

## 喜树种子内生放线菌的分离鉴定及抗菌活性物质初分离

姚晓玲<sup>1</sup> 康前进<sup>1</sup> 熊顺子<sup>1</sup> 李芳<sup>1</sup> 王益<sup>2</sup> 林双君<sup>1</sup> 白林泉<sup>1</sup> 马伟<sup>1\*</sup> 邓子新<sup>1</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 上海 200240)

(2. 上海交通大学 附属中学 上海 200439)

**摘要:**【目的】探究含有抗肿瘤活性喜树碱的喜树(*Camptotheca acuminata* Decne.)种子中内生放线菌的多样性, 以及从内生放线菌中寻找新型活性化合物产生菌。【方法】利用放线菌富集培养基分离喜树种子内生放线菌, 并根据菌落形态及 16S rRNA 基因序列同源性分析进行菌种鉴定; 以及利用与病原微生物共培养方法检测分离菌株的抗菌活性。【结果】从上海交通大学校园的喜树种子中共分离到 33 株内生疑似放线菌, 经基于 16S rRNA 基因序列分析的分子鉴定, 确定其中 21 株属于链霉菌, 1 株属于拟诺卡氏菌, 另有 3 株由于序列相似性低于 95% 而无法分类; 8 株因未能克隆 16S rRNA 基因序列而未确定分类。这 11 株疑似内生放线菌是否是新放线菌(种)类群, 有待后续深入研究。初步的抗细菌、真菌活性检测发现, 分离到的内生放线菌中 42.42% 以上对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)有很强的抑制菌核形成的作用, 54.54% 内生菌有较强抑制芽孢杆菌生长的作用。并且挑选其中具有代表性的菌株 *Streptomyces* sp. CXSZ1 进行代谢产物的分析, 初步发现其代谢产物中含有抗细菌活性成分。【结论】喜树种子内生放线菌的分离、鉴定及生物活性物质分离鉴定的研究工作, 一方面可以为揭示喜树等高等植物种子内生菌的起源、演化等提供有价值的信息, 同时也为新结构、新活性化合物发掘提供实验材料。

**关键词:** 喜树种子, 内生放线菌, 分离纯化, 分子鉴定, 抗菌活性物质

## Isolation and identification of endophytic actinomycetes from the seeds of *Camptotheca acuminata* Decne. and isolation of antimicrobial substances from those endophytic actinomycetes

YAO Xiao-Ling<sup>1</sup> KANG Qian-Jin<sup>1</sup> XIONG Shun-Zi<sup>1</sup> LI Fang<sup>1</sup> WANG Yi<sup>2</sup>  
LIN Shuang-Jun<sup>1</sup> BAI Lin-Quan<sup>1</sup> MA Wei<sup>1\*</sup> DENG Zi-Xin<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Microbial Metabolism, School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China)

(2. High School Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200439, China)

**Abstract:** [Objective] The seeds of *Camptotheca acuminata* Decne. containing camptothecin (an anticancer agent), was investigated to explore the endophytic actinomycetes diversity and screen for new active compounds producing strain. [Methods] The seeds of *C. acuminata* Decne. were sliced

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(No. 2012ZX08011002-004); 国家自然科学基金项目(No. 31121064)

\*通讯作者: Tel: 86-21-34206722; ✉: wma@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2013-07-24; 接受日期: 2013-12-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-02

and plated on different selective media after surface sterilization. Colonies that looked like actinomycetes were selected, and identified according to the colonial morphology and 16S rRNA sequence analysis. Strains isolated were tested for antimicrobial activity using co-culture method. **[Results]** Thirty-three suspected endophytic actinomycetes strains were isolated from the *C. acuminata* Decne. seeds collected in campus of Shanghai Jiao Tong University. Among the suspected endophytic actinomycetes isolated, twenty-one were identified as *Streptomyces*, one was *Nocardiopsis* by 16S rRNA sequence analysis. Three endophytes were left to be determined due to low sequence similarity (less than 95%). The other eight strains were failed to be identified because of failure of their 16S rRNA sequence cloning. Further study was needed to determine whether or not these eleven strains were new actinomycetes species. Preliminary antibacterial and antifungal activity survey of strains isolated showed that approximately 42.42% of them can strongly inhibit the sclerotia formation of *Rhizoctonia solani* Kühn, and 54.54% of them can strongly inhibit the growth of *Bacillus subtilis*. Further, the metabolites of one representative strain—*Streptomyces* sp. CXSZ1 was studied and found to contain antibacterial compounds. **[Conclusion]** Study of isolation and identification of endophytic actinomycetes from the *C. acuminata* Decne. seeds and isolation of antimicrobial substances from the endophytic actinomycetes not only revealed the origination and evolution of endophytes in *C. acuminata* Decne. seeds, but also provided unique material for mining new structural and new bio-active compounds.

**Keywords:** *C. acuminata* Decne. seeds, Endophytic actinomycetes, Isolation and purification, Molecular identification, Antimicrobial substances

植物内生菌长期生活于某种植物内部,因其独特的生存环境,可能进化出与宿主植物类似的代谢途径与产物<sup>[1]</sup>。近年来,植物内生菌作为一种新的微生物资源,而成为天然产物发掘的热点,并成功筛选到了紫杉醇<sup>[2]</sup>、鬼臼毒素<sup>[3]</sup>、长春碱<sup>[4]</sup>等化合物产生菌。获得特定生物活性物质产生菌,不仅为环保、可持续生产天然产物,及实现规模化生产提供了有利条件<sup>[5]</sup>;同时,也为复杂天然产物生物合成途径理论研究提供了更好的实验材料。

喜树为我国特有珙桐科高大乔木,其次生代谢产物中的喜树碱(Camptothecin, CPT)通过作用于拓扑异构酶 I (Topo I),而诱导细胞凋亡<sup>[6]</sup>。喜树碱及其衍生物已被广泛应用于肝癌、胃癌、膀胱癌及白血病等的临床治疗<sup>[7]</sup>。

迄今对于喜树内生菌的研究主要集中在内生真菌,并且已经发现了能够产喜树碱的内生真菌<sup>[8]</sup>;对喜树的根、茎、叶等器官中的内生放线菌已有研究<sup>[5]</sup>,但对喜树种子内生放线菌的研究尚未见报道。而种子是植物物种延续的重要繁殖体,种子内生菌因长期、稳定的进化选择,可能比植物其

他器官中的内生菌有更高几率演化出与宿主相似的次生代谢途径。

本实验试图通过系统分离喜树种子中以放线菌为主的内生菌,了解喜树种子中内生放线菌的群落结构。同时,通过分析喜树种子内生菌的代谢谱,探究喜树种子内次生代谢物质的生源,为寻找新型化合物产生菌和开发利用新型活性物质提供重要的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 喜树种子:** 2010年10月、11月、12月分4次采集多棵生长于上海交通大学闵行校区内的喜树(*C. acuminata* Decne.)种子,其中12月采集的是黄褐化、接近风干的成熟果实。

**1.1.2 指示菌株:** (1) 指示细菌:金黄色葡萄球菌 N315 (*Staphylococcus aureus* Rosenbach N315), 铜绿假单胞临床分离菌(*Pseudomonas aeruginosa*), 枯草芽孢杆菌 NP40 (*Bacillus subtilis* NP40), 枯草芽孢杆菌 800 (*B. subtilis* 800); (2) 指示植物病原真菌:小麦赤霉菌(*FusaHum graminearum* Sehwa), 串

珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme* Sheld), 水稻纹枯病致病菌[*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk]; 以上菌株均为本实验室保存。

**1.1.3 主要生化试剂及仪器:** 萘啶酮酸购自 Sigma-Alderich 公司; 溶菌酶、蛋白酶 K 等试剂购自 Amresco 公司; KOD-plus 高保真 DNA 聚合酶购自 Toyobo 公司; 1 kb DNA Marker 等购自上海东盛生物科技有限公司; PCR 产物纯化试剂盒、胶回收试剂盒购自上海捷瑞生物工程有限公司; 克隆载体-TaKaRa pMD18-T simple 购自上海皓嘉科技发展有限公司。化合物分离采用美国 Agilent 公司 Agilent 1260 series HPLC 进行, 分析柱为 Ascentis® C<sub>18</sub> (25 cm×4.6 mm, 5 μm)反相柱, 制备柱为 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (25 cm×9.4 mm, 5 μm)反相柱。

**1.1.4 培养基:** (1) 细菌培养基: LB 培养基<sup>[9]</sup>。(2) 植物病原真菌培养基: PDA 培养基<sup>[10]</sup>。(3) 喜树内生放线菌富集培养基: YS 培养基<sup>[11]</sup>、YMG (ISP2) 培养基<sup>[12]</sup>、Waksman 培养基<sup>[13]</sup>、无机盐-淀粉(ISP4) 培养基<sup>[12]</sup>、甘油-天冬酰胺(ISP5)培养基<sup>[12]</sup>、高氏一号培养基<sup>[14]</sup>、克氏合成一号培养基<sup>[14]</sup>、Corn 培养基(玉米粉 20 g/L, Saline standard solution 1 mL, pH 7.2)、Oatmeal (ISP3)培养基<sup>[12]</sup>、Soy 培养基(大豆粉 20 g/L, Saline standard solution 1 mL, pH 7.2)等, 倒培养皿前分别加入 20 mg/L 萘啶酮酸。(4) 放线菌固体发酵培养基: MS 培养基<sup>[14]</sup>。(5) 放线菌液体培养基: YEME 培养基<sup>[15]</sup>。Saline standard solution (g/L): FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 1, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1。

**1.1.5 引物:** 为提高扩增成功率并获得尽可能长的内生菌的 16S rRNA 基因序列及使扩增序列更加准确, 本研究采用了 4 对引物, 分别扩增不同区段, 引物具体信息见表 1。其中引物 4 为通用引物<sup>[16]</sup>, 引物 1–3 为根据公共数据库中的放线菌 16S rRNA 基因序列分析结果自行设计的引物, 以上引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 方法

**1.2.1 内生放线菌的分离方法:** 将采到的喜树果实去果肉, 进行种子表面消毒处理, 消毒步骤参照 Tobias Kieser 等<sup>[14]</sup>的方法。将消毒后的种子置于无菌滤纸上滤干, 用无菌手术刀切成小块 (1–2) mm×(1–2) mm 置于 10 种不同的放线菌富集培养基上, 28 °C 培养箱中暗培养。待喜树种子小切块经 4–5 周时间的培养, 陆续有内生菌菌落出现时, 挑取具有典型放线菌菌落形态与质地的菌落, 转接到相应的培养基上, 经 2–3 次纯培养传代后, 刮取孢子于 20%甘油中, –80 °C 长期保存。

**1.2.2 内生放线菌的鉴定:** 对纯化后的不同内生疑似放线菌进行液体培养, 采用 Tobias Kieser 等<sup>[14]</sup>的方法提取各内生菌的总 DNA。利用 4 对 16S rRNA 基因序列扩增引物对分离到的内生疑似放线菌进行 16S rRNA 基因序列扩增, 并对扩增产物经 TA 克隆后进行测序。将每株内生菌的不同引物扩增片段拼接、整理后分别用 EzTaxon server 2.1 (<http://147.47.212.35:8080/>)公共数据库进行分析比对, 初步鉴定各株内生菌的种属地位。

表 1 喜树种子内生放线菌 16S rRNA 基因序列扩增引物				
Table 1 Amplification primers of 16S rRNA sequences of endophytic actinomycetes from seeds of <i>C. acuminata</i> Decne.				
Primer	Sequence (5'→3')	Size (bp)	Location	Product size (kb)
Primer1: Forward	TGGCGAACGGGTGAGTAA	18	86	1.1
Reverse	CGCAGCCCAAGACATAAGG	19	1 201	
Primer2: Forward	TGGCGAACGGGTGAGTAA	18	86	1.3
Reverse	ATGACGTGACGGGCGGTGT	19	1 389	
Primer3: Forward	TGGCGAACGGGTGAGTAA	18	95	1.4
Reverse	CCGGTACGGCTACCTTGTTA	20	1 503	
Primer4: Forward	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG	21	8	1.5
Reverse	CGGCTACCTTGTTACGAC	18	1 492	

**1.2.3 基于 16S rRNA 基因序列比对的喜树内生放线菌进化关系分析:** 利用 MEGA 5.1 对分离到的喜树内生放线菌 16S rRNA 基因序列及其公共数据库中最为相似的菌株 16S rRNA 基因序列采用 Neighbor-Joining 法<sup>[16]</sup>构建系统发育树, 以分析喜树内生放线菌进化关系。

**1.2.4 生物活性检测:** 参照李芳等<sup>[17]</sup>的实验方法, 分别检测各内生菌的抗细菌及抗真菌活性。

**1.2.5 固体发酵及活性物质的初步分离:** 采用固体发酵的方法, 保存菌种经活化后, 接种到固体 MS 培养基上, 28 °C 培养 8–10 d, 将菌体及培养基切成小的菌块, 浸泡于无水乙醇中过夜, 滤去固体物, 减压蒸发去乙醇后进行乙酸乙酯萃取。取有机相减压蒸干后溶于甲醇中, 然后进行正相硅胶柱初分离, 流动相为石油醚:乙酸乙酯=5:1 (体积比); 石油醚:乙酸乙酯=1:1 (体积比); 氯仿:甲醇=8:1 (体积比)。三组流动相分别过 3 个柱体积进行样品分离。共收集了 121 个馏分(15 mL/馏分), 对各个馏分进行 TLC 检测, 分析后进行相关馏分的生物活性检测, 并根据结果进行进一步 HPLC 分析及纯化。

**1.2.6 HPLC 分析及分离纯化:** 取检测具有生物活性的馏分进行 HPLC 分析及分离纯化制备, 得到纯化的各个物质。进一步做生物活性检测后, 确定具有生物活性的物质峰, 并大量制备。HPLC 分析(流动相: 甲醇-水, 流速: 1 mL/min, 进样体积: 10 µL)与制备(流动相: 甲醇-水, 流速: 4 mL/min, 进样体积: 100 µL)均采用相同的检测波长(210、254、273、310、380 nm)及程序(0–19 min: 50%甲醇洗脱; 19–20 min: 50%–100%甲醇梯度; 20–25 min: 100%甲醇; 25–26 min: 100%–50%甲醇梯度; 26–40 min: 50%甲醇平衡)。

## 2 结果与分析

### 2.1 内生菌的分离纯化

对添加萘啶酮酸的放线菌富集培养基上出现的形态具有典型放线菌特征的菌落进行进一步分离、纯化与保种, 并通过菌落形态、气生菌丝、基质菌丝、色素颜色等特性进行筛选, 去除重复后共

得到 33 株内生疑似放线菌(图 1)。

在本研究中试验的 10 种不同放线菌富集培养基中, 高氏一号和克氏合成一号培养基是对喜树内生放线菌较合适的分离培养基, 两种培养基分别分离到 15 株与 8 株内生疑似放线菌, 占总分离菌株的近 70% (图 2)。

同时, 实验发现从未成熟喜树种子中分离到内生疑似放线菌数量(24 株)大大多于成熟喜树种子中分离到的内生疑似放线菌数量(9 株), 详见图 3 与表 2。

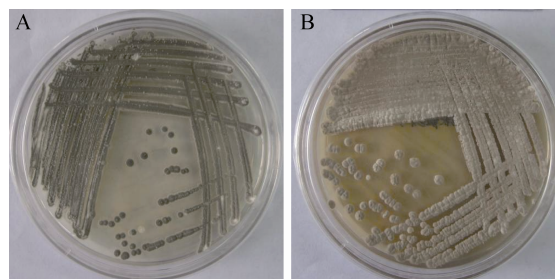


图 1 分离到的 XSZ 3 号(A)和 CXSZ 4 号(B)疑似内生放线菌的菌落形态

Figure 1 The colonial morphology of suspected endophytic actinomycetes No. XSZ 3 (A) and CXSZ4 (B)

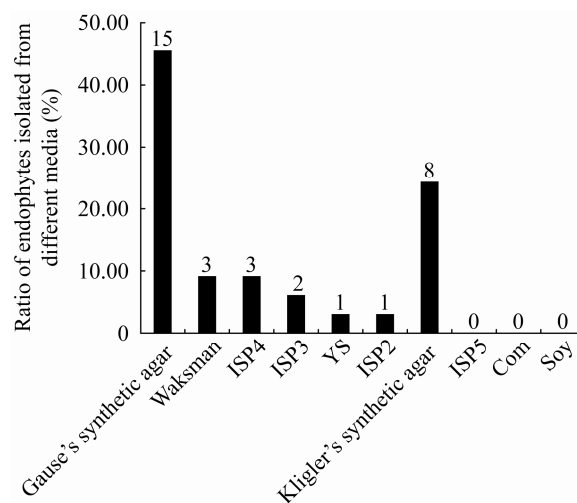


图 2 不同培养基分离喜树种子内生菌菌株数量

Figure 2 Amount of endophytes isolated from seeds of *C. acuminata* Decne. by different media

注: 柱上所标数字表示在该培养基上分离到的内生疑似放线菌数量。

Note: Numbers above the column represent the amount of suspected endophytic actinomycetes isolated from different media.

2.2 喜树内生菌分子鉴定

通过形态观察与基于 16S rRNA 基因序列分析相结合的方法，从分离到的 33 株喜树种子内生疑似放线菌中鉴定出了 22 株(占分离到内生菌总数的 66.67%)，其中 21 株属于链霉菌(占完成鉴定菌株的 95.45%)；1 株属于拟诺卡氏菌。在 22 株内生放线菌中，9 株属于或与密旋链霉菌最相似(占完成鉴定菌株的 40.91%)；4 株属于或与海德拉巴链霉菌最相似(占完成鉴定菌株的 18.18%)；另有微小链霉菌、唐德链霉菌、绿淀粉酶链霉菌和达松维尔拟诺卡氏菌达松维尔亚种各 1 株；其余 5 株内生菌仅能鉴定到链霉菌属。详细喜树内生菌鉴定结果见表 2。

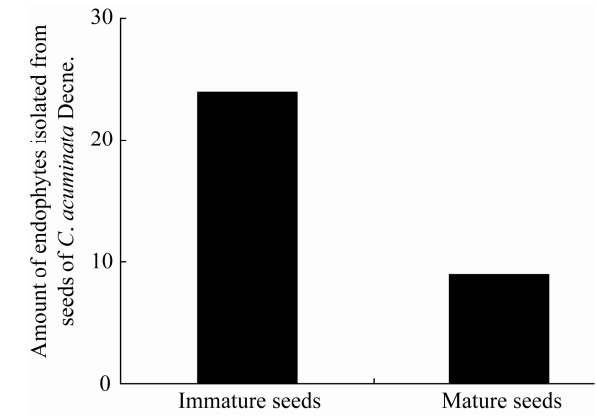


图 3 在喜树不同成熟度种子中分离到的内生菌数量  
Figure 3 Amount of endophytes isolated from *C. acuminata* Decne. seeds at different development stage

表 2 基于 16S rRNA 基因序列分析的喜树种子内生菌鉴定结果				
Table 2 Identification results of endophytes isolated form <i>C. acuminata</i> Decne. seeds by 16S rRNA gene sequence analysis				
喜树种子 <i>C. acuminata</i> Decne. seeds	菌株编号 Strain No.	EzTAXon 数据库中最相似的菌种及中文名 The most similar species in EzTAXon database and their Chinese names	分数 Score	分类鉴定 Identification
未成熟喜树种子 Immature seeds of <i>C. acuminata</i> Decne.	XSZ 1	海德拉巴链霉菌 <i>Streptomyces hyderabadensis</i> OU-40(T)	96.143	链霉菌属
	XSZ 2	海德拉巴链霉菌 <i>Streptomyces hyderabadensis</i> OU-40(T)	95.120	链霉菌属
	XSZ 3	海德拉巴链霉菌 <i>Streptomyces hyderabadensis</i> OU-40(T)	98.143	海德拉巴链霉菌
	XSZ 4	帚形假单胞菌 <i>Pseudomonas alcaliphila</i> AL15-21(T)	94.487	待定
	XSZ 5	<i>Pseudomonas seleniipraecipitatus</i> CA5(T)	90.613	待定
	XSZ 6	微小链霉菌 <i>Streptomyces parvulus</i> NBRC 13193(T)	98.255	微小链霉菌
	XSZ 7	海德拉巴链霉菌 <i>Streptomyces hyderabadensis</i> OU-40(T)	98.283	海德拉巴链霉菌
	XSZ 8	海德拉巴链霉菌 <i>Streptomyces hyderabadensis</i> OU-40(T)	97.875	海德拉巴链霉菌
	XSZ 9	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	97.514	密旋链霉菌
	XSZ 10	橄榄链霉菌 <i>Streptomyces olivaceus</i> NBRC 12805(T)	95.323	链霉菌属
	XSZ 12	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	99.863	密旋链霉菌
	XSZ 13	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	99.726	密旋链霉菌
	XSZ 14	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	99.110	密旋链霉菌
	XSZ 15	海德拉巴链霉菌 <i>Streptomyces hyderabadensis</i> OU-40(T)	97.784	海德拉巴链霉菌
	XSZ 17	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	99.247	密旋链霉菌
	XSZ 18	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	99.313	密旋链霉菌
	XSZ 19	达松维尔拟诺卡氏菌达松维尔亚种 <i>Nocardioopsis dassonvillei</i> subsp. <i>albirubida</i> DSM 40465(T)	97.299	达松维尔拟诺卡氏菌达松维尔亚种
	XSZ 20	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	92.473	待定
	XSZ 21	橄榄链霉菌 <i>Streptomyces olivaceus</i> NBRC 12805(T)	96.355	链霉菌属
	XSZ 22	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	98.426	密旋链霉菌
成熟喜树种子 Mature seeds of <i>C. acuminata</i> Decne.	CXSZ 1	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	98.202	密旋链霉菌
	CXSZ 2	唐德链霉菌 <i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812(T)	97.930	唐德链霉菌
	CXSZ 3	长孢红色链霉菌 <i>Streptomyces longispororuber</i> NBRC 13488(T)	96.449	链霉菌属
	CXSZ 4	密旋链霉菌 <i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433(T)	99.863	密旋链霉菌
	CXSZ 8	绿淀粉酶链霉菌 <i>Streptomyces viridodiataticus</i> NBRC 13106(T)	99.847	绿淀粉酶链霉菌

XSZ 11、XSZ 16、XSZ 23、XSZ 24、CXSZ 5、CXSZ 6、CXSZ 7 和 CXSZ 9 等 8 株内生菌因未能克隆 16S rRNA 基因序列, 分子鉴定未进行。

### 2.3 喜树内生菌进化关系

图 4 为以 MEGA 5.1 中的 Neighbor-Joining 算法构建的喜树种子内生放线菌的系统进化树,通过

分析该系统进化树,发现分离到的喜树种子内生放线菌主要分成两簇,其中一簇全部为分离得到的内生菌菌株,并不与各自数据库中比对获得的最相似菌株聚在一起,说明它们之间的相似程度高于公共数据库中的菌株;另一簇为部分分离得到的内生菌菌株与各自数据库中比对获得的最相似菌株。

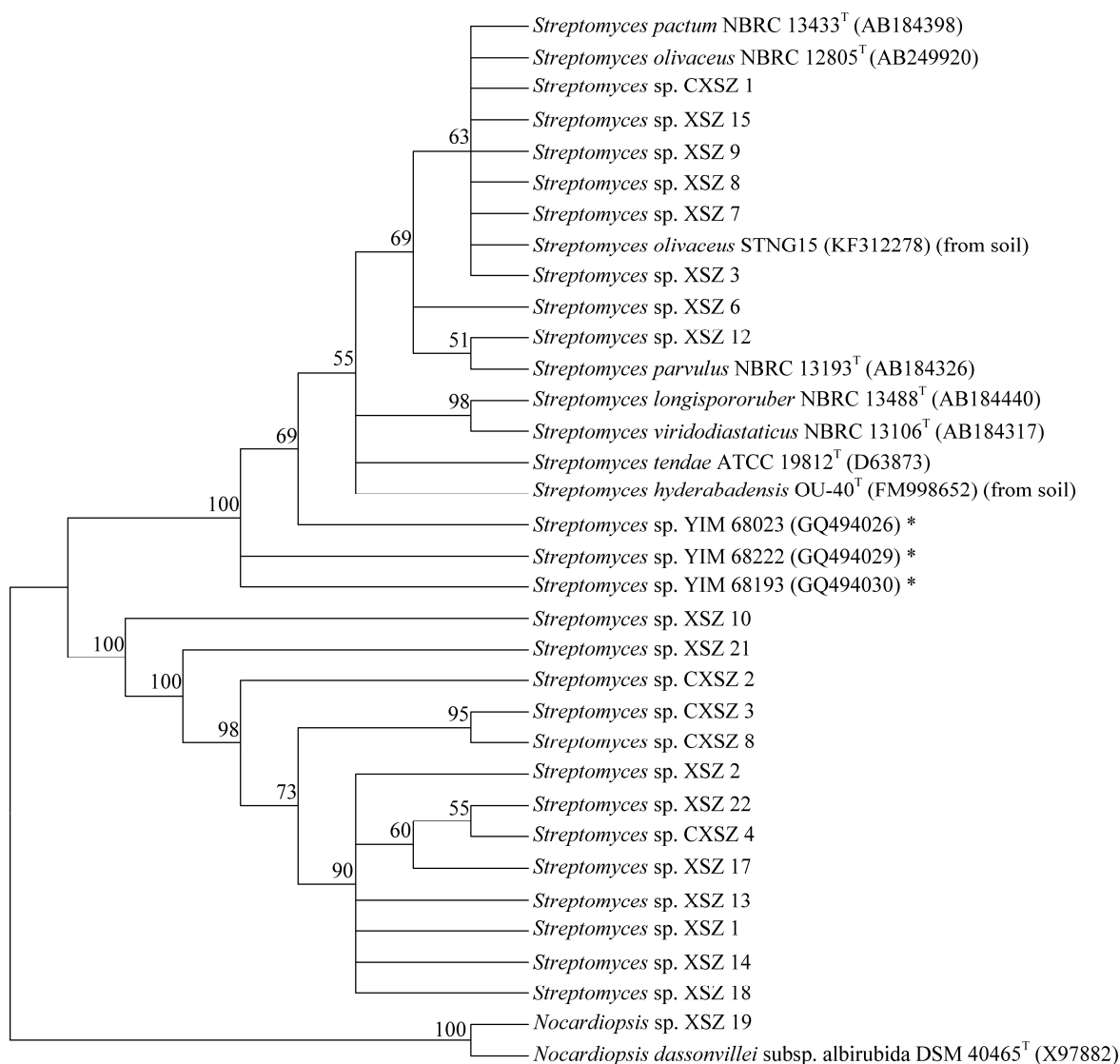


图 4 基于 16S rRNA 基因序列比对的喜树种子内生放线菌的系统进化树

Figure 4 Phylogenetic tree of endophytic actinomycetes isolated from *C. acuminata* Decne. seeds based on 16S rRNA gene sequence alignment

Note: The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on N-J analysis of 1 000 resampled data sets. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. \*: Endophytic streptomyces isolated from leaf, root and tree bark of *C. acuminata* Decne. in Yunnan province<sup>[5]</sup>.

2.4 抗菌活性检测

2.4.1 抗细菌活性检测结果：表 3 和图 5 中显示，从喜树种子内分离到的 33 株内生菌中，54.54%的菌株(18 株)同时对 *B. subtilis* 800 和 *B. subtilis* NP40 有较强的抑制作用(++或+++);而只有 6.06%的内生放线菌(*S. sp.* XSZ4 和 *S. sp.* XSZ14 两株)同时对 *S. aureus* Rosenbach N315 和 *P. aeruginosa* 有较强抑制作用。

表 3 喜树种子内生菌抗细菌活性统计				
Table 3 The antibacterial activity of endophytes isolated from <i>C. acuminata</i> Decne. seeds				
Strain No.	<i>B. subtilis</i> 800	<i>B. subtilis</i> NP40	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i> Rosenbach N315
XSZ 1	+++	+++	-	-
XSZ 2	+++	+++	-	-
XSZ 3	+++	+++	-	-
XSZ 4	+++	+++	+++	++
XSZ 5	+++	+++	-	-
XSZ 6	-	-	-	-
XSZ 7	-	-	-	-
XSZ 8	+++	+++	-	-
XSZ 9	+++	+++	-	-
XSZ 10	+++	++	-	-
XSZ 11	+++	+++	-	-
XSZ 12	+++	+++	-	-
XSZ 13	+++	+++	-	-
XSZ 14	+++	+++	++	++
XSZ 15	+++	++	-	-
XSZ 16	+++	++	-	-
XSZ 17	+++	++	-	-
XSZ 18	+	+++	-	-
XSZ 19	-	-	-	-
XSZ 20	-	-	-	-
XSZ 21	+	+	-	-
XSZ 22	+++	+++	-	-
XSZ 23	-	-	-	-
XSZ 24	-	-	-	-
CXSZ 1	-	-	-	-
CXSZ 2	+	-	-	-
CXSZ 3	-	-	-	-
CXSZ 4	-	-	-	-
CXSZ 5	+++	+++	-	-
CXSZ 6	++	+	-	-
CXSZ 7	+	-	-	-
CXSZ 8	-	-	-	-
CXSZ 9	-	-	-	-

注：+：有弱抑菌作用(抑菌圈 8 mm)；++：有较强抑菌作用(抑菌圈 10 mm)；+++：有很强抑菌作用(抑菌圈 12 mm)；-：无抑菌作用。

Note: +: Weak inhibitory effect (Inhibitory zone 8 mm); ++: Strong inhibitory effect (Inhibitory zone 10 mm); +++: Very strong inhibitory effect (Inhibitory zone 12 mm); -: Have no inhibitory effect.

2.4.2 抗真菌活性检测结果: 如表 4 所示,分离到的 33 株喜树种子内生菌中, 63.64%的菌株(21 株)对 *T. cucumeris* (Frank) Donk 的菌核形成有抑制作用, 其中 42.42%的菌株(14 株)具很强抑制作用。

对 *T. cucumeris* (Frank) Donk 有生长抑制作用的菌株为 36.36% (12 株), 且抑制作用较弱。对小麦赤霉病病原菌仅有一株有弱的抑制作用,未发现对串珠镰刀菌有抑制作用的菌株。

表 4 喜树种子内生菌抗真菌活性统计				
Table 4 The antifungal activity of endophytes isolated from <i>C. acuminata</i> Decne. seeds				
Strain No.	<i>T. cucumeris</i> (Frank) Donk		<i>F. graminearum</i> Sehw	<i>F. moniliforme</i> Sheld
	Inhibition of sclerotia formation	Inhibition of colony growth		
XSZ 1	+++	+	-	-
XSZ 2	+++	-	-	-
XSZ 3	++	+	-	-
XSZ 4	-	-	-	-
XSZ 5	+++	++	-	-
XSZ 6	-	-	-	-
XSZ 7	+++	+	-	-
XSZ 8	+++	+	-	-
XSZ 9	+++	+	-	-
XSZ 10	++	-	-	-
XSZ 11	-	-	-	-
XSZ 12	+++	-	-	-
XSZ 13	++	-	-	-
XSZ 14	+++	-	-	-
XSZ 15	+	-	-	-
XSZ 16	+	-	-	-
XSZ 17	+++	+	-	-
XSZ 18	+++	++	-	-
XSZ 19	-	-	-	-
XSZ 20	+	-	-	-
XSZ 21	+++	+	-	-
XSZ 22	++	-	+	-
XSZ 23	-	-	-	-
XSZ 24	-	-	-	-
CXSZ 1	+++	+	-	-
CXSZ 2	-	-	-	-
CXSZ 3	-	-	-	-
CXSZ 4	+++	++	-	-
CXSZ 5	+++	++	-	-
CXSZ 6	-	-	-	-
CXSZ 7	-	-	-	-
CXSZ 8	-	-	-	-
CXSZ 9	-	-	-	-

注: +: 有弱抑菌作用(抑菌圈 8 mm); ++: 有较强抑菌作用(抑菌圈 10 mm); +++: 有很强抑菌作用(抑菌圈 12 mm); -: 无抑菌作用。

Note: +: Weak inhibitory effect (Inhibitory zone 8 mm); ++: Strong inhibitory effect (Inhibitory zone 10 mm); +++: Very strong inhibitory effect (Inhibitory zone 12 mm); -: Have no inhibitory effect.



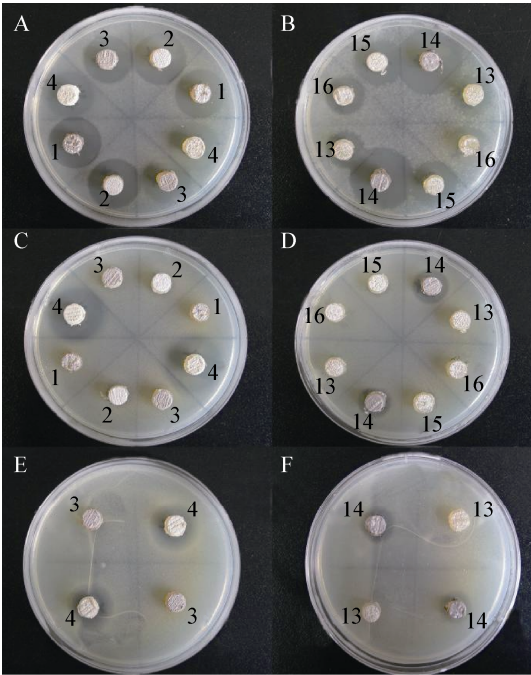


图 5 内生菌对细菌的抑菌作用  
**Figure 5 The inhibitory effect of endophytes to bacteria**  
Note: 1-4: Endophytes strain No. XSZ 1-XSZ 4; 13-16: Endophytes strain No. XSZ 13-XSZ 16. A: *B. subtilis* 800; B: *B. subtilis* NP40; C, D: *P. aeruginosa*; E, F: *S. aureus* Rosenbach N315.

从图 6 中可以看到 ,喜树内生菌 *S. sp. CXSZ 1* 与 *T. cucumeris* (Frank) Donk 共培养初期(3 d) ,*S. sp. CXSZ 1* 对 *T. cucumeris* (Frank) Donk 具有弱的抑

制生长作用。共培养后期(6、11 d) , *S. sp. CXSZ 1* 周围虽有 *T. cucumeris* (Frank) Donk 的菌丝生长 , 但均无法形成菌核。该结果表明 , *S. sp. CXSZ 1* 能够产生抑制 *T. cucumeris* (Frank) Donk 生长及菌核形成的物质。

2.5 内生菌活性物质的分离检测

对筛选到的内生菌 *S. sp. CXSZ1* (对 *T. cucumeris* (Frank) Donk 有很强的抑制菌核形成作用)固体发酵后的产物进行萃取 , 浓缩 , 正相硅胶柱初分离后 , 共得到 121 个馏分 , 对各馏分进行 TLC 检测(图 7)及抑菌活性检测后 , 初步确定抑菌活性成分主要分布在 41-48 号馏分中。

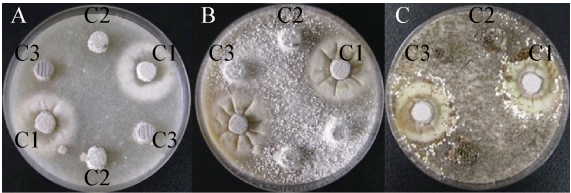


图 6 喜树内生菌 *S. sp. CXSZ 1, 2, 3* 对 *T. cucumeris* (Frank) Donk 的抑制作用  
**Figure 6 The inhibitory effect of *S. sp. CXSZ 1, 2, 3* to *T. cucumeris* (Frank) Donk**  
Note: C1-C3: *S. sp. CXSZ 1-S. sp. CXSZ 3*. A: Co-cultured for 3 days; B: Co-cultured for 6 days; C: Co-cultured for 11 days.

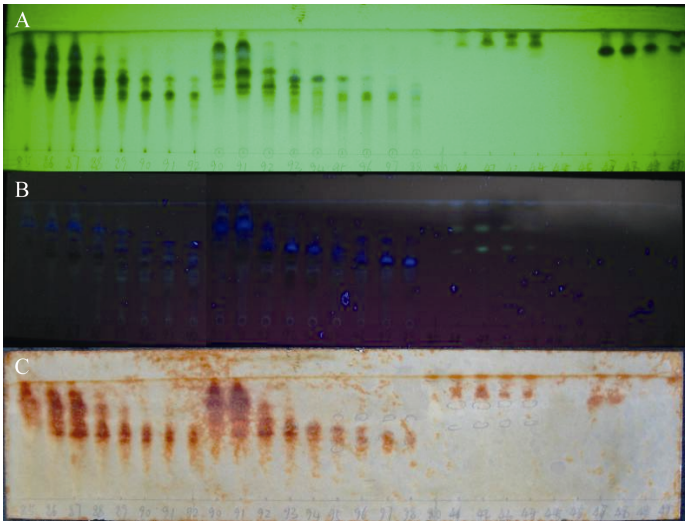


图 7 *S. sp. CXSZ1* 发酵液正相硅胶柱分离得到不同馏分的 TLC 检测  
**Figure 7 TLC assay of different fractions of *S. sp. CXSZ1* broth after normal phase silica gel column purification**  
Note: A: UV wave length at 254 nm; B: UV wave length at 365 nm; C: Bismuth potassium iodide colorimetry.

从图 8 中可以看到, 42–44 号馏分对 *B. subtilis* 800 有弱的抑制生长作用, 43–46 号馏分对 *B. subtilis* NP40 有弱的抑制生长作用。

进一步对 41–48 号馏分进行 HPLC 分析和分离制备, 其 HPLC 分析得到的峰谱图详见图 9。

### 3 讨论

本工作共尝试了 10 种放线菌富集培养基, 从四批次喜树种子约 2 400 个外植体中, 最终分离到 33 株内生菌。而朱文勇等<sup>[5]</sup>从生长于云南的喜树根、茎、叶等器官的几克材料中即分离到 90 株内生放线菌; 对于两实验结果的差异, 推测主要是由于本实验是以喜树种子为实验材料, 而朱文勇等是以喜树根、茎、叶为材料。由于种子是受植物高度保护的封闭性的器官, 导致内生菌种类、数量比其他植物器官要少。此外, 在喜树种子内生菌的分离工作中发现, 喜树种子中的内生菌不仅数量和

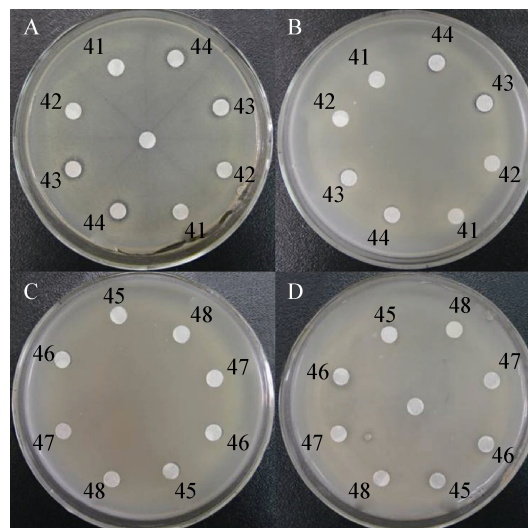


图 8 *S. sp. CXSZ1* 发酵液正相硅胶柱分离的不同馏分抗细菌活性检测

**Figure 8 The antibacterial activity of different fractions of *S. sp. CXSZ1* broth after normal phase silica gel column purification**

Note: 41–48: No. 41–48 fractions from normal phase silica gel column. A, C: *B. subtilis* 800; B, D: *B. subtilis* NP40.

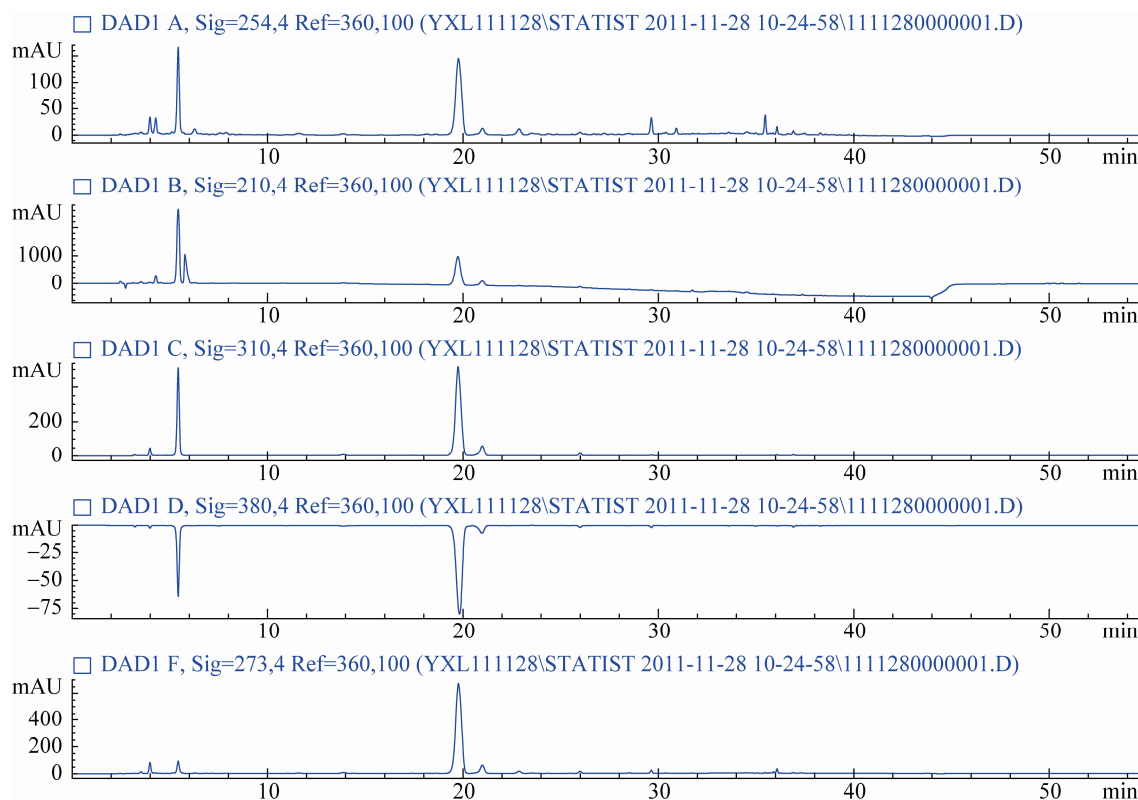


图 9 41 号馏分 HPLC 峰谱图

**Figure 9 HPLC result of fraction No. 41**

种类非常少,而且生长非常缓慢,多数内生菌要培养 6–8 周后才逐渐出现,该现象是否是种子内生菌的共同特性,还有待深入研究。

从未成熟喜树种子中分离到的内生菌(24 株)比成熟种子(9 株)要多近 3 倍(图 3);同时,在成熟喜树种子与未成熟喜树种子中均能分离到的内生放线菌只有密旋链霉菌(表 2),即喜树种子成熟过程中,内生菌群落结构是动态变化的,该现象暗示喜树对其种子中的内生菌存在选择作用<sup>[18-19]</sup>,对这一现象还需更多实验数据验证。

25 株成功克隆 16S rRNA 基因序列的内生菌中共鉴定出 22 株,另有 3 株由于序列相似性低于 95%,而无法确定分类地位,推测这 3 株内生菌很可能是新种甚至新属;同时,有 8 株内生菌未能成功克隆其 16S rRNA 基因序列,推测这 8 株菌为与已知放线菌进化关系较远的微生物,如稀有放线菌等,后续工作将对这 11 株菌进行深入研究。

在对分离到的内生菌的 16S rRNA 基因序列进行聚类分析(图 4)时加入了 3 株分离自云南喜树根、叶和树皮的内生放线菌<sup>[5]</sup>,从图 4 中可以看到,其呈现混杂分布的现象,说明两地的喜树内生放线菌有较高的相似性。对于该现象,推测可能由于喜树(宿主)与其内生菌两者之间存在相互选择作用;或者是由于两地喜树的内生菌存在共同起源。

抗细菌活性检测结果显示(表 3),54.54%的喜树内生菌能够抑制 *B. subtilis* 800 和 *B. subtilis* NP40 的生长,而仅 6.06%的内生菌能够抑制 *S. aureus* Rosenbach N315 和 *P. aeruginosa* 的生长。推测 *B. subtilis* 为自由生活细菌,而 *S. aureus* Rosenbach 和 *P. aeruginosa* 多为生活于动物(如:人类)体表甚至体内的细菌,长期进化选择导致喜树倾向于保留能够抑制可能侵害自身病菌的微生物并与其共生。

在抗真菌活性检测实验中发现,大部分的内生菌虽然对立枯丝核菌(*R. solani* Kühn-水稻纹枯病致病菌)菌丝生长的抑制作用较弱,但 42.42%的内生菌对立枯丝核菌的菌核形成有非常强的抑制作

用。鉴于立枯丝核菌是一种重要的植物病原真菌,寄主范围广,除了危害水稻引起纹枯病外,还能侵害其它禾谷类作物以及蔬菜、花卉等经济作物<sup>[20]</sup>,而菌核又与其存活及侵染宿主能力密切相关<sup>[21]</sup>,因此后续研究将对喜树内生菌中该活性物质进行分离鉴定。

本研究从生长于上海地区的喜树种子中分离、鉴定出了 22 株内生放线菌,并对其进行了抗菌活性研究,为后续深入开展新结构、新活性次生代谢产物发掘打下基础。

致谢:本研究在进行过程中得到了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、学院仪器平台、学校分析测试中心多位老师的帮助、指导,课题组多位同学参与了本研究的部分工作,在此,一并表示衷心感谢。

## 参 考 文 献

- [1] 郝晓娟. 植物内生菌[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 1-52.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of *Pacific yew*[J]. Science, 1993, 260(5105): 214-216.
- [3] 李海燕, 曾松荣, 张玲琪. 云南桃儿七植株地下茎内生真菌多样性及有价值菌株的筛选[J]. 西南农业学报, 1999, 12(4): 123-125.
- [4] 张玲琪, 郭波, 李海燕. 长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究[J]. 中草药, 2000, 31(11): 805-807.
- [5] 朱文勇, 李洁, 赵国振, 等. 喜树内生放线菌多样性及抗菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2010, 37(2): 211-216.
- [6] 陈贤兴, 陈析丰, 南旭阳, 等. 喜树果内生真菌的分离与鉴定[J]. 河南科学, 2003, 21(4): 431-433.
- [7] 刘吉华, 余伯阳. 喜树内生真菌的分离及其抗肿瘤活性代谢产物的筛选方法[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(4): 6-10.
- [8] 汪学军, 闵长莉, 刘文博, 等. 一株产 10-羟基喜树碱喜树内生真菌的分离和鉴定[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(6): 407-411.
- [9] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2005: 1-1949.
- [10] Huang Y, Wang J, Li G, et al. Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya*

- grandis*[J]. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 2001, 31(2): 163-167.
- [11] Akihiro Y, Jodo O, Watanabe Y, et al. Anthracycline antibiotics: Europe, 94100239.6[P]. 1995-2-22.
- [12] Shirling EB, Gottlieb D. Methods for characterization of *Streptomyces* species[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340.
- [13] Mashima S, Ikeda Y. Selection of mutagenic agents by the *Streptomyces* reverse mutation test[J]. Applied Microbiology, 1958, 6(1): 45.
- [14] Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ. Practical streptomyces genetics[M]. UK: The John Innes Foundation Norwich, UK. CSHL press. 2000: 1-663.
- [15] 霍普伍德. 链霉菌遗传操作实验手册[M]. 邓子新, 等译. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988: 1-271.
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [17] 李芳, 康前进, 姚晓玲, 等. 基于化学遗传学筛选产萘醌类化合物内生放线菌[J]. 微生物学报, 2012, 52(4): 442-448.
- [18] Mishra A, Gond SK, Kumar A, et al. Sourcing the fungal endophytes: a beneficial transaction of biodiversity, bioactive natural products, plant protection and nanotechnology, in microorganisms in sustainable agriculture and biotechnology[M]. Berlin: Springer, 2012: 581-612.
- [19] Kusari S, Košuth J, Čellárová E, et al. Survival-strategies of endophytic *Fusarium solani* against indigenous camptothecin biosynthesis[J]. Fungal Ecology, 2011, 4(3): 219-223.
- [20] 彭绍裘, 曾昭瑞, 张志光, 等. 水稻纹枯病及其防治[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 1-214.
- [21] 中国农业百科全书总编辑委员会. 中国农业百科全书: 植物病理学卷[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 1-740.

(上接 p.1081)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>