



# 高产杀粉蝶菌素的链霉菌鉴定及其拮抗水稻白叶枯菌活性研究

何亚文<sup>1\*</sup>, Azad Sepideh Mazhari<sup>1</sup>, 崔莹<sup>1</sup>, 姚润贤<sup>1</sup>, Law Woan-Fei Jodi<sup>2</sup>,  
Lee Learn-Han<sup>2</sup>, 郝祥蕊<sup>3</sup>, 张红艳<sup>3</sup>

1 上海交通大学生命科学技术学院 微生物代谢国家重点实验室 代谢与发育科学国际合作联合实验室 上海交通大学-上海农乐生物农药与生物肥料联合研发中心, 上海 200240

2 Novel Bacteria and Drug Discovery Research Group (NBDD), Microbiome and Bioresource Research Strength (MBRS), Jeffrey Cheah School of Medicine and Health Sciences, Monash University Malaysia, Johor Bahru 47500, Malaysia

3 上海农乐生物制品股份有限公司, 上海 201419

何亚文, Azad Sepideh Mazhari, 崔莹, 姚润贤, Law Woan-Fei Jodi, Lee Learn-Han, 郝祥蕊, 张红艳. 高产杀粉蝶菌素的链霉菌鉴定及其拮抗水稻白叶枯菌活性研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(4): 1447-1459.

HE Ya-Wen, AZAD Sepideh Mazhari, CUI Ying, YAO Runxian, LAW Woan-Fei Jodi, LEE Learn-Han, HAO Xiangrui, ZHANG Hongyan. A piericidin-producing *Streptomyces* strain: identification and antagonistic activity on *Xanthomonas oryzae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(4): 1447-1459.

**摘要:**【目的】为保证农业生产可持续性发展, 研发和使用环境友好的生物农药受到全社会的高度重视。微生物代谢产物农药是我国目前应用最广的生物农药, 也是未来发展绿色农药的一个重要方向。【方法】利用包含水稻白叶枯菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) PXO99A 的 NA 培养基琼脂平板, 从水稻根际土壤中筛选能抑制 *Xoo* 生长的链霉菌。通过高效液相色谱和质谱分析活性代谢产物的化学结构; 采用剪叶法接种 *Xoo* 到水稻叶片后, 再喷施杀粉蝶菌素溶液(0.1 g/L), 2 周后测定叶枯症状; 采用响应面分析法优化高产杀粉蝶菌素的发酵培养基; 采用 PacBio SMRT 测序平台+Illumina HiSeq X Ten 平台开展全基因组测序。平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)用于比较 HSW2009 与其他链霉菌在全基因组水平的亲缘关系。【结果】分离到一株对 *Xoo* 生长有强抑制活性的链霉菌 HSW2009, 其活性代谢产物为杀粉蝶菌素 A1 (piericidin A1, 简称 PIE); 喷施 PIE 可以减轻 *Xoo* 在水稻叶片内的侵染; 优化 HSW2009 高产 PIE 的发酵条件, 得到

资助项目: 国家重点研发计划(2018YFA0901901); 国家自然科学基金(32172355)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFA0901901) and the National Natural Science Foundation of China (32172355).

\*Corresponding author. E-mail: yawenhe@sjtu.edu.cn

Received: 2022-08-06; Accepted: 2022-09-20; Published online: 2022-10-17

MFM 培养基; HSW2009 在 MFM 培养中生长快、PIE 发酵效价最高可以达到 0.72 g/L; 菌落表型分析、PIE 生物合成基因簇分析、全基因组测序和 ANI 分析表明 HSW2009 与目前有效描述的 PIE 产生菌不同。【结论】HSW2009 是一株高产杀粉蝶菌素 A1 的链霉菌属候选新种, 命名为绍武链霉菌, 可作为杀粉蝶菌素产业化研究的出发菌株。

关键词: 链霉菌; 代谢产物; 杀粉蝶菌素; 水稻白叶枯菌; 生物防治

## A piericidin-producing *Streptomyces* strain: identification and antagonistic activity on *Xanthomonas oryzae*

HE Ya-Wen<sup>1\*</sup>, AZAD Sepideh Mazhari<sup>1</sup>, CUI Ying<sup>1</sup>, YAO Runxian<sup>1</sup>, LAW Woan-Fei Jodi<sup>2</sup>, LEE Learn-Han<sup>2</sup>, HAO Xiangrui<sup>3</sup>, ZHANG Hongyan<sup>3</sup>

1 State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Joint International Research Laboratory of Metabolic and Developmental Sciences, SJTU-NLBP Joint R&D Center on Biopesticides and Biofertilizers, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University (SJTU), Shanghai 200240, China

2 Novel Bacteria and Drug Discovery Research Group (NBDD), Microbiome and Bioresource Research Strength (MBRS), Jeffrey Cheah School of Medicine and Health Sciences, Monash University Malaysia, Johor Bahru 47500, Malaysia

3 Shanghai Nongle Biological Products Company Limited (NLBP), Shanghai 201419, China

**Abstract:** [Objective] The research and development and application of eco-friendly biopesticides for the sustainable agricultural development has received widespread concern. Microbial metabolite pesticide (MMP) is one of the most popular biopesticides in China and also one of the most important green pesticides to be developed. [Methods] The nutrient agar (NA) containing *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) strain PXO99A was used to screen the anti-*Xoo* *Streptomyces* strain HSW2009. High performance liquid chromatography (HPLC) and mass chromatography (MS) were employed to characterize the chemical structure of the anti-*Xoo* metabolite produced by HSW2009. *Xoo* was inoculated into adult rice plants (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) by leaf-clipping, followed by spraying with the piericidin solution (0.1 g/L). The length of spot was measured 2 weeks after inoculation. Response surface methodology was employed to optimize the fermentation medium. PacBio SMRT together with Illumina HiSeq X Ten was applied for genome sequencing. Average nucleotide identity (ANI) was compared to analyze the relationship between HSW2009 and other *Streptomyces* strains. [Results] A *Streptomyces* strain HSW2009 was detected to have strong inhibitory effect on *Xoo* growth and it produced the active metabolite piericidin A1 (PIE). PIE application mitigated *Xoo* infection on rice leaves. An optimized MFM medium was developed for PIE production. In MFM, HSW2009 grew well, with the highest fermentation titer of PIE reaching 0.72 g/L. HSW2009 was different from the known PIE-producing *Streptomyces* strains in colony phenotype, PIE biosynthetic gene cluster, whole genome sequence, and ANI. [Conclusion] HSW2009 is a representative of a candidate novel species of *Streptomyces* producing high level

of PIE and is named as *Streptomyces shaowuensis* sp. nov. It has potential to be developed as an industrial strain for piericidin production.

**Keywords:** *Streptomyces*; metabolite; piericidin; *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; biocontrol

农业是人类衣食之源、生存之本，是一切生产的首要条件。农药是农业生产中必需的生产资料，没有农药的保护，全球作物产量可能减产三分之一左右<sup>[1-2]</sup>。为保证农业生产的可持续性发展，研发和使用生态友好的生物农药得到全社会的高度重视。微生物代谢产物农药是以微生物发酵产生的代谢产物为活性成分、用于防治病虫害等有害生物或调节植物生长发育的生物农药，主要包括农用抗生素、植物免疫诱抗剂和植物生长调节剂<sup>[3]</sup>。中国是一个农业大国，生态环境多样，作物种类繁多，病、虫、草等危害频繁发生，导致农药需求量大。但我国生物农药只占总农药市场规模的 10%左右，因此，生物农药增长潜力大，蕴含着较大的经济和社会效益<sup>[4]</sup>。

从 20 世纪 70 年代至今，我国先后自主研发了一系列代谢产物农药，如井冈霉素、春雷霉素、多氧霉素、中生菌素、农抗 120、阿维菌素和盐霉素等<sup>[5-7]</sup>。申嗪霉素是我国近年来自主研发的一种新型代谢产物农药，主要成分是假单胞菌发酵产生的代谢产物吩嗪-1-羧酸<sup>[2,8-10]</sup>。申嗪霉素 2011 年首获农药登记证，至 2016 年，1% 申嗪霉素悬浮剂获得防治 9 种作物病害(水稻纹枯病、稻瘟病、稻曲病、小麦全蚀病、赤霉病、甜椒疫霉病、西瓜枯萎病、黄瓜灰霉病和霜霉病)的农药登记证，应用于主粮和经济作物病害的生物防治<sup>[3,11]</sup>。虽然这些代谢产物农药在植物保护中发挥了重要作用，但同化学农药相比，我国代谢产物农药品种有限，缺少高效工程菌株，应用推广面积相对有限<sup>[12]</sup>。水稻白叶枯病

是由稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*)侵染引起的一种细菌性病害，是我国水稻三大传统病害之一，感染严重时会导致水稻减产 50%–70%。*Xoo* 属于维管束病害，其防治目前主要依赖化学农药，如铜制剂、叶枯净和农用链霉素等，防效有限<sup>[13]</sup>。本研究分离和初步鉴定了一株链霉菌菌株 HSW2009。表型、代谢特征和基因型特征显示，菌株 HSW2009 代表了一个潜在新种，命名为绍武链霉菌。HSW2009 在发酵培养基中生长快，高产杀粉蝶菌素 A1，对 *Xoo* 的生长抑制作用活性强，可以作为杀粉蝶菌素产业化研发的新一代出发菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 筛选能有效抑制水稻白叶枯菌生长的菌株

本研究从湖北省黄梅县苦竹乡安山村何上屋冯象塘上游采取杂交水稻根际土壤样品，将 10 g 土壤样品溶在 10 mL PBS 缓冲液中，经纱布过滤后，稀释 100 倍，涂布在 NA 培养基(5 g/L 蛋白胨，3 g/L 牛肉膏，10 g/L 蔗糖，1 g/L 酵母提取物，pH 7.0)琼脂平板上，28 °C 培养 72 h。长出的菌落分别接种到含有 100 μL NA 液体培养基的 96 孔培养板中，培养 48 h。培养液离心(5 000 r/min) 10 min 得到上清液，上清液浓缩 10 倍后取 10 μL 浓缩液点到无菌滤纸片上，置于含有 *Xoo* PXO99A 的 NA 琼脂糖平板上。NA 平板在 30 °C 培养箱中培养 3 d 后，观察抑菌圈的出现。*Xoo* 为实验室多年保藏和使用的标准菌株，其培养基中均需添加壮观霉素，终浓度为 25 μg/mL。

## 1.2 HSW2009 菌株生长和发酵方法及所用培养基

种子液培养：目标菌株在 NA 琼脂平板上长出菌落后，用无菌刀片割取带有菌落的琼脂块(1 cm×2 cm)，接种到 50 mL TSBY 液体培养基(30 g/L 胰蛋白胨大豆肉汤，5 g/L 酵母提取物，103 g/L 蔗糖，pH 7.0)中，置于 28 °C、200 r/min 摇床中培养 24 h。250 mL 摇瓶发酵：取 5 mL 上述种子液，接种到 50 mL FM 发酵培养基(45 g/L 蔗糖，25 g/L 大豆粉，1 g/L NaCl，3 g/L CaCO<sub>3</sub>，0.2 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>，0.2 g/L KNO<sub>3</sub>，0.05 g/L FeSO<sub>4</sub>，0.1 g/L Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，pH 7.0)中，于 28 °C、250 r/min 摇床中培养 48 h。5 L 发酵罐发酵：取 400 mL 上述种子液，接种到 4 000 mL MFM 发酵培养基中，于 28 °C、300 r/min 连续培养 60 h。

## 1.3 代谢产物提取、高效液相色谱(HPLC)和质谱分析与结构鉴定

发酵液上清用等体积的乙酸乙酯萃取 30 min 后，取上层乙酸乙酯有机相，经旋转蒸发器蒸干后，溶于甲醇之中。甲醇粗提物分别经高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC) (1260 Infinity II, Agilent)分离和质谱(Agilent)分析，确定活性组分的分子量。HPLC 分析的实验条件：C18 反相柱(Zorbax XDB; 5 μm, 4.6 mm×150 mm)；流动相：甲醇/水(25%:75%)，0.05%甲酸；流速：1 mL/min。

## 1.4 杀粉蝶菌素 A1 抑制水稻白叶枯菌活性筛选

纯化的杀粉蝶菌素 A1 用甲醇稀释成 0.1、0.01、0.001 和 0.000 1 g/L 溶液，分别取 10 μL 逐滴点到无菌滤纸片上，甲醇完全挥发后将滤纸片放到含有 *Xoo* PXO99A 的 NA 琼脂糖平板上，置于 30 °C 培养箱中倒置培养 3 d，统计抑菌圈的大小，计算抑菌活性。

## 1.5 接种 *Xoo* 侵染水稻叶片和杀粉蝶菌素 A1 喷施

*Xoo* 菌株接种在 NA 培养基中，在 28 °C、250 r/min 摇床中培养过夜至  $OD_{600}=1.0$ 。培养液用 MM 培养基稀释到  $OD_{600}=0.05$  后，采用剪叶法接种 *Xoo* 到盆栽水稻(日本晴)叶片。接种后的水稻分为 2 组，一组喷施甲醇处理作为对照，另一组喷施含 0.1 g/L 杀粉蝶菌素 A1 的甲醇溶液。每组处理接种 15 片水稻叶片，接种后的水稻植株用透明保鲜膜罩起来，置于恒温(28 °C)、湿度 90%光照培养箱中生长，直到叶枯病斑出现，测量病斑长度，评价防效。

## 1.6 菌株 HSW2009 基因组测序和分析

全基因组测序在上海派森诺生物科技有限公司(Shanghai Personalbio Technology Co., Ltd.)完成，采用 PacBio SMRT 测序平台+Illumina HiSeq X Ten 平台。运用 PacBio 公司的第三代单分子测序技术得到基因组序列，使用软件 HGAP 或 Canu 对 reads 进行组装，同时使用 Illumina 公司的第二代数据提高序列质量，最终得到高质量的全基因组序列。分别使用 Glimmer、tRNAscan-SE、rnammer、Rfam、RepeatMasker、trf407b.linux、MISA、MinCED 预测蛋白编码基因、tRNA、rRNA、非编码 RNA、基因组重复区域、串联重复序列、简单重复序列和 CRISPR 结构。基因功能注释主要采用数据库(NR、Swiss-Prot、COG、KEGG、GO)比对，并结合数据库内蛋白的功能信息对现有蛋白开展功能预测。

## 1.7 平均核苷酸一致性(average nucleotide identity, ANI)计算

根据上述得到的基因组序列，利用 16S rRNA 基因序列在 NR 数据库中进行 BLASTn 分析，获得 9 株基因组相近的链霉菌基因组，使用 Orthologous Average Nucleotide Identity Tool (OAT, <https://www.ezbiocloud.net/tools/orthoani>)分别计算彼此间的 ANI<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株分离及初步鉴定

本研究从湖北省黄梅县苦竹乡安山村何上屋杂交水稻根际土壤中分离到一株链霉菌, 编号为 HSW2009。HSW2009 在 NA 琼脂平板上生长过程中产生深黄色色素(图 1A)。该菌株培养在 NA 液体培养基中 48 h 后, 上清液对 *Xoo* 生长有较强的抑制作用(图 1B); 相比之下, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株上清对 *Xoo* 生长却没有明显的抑制活性(图 1B)。这些结果表明 HSW2009 菌株可能产生一种抑制 *Xoo* 生长的代谢产物。

### 2.2 HSW2009 通过杀粉蝶菌素 A1 抑制 *Xoo* 生长

HSW2009 NA 培养液经乙酸乙酯萃取和浓缩, 经高效液相色谱(HPLC)分析, 可以观察到粗提物中含有一个浓度较高的代谢产物 X (图 2A)。质谱分析表明产物 X 的分子量约为 415.280 4 g/mol (图 2B), 与茂源链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*)、密团链霉菌(*Streptomyces conglobatus* ATCC31005) 和票霉素链霉菌杭州湾变种 (*Streptomyces piomogeues* var. *hangzhouwanensis*) 产生的代谢产物杀粉蝶菌素 A1 的分子量(415.56 g/mol)相近<sup>[15-17]</sup>。通过比较代谢产物 X 与杀粉蝶菌素 A1 标准品在 HPLC 和 MS 分析中的化学特征(图 2A), 证实 HSW2009 产生的代谢产物 X 为杀粉蝶菌素 A1 (图 2C)。

纯化的杀粉蝶菌素 A1 溶解在甲醇中, 取 10  $\mu$ L 点到含有 *Xoo* 的 NA 平板上。3 d 后可以观察到 0.01 g/L 的杀粉蝶菌素 A1 依然能有效抑制 *Xoo* 的生长(图 3A)。这一结果证实 HSW2009 通过产生杀粉蝶菌素 A1, 抑制 *Xoo* 的生长。

### 2.3 喷施杀粉蝶菌素显著减轻 *Xoo* 的致病性

*Xoo* 菌株 NA 培养液用 MM 培养基稀释后, 通过剪叶法接种到水稻叶片上。在没有杀粉蝶

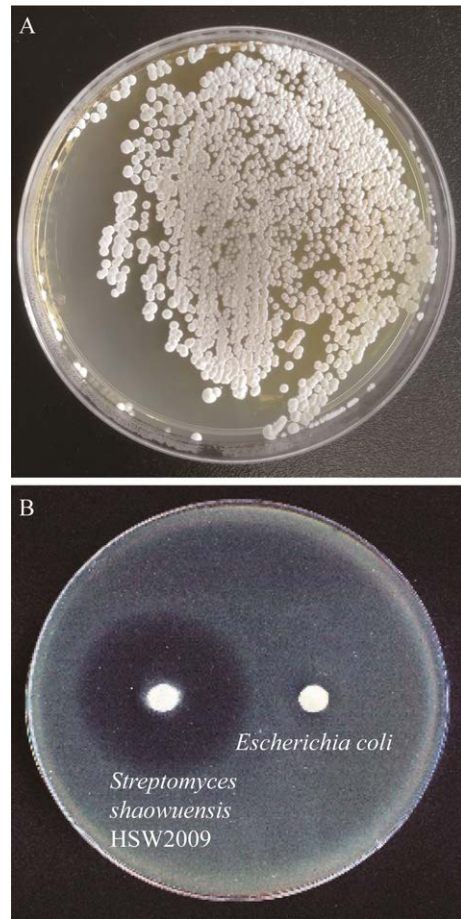
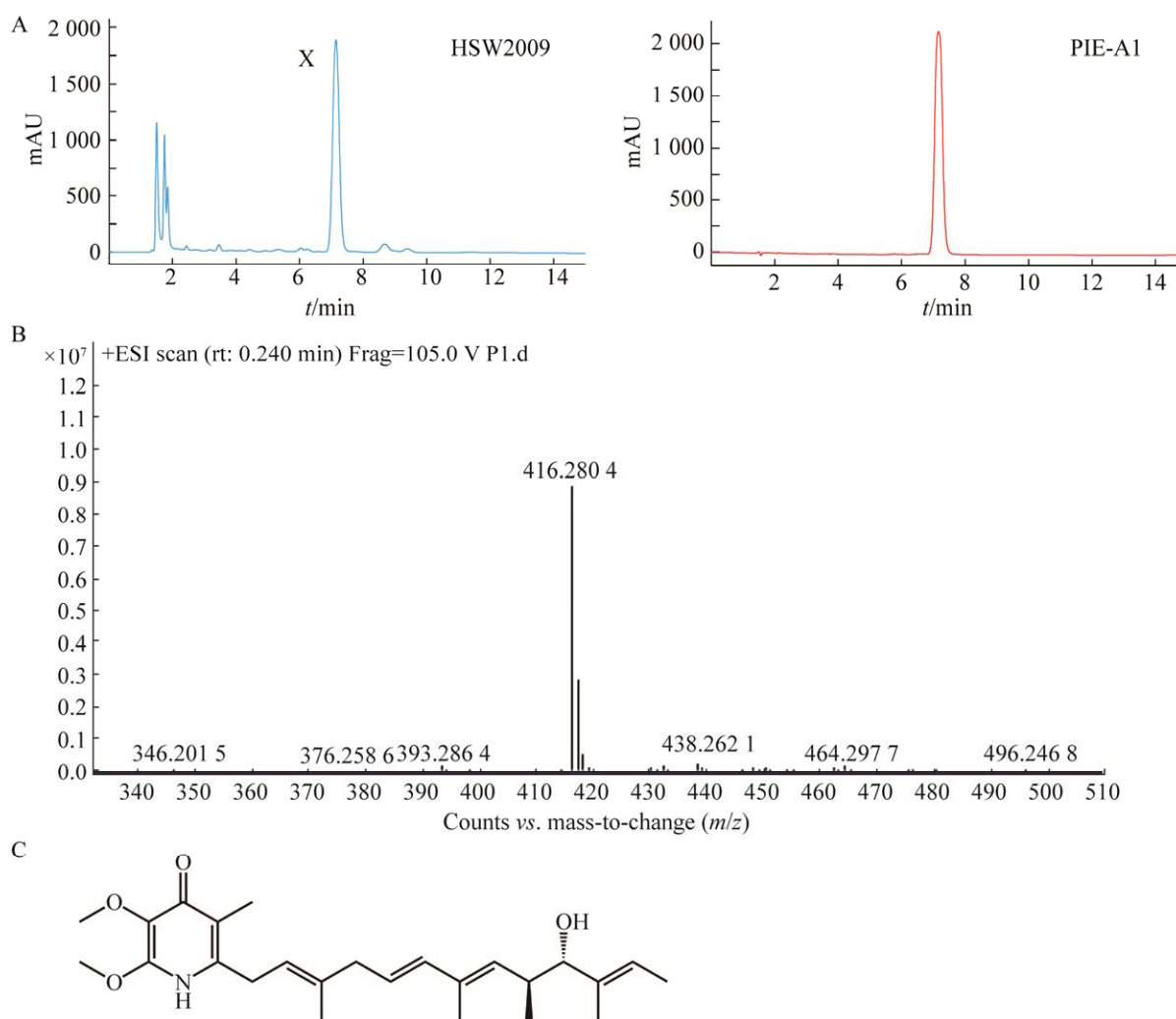


图 1 链霉菌 HSW2009 菌落特征及其拮抗 *Xoo* 生长活性

Figure 1 Identification of a *Streptomyces* strain HSW2009 with anti-*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) activity. A: HSW2009 colony on NA agar plate. B: Anti-*Xoo* activity of the supernatant of NA culture of HSW2009 at 48 hours post inoculation. The supernatant of *Escherichia coli* NA culture has no significant inhibitory effect on *Xoo* growth.

菌素处理的水稻组叶片上, 2 周后可以观察到明显的叶枯症状, 病斑平均长度 3.80 cm (图 3B)。杀粉蝶菌素 A1 处理的水稻叶片上 2 周后也有轻微感染, 病斑平均长度 0.65 cm (图 3B), 显著低于对照组。这一初步结果说明在温室条件下喷施杀粉蝶菌素可以减轻 *Xoo* 在水稻叶片上的侵染。



**图 2 HSW2009 产生的杀粉蝶菌素 A1 鉴定分析**

Figure 2 Characterization of piericidin A1 produced by HSW2009. A: High performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the ethyl acetate extract of NA culture of HSW2009, and piericidin standard samples. B: Mass spectrometry (MS) of the purified metabolite X produced by HSW2009. C: The chemical structure of metabolite X.

#### 2.4 高产杀粉蝶菌素 A1 的发酵条件优化

为了评价 HSW2009 菌株产生杀粉蝶菌素 A1 的潜能, 本研究首先比较了该菌株在 3 种常用发酵培养基(TBSY、NA、FM)中的生长和杀粉蝶菌素 A1 的产量。结果表明, HSW2009 在这 3 种培养基中的生长速率类似, 但接种 60 h 后, 杀粉蝶菌素 A1 的发酵效价在 FM 培养基中最高(~0.10 g/L), 其次为 TBSY 培养基

(图 4A)。FM 培养基以蔗糖、黄豆粉和无机盐为主要成分, 通过响应面分析法优化了蔗糖和黄豆粉的浓度及其他无机盐的组分, 得到一个改良培养基 MFM。在 5 L 发酵罐 MFM 培养基中, 杀粉蝶菌素 A1 的浓度时间曲线如图 4C 所示, 接种 48 h 后, 发酵效价即可可达 0.60 g/L, 最高发酵效价在接种后 120 h, 为 0.72 g/L (图 4C)。

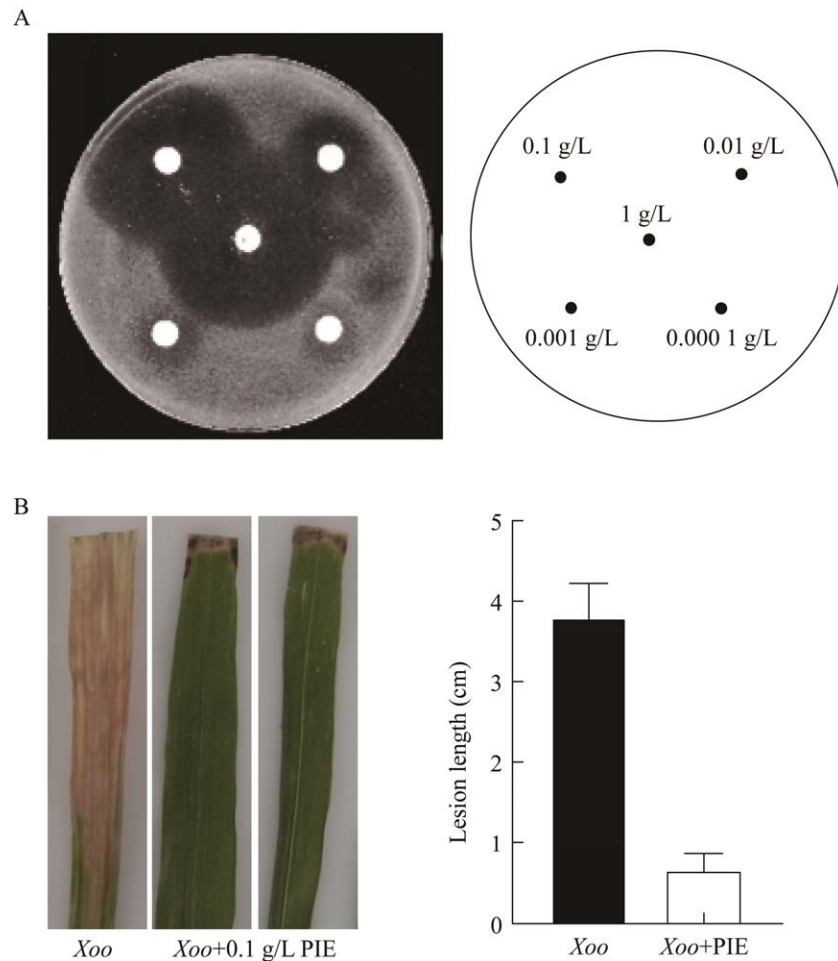


图3 杀粉蝶菌素 A1 (PIE)抑制 *Xoo* 生长, 显著减轻 *Xoo* 在水稻叶片上的致病性

Figure 3 The effects of piericidin A1 (PIE) on *Xoo* growth and *Xoo*-derived infection in rice. A: Piericidin A1 inhibits *Xoo* growth in a dosage-dependent manner. B: Piericidin A1 at 0.1 g/L mitigates *Xoo*-derived infection in rice leaves.

## 2.5 HSW2009 基因组和杀粉蝶菌素合成基因簇分析

本研究提取了 HSW2009 菌株的基因组 DNA, 由上海派森诺生物科技有限公司开展二代和三代测序, 获得 3 个 CONTIGS。进一步通过 PCR 和一代测序技术成功实现连接, 获得完整的基因组序列和如图 5A 所示的基因组圈图, 全基因组信息正在提交到 NCBI 微生物基因组数据库中。HSW2009 基因组大小为 8.718 347 Mb, 平均 GC 含量为 72.4%, 编码 6 417 个基因、18 个 rRNA

和 68 个 tRNA。目前已知的杀粉蝶菌素产生菌中只有茂源链霉菌(*Streptomyces mobaraensis*) DSM40587 基因组序列公布, 其大小为 7.638 929 Mb, 平均 GC 含量为 73.1%, 编码 6 739 个基因、21 个 rRNA 和 70 个 tRNA (NCBI Reference Sequence: NZ\_CP083590.1)。因此, HSW2009 基因组与 DSM40587 基因组特征明显不同。

anti-SMASH 分析 HSW2009 基因组得到一个 52.343 Kb 的 *pie* 基因簇, 与密团链霉菌和票霉

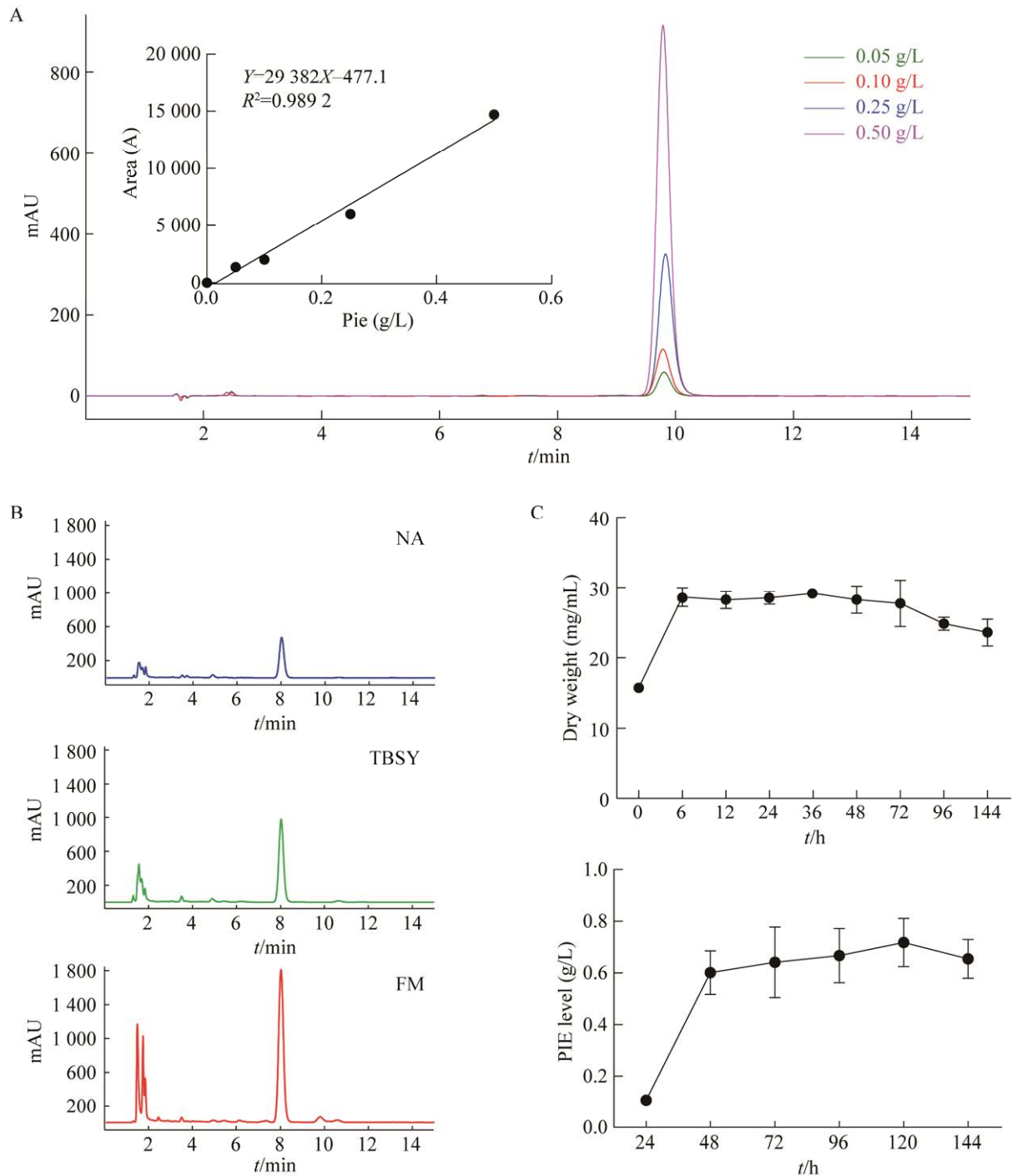


图 4 优化 HSW2009 生物合成杀粉蝶菌素 A1 的发酵条件

Figure 4 Optimization of the fermentation conditions for piericidin A1 biosynthesis in HSW2009. A: The linear regression of piericidin concentration vs. peak area. The standard curve equation was:  $Y=29\ 382X-477.1$ ,  $R^2=0.989\ 2$ . The concentration (X) of piericidin showed a good linear relationship to the peak area ratio (Y). B: Piericidin biosynthesis in three media, NA, TBSY and FM. C: The time course of HSW2009 growth and piericidin production in MFM medium in 5 L fermenter.



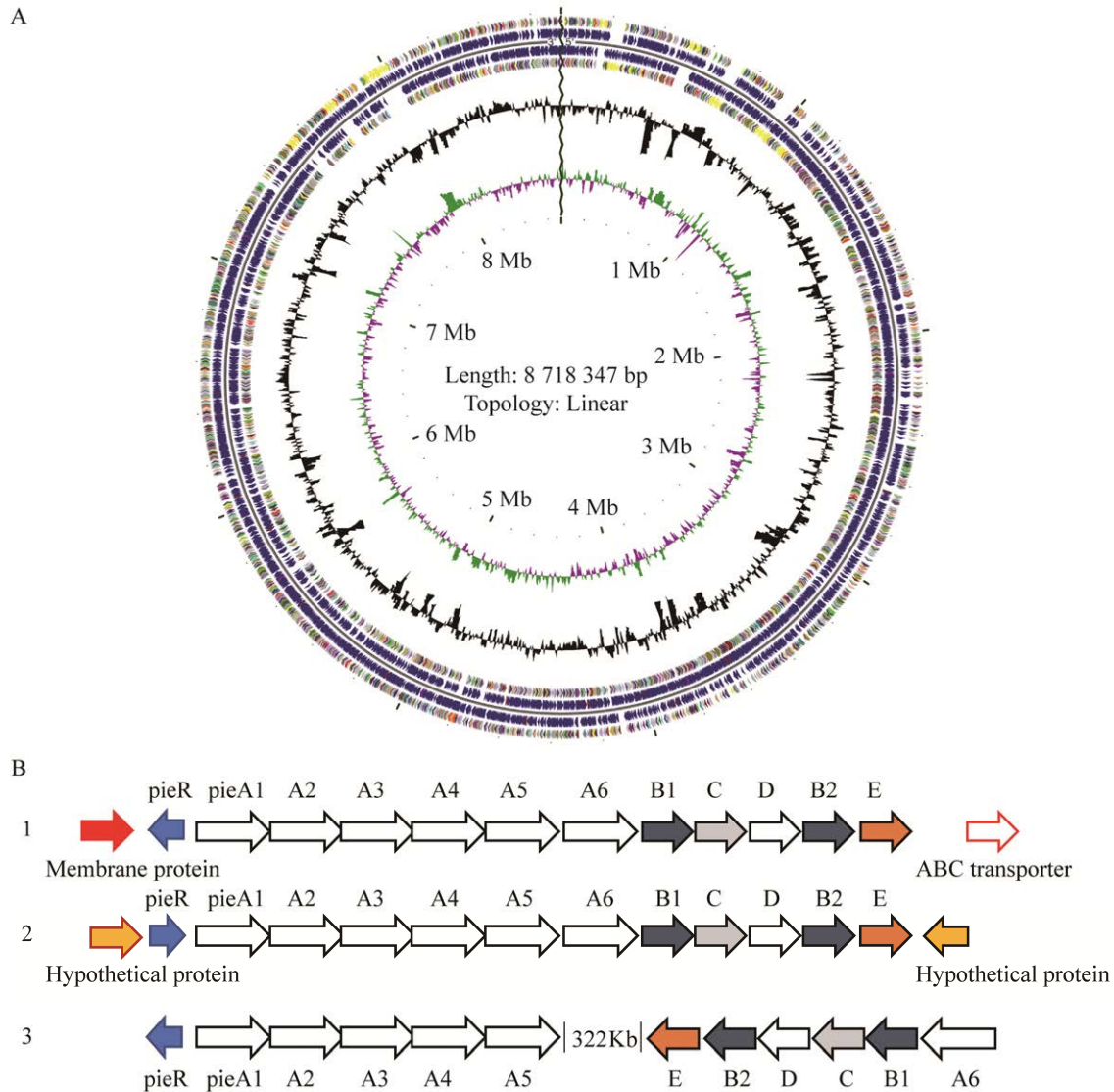


图 5 HSW2009 基因组和杀粉蝶菌素生物合成基因簇生物信息学分析

Figure 5 Bioinformatics analysis of HSW2009 genome and piericidin biosynthetic gene cluster. A: The circular map of HSW2009 genome. B: Comparative analysis of piericidin biosynthetic gene clusters in three *Streptomyces* strains. 1: *Streptomyces piomogeues*; 2: *Streptomyces shaowuensis*; 3: *Streptomyces conglobatus* var. *hangzhouwanensis*.

素链霉菌杭州湾变种中的杀粉蝶菌素生物合成基因簇同源(图 5B)。密团链霉菌中 *pie* 基因簇分别位于 2 个位点, 被一个 322 kb 区域隔开(图 5B); HSW2009 中杀粉蝶菌素 A1 生物合成基因簇的组成与票霉素链霉菌杭州湾变种中的同源基因簇类似, 所有基因都在一个完整的基因簇之中

(图 5B)。但是, 同票霉素链霉菌杭州湾变种 *pie* 基因簇相比, HSW2009 *pie* 基因簇至少具有以下 2 个特点: (1) 上下游基因不同。杭州湾变种 *pie* 基因簇上游是~4 kb 非编码区和一个膜蛋白基因, 下游是~10 kb 非编码区和多个 ABC 转运蛋白基因<sup>[18]</sup>。HSW2009 菌株 *pie* 基因簇上下

游非编码区非常短，上下游均为假定蛋白基因(图 5B)。(2) *pieR* 基因转录方向不同。杭州湾变种基因组上 *pieR* 与其他 *pie* 基因的转录方向相反，呈现一个典型的转录因子调控模式；但是，HSW2009 *pie* 基因簇中 *pieR* 与受其调控的其他 *pie* 基因的转录方向相同(图 5B)。

## 2.6 HSW2009 是一个链霉菌属潜在候选新种

菌株 HSW2009 基因组包含 6 个 16S RNA 基因。在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对分析，结果表明，HSW2009 与 *Streptomyces antioxidans*

MUSC 164、*Streptomyces iranensis* 41954、*Streptomyces violaceusniger* Tu4113、*Streptomyces hygrosopicus* XM201、*Streptomyces sparsogenes* DSM 40356、*Streptomyces albireticuli* MDJK11、*Streptomyces mobaraensis* DSM40587、*Streptomyces varsoviensis* NRRL B-3589 和 *Streptomyces silvensis* ATCC 53525 的相似性在 99.62%–98.63% 之间，聚在同一个进化分支上。进一步通过 ANI 分析，发现 HSW2009 基因组与这些基因组相似的链霉菌的 ANI 均低于 95% (图 6)。结合 HSW2009 产生深黄色色素表型以及 *pie* 基因簇差别，我

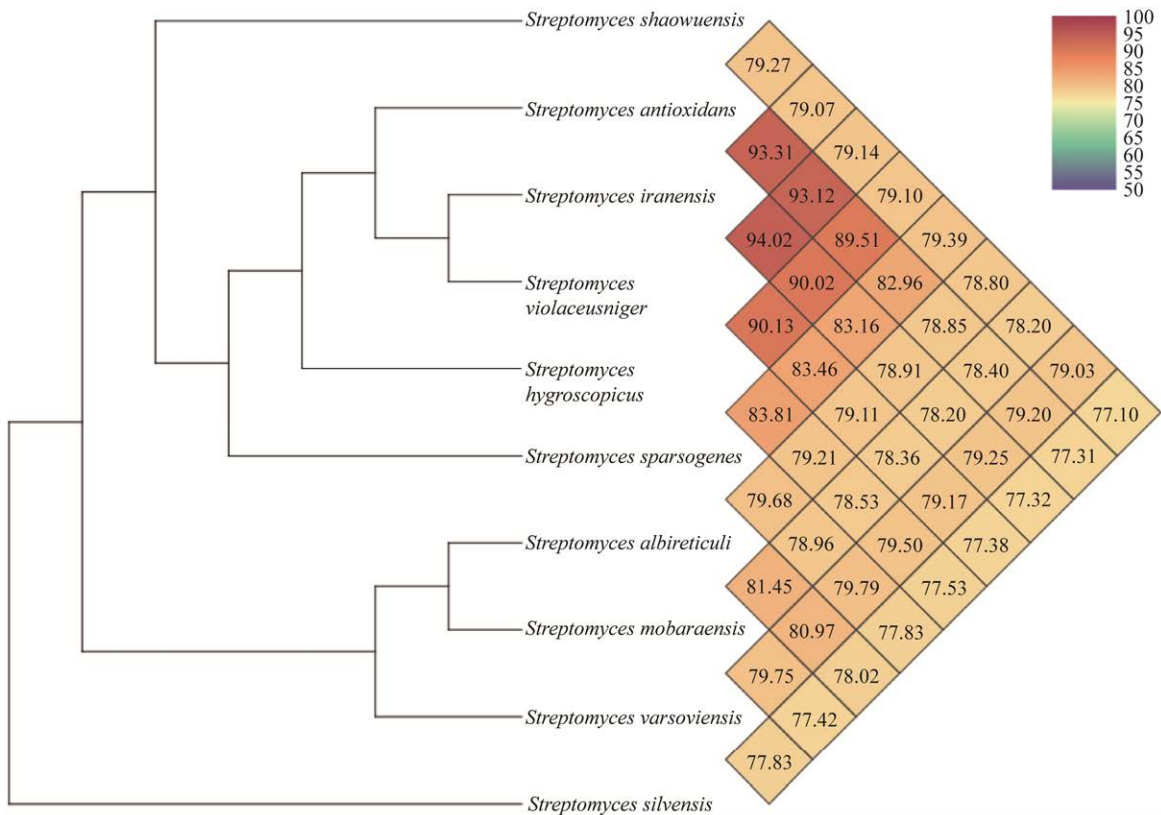


图 6 HSW2009 和其他 9 个链霉菌基因组的平均核苷酸一致性分析

Figure 6 ANI (average nucleotide identity) analysis of the genomes of HSW2009 and other 9 *Streptomyces* strains. *Streptomyces antioxidans* strain MUSC 164 (NZ\_LAKD00000000.2), *Streptomyces iranensis* DSM strain 41954 (NZ\_JAGGLR000000000.1), *Streptomyces violaceusniger* strain Tu4113 (NZ\_LLZJ000000000.1), *Streptomyces hygrosopicus* strain XM201 (NZ\_CP018627.1), *Streptomyces sparsogenes* strain DSM40356 (GCA\_001969965.1), *Streptomyces albireticuli* strain MDJK11 (NZ\_CP021744.1), *Streptomyces mobaraensis* strain DSM40587 (NZ\_CP094262.1), *Streptomyces varsoviensis* strain NRRL B-3589 (NZ\_JOFN000000000.1), and *Streptomyces silvensis* strain ATCC 53525 (NZ\_LOCL000000000.1).

们初步确定 HSW2009 是链霉菌属的一个潜在候选新种的成员, 命名为绍武链霉菌(*Streptomyces shaowuensis* sp. nov.), 其精确的分类学地位还需要结合形态学、生理生化特征、化学分类以及分子分类等多相分类结果来确认。

### 3 讨论与结论

自从 Waksman 和 Henrici 于 1943 年建立链霉菌属以来, 链霉菌已成为细菌域中“种”数量最多的一个属。目前有效描述的种已达 685 个 (<http://www.bacterio.net/streptomyces.html>)<sup>[19]</sup>。链霉菌基因组相对较大, 产生多种代谢物质, 因此, 各国学者仍在不断利用链霉菌寻找新的天然生物活性物质, 开发新型抗生素等产品。本研究分离鉴定了一个能产生杀粉蝶菌素 A1、抑制水稻白叶枯菌生长的链霉菌菌株 HSW2009。目前已报道的产杀粉蝶菌素链霉菌包括茂源链霉菌、霉素链霉菌杭州湾变种、密团链霉菌和 *Streptomyces* sp. SCSIO 03032<sup>[15,17,20-21]</sup>。菌落表型分析、杀粉蝶菌素基因簇比较和全基因组序列分析结果表明, HSW2009 为链霉菌属中的一个潜在候选新种, 初步命名为绍武链霉菌。该菌株的全基因组已测序完成, 有必要在此基础上进一步发掘该新种中是否蕴藏新的遗传资源。

同上述已知的杀粉蝶菌素产生菌相比, 链霉菌 HSW2009 具有生长快和杀粉蝶菌素 A1 发酵效价高等特点。在目前所测试的 3 种营养条件不同的培养基(NA、TBSY、FM)中, 28 °C 条件下培养 48 h 即可达到较高的生物量, 比大多数链霉菌的生长速率快。在 MFM 培养基和 5 L 发酵罐中杀粉蝶菌素 A1 的最高发酵效价可达 0.72 g/L (图 4C), 远远高于已报道的茂源链霉菌中的发酵效价(0.144 g/L)<sup>[15]</sup>。因此, HSW2009 是杀粉蝶菌素产业化研发的理想出发菌株。

杀粉蝶菌素最早由日本科学家发现, 是一种具有良好生物活性的  $\alpha$ -吡啶酮类天然产物, 后来在多个链霉菌中都有发现<sup>[22-23]</sup>。它可能是线粒体呼吸作用抑制剂, 对多种生物具有较强的生物活性。首先, 杀粉蝶菌素 A1 对蚕、菜青虫有很显著的杀虫效果<sup>[24]</sup>。20 世纪 70 至 80 年代, 杀粉蝶菌素曾经作为杀虫抗生素, 在我国进行了大规模的应用性示范推广<sup>[21,25]</sup>; 杀粉蝶菌素对多种癌细胞和动物细胞也有很好的生长抑制作用<sup>[17,26]</sup>。其次, 杀粉蝶菌素对多种病原真菌和粘红酵母等也有很强的抑制活性<sup>[27]</sup>。本研究发现杀粉蝶菌素 A1 对水稻白叶枯菌的生长有较强的抑制作用, 在温室条件下喷施杀粉蝶菌素 A1 能够减轻白叶枯症状(图 3)。类似的结果在其他杀粉蝶菌素同系物中也得到证实<sup>[27-28]</sup>。进一步研究发现杀粉蝶菌素 A1 的抑菌活性具有选择性, 对所有检测的病原黄单胞菌, 如野油菜黄单胞菌、水稻细菌性条斑病菌、柑橘溃疡病菌和芒果细菌性黑斑病菌等, 都有较强的抑制作用, 但对大肠杆菌、假单胞菌和芽孢杆菌等却没有明显的抑制作用<sup>[29]</sup>。黄单胞菌是黄单胞菌属细菌的统称, 侵染至少 124 种单子叶植物和 268 种双子叶植物, 包括主粮作物水稻和小麦, 以及许多重要的经济作物, 因此是一类重要的农业病害<sup>[30-31]</sup>。目前, 农业生产上主要依赖铜制剂等化学农药防治黄单胞菌引起的作物病害, 迫切需要环境友好的生防制剂。本研究结果为研发生态友好的水稻白叶枯菌等黄单胞菌病害生物防治方法提供了依据。

### 参考文献

- [1] 纪明山. 生物农药手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012.  
JI MS. Biopesticide Manual[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012 (in Chinese).

- [2] 方运玲, 孙爽, 申阅, 何亚文. 微生物源农药申喹霉素的研制与应用[J]. 农药学学报, 2014, 16(4): 387-393. FANG YL, SUN S, SHEN Y, HE YW. Progress on the development and application of biopesticide shenqinmycin[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2014, 16(4): 387-393 (in Chinese).
- [3] 何亚文, 李广悦, 谭红, 康前进, 葛蓓亭, 赵杨扬, 张克诚, 蒋细良, 刘凤权, 李亚宁, 张红艳, 白林泉, 向文胜, 邱德文, 杨自文, 邓子新. 我国生防微生物代谢产物研发应用进展与展望[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(3): 537-548. HE YW, LI GY, TAN H, KANG QJ, GE BB, ZHAO YY, ZHANG KC, JIANG XL, LIU FQ, LI YN, et al. Progress and prospect of microbial metabolite pesticides research, development and application in China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(3): 537-548 (in Chinese).
- [4] 张慧, 许宁, 曹丽茹, 张凯. “化学肥料和农药减施增效综合技术研发”重点专项生物源农药的标志性成果[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 1-8. ZHANG H, XU N, CAO LR, ZHANG K. The landmark achievements of biological pesticides in comprehensive technology development for reduction and efficiency enhancement of chemical fertilizers and pesticides[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(1): 1-8 (in Chinese).
- [5] 蒋细良, 李梅. 我国农用抗生素研究的历史、现状及展望[A]//杨怀文. 生物农药防治与创新[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 137-144. JIANG X, LI M. Agro-antibiotics research in China: history, current situation, and outlook[A]//YANG HW. Biopesticide Prevention and Innovation[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology, 2009: 137-144 (in Chinese).
- [6] 何亚文. 微生物源抗生素农药[A]//王中康, 张兴, 张礼生, 邱德文, 杨自文. 现代生物农药 100 问[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2014: 60-75. HE YW. Microbial Agro-antibiotics[A]//WANG ZK, ZHANG X, ZHANG LS, QIU DW, YANG ZW. The 100 Questions for Modern Biopesticide[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology, 2014: 60-75 (in Chinese).
- [7] 陈金松, 刘梅, 张立新. 从阿维菌素获得诺贝尔奖到中国创造[J]. 微生物学报, 2016, 56(3): 543-558. CHEN JS, LIU M, ZHANG LX. Avermectin, from winning the Nobel Prize to “innovation in China”[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(3): 543-558 (in Chinese).
- [8] JIN KM, ZHOU L, JIANG HX, SUN S, FANG YL, LIU JH, ZHANG XH, HE YW. Engineering the central biosynthetic and secondary metabolic pathways of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA1201 to improve phenazine-1-carboxylic acid production[J]. *Metabolic Engineering*, 2015, 32: 30-38.
- [9] SUN S, CHEN B, JIN ZJ, ZHOU L, FANG YL, THAWAI C, RAMPIONI G, HE YW. Characterization of the multiple molecular mechanisms underlying RsaL control of phenazine-1-carboxylic acid biosynthesis in the rhizosphere bacterium *Pseudomonas aeruginosa* PA1201[J]. *Molecular Microbiology*, 2017, 104(6): 931-947.
- [10] 郝祥蕊, 吴小珍, 崔莹, 何亚文. 水稻纹枯病菌对生物农药申喹霉素和吩胺霉素的抗药性初探[J]. 天津农业科学, 2021, 27(9): 51-57. HAO XR, WU XZ, CUI Y, HE YW. Evaluation of the drug resistance of *Rhizoctonia* to two metabolite pesticides shenqinmycin and fenanmycin[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2021, 27(9): 51-57 (in Chinese).
- [11] FANG YL, CUI Y, ZHOU L, THAWAI C, NAQVI TA, ZHANG HY, HE YW. H-NS family protein MvaU downregulates phenazine-1-carboxylic acid (PCA) biosynthesis via binding to an AT-rich region within the promoter of the *phz2* gene cluster in the rhizobacterium *Pseudomonas* strain PA1201[J]. *Synthetic and Systems Biotechnology*, 2021, 6(4): 262-271.
- [12] 张宏军, 陶岭梅, 刘学, 黄修柱. 我国生物农药登记管理情况分析[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(1): 9-17. ZHANG HJ, TAO LM, LIU X, HUANG XZ. Review on registration and management of bio-pesticide in China[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38(1): 9-17 (in Chinese).
- [13] 蔡祝南, 吴蔚文, 高君川. 水稻病虫害防治[M]. 北京: 金盾出版社, 2006. CAI ZN, WU WW, GAO JC. Prevention and Control of Rice Diseases and Pests[M]. Beijing: The Jin Dun Publishing House, 2006, 5-23 (in Chinese).
- [14] LEE I, KIM YO, PARK SC, CHUN J. OrthoANI: An improved algorithm and software for calculating average nucleotide identity[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(2): 1100-1103.
- [15] 王珊珊, 郭文强, 何宁, 齐欣, 解云英. 基因组信息指导下茂源链霉菌代谢产物研究[J]. 中国抗生素杂志, 2018, 43(1): 28-34.

- WANG SS, GUO WQ, HE N, QI X, XIE YY. Genome guided investigation of metabolites of the strain *Streptomyces mobaraensis*[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2018, 43(1): 28-34 (in Chinese).
- [16] LIU Q, YAO F, CHOOI YH, KANG QJ, XU W, LI YR, SHAO YC, SHI YF, DENG ZX, TANG Y, et al. Elucidation of piericidin A1 biosynthetic locus revealed a thioesterase-dependent mechanism of  $\alpha$ -pyridone ring formation[J]. Chemistry & Biology, 2012, 19(2): 243-253.
- [17] LI WL, ZHANG WY, CHENG YJ, SHEN YY, QI JZ, LIN HW, ZHOU YJ. Investigation of carbonyl amidation and O-methylation during biosynthesis of the pharmacophore pyridyl of antitumor piericidins[J]. Synthetic and Systems Biotechnology, 2022, 7(3): 880-886.
- [18] 刘倩. 杀粉蝶菌素 A1 的生物合成研究[D]. 上海: 上海交通大学博士学位论文, 2012.
- LIU Q. Revealing the biosynthetic mechanism of antibiotic piericidin A1[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation Shanghai Jiao Tong University, 2012 (in Chinese.)
- [19] ŚWIECIMSKA M, GOLIŃSKA P, GOODFELLOW M. Genome-based classification of *Streptomyces pinistramenti* sp. nov, a novel actinomycete isolated from a pine forest soil in Poland with a focus on its biotechnological and ecological properties[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2022, 115(6): 783-800.
- [20] CHEN YL, ZHANG WJ, ZHU YG, ZHANG QB, TIAN XP, ZHANG S, ZHANG CS. Elucidating hydroxylation and methylation steps tailoring piericidin A1 biosynthesis[J]. Organic Letters, 2014, 16(3): 736-739.
- [21] 赵震宇, 刘倩, 由德林. 杀粉蝶菌素 A1 生物合成基因簇中甲基转移酶 PieB2 的功能[J]. 微生物学报, 2016, 56(7): 1186-1193.
- ZHAO ZY, LIU Q, YOU DL. Function of methyltransferase gene pieB2 in the biosynthetic cluster of piericidin A1[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(7): 1186-1193 (in Chinese).
- [22] HALL C, WU MJ, CRANE FL, TAKAHASHI H, TAMURA S, FOLKERS K. Piericidin A: a new inhibitor of mitochondrial electron transport[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1966, 25(4): 373-377.
- [23] ZHOU XF, FENICAL W. The unique chemistry and biology of the piericidins[J]. The Journal of Antibiotics, 2016, 69(8): 582-593.
- [24] DARROUZET E, ISSARTEL JP, LUNARDI J, DUPUIS A. The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors[J]. FEBS Letters, 1998, 431(1): 34-38.
- [25] 陈传盈, 黄文彩, 林开江, 钱玉英, 王龙英, 周伟强. 杀蚜素的研究II. 杀蚜素 A 的分离和鉴别[J]. 微生物学报, 1981, 21(2): 192-196.
- CHEN CY, HUANG WC, LIN KJ, QIAN YY, WANG LY, ZHOU WQ. Studies on aphicidin II. isolation and characterization of aphicidin A[J]. Acta Microbiologica Sinica, 1981, 21(2): 192-196 (in Chinese).
- [26] ZHOU XF, LIANG Z, LI KL, FANG W, TIAN YX, LUO XW, CHEN YL, ZHAN ZK, ZHANG T, LIAO SR, LIU S, LIU Y, FENICAL W, TANG L. Exploring the natural piericidins as anti-renal cell carcinoma agents targeting peroxiredoxin 1[J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2019, 62(15): 7058-7069.
- [27] AZAD S M, JIN Y, SER HL, GOH BH, LEE LH, THAWAI C, HE YW. Biological insights into the piericidin family of microbial metabolites[J]. Journal of Applied Microbiology, 2022, 132(2): 772-784.
- [28] 尚宁宁. 五株药用植物内生和根际链霉菌次级代谢产物及抗菌活性研究[T]. 成都中医药大学硕士论文, 2017.
- SHANG NN. The secondary metabolites from 5 endophytic and rhizosphere *Streptomyces* strains and their antibiotic activities. MSc[T]. Thesis of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2017 (in Chinese).
- [29] 何亚文. 一株产杀粉蝶菌素和抑制植物病原黄单胞菌生长的链霉菌菌株: ZL202011190782.1[P]. 2020-04-02.
- HE YW. A *Streptomyces* strain producing piericidin and inhibiting the growth of *Xanthomonas oryzae*: ZL202011190782.1[P]. 2020-04-02 (in Chinese).
- [30] 宋凯, 郭晓春, 陈博, 何亚文. 植物病原黄单胞菌退出群体感应生理状态的分子机制和生物学意义[J]. 微生物学报, 2021, 61(1): 68-76.
- SONG K, GUO XC, CHEN B, HE YW. Molecular mechanisms and biological significance of the naturally occurring turnover of DSF-family quorum sensing signal in the phytopathogen *Xanthomonas*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(1): 68-76 (in Chinese).
- [31] VICENTE JG, HOLUB EB. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops[J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(1): 2-18.