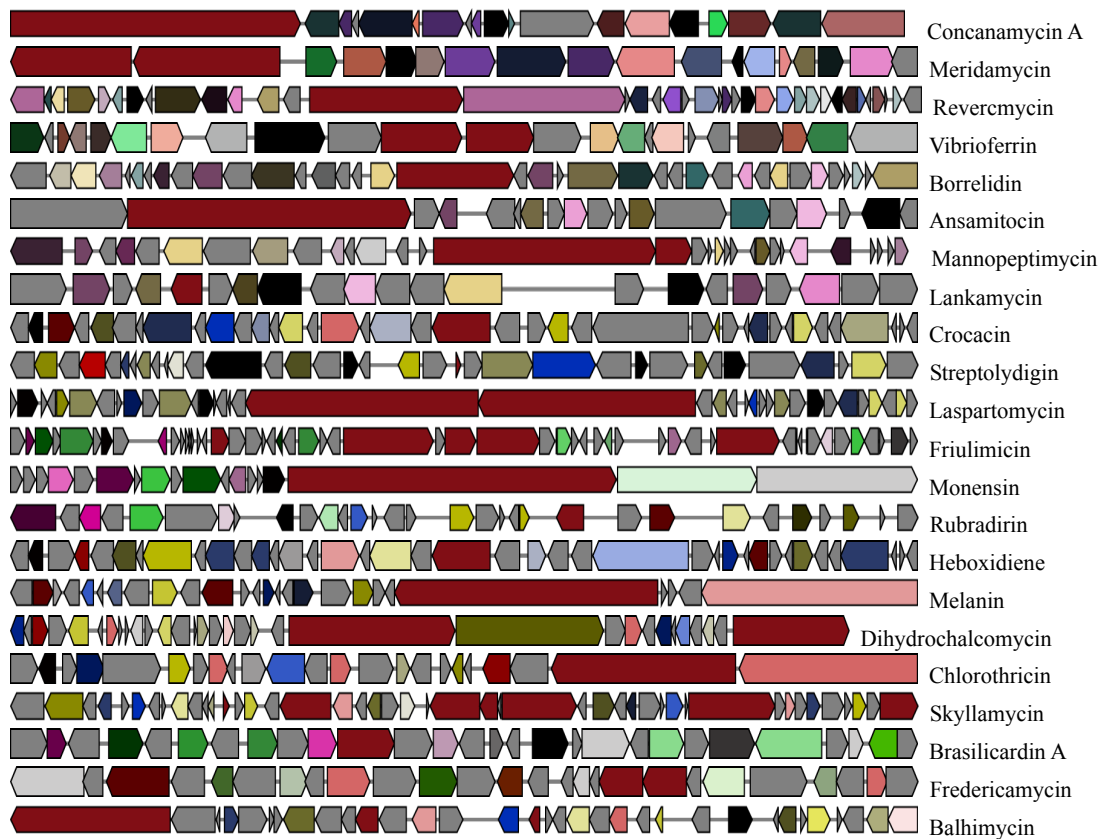


图3 *Streptomyces* sp. PRh5 次级代谢产物合成基因簇示意图(部分)

Figure 3 Gene clusters sketch map involved in synthesis of secondary metabolites in *Streptomyces* sp. PRh5 (Partial)

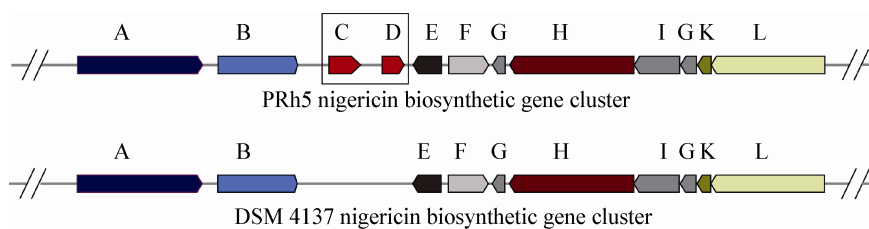


图4 尼日利亚菌素合成基因簇比较

Figure 4 Comparison of nigericin biosynthetic gene cluster

表4 尼日利亚菌素生物合成基因簇相关基因
Table 4 Genes involved in nigericin biosynthetic gene cluster

编号 No.	开发阅读框 ORF	蛋白长度 Protein length	功能 Fuction	登录号 Accession No.
A	NigAV	1 946	Beta-ketoacyl synthase	EXU62069
B	NigAVI	1 666	Beta-ketoacyl synthase	EXU62070
C		186	Regulatory protein	EXU62080
D	TetR	231	TetR family transcriptional regulator	EXU62071
E	NigCII	288	Alpha/beta hydrolase	EXU62072
F	NigD	419	Cytochrome P450	EXU62073
G	NigAXI	136	Phosphopantetheine-binding protein	EXU62074
H	NigAX	1 288	Polyketide synthase	EXU62075
I	NigCI	476	Enterotoxin	EXU62076
J	NigBIII	155	Hypothetical protein	EXU62077
K	NigBI	144	Nuclear transport factor 2	EXU62078
L	NigAIX	1 178	Polyketide synthase	EXU62079

3 讨论

较土壤放线菌而言,植物内生放线菌研究较少且所处生境特殊,成为新菌株和天然活性化合物的新来源,在促生、抑制病虫害等方面具有广阔应用前景。*Streptomyces* sp. PRh5 是一株从东乡野生稻中分离得到的对革兰氏阳性菌和真菌都具有较强抑制活性的内生放线菌。本实验室邓映明^[16]采用琼脂扩散法检测 PRh5 菌株发酵液抑菌活性,结果显示发酵液对金黄色葡萄球菌和枯草杆菌具有很高的抑制活性;采用菌丝生长抑制法检测 PRh5 菌株发酵液对 7 种病原真菌抑制活性,结果显示对病原真菌较高的抑制活性,其中对油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)抑制率高达 86%。因此,对

PRh5 菌株进行全基因组测序有助于从分子水平上阐明抗性机制。

次级代谢产物是指微生物生长到一定阶段才产生的化学结构十分复杂、对该生物无明显生理功能或并非是微生物生长和繁殖所必需的物质。次级代谢产物包括聚酮(PK)、非核糖体肽(NRPS)、羊毛硫抗生素(Lantibiotics)、铁载体(Siderophores)、萜烯(Terpenes)等十几种。

链霉菌属是公认的次级代谢产物主要来源,本研究通过 antiSMASH 软件,首次在全基因组范围内分析 *Streptomyces* sp. PRh5 的次级代谢产物合成基因簇,共预测得到 50 个基因簇,为相关化合物的合成机制研究提供数据。另一方面,在对基因组背

景信息了解的基础上, 可通过基因工程技术, 将次级代谢产物合成基因簇转移至不同的异源宿主中表达, 不仅能够激活沉默的生物合成基因簇, 而且可将异源表达体系作为一个非常有用的工具通过组合生物合成生产更多结构新颖、功能独特的化合物。

4 结论

本研究采用高通量测序技术对 *Streptomyces* sp. PRh5 进行全基因组测序及分析, 预测得到 8 712 个蛋白基因, 50 个次级代谢产物合成基因簇, 并对基因簇可能合成的化合物进行了预测, 包括美力霉素、雷弗霉素、弧菌铁素、疏螺旋体素、利迪链菌素、天冬霉素等十多种。同时, 对尼日利亚菌素合成基因簇详细分析发现, PRh5 的尼日利亚菌素基因簇较文献报道的多出两个基因, 这可能是导致 PRh5 高效分泌合成尼日利亚菌素的原因。本研究的相关研究结果将为 *Streptomyces* sp. PRh5 的功能基因组学研究及相关次级代谢产物的生物合成途径及异源表达研究提供帮助。*Streptomyces* sp. PRh5 基因组序列已提交至 NCBI 数据库, 登录号为 JABQ00000000。

参考文献

- [1] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1997, 43(10): 895-914
- [2] Stone JK, Bacon CW, White J. An overview of endophytic microbes: endophytism defined[A]/Microbial Endophytes[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 29-33
- [3] Sturz A, Christie B, Nowak J. Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2000, 19(1): 1-30
- [4] Chen JK, Wang HY, He GQ. A survey on the habitats of *Oryza rufipogon* and *Isoetes sinensis* in Jiangxi Province[J]. Chinese Biodiversity, 1998, 6(4): 260-266 (in Chinese)
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
- [5] Zhang CL, Huang YJ, Chen DZ, et al. Biochemical and physiological characteristics of cold tolerance for roots in dongxiang wild rice at the seedling stage[J]. Review of China Agricultural Science and Technology, 2007, 9(2): 49-52 (in Chinese)
张成良, 黄英金, 陈大洲, 等. 东乡野生稻苗期根系耐冷性生理生化特性[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(2): 49-52
- [6] Xie JK, Hu BL, Wan Y, et al. Comparison of the drought resistance characters at seedling stage between Dongxiang common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivars (*Oryza*

- sativa* L.)[J]. Acta Ecologica Sinica, 2010(6): 1665-1674 (in Chinese)
谢建坤, 胡标林, 万勇, 等. 东乡普通野生稻与栽培稻苗期抗旱性的比较[J]. 生态学报, 2010(6): 1665-1674
- [7] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(8): 827-837
- [8] Saikkonen K, Faeth S, Helander M, et al. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1998, 29: 319-343
- [9] Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013, 1830(6): 3670-3695
- [10] Strobel G, Daisy B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(4): 491-502
- [11] Strobel G, Daisy B, Castillo U, et al. Natural products from endophytic microorganisms[J]. Journal of Natural Products, 2004, 67(2): 257-268
- [12] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes and Infection, 2003, 5(6): 535-544
- [13] Nakashima T, Okuyama R, Kamiya Y, et al. Trehangelins A, B and C, novel photo-oxidative hemolysis inhibitors produced by an endophytic actinomycete, *Polymorphospora rubra* K07-0510[J]. The Journal of Antibiotics, 2013, 66(6): 311-317
- [14] Igarashi Y, Ogura H, Furihata K, et al. Maklamicin, an antibacterial polyketide from an endophytic *Micromonospora* sp. [J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(4): 670-674
- [15] Indananda C, Igarashi Y, Ikeda M, et al. Linfuranone A, a new polyketide from plant-derived *Microbispora* sp. GMKU 363[J]. The Journal of Antibiotics, 2013, 66(11): 675-677
- [16] Deng YM. Study on identification and secondary metabolites of two endophytic actinomycetes from Dongxiang wild rice[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi Normal University, 2014 (in Chinese)
邓映明. 两株东乡野生稻内生放线菌的鉴定及代谢产物分离[D]. 南昌: 江西师范大学硕士论文, 2014
- [17] Zhu D, Deng YM, Zhang ZB, et al. A method of preparation two antibiotics using *Streptomyces* sp.: China, ZL2013106266697[P]. 2014-03-19 (in Chinese)
朱笃, 邓映明, 张志斌, 等. 一种链霉菌及利用其制备两种抗生素的方法: 中国, ZL2013106266697[P]. 2014-03-19
- [18] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs[J]. Genome Research, 2008, 18(5): 821-829
- [19] Delcher AL, Bratke KA, Powers EC, et al. Identifying bacterial genes and endosymbiont DNA with Glimmer[J]. Bioinformatics, 2007, 23(6): 673-679
- [20] Blin K, Medema MH, Kazempour D, et al. antiSMASH 2.0-a versatile platform for genome mining of secondary metabolite producers[J]. Nucleic Acids Research, 2013, 41(Web Server issue): W204-W212
- [21] Medema MH, Blin K, Cimermancic P, et al. antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(Web Server issue): W339-W346
- [22] Harvey BM, Mironenko T, Sun Y, et al. Insights into polyether biosynthesis from analysis of the nigericin biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. DSM4137[J]. Chemistry & Biology, 2007, 14(6): 703-714