

东乡野生稻内生放线菌分离及菌株 S123 次级代谢产物分析

张志斌¹ 邓映明^{1,3} 熊瑶瑶¹ 汪涯² 颜日明¹ 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. 梅州市食品药品监督管理局 广东 梅州 514071)

摘要:【目的】从东乡野生稻(*Oryza rufipogon*)中分离和鉴定内生放线菌, 对其进行抗菌活性筛选, 并分析高抗菌活性菌株 S123 的次级代谢产物。【方法】采用 S 培养基对东乡野生稻内生放线菌进行分离、纯化, 并构建 16S rRNA 基因序列系统发育进化树进行菌株鉴定。以琼脂扩散法和菌丝生长速率法进行抗菌活性筛选, 同时设计简并引物检测菌株 I 型聚酮合酶(PKS-I)基因。对具广谱抗菌活性的菌株 S123 进行分批大量发酵, 运用多种色谱方法对发酵产物进行分离、纯化, 利用 MS 和 NMR 分析鉴定化合物的结构。【结果】从东乡野生稻中共分离到 11 株内生放线菌, 分别属于链霉菌属(8 株)和假诺卡氏属(3 株)。其中有 8 株具有抗菌活性, 8 株呈现 I 型 PKS 阳性。从高抑菌活性菌株 S123 中分离到化合物 Nigericin 和 17-O-demethylgeldanamycin, 其中 Nigericin 对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌及水稻纹枯病菌均有抑制活性。【结论】对东乡野生稻内生放线菌进行了分离、鉴定和抗菌活性筛选, 并从中分得两种与 I 型 PKS 基因相关活性的化合物 Nigericin 和 17-O-demethylgeldanamycin, 为研究东乡野生稻内生放线菌的多样性和次级代谢产物的分离提供依据。

关键词: 东乡野生稻, 内生放线菌, I 型 PKS, 抗菌活性, 次级代谢产物

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. GJJ14250, GJJ12208)

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

收稿日期: 2014-10-29; 接受日期: 2015-01-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-02-10

Isolation of endophytic actinomycetes from Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) and analysis of secondary metabolite of active strain S123

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

(1. Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources of Jiangxi Province, College of Life Sciences, 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. Meizhou Institute for Food and Drug Control, Meizhou, Guangdong 514071, China)

Abstract: [Objective] To isolate endophytic actinomycetes from Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*), and to study the classification, antimicrobial activity and analysis the secondary metabolites from the high active strain S123. [Methods] S medium was used to isolate endophytic actinomycetes from Dongxiang wild rice. The isolates were classified by 16S rRNA gene sequence analysis. Antimicrobial activity of the isolates was tested using agar diffusion and growth rate method. Meanwhile, to screen the potential activity compounds, The degenerated primer targeted on type-I polyketide synthase (PKS-I) was designed. Bioactivity strain S123 was subjected to large scale fermentation for isolating secondary metabolites. The compounds were separated and purified by various chromatographic methods, and the structure was determined by mass spectrum and nuclear magnetic resonance analyses. [Results] We obtained 11 actinomycete isolates from Dongxiang wild rice. The isolates belonged to 2 genera, *Streptomyces* (8) and *Pseudonocardia* (3). Among of these isolates 8 strains show their anti-microbial activities and 8 strains were positive for type-I PKS genes. Two compounds were isolated from strain S123 and determined as Nigericin and 17-O-demethylgeldanamycin separately. The compound Nigericin showed inhibition against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Rhizoctonia solani*. [Conclusion] This is the first report of endophytic actinomycetes from Dongxiang wild rice and identified two activity compounds Nigericin and 17-O-demethylgeldanamycin associated with type-I PKS genes. It provides a reliable basis for studying Dongxiang wild rice endophytic actinomycetes diversity and seeking activity secondary metabolites.

Keywords: Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*), Endophytic actinomycetes, Type-I PKS genes, Antimicrobial activity, Secondary metabolite

植物内生菌(Endophytes)是一类定殖于健康植物组织内部, 正常情况下不引发(至少是暂时不引发)植物产生明显病症的微生物^[1]。据统计, 从内生菌中发现的生物活性化合物有 51%是新化合物, 而从土壤微生物中分离的生物活性化合物中只有 38%是新化合物, 因此植物内生菌得到广泛的关注^[2-3]。植物内生放线菌是内生菌群落中的重要组成部分, 该类物种生物多样性丰富、具有产生多种生物活性物质的潜力, 其中许多具有特殊结构或者新颖的生物活性^[4-5]。此外, 植物内生放线菌在与植物

共同进化的同时, 可通过自身的代谢产物或借助于信号传导作用于植物, 如通过合成抗生素、激素、酶抑制剂、诱导物等活性物质促进宿主植物生长发育, 提高植物对环境压力的耐受能力, 协助宿主植物抵御病虫害的威胁, 具有极大的生防意义^[6-7]。因此, 从植物内生环境中分离放线菌并发现新的菌种, 利用这些菌分离新的化合物和开发高效杀菌剂是当前内生放线菌研究的热点^[8-10]。

普通野生稻(*Oryza rufipogon*)是栽培稻的祖先, 作为一种非常重要的野生种质资源, 长期在自然条

件下适应各种环境的变化,具有复杂的遗传背景和丰富的遗传多样性,蕴含着高产、优质、抗病虫害、耐逆境等优异基因,是水稻育种和生物技术研究的物质基础^[11-13]。东乡野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.)是迄今发现的世界上纬度最高、分布最北的野生稻,是我国三大野生稻之一,已被列为国家二级保护植物^[14],是江西特有且具有抗病虫害、抗寒、耐旱、耐瘠等抗逆优良特性^[15-16]。目前,有关水稻内生菌的报道主要集中在菌种多样性^[17]、高固氮酶活性^[18]、拮抗病原菌^[19]和植物促生等^[20]方面,而水稻内生放线菌的研究报道不多,Tian等从水稻中分离的内生放线菌主要类群为链霉菌属,其中50%有拮抗水稻病害病原真菌的作用^[21-22],而相关菌株的抗病活性代谢产物却未见后续报道。迄今为止,已有东乡野生稻内生菌的促生防病等生物学功能的报道^[23-25],但缺乏对相关内生放线菌的分离和代谢产物的系统研究。鉴于植株内生放线菌在长期的进化、共生过程中与宿主植物抗逆抗病等有着密切的关系,本研究对原位自然保护区内东乡野生稻内生放线菌进行了分离和鉴定,并对其抑菌活性进行了测定和筛选。在此基础上,利用正相硅胶、反相色谱和凝胶色谱等方法,对具有较强抗菌活性的内生放线菌S123活性产物进行分离,并采用MS和NMR等波谱分析方法对活性化合物进行鉴定,旨在为东乡野生稻内生放线菌资源进一步的开发和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:东乡野生稻采自江西省东乡县岗上积镇东乡野生稻原位保护区,采集时间为2009年8月。

1.1.2 培养基:(1)分离培养基:S培养基(g/L)^[22],培养基加入制霉菌素(Nystatin) 50 mg/L、萘啶酮酸(Nalidixic acid) 25 mg/L。(2)LB培养基(g/L):蛋白胨 10,牛肉膏 5,NaCl 5,固体培养基加入1.5% (质量体积比)的琼脂,加水定容至1 L, pH 7.2。

(3) PDA 培养基(g/L):去皮土豆 200,葡萄糖 20,加水定容至1 L,琼脂 15, pH 自然。(4)种子培养基(g/L):玉米粉 15.0,玉米淀粉 5.0,酵母膏 0.5, KH₂PO₄ 0.5, KNO₃ 0.5, NaCl 0.5, CaCO₃ 3.0,补水至1 L, pH 8.0。(5)发酵培养基(g/L):玉米粉 44.00,玉米淀粉 17.00,酵母膏 0.50, K₂HPO₄ 0.25, KNO₃ 0.35, NaCl 0.50, CaCO₃ 6.00,补水至1 L, pH 8.0。

1.1.3 指示菌:大肠杆菌(*Escherichia coli*, CCTCC AB93154)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, CCTCC AB91093)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, CCTCC AB90008),购自中国典型微生物菌种保藏中心,由本实验室保存;水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)由江西农业大学农学院植物保护研究室提供。

1.2 东乡野生稻内生放线菌分离

采集植物样品后24 h内完成内生放线菌分离前的处理工作。将所采集并清洗过的东乡野生稻的根、茎、叶新鲜组织自然晾干水分,75%乙醇浸5 min,在5%的次氯酸钠中处理5 min,用无菌2.5%硫代硫酸钠处理10 min,无菌水冲洗5次,最后用10%无菌NaHCO₃溶液浸泡10 min,无菌滤纸吸取多余水分;将表面灭菌干净的根、茎、叶样品2 g放于无菌研钵中,加入2 mL无菌水和少许灭菌的石英沙研磨,充分捣碎研磨后,加入装有10 mL无菌水的试管中混匀后按10倍的稀释倍数稀释4次,取0.1 mL涂布培养,每个梯度、每种培养基3个重复,28–30 °C培养5–30 d后,分别挑取形态、颜色和透明度不同的单菌落平板划线纯化,镜检,斜面保存。

1.3 放线菌基因组提取和16S rRNA基因序列的扩增与鉴定

分离菌株经过CTAB法提取总DNA后,采用细菌通用引物27F (5'-AGAGTTTGTACCTGGCT CAG-3')和1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')扩增其16S rRNA基因。反应体系为25 μL: *Taq*

buffer mix 混合物 12.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 正反引物各 2 μL , DNA 模板 1 μL , ddH₂O 7.5 μL 。PCR 扩增条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 共 34 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增产物送上海生物工程服务有限公司测序。将获得的 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank, 获得基因登录号; 系统发育树的构建通过 MEGA 5.0 软件进行多序列比对, Neighbour-Joining 方法构建系统发育树。

I 型 PKS 基因片段的扩增: 采用 KS 基因的简并引物 KSF (5'-CCSCAGSAGCGCSTCTCTSGA-3')和 KSR (5'-GTSCCSGTSCCGTGGCGCTCSA-3'); PCR 反应体系同 16S rRNA 基因; 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

1.4 内生菌抑菌活性筛选

无菌发酵液的制备: 将高氏 1 号培养基上培养 4 d 的放线菌菌株斜面, 用 5 mL 无菌水冲洗菌体, 接种到装有 50 mL 高氏 1 号培养液的 250 mL 三角瓶内, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、140 r/min 振荡培养 7 d, 培养液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min 离心 10 min, 上清液用直径 0.22 μm 的细菌过滤器过滤, 得到无菌发酵液。

采用琼脂扩散法^[26]测定发酵液浓缩液和单体化合物对 3 种指示细菌的抑制活性。将所有供试菌接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基中, 供试菌于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 恒温摇床培养 1–2 d 活化。将上述供试菌充分稀释至菌悬液并均匀涂布在牛肉膏蛋白胨培养基上。用移液枪吸取 100 μL (1 g/L) 药液滴加到直径为 6 mm 的无菌滤纸片上, 待溶剂挥发后放入上述制备好的培养基中, 置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 1–2 d, 观察是否产生抑菌圈, 并采用十字交叉法测量抑菌圈的直径。重复 3 次, 同时以氯霉素作为供试细菌的阳性对照, 培养基为阴性对照。

参照文献^[27]中的菌丝生长速率法测定分离放线菌发酵液对植物致病真菌的抗菌活性。将发酵液浓缩, 分别吸取 3 mL 浓缩液与 12 mL PDA 培养基于无菌试管中, 充分振摇后倒入无菌培养皿中。将

活化的植物致病真菌用无菌打孔器打成直径为 5 mm 的菌块, 置于上述培养基, 每处理重复 3 次, 培养 3–7 d 后, 采用十字交叉法测量供试菌菌落直径。按如下公式计算抑制率: 抑制率=[(对照菌落直径–处理菌落直径)/(对照菌落直径–5 mm)] \times 100%。

1.5 菌株 S123 的发酵培养

将活化的菌株 S123 接入种子培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 72 h 得到种子液, 再将种子液以 5% 的接种量接入到发酵培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 振荡培养 168 h, 获得发酵培养物。将所得发酵液于 4 800 r/min 离心 20 min, 共得 20 L 发酵液。

1.6 产物提取分离及结构解析

发酵所得 20 L 发酵液依次用石油醚、乙酸乙酯梯度萃取, 萃取液经减压浓缩依次得到石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物。该萃取物经薄层层析、硅胶柱层析及凝胶柱层析等色谱方法分离、纯化, 得到纯的单体化合物。用质谱仪测定单体化合物的分子量, Bruker AVANCE-400 MHz 核磁共振仪对活性物质的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱进行分析, 结合数据库对所得纯品进行结构推断。

2 结果与分析

2.1 菌种的分离和鉴定

从东乡野生稻全株样品中获得分离的菌株, 根据表型特征得到 11 株放线菌, 代表菌株 16S rRNA 基因测序后经 BLAST 比对, MEGA 5.0 构建 Neighbor-Joining 系统进化树(图 1), 结果表明其分别属于链霉菌属(*Streptomyces*)和假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)。

2.2 抑菌活性及 I 型 PKS 基因检测

采用琼脂扩散法和菌丝生长速率法对分离获得的菌株进行了抗菌活性筛选, 表 1 结果表明, 8 株菌显示不同程度的抗细菌活性, 7 株菌具有一定的抗真菌活性, 其中菌株 S123 显示对所有测试菌株均有较强的抑制活性。对 11 株内生放线菌的 I 型聚酮合成酶(PKS-I)相关基因进行了筛查, 各菌株的 I 型 PKS 基因的筛查结果见图 2, 具有 PKS-I 基

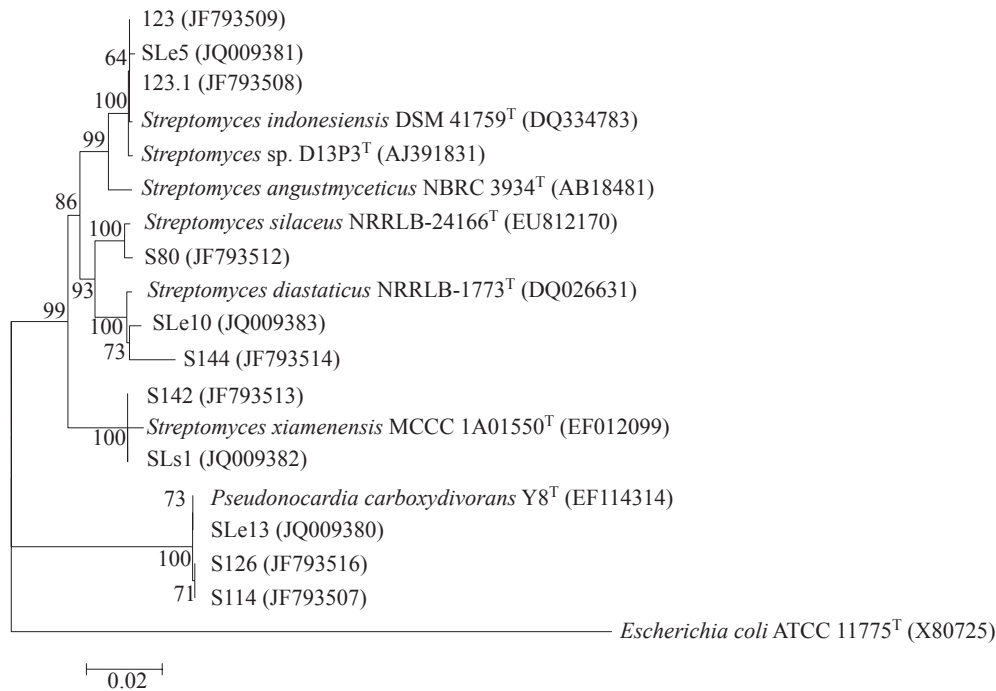


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的东乡野生稻内生放线菌系统发育进化树

Figure 1 Neighbor-Joining tree showing the affiliation of 16S rRNA gene sequences from surface sterilized tissues of Dongxiang wild rice

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 0.02 代表 2% 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 0.02 substitutions two percent nucleotide position with their 16S rRNA gene sequences.

表 1 内生放线菌抗菌活性检测						
Table 1 Antimicrobial activities of tested endophytic actinomycetes						
菌属(数量)	菌株	大肠杆菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	水稻纹枯病菌	小麦赤霉病菌
Genera (No.)	Strains	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>R. solani</i> (%)	<i>G. zeae</i> (%)
<i>Streptomyces</i> sp. (8)	SLe5	+++	+++	+++	72.83	—
	S123	+++	++	+++	81.68	56.40
	S144	—	—	—	—	—
	SLs1	—	++	—	—	—
	SLe10	—	++	—	—	50.51
	S142	—	++	—	—	—
	S80	—	++	—	—	—
	S123.1	++	++	++	—	—
<i>Pseudonocardia</i> sp. (3)	S126	—	++	—	—	17.99
	S114	—	—	—	13.00	35.32
	SLe13	—	—	—	65.35	57.08

注：—：无明显活性；+：抑菌圈直径在 10–15 mm；++：抑菌圈直径在 15–20 mm；+++：抑菌圈直径>20 mm.

Note: —: No obvious activity; +: Inhibition zones 10–15 mm; ++: Inhibition zones 15–20 mm; +++: Inhibition zones greater than 20 mm.

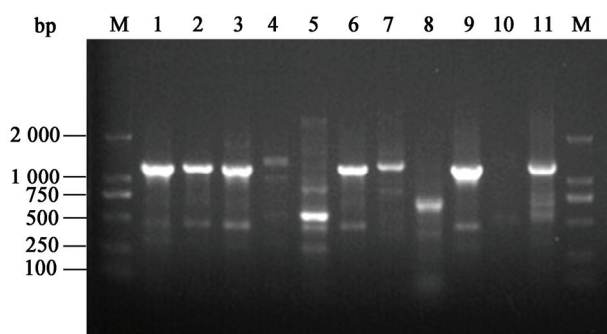


图 2 分离菌株基因组中 PKS I 基因扩增

Figure 2 PCR amplification of PKS I gene from genomic DNA of isolates

Note: M: Marker; 1–11: S123, S123.1, S114, S80, SLe5, SLe10, S144, SLe13 S126, SLs1, S142.

因的菌株分别为 S123、S123.1、S114、S80、SLe10、S144、S126、S142, 研究结果显示 PKS-I 基因筛查的阳性频率较高, 占总菌株数的 72.7%。

2.3 菌株 S123 产物的分离与鉴定

由表 1 可知, 菌株 S123 是一株对指示细菌和真菌均有较强抑制活性的内生放线菌。对其进行发酵培养, 离心所得 20 L 发酵液用石油醚和乙酸乙酯梯度萃取, 经 TLC 活性检测, 结果显示较强的抑菌活性。萃取液经减压浓缩依次得到石油醚萃取物浸膏 A (1.8 g) 和乙酸乙酯萃取物浸膏 B (3.5 g)。

浸膏 A 经硅胶柱梯度洗脱(石油醚-乙酸乙酯, 100:0–0:100)得到 5 个馏分(馏分 P1–P5); 馏分 P3 经正向硅胶得到单体化合物 **1** (15 mg); 浸膏 B 经硅胶柱梯度洗脱(石油醚-乙酸乙酯, 90:10–0:100; 乙酸乙酯-甲醇, 100:0–50:50), 得到 15 个馏分(馏分 E1–E15)。其中馏分 E9 经反复 LH-20 凝胶柱, 甲醇洗脱, 后重结晶(氯仿:甲醇=1:1, 体积比)得到单体化合物 **2** (24 mg)。对所得的单体化合物进行了质谱和核磁共振谱分析。

化合物 **1**: 白色晶体(甲醇), 白色粉末, ESI-MS m/z 747.465 0 $[M+Na]^+$, 1H -NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 4.31 (1H, m, H-9), 4.13 (1H, m, H-7), 3.90 (1H, dd, $J=3.6, 7.6$ Hz, H-24), 3.60 (3H, s, CH_3O-40), 1.50 (3H, s, Me-35), 1.08 (3H, s, Me-34), 1.04 (3H,

d, $J=6.0$ Hz, Me-31), 0.99 (3H, $J=6.8$ Hz, Me-37), 0.97 (3H, $J=4.0$ Hz, Me-39), 0.93 (6H, $J=4.0$ Hz, Me-33, Me-36), 0.87 (6H, d, $J=4.0$ Hz, Me-32, Me-38); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 177.0 (C-1), 44.0 (C-2), 73.1 (C-3), 27.5 (C-4), 26.3 (C-5), 23.1 (C-6), 69.2 (C-7), 35.3 (C-8), 60.2 (C-9), 32.2 (C-10), 78.6 (C-11), 35.5 (C-12), 108.0 (C-13), 39.0 (C-14), 41.8 (C-15), 82.1 (C-16), 82.2 (C-17), 25.9 (C-18), 30.7 (C-19), 83.6 (C-20), 86.1 (C-21), 35.3 (C-22), 32.9 (C-23), 75.1 (C-24), 78.6 (C-25), 31.8 (C-26), 37.0 (C-27), 37.2 (C-28), 96.9 (C-29), 68.8 (C-30), 16.2 (C-31), 17.4 (C-32), 15.6 (C-33), 22.9 (C-34), 27.5 (C-35), 13.1 (C-36), 12.9 (C-37), 10.9 (C-38), 13.1 (C-39), 58.0 (C-40), 以上数据与文献报道结构一致^[28], 故鉴定为尼日利亚菌素(Nigericin), 结构见图 3。

化合物 **2**: 黄色针晶(甲醇), 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 6.98 (1H, d, $J=11.8$ Hz, H-3), 6.57 (1H, t, $J=11.8$ Hz, H-4), 5.90 (1H, t, $J=11.8$ Hz, H-5), 4.33 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-6), 5.18 (1H, s, H-7), 5.82 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-9), 2.79 (1H, t, $J=7.0$ Hz, H-10), 3.55 (1H, overlap, H-11), 3.53 (1H, overlap, H-12), 1.77 (2H, s, H-13), 1.63 (1H, overlap, H-14), 2.47 (2H, m, H-15), 7.42 (1H, s, H-19), 0.96 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-22), 2.03 (3H, s, H-23), 1.01 (3H, d, $J=6.15$ Hz, H-24), 1.79 (3H, s, H-25), 3.36 (3H, s, 6- OCH_3), 3.30 (3H, s, 12- OCH_3), 8.95 (1H, s, NH); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 168.1 (C-1), 134.6 (C-2), 129.1 (C-3), 126.2 (C-4), 136.9 (C-5), 81.4 (C-6), 56.7 (6- OCH_3), 81.8 (C-7), 156.0 (7- $CONH_2$), 133.3 (C-8), 133.1 (C-9), 32.2 (C-10), 72.7 (C-11), 81.0 (C-12), 57.3 (12- OCH_3), 34.4 (C-13), 28.0 (C-14), 32.6 (C-15), 117.4 (C-16), 153.3 (C-17), 183.3 (C-18), 108.2 (C-19), 140.5 (C-20), 183.1 (C-21), 12.3 (C-22), 12.5 (C-23), 23.2 (C-24), 12.9 (C-25), 以上数据与文献[29]报道一致,

确定化合物 2 为 17-脱甲基格尔德霉素 (17-O-demethyl geldanamycin), 结构见图 3。

2.4 化合物的抑菌活性

化合物 1 (Nigericin)和化合物 2 (17-O-demethyl geldanamycin)对 4 种指示菌的生长抑制作用见表 2。从表 2 数据可知, 在供试浓度为 100 μg /滤纸片时, 化合物 1 对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑制作用与阳性对照氯霉素(50 μg /滤纸片)相当, 抑菌圈直径分别为 19.34 ± 1.04 mm 和 17.28 ± 1.42 mm, 对水稻纹枯病菌具有一定的抑制活性; 化合物 2 对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和水稻纹枯病菌均无抑制作用。

3 讨论

植物内生微生物具有丰富的多样性, 不同地域、不同分离方法(培养基类型、培养条件等)所获得的微生物类群具有很大差别^[30]。从东乡野生稻原位保护区内健康的东乡野生水稻植株中分离得到 11 株放线菌, 通过 16S rRNA 基因序列系统发育分析鉴定将其分为 2 个属, 链霉菌属和假诺卡氏菌属, 其中链霉菌属分离频率最高, 这与从热带雨林树木、水稻及一些药用植物中内生放线菌研究的报道相一致的^[4,31-32]。本研究所获得的内生放线菌菌株不多, 种属比较单一, 这可能与仅采用 S 培养基对

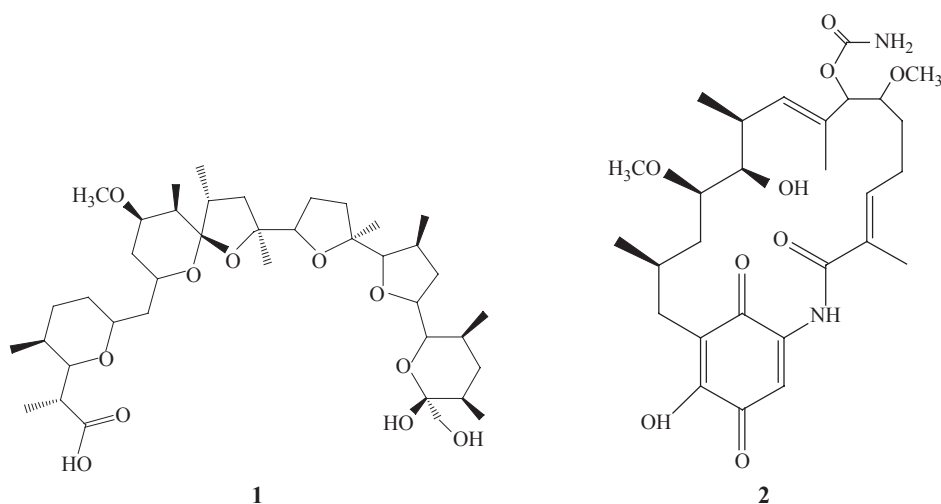


图 3 化合物 1 和 2 的结构式

Figure 3 Chemical structures of compounds 1 and 2

表 2 化合物 1 和 2 的抑菌活性
Table 2 Antimicrobial activities of compounds 1 and 2

化合物 Compound	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter of growth (mm)			抑制率 (对水稻纹枯病菌) Inhibition rate (against <i>R. solani</i> , %)
	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	
化合物 1 Compound 1	19.34 ± 1.04	17.28 ± 1.42	0	18.78 ± 3.28
化合物 2 Compound 2	0	0	0	0
氯霉素 Chloramphenicol	20.21 ± 1.54	21.22 ± 1.32	24.55 ± 1.68	—

注: 表中数据为平均数 \pm 标准差, —: 未检测。

Note: Data in the table are $\bar{x} \pm s$, —: No test.

东乡野生稻进行分离有关, 如果采用多种培养基分离, 该植物的内生放线菌极有可能呈现更丰富的多样性^[30,33]。

抗菌活性检测结果表明, 大部分菌株具有抗真菌或细菌的活性, 其中菌株 S123 显示对所有测试菌株均有较强的抑制活性。进一步对所分离的菌株进行 I 型 PKS 基因筛选, 得到 8 株阳性菌株, 表明 I 型 PKS 基因广泛存在放线菌基因组中。近年来, 基于功能基因预测代谢产物的方法在天然产物的分离中受到广泛关注^[34]。本研究仅利用 I 型 PKS 基因筛选与菌株的抑菌活性相关性进行尝试, 菌株 S144 检测到 I 型 PKS 基因, 但并未检测到任何抗菌活性; 同时也有菌株虽然没有检测到 PKS 相关基因的存在, 但在抗菌活性检测中表现出了较强的抑菌活性, 如菌株 SLe5。上述这些结果可能与 I 型 PKS 基因表达产物所需的条件有关, 在常规培养条件下放线菌中确实存在许多沉默基因簇, 表达量低甚至完全不表达, 只有在合适的培养条件下才能增强或启动表达, 合成相应的化合物^[35]; 也有一些菌株可能是通过其他途径产生其他类型的活性物质, 或是其他的抑菌机制达到抑菌效果^[31]。

从菌株 S123 中分离得到的次生代谢产物分别属于两类抗生素类化合物, 且均具有较好的生物活性。化合物 1 (尼日利亚菌素) 是聚醚类抗生素, 该类抗生素是由 I 型 PKS 基因合成的^[36]。大多数聚醚类抗生素都能通过形成亲脂混合物携带 1 价阳离子穿过生物膜, 并作为抗球虫剂和牲畜生长促进剂应用于农业生产中。此外化合物 1 还具有抑制其他多种细菌的活性, 如酸热芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等^[37], 同时还具有较强的抑制肿瘤细胞活性^[38], 在本研究中化合物 1 对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌表现出较强的抑制活性, 这与该类化合物对革兰氏阳性细菌具有明显的抑制活性, 而对革兰氏阴性细菌不敏感的报道相一致^[37], 该化合物在水稻纹枯病菌抑制活性试验中的效果也不明显。化合物 2 (17-脱甲基格尔德霉素) 属于带有苯醌

的安莎类抗生素, 是格尔德霉素在 17 位 C 原子上脱去一个甲基所形成的, 该类化合物在 17 位 C 原子进行修饰可具有抗菌、抗病毒和抗肿瘤活性^[39], 但在本研究中化合物 2 对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌及水稻纹枯病菌均没有表现出抑制活性, 这有可能与格尔德霉素在 17 位 C 原子脱去甲基有关, 该化合物能否进行结构修饰, 以及是否具有其他的药理活性, 都值得进一步研究。

本研究采用 S 培养基对江西特有的东乡野生稻内生放线菌进行了初步分离, 从中发现了较高比例的具有抑菌活性的菌株, 且在菌株 *Streptomyces* sp. S123 中分离获得 2 种不同类型的抗生素类化合物, 这些结果说明东乡野生稻蕴藏着丰富的内生放线菌资源, 具有产生多种活性次生代谢产物的潜力, 值得进一步开发和利用。

参 考 文 献

- [1] Stone JK, Bacon CW, White J. An overview of endophytic microbes: endophytism defined[J]. *Microbial Endophytes*, 2000, 3: 29-33
- [2] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products[J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5(6): 535-544
- [3] Strobel GA. Rainforest endophytes and bioactive products[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2002, 22(4): 315-333
- [4] Du HJ, Su J, Yu LY, et al. Isolation and physiological characteristics of endophytic actinobacteria from medicinal plants[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(1): 15-23 (in Chinese)
杜慧竟, 苏静, 余利岩, 等. 药用植物内生放线菌的分离和生物学特性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(1): 15-23
- [5] 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(3): 457-473
- [6] Hasegawa S, Meguro A, Shimizu M, et al. Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants[J]. *Actinomycetologica*, 2006, 20(2): 72-81
- [7] White Jr JF, Torres MS, Johnson H, et al. A functional view of plant microbiomes: endosymbiotic systems that enhance plant growth and survival[A]//*Advances in Endophytic Research*[M]. Berlin: Springer, 2014: 425-439
- [8] Igarashi Y, Trujillo ME, Martínez-Molina E, et al. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov.[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17(13): 3702-3705
- [9] Inahashi Y, Iwatsuki M, Ishiyama A, et al. Spoxazomicins A-C, novel antitrypanosomal alkaloids produced by an endophytic actinomycete, *Streptopogonium oxazolinicum* K07-0460T[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2011, 64(4): 303-307
- [10] 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
- [11] Chen LJ, Lee DS, Song ZP, et al. Gene flow from cultivated rice

- (*Oryza sativa*) to its weedy and wild relatives[J]. *Annals of Botany*, 2004, 93(1): 67-73
- [12] Xiao JH, Grandillo S, Ahn SN, et al. Genes from wild rice improve yield[J]. *Nature*, 1996, 384(6606): 223-224
- [13] Xiao J, Li J, Grandillo S, et al. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*[J]. *Genetics*, 1998, 150(2): 899-909
- [14] Cheng JK, Wang HY, He GQ. A survey on the habitats of *Oryza rufipogon* and *Isoetes sinensis* in Jiangxi Province[J]. *Biodiversity Science*, 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
- [15] Hu BL, Fu XQ, Zhang T, et al. Genetic analysis on characteristics to measure drought resistance using dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and its derived backcross inbred lines population at seedling stage[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2011, 10(11): 1653-1664
- [16] Xie J, Agrama H, Kong D, et al. Genetic diversity associated with conservation of endangered Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*)[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2010, 57(4): 597-609
- [17] Sun L, Qiu F, Zhang X, et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis[J]. *Microbial Ecology*, 2008, 55(3): 415-424
- [18] 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(5): 431-439
- [19] Yang JH, Liu HX, Zhu GM, et al. Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(1): 91-104
- [20] Feng Y, Shen D, Song W. Rice endophyte *Pantoea agglomerans* YS19 promotes host plant growth and affects allocations of host photosynthates[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2006, 100(5): 938-945
- [21] Tian X, Cao L, Tan H, et al. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2004, 20(3): 303-309
- [22] Tian XL, Cao LX, Yang GW, et al. Studies on communities of endophytic actinomycetes from rice and their antipathogenic activities *in vitro*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(5): 641-646 (in Chinese)
田新莉, 曹理想, 杨国武, 等. 水稻内生放线菌类群及其对宿主病原菌的抗性研究[J]. *微生物学报*, 2004, 44(5): 641-646
- [23] Lou F, Zhang ZB, Zhu D, et al. Diversity and plant growth promoting activities of the cultivable rhizobacteria of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*)[J]. *Biodiversity Science*, 2011, 19 (4): 476-484 (in Chinese)
罗菲, 张志斌, 朱笃, 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
- [24] Zeng QG, Luo F, Zhu D, et al. Phosphate solubilizing rhizospherebacterial T21 isolated from Dongxiang wild rice species promotes cultivated rice growth[J]. *Applied Mechanics and Materials*, 2012, 108: 167-175
- [25] Zhang ZB, Ao W, Zhu D, et al. Identification of antagonistic endophytic actinomycete FRo2 and isolation of its antimicrobial composition[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(8): 1574-1581 (in Chinese)
张志斌, 敖武, 朱笃, 等. 内生拮抗放线菌 FRo2的鉴定及抑菌活性物质的分离[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(8): 1574-1581
- [26] Nong XH, Zhang XY, Cheng Y, et al. Alkaloids from gorgonian-derived *Streptomyces* sp. SCSGAA0009 and their antibacterial and antilarval activities[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(9): 995-1000 (in Chinese)
农旭华, 张晓勇, 陈茵, 等. 柳珊瑚共附生放线菌 *Streptomyces* sp. SCSGAA0009中生物碱类化合物及其抗菌和抗附着活性[J]. *微生物学报*, 2013, 53(9): 995-1000
- [27] Zhang YL, Kong LC, Jiang DH, et al. Phytotoxic and antifungal metabolites from *Curvularia* sp. FH01 isolated from the gut of *Atractomorpha sinensis*[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3575-3577
- [28] Berrada R, Dauphin G, David L. Epinigericin, a new polyether carboxylic antibiotic. Structural determination by 2D NMR methods[J]. *The Journal of Organic Chemistry*, 1987, 52(12): 2388-2391
- [29] Anansiriwattana W, Tanasupawat S, Amnuoypol S, et al. Identification and antimicrobial activities of actinomycetes from soils in Samed Island, and geldanamycin from strain PC4-3[J]. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2006, 30: 49-56
- [30] Qin S, Li J, Chen HH, et al. Isolation, diversity, and antimicrobial activity of rare actinobacteria from medicinal plants of tropical rain forests in Xishuangbanna, China[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(19): 6176-6186
- [31] Li J, Zhao GZ, Chen HH, et al. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47(6): 574-580
- [32] 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
- [33] Zhang JL, Qin YL, Xu LH, et al. The selective isolation of endophytic actinomycetes[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(7): 1305-1313 (in Chinese)
张金丽, 秦玉丽, 徐丽华, 等. 植物内生放线菌的选择性分离[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(7): 1305-1313
- [34] Gontang EA, Gaudêncio SP, Fenical W, et al. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(8): 2487-2499
- [35] Craney A, Ozimok C, Pimentel-Elardo SM, et al. Chemical perturbation of secondary metabolism demonstrates important links to primary metabolism[J]. *Chemistry & Biology*, 2012, 19(8): 1020-1027
- [36] Donadio S, Monciardini P, Sosio M. Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics[J]. *Natural Product Reports*, 2007, 24(5): 1073-1109
- [37] Wu Z, Bai L, Wang M, Shen Y. Structure—antibacterial relationship of nigericin derivatives[J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2009, 45(3): 333-337
- [38] Zhou HM, Dong TT, Wang LL, et al. Suppression of colorectal cancer metastasis by nigericin through inhibition of epithelial-mesenchymal transition[J]. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 2012, 18(21): 2640
- [39] Li MG, Wu SH, Zhao LX, et al. Isolation and structure elucidation of autolytymycin, a new compound produced by *Streptomyces autolyticus* JX-47[J]. *Chinese Chemical Letters*, 2001, 12(10): 903-906