

番茄溃疡病菌拮抗菌株 Z-L-22 的鉴定及其活性物质

张艳, 张维宏, 王松红, 李亚宁, 赵志泉, 刘大群*, 杨文香*

(河北农业大学植物保护学院, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 保定 071001)

摘要 【目的】鉴定一株对番茄溃疡病病原菌—密执安棒形杆菌密执安亚种(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, Cmm)具有强拮抗作用的放线菌菌株 Z-L-22, 并分析其代谢产物, 为开发新的生物活性物质奠定基础。【方法】根据菌株 Z-L-22 的形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞壁组分和 16S rDNA 序列对菌株 Z-L-22 的进行了鉴定。通过薄层层析、纸层析和特征性鉴别试验对活性物质进行分离、回收和鉴定。并利用抗生素合成基因保守区域设计的引物用对基因组 DNA 进行 PCR 扩增。【结果】菌株 Z-L-22 属于链霉菌属, 各特征与西唐链霉菌(*Streptomyces setonii*)相似。获得了 2 个主要活性成分, 均为放线菌素类抗生素。利用放线菌素类抗生素合成酶保守引物在该菌基因组中扩增到 770 bp 的相关基因片段。【结论】活性菌株 Z-L-22 鉴定为西唐链霉菌, 命名为西唐链霉菌 Z-L-22。该菌产生的抗生活性物质为放线菌素类抗生素, 本研究为开发该菌株奠定基础。

关键词: Z-L-22 菌株; 西唐链霉菌; 番茄溃疡病; 放线菌素

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2009)07-0889-07

番茄溃疡病(Bacterial canker of tomato)是番茄生产中最为严重的病害之一, 自从 1909 年首次在美国密执安州的温室番茄上发现以来^[1], 发生频繁, 现已广泛分布于世界各番茄产区。近年来在我国的发生呈上升趋势^[2]。国内外尚无防治该病的有效方法。已报道的一些措施仅局限在一定程度上控制病害的发生和蔓延。

生物防治是利用生物群防治生物群的方法来调节有害生物种群密度, 可能为防治番茄溃疡病提供新的途径。目前报道的对于番茄溃疡病生物防治的研究较少。放线菌(Actinomycetes)是一类具有很大应用潜力的微生物资源。已报道的 8000 种抗生素中约有 80% 是由放线菌产生的^[3], 其中的抗生素产生菌又主要集中在链霉菌属。该属也是放线菌目中最大的一个属, 是重要的微生物农药来源。我们从

生物防治的角度出发, 在河北保定地区采集番茄根际土样, 通过双层平板法并结合液体发酵试验筛选到一株对番茄溃疡病菌有强烈抑制作用的放线菌菌株 Z-L-22, 温室药效表明用该菌株孢子或代谢产物处理番茄种子对番茄溃疡病有较好的防治效果(未发文)。本文对该菌株进行了鉴定, 并对其抑菌活性物质开展研究, 以期开发新的微生物资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 菌株 Z-L-22, 由本实验室从保定近郊番茄根际土样分离, 在高氏一号培养基上扩繁保存; 番茄溃疡病菌—密执安棒形杆菌密执安亚种, 由中国农业大学种子病理实验室惠赠, 在 YDC 培养基上扩繁保存。用于生物活性测定的指示细菌和真菌见

基金项目: 河北省博士基金项目(05547005D-1)

* 通信作者。刘大群: Tel: +86-312-7528500, E-mail: ddq@mail.hebau.edu.cn; 杨文香: Tel: +86-312-7528585, E-mail: wenxiangyang2003@163.com

作者简介: 张艳(1980-), 女, 河北邯郸人, 主要从事农业微生物的研究。E-mail: geneclone@126.com

收稿日期: 2009-03-11; 修回日期: 2009-04-17

2.1 均由本实验室保存。

1.1.2 培养基: 发酵培养基每升培养基中含黄豆饼粉 10.0 g, 葡萄糖 10.0 g, 蛋白胨 3.0 g, NaCl 2.5 g, CaCO₃ 2.0 g, pH 7.2 ~ 7.4。菌株培养特征以及生理生化特性测定所用培养基参照文献 [4] 配制。

1.1.3 主要试剂和仪器: Taq DNA 聚合酶、GC buffer I 和 dNTP 购自大连宝生物公司; PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成; PCR 扩增使用 Eppendorf 公司的 T-gradient PCR thermocycler; 薄层层析板 GF254 购自青岛海洋化工厂; 纸层析滤纸为新华三号滤纸; KYKY--2800 型扫描电子显微镜进行电镜观察。

1.2 菌株的发酵和抑菌谱的测定

从新鲜培养的斜面菌种制备孢子悬浮液, 以 1% 的接种量接种于发酵培养基中, 28℃ 振荡培养 (150 r/min) 5 d 后, 2124 × g 离心 20 min, 上清液用 0.22 μm 孔径的细菌过滤器过滤除菌, 即得无菌发酵液。采用纸碟法进行抑菌谱测定。滴加 50 μL 无菌发酵液于直径为 15 mm 的滤纸片上, 然后将滤纸片置于涂布有指示菌的平板上, 每个处理重复 3 次。真菌于 25℃ 培养 3 d, 细菌于 28℃ 培养 1 d, 观察抑菌情况。

1.3 菌株鉴定

1.3.1 形态特征: 采用高氏一号培养基 28℃ 培养 7 d 进行光学显微镜和电子显微镜观察。电镜样品用 1% 锇酸固定, 在干燥器中干燥脱水 2 ~ 3 d; KYKY SBC-12 离子溅射镀膜机喷金 5 次, 每次 60 s; 扫描电镜观察。

1.3.2 培养特征和生理生化特征: 参照文献 [4] 中推荐的部分培养基 (表 2) 和方法进行, 28℃ 培养 7 ~ 10 d 后观察记录特征。

1.3.3 细胞壁类型分析: 采用 Hasegawa^[5,6] 薄层层析法 (Thin layer chromatography, TLC) 对菌株进行全细胞水解液的氨基酸和糖型分析。

1.3.4 16S rDNA 序列分析: 用溶菌酶法^[7] 提取基因组 DNA, 采用通用引物^[8] 进行 16S rDNA 扩增。扩增产物回收后与 pMD19-T 连接, 克隆入大肠杆菌 (*Escherichia coli*, *E. coli*) JM109 感受态细胞, 选取阳性克隆委托上海生工测序。将所测得的序列与 GenBank 数据库中的 16S rRNA 基因序列进行相似性比较分析, 以确定该菌株分类地位。

1.4 活性物质的提取分离和类别鉴定

1.4.1 活性物质的提取和薄层层析分离: 发酵液 2124 × g 离心 20 min, 上清液用等体积乙酸乙酯萃

取, 把有机相旋转蒸发, 溶解于上清液体积 1/10 的甲醇中。取 10 μL 浓缩物滴加在滤纸片上, 待有机溶剂完全后挥发后用纸碟法测定对番茄溃疡病菌的抑制效果, 同时将 10 μL 甲醇滴加在滤纸片上, 待有机溶剂挥发完后测定对番茄溃疡病菌的抑制效果作为空白对照。将粗提物用毛细管点到层析板距底部 1.5 cm 处, 展层剂用苯: 乙酸乙酯: 甲醇 = 19: 19: 4。层析板置于密闭的层析缸中, 采用上行层析。在紫外分析仪下用 254 nm 波长观察粗体物的分离情况。把含有活性组分的硅胶从层析板上刮下, 用甲醇浸提, 浸提液浓缩后进行抑菌活性测定。

1.4.2 Doskochilova 八溶剂系统纸层析: 从层析板上分离的主要活性成分进行 Doskochilova 纸层析^[9] 以确定抗生素类别。层析实验在有密闭玻璃塞的展层缸中进行, 采用上行层析。层析后采用平板生物显影法, 将滤纸条贴在涂布有菌层的平板上, 26℃ 培养 48 h 观察对 *Cmm* 的抑制情况, 以确定 Rf 值。

1.4.3 放线菌素鉴别试验: 样品分别加入等体积的氢氧化钠乙醇溶液和浓盐酸, 观察颜色变化^[10]。

1.4.4 放线菌素合成基因扩增: 根据放线菌素合成酶的保守结构设计引物进行 PCR 扩增^[11]。引物序列 A3: ACSTCSGGCWCGCACCGGCCIGCCSAAG; A8: AGCTCSAYS CGSTAGCCSCGSAYCTTSACCTG。以菌株 Z-L-22 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增 (95℃ 5 min, 1 个循环; 95℃ 1 min, 65℃ 1 min, and 72℃ 1 min, 30 个循环; 72℃ 7 min, 1 个循环)。

2 结果

2.1 菌株 Z-L-22 的抗菌谱测定

对菌株 Z-L-22 的发酵液进行抗菌谱测定, 发现该菌株对供试的革兰氏阳性细菌包括番茄溃疡病菌、菜豆细菌性萎蔫病菌 (*Curtobacterium flaccumfaciens*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、藤黄八叠球菌 (*Sarcina lutea*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、马铃薯疮痂病菌 (*Streptomyces scabies*)、藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 表现强烈拮抗活性 (见表 1); 对供试的革兰氏阴性细菌包括大肠杆菌、白菜软腐病菌 (*Erwinia carotovora*)、丁香假单胞杆菌 (*Pseudomonas syringae*)、嗜水气单胞菌 (*Aeromonas hydrophila*)、水稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 和真菌包括番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinere*)、番茄早疫病菌 (*Alternaria solan*)、棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium*

oxysporum) 白菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)、棉立枯病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)、黄瓜炭疽病菌(*Colletrichum orbiculare*)无活性。

表 1 菌株 Z-L-22 发酵滤液对 8 种革兰氏阳性细菌的抑菌效果

Table 1 Inhibition of fermentation filtrate of strain Z-L-22 on 8 gram-positive bacteria

Bacteria	Inhibition diameter /mm	Bacteria	Inhibition diameter /mm
<i>Clavibacter michiganensis</i>	45.23	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	41.35
<i>Staphylococcus aureus</i>	42.20	<i>Sarcina lutea</i>	41.27
<i>Bacillus subtilis</i>	42.00	<i>Streptomyces scabies</i>	22.38
<i>Micrococcus luteus</i>	39.86	<i>Enterococcus faecalis</i>	40.58

2.2 菌种鉴定

2.2.1 形态特征 :菌株 Z-L-22 在高氏培养基上菌株的基内菌丝发育良好,无横隔、不断裂,气生菌丝生长良好,多分支,孢子丝直或柔曲,孢子球型至卵圆型,表面光滑无刺(图 1)。

表 2 菌株 Z-L-22 的培养特征

Table 2 The culture characteristics of Z-L-22

Medium	Aerial mycelium	Vegetative mycelium	Soluble pigment
Gaoses No.1 medium agar	Pale gray-yellow	Yellow-orange	Pale orange
Starch ammonium agar	Gray-yellow	Yellow-orange	Orange
Glucose asparagine agar	Gray-yellow	Yellow-orange	Pale orange
Glycerol asparagine agar	Gray-yellow	Gray-yellow	Pale orange
Oat agar	Gray-yellow	Yellow-orange	Orange

2.2.3 生理生化特征 :菌株 Z-L-22 水解淀粉、液化明胶,产生硫化氢,可分解纤维素,可还原硝酸盐,但不胨化和凝固牛奶,不产生黑色素和 H_2S ,可利用木糖、葡萄糖、半乳糖、蔗糖、果糖、甘露醇、鼠李糖、阿拉伯糖、乙酸盐、丁二酸盐、柠檬酸盐、肌醇作为碳源生长,不利用山梨糖、丙二酸盐。

2.2.4 细胞壁类型分析 :菌株 Z-L-22 格兰氏染色阳性,全细胞水解液含有 L,L-DAP(L,L-二氨基庚二酸, Diaminopimelic acid),且含有甘氨酸。无特征性糖,细胞壁属于 I 型,糖型 C。

2.2.5 16S rDNA 序列分析 :菌株 Z-L-22 的 16S rDNA 序列(基因登陆号:FJ767837)与 GenBank 中相关序列 Blast 比较的结果表明,该菌株属于链霉菌属,与西唐链霉菌及深陷疮痂链霉菌(*Streptomyces caviscabies*)的序列相似性很高,为 99.9%。

2.3 活性物质的类别鉴定

2.3.1 活性物质的抑菌效果 :从发酵液中用乙酸乙酯萃取得到橙红色液体,浓缩后颜色加深。对粗品进行活性测定(图 2),萃取物有很好的抑菌效果,对

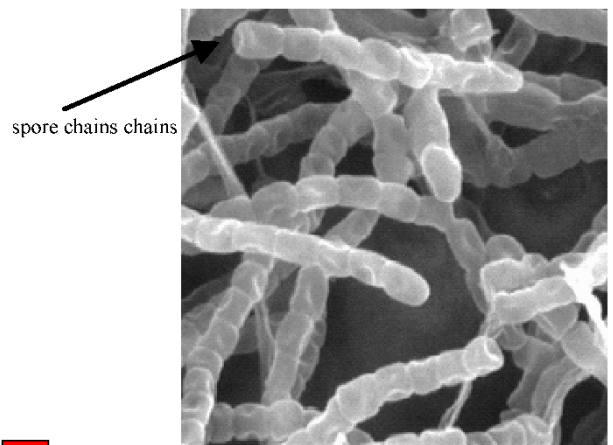


图 1 Z-L-22 的孢子链形态(6060 ×)

Fig. 1 Morphology of Z-L-22 spore chains (6060 ×)

2.2.2 培养特征 :在供试培养基上的培养特征见表 2。该菌株在所选用的 5 种培养基上生长良好,在甘油天门冬素和燕麦培养基上生长最好,其气生菌丝、基内菌丝以及可溶性色素的颜色在不同培养基上略有不同。

Cmm 的抑菌圈直径达到 42.38 cm。

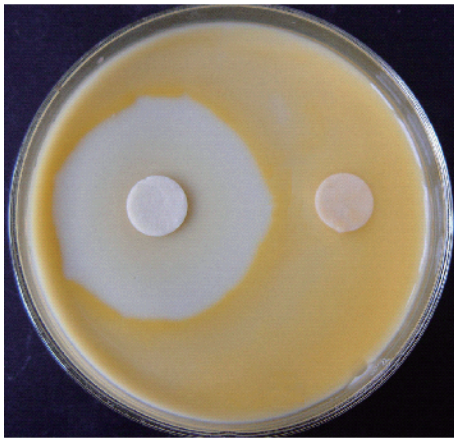
2.3.2 活性物质的薄层层析分离 :粗提取物展开剂苯、乙酸乙酯、甲醇(比例为 19:19:4)分离后在 254 nm 的紫外光下观察(图 3),分离效果较好,可见 8 个组分(I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII),对各组分回收进行抑菌实验,发现 Rf 值为 0.56 和 0.64 的两个组分抑菌活性最强(表 3),这两个组分在可见光下都为橙红色斑点。其他组分没有或表现很弱的抑菌活性。

表 3 薄层层析回收各组分对 *Cmm* 的抑制效果

Table 3 Inhibition of substances separated by TLC to *Cmm*

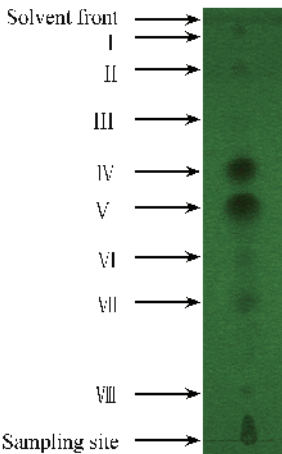
Component	Rf value	Diameter of inhibition zone (mm)
I	0.96	0
II	0.85	0
III	0.72	0
IV	0.64	23.30
V	0.56	27.00
VI	0.50	8.22
VII	0.26	0
VIII	0.09	0

Note: Roman numerals in table 3 indicate the components separated by TLC as shown in Fig. 3.



2.2 发酵液萃取物对 *Cmm* 的抑制效果

Fig.2 Inhibition of substances extracted from fermentation broth to *Cmm*. The left paper disk indicates inhibition of substances extracted from fermentation broth to *Cmm* while the right indicates methanol dript on the paper disk as a control.



2.3 活性物质薄层层析结果

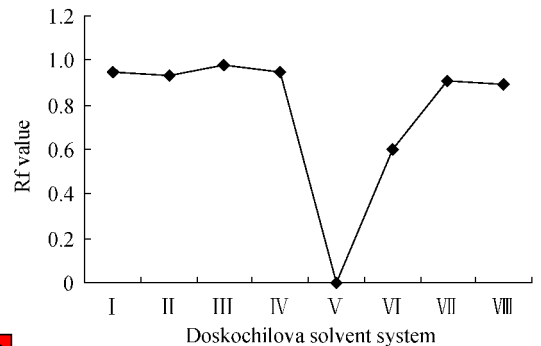
Fig.3 TLC analysis of bioactive compounds. Roman numerals (I , II , III , IV , V , VI , VII , VIII) with arrowheads pointed to the figure indicate the components separated by TLC.

2.3.3 Dorskochilova 八溶剂系统纸层析:薄层层析后对 2 个抑菌活性强的组分回收,用 Dorskochilova 八溶剂系统纸层析系统进行层析。测量各溶剂系统中的 R_f 值发现,两组分的层析结果一致,在各溶剂中均得到一个抑菌斑点,说明活性物质较单一。除在溶剂 V 中不移动外,在其他溶剂中均移至溶剂前沿, R_f 值在 0.9 以上(图 4),与标准谱图对比,这两组分均属于放线菌素类(actinomycin ,AM)抗生素。

2.3.4 放线菌素鉴别试验:在薄层层析回收的两活性组分中加入氢氧化钠乙醇溶液 2 组分均由橙红色变为紫色,加入浓盐酸后均由橙红色变为暗红色,与放线菌素颜色反应一致。

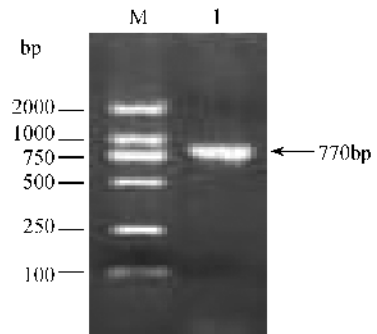
2.3.5 放线菌素合成基因扩增:以菌株 Z-L-22 基因

组 DNA 为模板,用放线菌素合成酶保守引物进行 PCR 扩增。扩增后得到特异条带,片段长度为 770 bp(图 5),序列分析结果(基因登陆号为: FJ767838)显示与金羊毛链霉菌(*Streptomyces chrysomallus*)放线菌素 III 合成酶(actinomycin synthetase III , *acmC*)基因(基因登录号为: AF204401.1)有 82% 的相似性(图 6),扩增片段特征与预期一致。表明该菌株中含有放线菌素合成酶相关基因,进一步证实了该菌产生抗生素的类别,为在基因水平上研究该菌的抗生素合成奠定了基础。



2.4 活性物质在 Dorskochilova 溶剂系统中纸层析结果

Fig.4 The result of paper chromatography of bioactive components in Dorskochilova solvent system. Roman numerals in the abscissa indicate different solvents used in paper chromatography.



2.5 放线菌素合成酶的保守引物扩增结果

Fig.5 Amplification results with the primers targeted to conserved domain of actinomycin synthetase. Lane M indicates DNA marker ladder DL2000 with the length of the bands shown in the figure ,Lane I indicates the amplification result by PCR.

3 讨论

微生物药物的开发和研究在整个微生物资源的研究中占有及其重要的地位。本文以本实验室从土壤中分离得到的对番茄溃疡病菌有强烈抑制作用的放线菌菌株 Z-L-22^[12]为出发菌株,进行了菌株的鉴定和活性物质分析。

根据形态特征、细胞壁组分分析和 16S rDNA 序

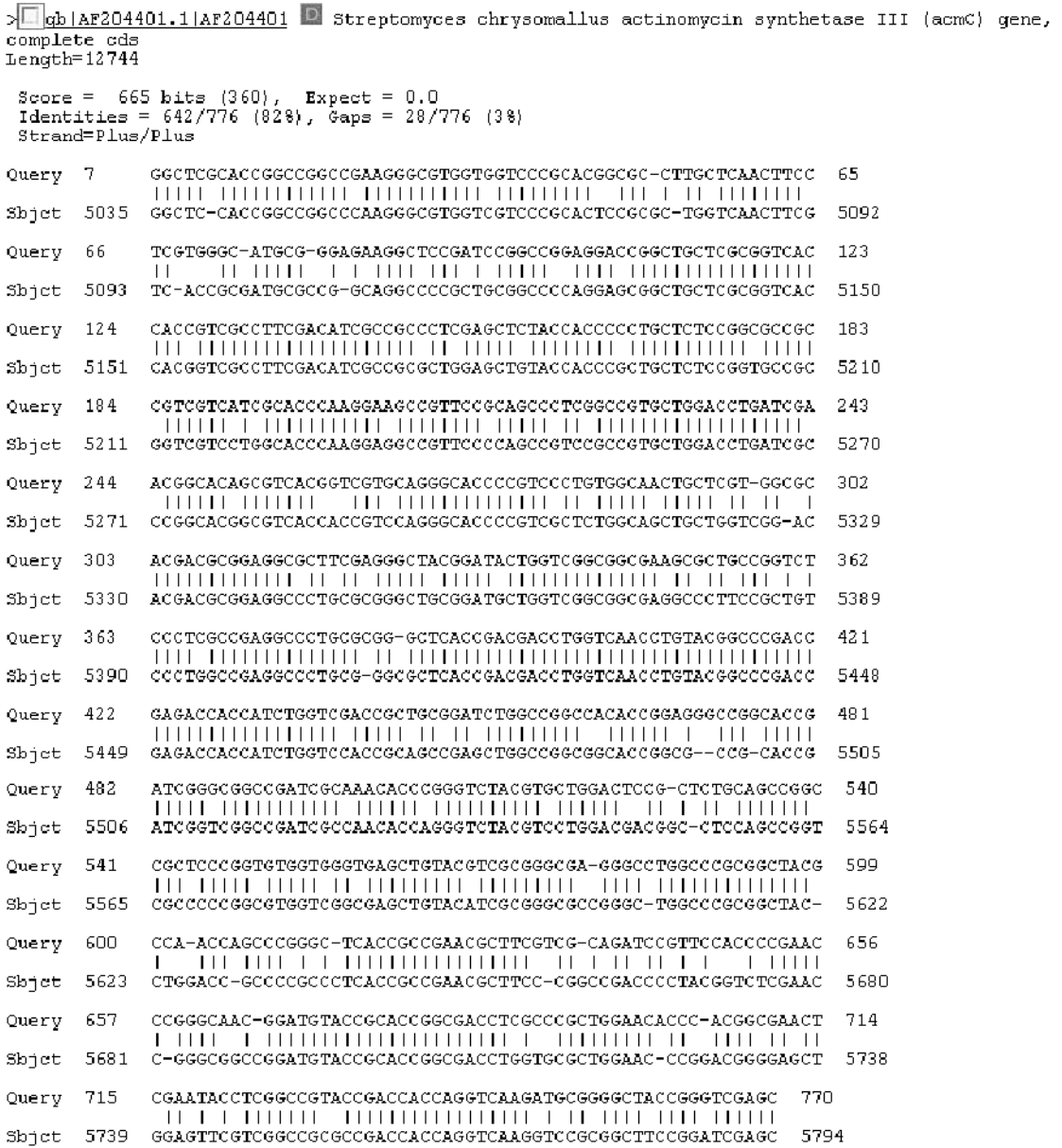


图 6 菌株 Z-L-22 扩增序列与金羊毛链霉菌 acmC 基因比对结果
 Fig.6 The blast result of amplified sequence and acmC gene of Streptomyces chrysomallus .

列分析结果可见,菌株 Z-L-22 属于链霉菌属,并与西唐链霉菌和深陷疮痂链霉菌亲缘关系最近,但该菌株的培养特征和生理生化特征与西唐链霉菌很相似,而与深陷疮痂链霉菌有明显差异。故综合表型和基因型分析,将该菌株确定为西唐链霉菌。

菌株代谢产物的早期鉴别对于开发菌株有重要的意义。本文对西唐链霉菌 Z-L-22 的代谢产物进行了初步的分离和分析。薄层层析分离得到的两个活性较强的组份组分经 Doskochilova 八溶剂纸层析系统分析和鉴别试验判断为放线菌素类抗生素。抑菌谱试验中发现,西唐链霉菌 Z-L-22 对供试

的革兰氏阳性细菌呈抑制作用,对革兰氏阴性细菌和真菌无效,与放线菌素的抑菌范围相同。

放线菌素一类色肽的抗生素^[13],能抑制 DNA 病毒,而不能抑制 RNA 病毒,并且对依赖于 DNA 的 RNA 合成有特殊的抑制作用,在研究大分子生物合成、病毒复制方面是一个重要的生化工具。另外对许多肿瘤细胞有抑杀作用,是一类重要的抗生素资源。已报道的放线菌素产生菌有金羊毛链霉菌 (*Streptomyces chrysomallus*)^[13]、小单胞菌 (*Micromonospora floridensis*)^[13]、浅藤黄链霉菌 (*Streptomyces luteointescens*)^[14]、微小链霉菌

(*Streptomyces parvulus*)^[15]、黑色素链霉菌(*Streptomyces melanochromogenes*)^[16]、抗生链霉菌(*Streptomyces antibioticus*)^[17]。西唐链霉菌作为放线菌素产生菌为未见报道。在西唐链霉菌的研究中,国内仅刘丽等^[18]报道了一株抗稻瘟病菌的海绵放线菌 Hmp-S14 经鉴定属于西唐链霉菌。Larsen 等^[19]报道西唐链霉菌能产生一种称之为 16-Deethylindanomycin 的新型吡咯醚类抗生素。西唐链霉菌由于表型和基因型的相似作为同义种合并入灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)^[20]。在灰色链霉菌中,也未有产生放线菌素类抗生素的报道。本文的研究为该菌株的开发奠定了基础。

抗生素生物合成相关基因研究对于阐明抗生素生物合成的途径、基因表达的调控机制、优化生产菌株甚至遗传改造创造新的抗生素有重要的意义。在抗生素类别确定的基础上,对西唐链霉菌 Z-L-22 中放线菌素合成相关基因进行了扩增。放线菌素类抗生素中肽链的合成是非核糖体的,由非核糖体多肽合成酶(non-ribosomal peptide synthetase, NRPS)作用。根据这种合成酶保守结构域设计引物,在菌株 Z-L-22 基因组中扩增到放线菌素合成酶相关基因,为在基因水平上研究该菌株奠定基础,也进一步证实了对代谢产物类型的判断。

抗生素研究与开发,是一项综合利用各项科学和高新技术的系统工程。本文对菌株 Z-L-22 菌株鉴定和活性成分做了一些初步的研究,对于该菌株的开发应用还需要进行大量系统的工作。结构鉴定、田间防效、安全性评价等工作需要在今后研究中深入进行。

参考文献

- [1] Gleason ML, Gitaitis RD, Ricker MD. Recent Progress in understanding and controlling bacterial canker of tomato in eastern North America. *Plant Disease*, 1993, 77: 1069 - 1076.
- [2] 罗来鑫, 赵廷昌, 李健强, 等. 番茄细菌性溃疡病研究进展. *中国农业科学* (*Scientia Agricultura Sinica*), 2004, 37(8): 1144 - 1150.
- [3] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社, 1992.
- [4] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975.
- [5] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *Journal of General Applied Microbiology*, 1983, 29: 319 - 322.
- [6] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究及应用. 北京: 科学出版社, 1990.
- [7] Kieser T, Mervyn JB, Mark JB, et al. *Practical Streptomyces Genetics*. England: The John Innes Foundation Norwich, 2000.
- [8] Edwards U, Rogall T, Booker H, et al. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: Characterization of a gene coding for 16s ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17(19): 7843 - 7853.
- [9] 周启, 王道本. 农用抗生素和微生物杀虫剂. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [10] 夏海洋. 农抗 A9901-I 素分离鉴定及生物理化特性研究. 华中农业大学学位论文, 2003.
- [11] Magarvey NA, Halti B, He M, et al. Biosynthetic pathway for mannopeptimycins, lipoglycopeptide antibiotics active against drug-resistant Gram-positive pathogens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(6): 2167 - 2177.
- [12] 张维宏. 番茄溃疡病菌拮抗链霉菌的筛选、鉴定及活性物质理化性质初步研究. 河北农业大学学位论文, 2005.
- [13] 王, 方金瑞. 抗生素. 北京: 科学出版社, 1998.
- [14] 顾觉奋, 王鲁燕, 倪孟祥. 抗生素. 上海: 上海科技出版社, 2001.
- [15] Williams WK, Katz E. Development of a chemically defined medium for the synthesis of actinomycin D by *Streptomyces parvulus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1977, 11(2): 281 - 290.
- [16] 陈钧鸿, 徐玲娣. 抗生素工业分析. 北京: 中国医药科技出版社, 1991.
- [17] Katz E, Weissbach H. Incorporation of C¹⁴-labeled amino acids into actinomycin and protein by *Streptomyces antibioticus*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1963, 288(2): 666 - 675.
- [18] 刘丽, 胡江春, 王书锦. 抗稻瘟病菌的海绵放线菌 Hmp-S14 的生物学特性及其鉴定. *沈阳农业大学学报* (*Journal of Shenyang Agricultural University*). 2004, 35(1): 16 - 19.
- [19] Larsen SH, Boeck LD, Mertz FP, et al. 16-Deethylindanomycin (A83094A), a novel pyrrole-ether antibiotic produced by a strain of *Streptomyces setonii*. Taxonomy, fermentation, isolation and characterization. *Journal of Antibiotics* (Tokyo), 1988, 41(9): 1170 - 1176.
- [20] Liu ZH, Shi YL, Zhang YM, et al. Classification of *Streptomyces griseus* (Krausky 1914) Waksman and Henrici

1948 and related species and the transfer of *Microstreptospora cinerea* ' to the genus *Streptomyces* as *Streptomyces yanii* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2005, 55 :1605 - 1610.

Identification and analysis of an actinomycete strain suppressing *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

Yan Zhang, Weihong Zhang, Songhong Wang, Yaning Li, Zhiqian Zhao, Daqun Liu*, Wenxiang Yang*

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center for Plant Disease and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China)

Abstract [Objective] To identify and analyze bioactive compounds of an actinomycete strain Z-L-22 suppressing *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, the causal agent of bacterial canker of tomato. **[Methods]** Morphological, biological and biochemical characterization, chemotaxonomy analysis and 16S rDNA sequences homology analysis were performed to identify the strain Z-L-22. Bioactive compounds were separated and retrieved by thin layer chromatography. Paper chromatography and confirmation tests were used to identify the antibiotic. PCR was carried out using the primers targeted to synthetase of the antibiotic. **[Results]** Strain Z-L-22 belonged to *Streptomyces* sp. and was similar to *Streptomyces setonii*. Two main bioactive components were isolated by thin layer chromatography, which were all identified as actinomycin. New actinomycin synthetase gene was cloned using the primers designed from actinomycin synthetase conserve domain. **[Conclusion]** Strain Z-L-22 was classified as *Streptomyces setonii*. Actinomycin produced by *Streptomyces setonii* was first reported.

Keywords : strain Z-L-22 ; *Streptomyces setonii* ; bacterial canker of tomato ; actinomycin

(本文责编 : 张晓丽 , 谷志静)

Supported by the Doctor's Foundation of Hebei Province (05547005D-1)

* Corresponding authors. Daqun Liu : Tel : + 86-312-7528500 , E-mail : ldq @ mail . hebau . edu . cn ; Wenxiang Yang : Tel : + 86-312-7528585 , E-mail : wenxiangyang2003 @ 163 . com

Received : 11 March 2009 / Revised : 17 April 2009

《微生物学报》答作者问——关于署名

问:我想问一下作者及单位署名顺序的修改问题。投稿后经过专家审查通过后即将发表,如果想在作者和单位方面增、减新的内容,并且修改作者及单位署名顺序是否可以?是否需要提供什么证明或者相关的材料?

答:可以变更,但需要作者再提供以下材料。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。