

宁夏白芨滩自然保护区苦豆子内生放线菌多样性及其分布

祁鹤兴¹ 周星辰¹ 胡美娟¹ 高媛¹ 陈亚萍¹ 张庆宸² 顾沛雯^{1*}

(1. 宁夏大学 农学院 宁夏 银川 750021)

(2. 山东大学 药学院 山东 济南 250012)

摘要:【目的】探索宁夏干旱荒漠区苦豆子内生放线菌的多样性及区系组成,为苦豆子内生放线菌的合理开发和利用提供理论依据。【方法】从宁夏白芨滩自然保护区不同植被和土壤类型的6个样区采集健康苦豆子样品30份,采用组织匀浆法从苦豆子植株的根部、茎部、叶部和种子中分离内生放线菌,根据培养性状、菌落、孢子等的形态特征和16S rRNA基因序列分析对分离菌株进行鉴定;根据苦豆子内生放线菌的相对频率、物种多样性指数、丰富度指数和相似性系数分析其区系组成特点。【结果】从30份苦豆子样品中,共分离得到内生放线菌111株,这些菌株分属于链霉菌属(*Streptomyces*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)、普劳斯氏菌属(*Prauserella*)、*Actinophytocola*、微杆菌属(*Microbacterium*)、束丝放线菌属(*Actinosynnema*)、嗜热油菌属(*Thermoleophilum*)、糖霉菌属(*Glycomyces*)和糖丝菌属(*Saccharothrix*)9个属,其中链霉菌属(*Streptomyces*)和拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)为优势属。苦豆子内生放线菌的分布具有一定的组织特异性,根和种子中的内生放线菌数量高于茎和叶。植被类型中,沙生植被草原(样区IV)分离的苦豆子内生放线菌物种多样性指数最高,而荒漠草原(样区V)最低。荒漠草原(样区V)和林地(样区VI)内生放线菌群落有密切的相似性。【结论】苦豆子体内含有丰富的内生放线菌资源,其内生放线菌具有很高的宿主特异性,而且其分布受生境影响。

关键词: 苦豆子, 内生放线菌, 多样性, 16S rRNA 基因序列分析

Diversity and distribution of endophytic actinomycetes strains in *Sophora alopecuroides* L. from Baijitan Nature Reserve of Ningxia

QI He-Xing¹ ZHOU Xing-Chen¹ HU Mei-Juan¹ GAO Yuan¹ CHEN Ya-Ping¹
ZHANG Qing-Chen² GU Pei-Wen^{1*}

(1. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

(2. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

Abstract: [Objective] The diversity and microflora composition of endophytic actinomycetes from

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30960228); 宁夏回族自治区科技支撑计划项目(No. NG2013)

*通讯作者: ✉: gupeiwen2013@126.com

收稿日期: 2014-08-24; 接受日期: 2014-10-21; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-10-22

Sophora alopecuroides L. in arid and desolate areas of Ningxia were analyzed, which could also provide research methods and theory on rational development and use of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L.. [Methods] The endophytic actinomycetes were separated and cultivated from 30 samples of healthy roots, stems, leaves and seeds of *Sophora alopecuroides* L. by tissue homogenate in six sample plots, where were sampled from different vegetations and soil types in Baijitan Nature Reserve of Ningxia. Endophytic actionmycetes were classified according to their morphological characteristics of culture, bacterial colonies and spores and 16S rRNA gene sequences analysis. Relative frequency (R_f), Shannon-wiener index (F), Margalef index (D) and Sorenson's similarity coefficient (C_s) were calculated to analyze their characteristics of microflora composition. [Results] 111 endophytic actinomycetes were isolated from 30 samples, and they belong to *Streptomyces*, *Nocardiopsis*, *Prausserella*, *Actinophytocola*, *Microbacterium*, *Actinosynnema*, *Thermoleophilum*, *Glycomyces* and *Saccharothrix* respectively, *Streptomyces* and *Nocardiopsis* were dominant genera. The distribution of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L. has some degree of tissue preference. Quantities of endophytic actinomycetes from roots and seeds of *Sophora alopecuroides* L. were more than ones of stems and leaves for the same plant. In different vegetations types, Shannon-wiener index (H') of endophytic actionmycetes from *Sophora alopecuroides* L. were most significantly in the sandy weeds (sample IV) and least in desert steppes (sample V). The community of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L. of desert steppe (sample V) and woodland (sample VI) has closely similarity. [Conclusion] From the experiment we can see that *Sophora alopecuroides* L. have abundant resources of endophytic actinomycetes, the species diversity of endophytic actinomycetes communities is affected both by its host preference and by its different habitats.

Keywords: *Sophora alopecuroides* L., Endophytic actinomycetes, Diversity, 16S rRNA gene sequences analysis

放线菌是一类具有重要应用价值的微生物资源, 目前报道的抗生素约有 80%是由放线菌产生的^[1]。然而植物内生放线菌是一类相对未开发的新微生物资源, 研究表明内生放线菌除了从宿主获得自身生长所需的营养物质外, 一些有益的内生放线菌还能提高宿主植物的抗逆性, 促进植物生长^[2]。植物内生放线菌广泛的分布于植物体根、茎、叶、花、果实和种子等器官、组织的细胞或细胞间隙中^[3], 其多样性受多种因素的影响, 如不同的区域或位点、气候条件、植被等均可影响植物内生放线菌类群的多样性。有研究表明湿润、低洼的雨林环境更适合植物内生放线菌在其宿主中定殖^[4], 植被丰富的热带或亚热带的常青植物中内生放线菌的数目和种类比生长在较干燥、寒冷环境下的植物内生放线菌更为丰富^[5-6]。

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.)为我国北方荒漠、半荒漠地区重要的沙生药用植物, 其功效主要有清热解毒、驱风燥湿、抗菌杀虫^[7]、抗肿瘤^[8]、

增强免疫^[9]等, 具有独特的民族药用历史, 是研究沙生药用植物内生放线菌及其活性代谢产物的绝好材料^[10]。目前国内外对苦豆子的研究主要集中在对其活性成分的分析以及相关功能性产品的研发上面^[11-13], 对其内生放线菌的研究报道还较少。

2009年, 顾沛雯^[14]从采自宁夏毛乌苏荒漠的野生苦豆子中分离得到 26 株内生放线菌, 经初步鉴定发现苦豆子内生放线菌以链霉菌属(*Streptomyces*)和诺卡氏菌属(*Nocardia*)菌株最多。2013年, 胡美娟等^[15]对 126 株苦豆子内生放线菌进行了产酶活性分析, 并对 8 株高产酶活性内生放线菌菌株进行了 16S rRNA 基因序列片段同源性分析, 发现 7 株活性菌株属于链霉菌属(*Streptomyces*), 1 株属于拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)。为了深入了解内生放线菌在其宿主苦豆子体内的生态功能和作用机制, 更好地挖掘和利用苦豆子内生放线菌资源, 本研究在宁夏白芨滩自然保护区分别选择了生长在植被和土壤类型不同的 6 种生境中的苦豆子作为研究对象, 分

析了它们的内生放线菌区系、种类组成及其分布特点, 以期为苦豆子内生放线菌的合理开发和利用提供理论依据。

宁夏灵武白芨滩自然保护区地处毛乌素沙漠西南边缘, 是一个以防风固沙造林, 保护生态环境为主的荒漠类型生态系统自然保护区。位于北纬 37°49'05"—38°20'53", 东经 106°20'22"—106°37'19", 属于我国西部鄂尔多斯台地西南缘的一部分, 区内南部以沙地丘陵为主, 北部以山地荒漠为主, 平均海拔 1 250 m。区域内沟壑纵横、沙丘发育, 加上黄土堆积物垂直节理发育、疏松多孔、富水性差。保护区深居西北内陆高原, 属中温带干旱气候区, 四季分明, 最显著的气候特点是干燥、风大、沙多, 年平均气温在 8—9 °C 之间。保护区全年的降雨量少而集中, 蒸发量大、冬寒长、夏热短、温差大、日照长、光能丰富, 土壤类型以灰钙土和风沙土为主。植被类型以沙生植物为主, 包括沙生禾草类, 如白草(*Pennisetum centrasiaticum*)、蒙古冰草(*Agropyron desertorum*)、芨芨草(*Achnatherum splendens*)、短花针茅(*Stipa breviflora*)、沙地芦苇(*Phragmites*

australis)等; 豆科、藜科、萝藦科、鸢尾科等旱生杂草类, 如甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)、苦豆子(*S. alopecuroides* L.)、沙蓬(*Agriophyllum squarrosum*)、骆驼蓬(*Peganum nigellastrum*)、沙蒿(*Artemisia desertorum*)、老瓜头(*Cynanchum komarovii*)、打苞鸢尾(*Iris bungei*)等; 旱生强旱生灌木和半灌木类, 如猫头刺(*Oxytropis aciphylla*)、柠条锦鸡儿(*Caragana korshinskii*)、川青锦鸡儿(*Caragana tibetica*)、沙冬青(*Ammopiptanthus mongolicus*)等; 沙地盐生植物类, 如盐爪爪(*Kalidium cuspidatum*)、红砂(*Reaumuria soongorica*)等。

1 材料与方法

1.1 材料来源

于 2010 年 6 月和 10 月, 从宁夏白芨滩自然保护区的回民巷、冯记沟、羊肠湾、宁东、宝塔和小口子等地, 根据海拔、土壤类型、有机质含量及植被类型的不同, 分别选取 I、II、III、IV、V 和 VI 6 个样区(表 1)。在各样区内用 5 点“Z”型(每样点面积 1 m²)方法, 于每样点采集苦豆子豆荚 30 个和

表 1 宁夏灵武白芨滩自然保护区苦豆子各采样区概况

Table 1 Basic condition of each sample plot of *Sophora alopecuroides* L. from Baijitan Nature Reserve of Ningxia

样区号 Sample code	植被类型 Vegetation type	植被特征 Vegetation characteristics	海拔 Altitude (m)	土壤 Soils		
				类型 Type	pH	有机质 Organic matter (%)
I	荒漠草原	白草、甘草、苦豆子、蒙古冰草、短花针茅、川青锦鸡儿、刺蓬等为优势种群, 群落覆盖度 50%左右	1 350—1 370	淡灰钙土	8.5	1.0—1.2
II	沙生植被草原	短花针茅、猫头刺、芨芨草 等为优势种群, 群落覆盖度 40%左右	1 350—1 370	淡灰钙土	8.9	0.7—0.9
III	荒漠草原	猫头刺、打苞鸢尾、苦豆子、甘草、刺蓬等为优势种群, 群落覆盖度 40%左右	1 410—1 425	风沙土	8.9	1.0—1.2
IV	沙生植被草原	苦豆子、甘草、蒙古冰草、刺蓬等为优势种群, 群落覆盖率为 50%左右	1 390—1 400	淡灰钙土	8.5	0.7—0.9
V	荒漠草原	骆驼蒿、红砂、猫头刺、老瓜头等为优势种群, 群落覆盖度 35%左右	1 360—1 380	盐碱风沙土	9.3	0.4—0.6
VI	林地	银白杨及一年生沙生杂草, 植被覆盖率为 50%左右	1 420—1 430	淡灰钙土	9.0	1.5—2.0

健康植株 10 株, 作为 1 份, 共采 30 份。种子脱粒后选择光滑圆润无病虫害的籽粒进行内生放线菌的分离。健康植株用保鲜袋带回后, 于 4 °C 保存, 分别于采集后 3–4 d 内按根、茎、叶 3 个部位分离内生放线菌。

1.2 培养基组成

高氏 I 号培养基(GA)、燕麦琼脂培养基(OA)和植物汁液培养基(ZYP, GA 添加 1%苦豆子茎叶汁液)的成分及配制参照文献[16]。

1.3 苦豆子内生放线菌的分离和纯化

称取苦豆子种子约 1–2 g, 用 50% (质量体积比) H_2SO_4 浸泡 4–5 h 软化种皮, 用清水冲洗数次, 催芽 3–5 d 后, 在超净台中用无菌水清洗 3 次, 用 75% (体积比) 酒精浸泡 30 s, 再用 3% (质量体积比) 的次氯酸钠浸泡 5 min, 立即用无菌水洗涤 5 次, 最后一遍无菌水洗涤液涂板检测有无杂菌污染。加入 5 mL 无菌水, 采用组织匀浆法分离种子的内生放线菌。健康苦豆子植株用清水洗去污泥, 按根部、茎部和叶部 3 个部位采用组织匀浆法分离内生放线菌, 其消毒时间为 3 min, 杂菌检测方法同种子。

将表面消毒充分的种子或植物组织直接置于 GA、OA 和 ZYP 培养基平板上(培养基中加入 3% 的重铬酸钾溶液, 以抑制真菌和细菌的生长), 28 °C 培养 7 d 后, 从分离得到的内生放线菌菌落边缘处, 切取菌丝尖端到新的 GA 培养基上进行纯化, 纯化菌落分别采用埋片法和插片法^[17]。

1.4 苦豆子内生放线菌的分类鉴定

1.4.1 苦豆子内生放线菌的形态鉴定: 根据分离菌株基内菌丝、气生菌丝和孢子丝的发育等形态特征进行分类鉴定^[18]。

1.4.2 苦豆子内生放线菌 16S rRNA 基因序列分析: 放线菌 DNA 的提取参考姜淑梅等^[19]的改良酶法和 Lee 等^[20]的简单提取细菌 DNA 法。16S rRNA 基因扩增反应体系(25 μ L): 2 \times PCR mix 12.5 μ L; 引物 F8 (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 引物 R1492 (10 μ mol/L) 1.0 μ L; 模板 DNA (30 μ g/L) 1.0 μ L; 双蒸水补足至 25 μ L, 做 3 个重复。PCR 反应条件为: 94 °C 4 min;

95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。用 0.9% 的琼脂糖凝胶电泳检测产物, PCR 扩增产物由上海 Invitrogen 生物公司进行测序。

使用 ContigExpress 软件拼接 DNA 序列后, 测得序列提交到 GenBank, 并在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 网站上进行序列分析, 获得相似序列后用 DNAMAN 6.0.3.48 软件进行多序列比对构建系统发育树, 系统发育树的构建采用邻接法(Neighbour-Joining)。

1.5 统计学分析

相对频率(Relative frequency, R_i)=样区(部位)内生放线菌各属的分离数/样区(部位)内生菌分离总数 $\times 100\%$ ($R_i > 10\%$ 的属定义为某样区的优势属, $5\% \leq R_i \leq 10\%$ 定义为常见属, $R_i < 5\%$ 定义为稀有属)。

物种多样性指数采用 Shannon-Wiener index (H')

来表示, 其计算公式为: $H' = -\sum_{i=1}^k P_i \times \ln P_i$

式中: k 是某样区(部位)分离到的内生放线菌物种数量, P_i 是指该样区(部位)各属内生放线菌种数占样区(部位)分离内生菌总数的百分比。

丰富度指数(D)采用 Margalef 指数来表示, 其计算公式为: $D = (S-1)/\ln N$

其中: S 为物种数, N 为种群中所有物种个体总数。

物种相似性系数采用 Sorenson's similarity coefficient (C_s)来表示, 其计算公式为: $C_s = 2j/(a+b)$

式中: j 是两样区(部位)共同分离到的内生放线菌属数, a 为一样区(部位)内分离的内生放线菌属数, b 为另一样区(部位)内分离的内生放线菌属数。

2 结果与分析

2.1 苦豆子内生放线菌的组成

对宁夏白芨滩自然保护区 6 个样区共 30 份苦豆子样品进行了内生放线菌的分离。从苦豆子组织中共分离得到内生放线菌 111 株, 通过菌落特征、显微观察和 16S rRNA 基因序列分析可知, 这 111 株内生放线菌分别属于链霉菌属(*Streptomyces*)、拟

诺卡氏菌属(*Nocardioopsis*)、普劳斯氏菌属(*Prauserella*)、*Actinophytocola*、微杆菌属(*Microbacterium*)、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、束丝放线菌属(*Actinosynnema*)、糖霉菌属(*Glycomyces*)和嗜热油菌属(*Thermoleophilum*) 9 个属(图 1)。其中链霉菌属(*Streptomyces*)和拟诺卡氏菌属(*Nocardioopsis*)为优势属,分别占分离菌数的 74.30%和 15.30%,其他各属都为稀有属,所占分离菌数的比例不足 5%。链霉菌属(*Streptomyces*)可进一步被归于白色类群(*Albosporus*)、烬灰类群(*Cinereus*)、蓝色类群(*Gyaneus*)、灰褐类群(*Griseofuscus*)、黄色类群(*Flavus*)、青色类群(*Glaucus*)和金色类群(*Aureus*) 7 个类群,其中白色类群(*Albosporus*)和烬灰类群(*Cinereus*)最多,分别占分离菌数的 32.40%和 15.30%,青色类群(*Glaucus*)和金色类群(*Aureus*)最少,分别占分离菌数的 3.60%和 0.90%。

2.2 苦豆子内生放线菌分布的差异性

2.2.1 苦豆子内生放线菌在不同器官的分布:苦豆子植株各器官都有内生放线菌分布,所得到的 111 株菌株中,根部分布最多,分离到的 53 株内生放线菌分属于 4 个属;其次是种子,分离到 32 株分属于 7 个属;茎部分离到 20 株分属于 3 个属,叶部内生放线菌的分布最少,分离到 6 株都属于 1 个属(表 2)。链霉菌属(*Streptomyces*)在苦豆子植株的各

器官都有分布,并且是根部、茎部和种子的优势属,其相对频率依次为 31.5%、15.3%和 22.5%。链霉菌属(*Streptomyces*)中白色类群和烬灰类群分布最多,且白色类群在苦豆子植株的各器官都有分布,金色类群只在茎部有分布。其他各属则表现出一定的组织特异性和偏好性,如普劳斯氏菌属(*Prauserella*)在根部、茎部和种子中有分布,拟诺卡氏菌属(*Nocardioopsis*)只在根部和种子中有分布,而 *Actinophytocola*、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、束丝放线菌属(*Actinosynnema*)和糖霉菌属(*Glycomyces*)只在种子中有分布。

根部、茎部、叶部和种子各部位的内生放线菌物种多样性指数分别为 2.82、2.31、1.79 和 2.78。不同植株部位间内生放线菌的相似性系数如表 3 所示,由此可见苦豆子根部内生放线菌最为丰富,并且根部与茎部的相似性系数最大,为 0.57,叶部与种子的相似性系数最小,为 0.25。

2.2.2 苦豆子内生放线菌在不同生境的分布:链霉菌属(*Streptomyces*)在生境不同的 6 个样区中都有分布,是各个样区的共有属和优势属,相对频率依次为 76.9%、86.4%、100%、57.4%、85.7%和 88.9%(表 4),并且白色类群和烬灰类群分布最多,表明链霉菌属(*Streptomyces*)对不同的生境有很好的适应性。在不同植被类型中,链霉菌属(*Streptomyces*)在荒漠

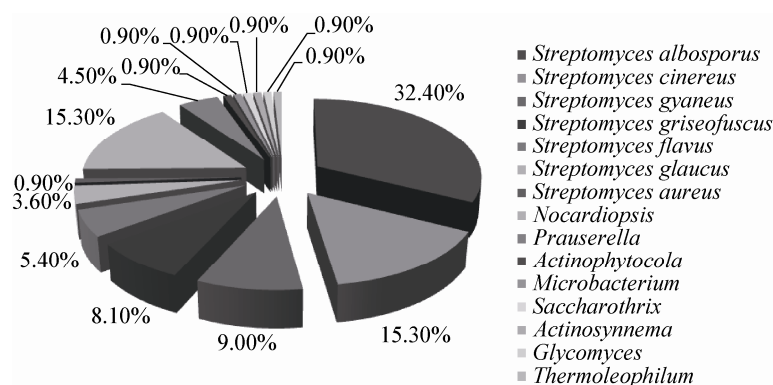


图 1 宁夏白芨滩自然保护区苦豆子内生放线菌的组成分布

Figure 1 Composition distribution of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L. of Baijitan Nature Reserve in Ningxia

表 2 苦豆子植株不同器官内生放线菌的相对频率						
Table 2 The distribution of endophytic actinomycetes of different separated positions from <i>Sophora alopecuroides</i> L. of Baijitan Nature Reserve in Ningxia (%)						
属 Genus		植株分离部位 Separated parts of plants				
		根 Roots	茎 Stems	叶 Leaves	种子 Seeds	
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	白色类群 Albosporus	11.7	6.3	3.6	10.8	
	烬灰类群 Cinereus	9.9	0.9	0	4.5	
	灰褐类群 Griseofuscus	3.6	2.7	0	2.7	
	蓝色类群 Gyaneus	2.7	2.7	1.8	0.9	
	青色类群 Glaucus	2.7	0	0	2.7	
	黄色类群 Flavus	0.9	1.8	0	0.9	
	金色类群 Aureus	0	0.9	0	0	
总数 Total		31.5	15.3	5.4	22.5	
普劳斯氏菌属 <i>Prauserella</i>		0.9	1.8	0	1.8	
拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>		14.4	0	0	0.9	
嗜热油菌属 <i>Thermoleophilum</i>		0.9	0	0	0	
微杆菌属 <i>Microbacterium</i>		0	0.9	0	0	
<i>Actinophytocola</i>		0	0	0	0.9	
糖丝菌属 <i>Saccharothrix</i>		0	0	0	0.9	
束丝放线菌属 <i>Actinosynnema</i>		0	0	0	0.9	
糖霉菌属 <i>Glycomyces</i>		0	0	0	0.9	
Shannon-Wiener index (<i>H'</i>)		2.82	2.31	1.79	2.78	

表 3 不同器官内生放线菌的相似性系数			
Table 3 The similarity coefficients of endophytic actinomycetes of different parts			
器官 Part	茎 Stems	叶 Leaves	种子 Seeds
根 Roots	0.57	0.40	0.55
茎 Stems		0.50	0.40
叶 Leaves			0.25

草原(样区III)和林地(样区VI)分布最多,相对频率分别为 100%和 88.9%。不同生境的苦豆子内生放线菌在某些属上存在特异性,普劳斯氏菌属(*Prauserella*)在荒漠草原(样区 I 和样区 V)、沙生植被草原(样区 II)和林地(样区 VI)有分布;拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)只在荒漠草原(样区 I)和沙生植被草原(样区IV)有分布;嗜热油菌属(*Thermoleophilum*)和微杆菌属(*Microbacterium*)只在沙生植被草原(样

区 II)有分布, *Actinophytocola*、糖丝菌属(*Saccharothrix*)、束丝放线菌属(*Actinosynnema*)和糖霉菌属(*Glycomyces*)只在样区IV有分布。

各样区土壤有机质含量和土壤类型对苦豆子内生放线菌的分布有一定影响。样区 I 和样区IV土壤有机质含量较高,分别为 1.0–1.2 和 0.7–0.9,植被类型丰富且覆盖度高,都为 50%左右,内生放线菌数量分布多,种类丰富多样;而样区 V 土壤有机质含量低,为 0.4–0.6,植被覆盖度低,为 35%左右,内生放线菌数量分布最少。总体来说,苦豆子内生放线菌的数量和种类分布与土壤类型的关系为:淡灰钙土>风沙土>盐碱风沙土。

6 个样区苦豆子内生放线菌物种多样性指数范围为 1.74–2.53 之间,丰富度指数范围为 2.57–5.45 之间。样区IV的内生放线菌物种多样性指数和丰富

表 4 6 样区苦豆子内生放线菌的相对频率
Table 4 Relative frequency of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L. in 6 sample areas of Baijitan Nature Reserve of Ningxia (%)

属 Genus		样区 Sample area					
		I	II	III	IV	V	VI
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	白色类群 <i>Albosporus</i>	38.5	45.5	38.5	29.8	0	22.2
	烬灰类群 <i>Cinereus</i>	15.4	0	38.5	10.6	28.6	33.3
	灰褐类群 <i>Griseofuscus</i>	0	0	15.4	10.6	14.3	11.1
	蓝色类群 <i>Gyaneus</i>	7.7	27.3	0	0	28.6	11.1
	青色类群 <i>Glaucus</i>	7.7	0	0	4.3	0	11.1
	黄色类群 <i>Flavus</i>	0	13.6	1	2.1	14.3	0
	金色类群 <i>Aureus</i>	7.7	0	0	0	0	0
总数 Total		76.9	86.4	100	57.4	85.7	88.9
普劳氏菌属 <i>Prauserella</i>		15.4	4.5	0	0	14.3	11.1
拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>		7.7	0	0	34.1	0	0
嗜热油菌属 <i>Thermoleophilum</i>		0	4.5	0	0	0	0
微杆菌属 <i>Microbacterium</i>		0	4.5	0	0	0	0
<i>Actinophytocola</i>		0	0	0	2.1	0	0
糖丝菌属 <i>Saccharothrix</i>		0	0	0	2.1	0	0
束丝放线菌属 <i>Actinosynnema</i>		0	0	0	2.1	0	0
糖霉菌属 <i>Glycomyces</i>		0	0	0	2.1	0	0
Shannon-Wiener index (<i>H'</i>)		2.35	2.04	2.14	2.53	1.74	1.88
Margalef index (<i>D</i>)		3.89	2.90	3.10	5.45	2.57	2.73

度指数最大, 分别为 2.53 和 5.45, 而样区 V 的多样性指数和丰富度指数最小, 分别为 1.74 和 2.57。物种多样性指数和丰富度指数恰好反映了样区内苦豆子内生放线菌数量和种类的丰富程度。

保护区内生境不同的 6 个样区苦豆子内生放线菌群落的相似性系数在 0.20–1.00 之间(表 5), 相似性最高的样区是样区 V 和样区 VI, 这两个样区只有链霉菌属 (*Streptomyces*) 和普劳氏菌属 (*Prauserella*) 被鉴定。样区 IV 与其他几个样区之间的相似性系数都很小, 在 0.20–0.44 之间。这是因为样区 IV 内生放线菌群落最丰富, 而其他几个样区相对于样区 IV 群落比较单一。宁夏灵武白芨滩自然保护区为典型的荒漠类型生态系统自然保护区, 多年来由于过度放牧, 管理粗放, 造成大量天然草场退化为荒漠, 现存的苦豆子资源主要是荒漠退化过程

中自然残存的植被^[21]。样区 V 和样区 VI 的高度相似性恰好反映了过去这两个样区气候、土壤和植被等的相似性。

表 5 白芨滩自然保护区 6 样区内生放线菌相似性系数

Table 5 The similarity coefficients of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L. in 6 sample areas of Baijitan Nature Reserve in Ningxia

样区 Sample area	II	III	IV	V	VI
I	0.57	0.50	0.44	0.80	0.80
II		0.40	0.20	0.67	0.67
III			0.29	0.67	0.67
IV				0.25	0.25
V					1.00

2.3 苦豆子内生放线菌系统发育分析

根据形态特征和 16S rRNA 基因序列分析, 合并形态和序列相同的菌株, 从 111 株苦豆子内生放线菌中选择 19 株菌株, 作为代表菌株, 其中链霉菌属(*Streptomyces*)依据不同类群选择 11 株为代表菌株。从 GenBank 下载与这些菌株序列相似性较高的 16S rRNA 基因序列, 用于系统发育分析, 构建

系统发育树(图 2)。

从系统发育树上可见, 19 株内生放线菌代表菌株大致可以分为 A、B、C 和 D 4 簇。按 16S rRNA 基因序列相似性大于 97% 的菌株归于同一个种的规则^[22], 菌株 NDZKDS₇₀、NDZKDS₃₃、NDZKDS₅、NDZKDS₅₁ 和 NDZKDS₄ 分别与达氏拟诺卡菌(*Nocardiopsis dassonvillei*)、哈尔滨糖霉菌

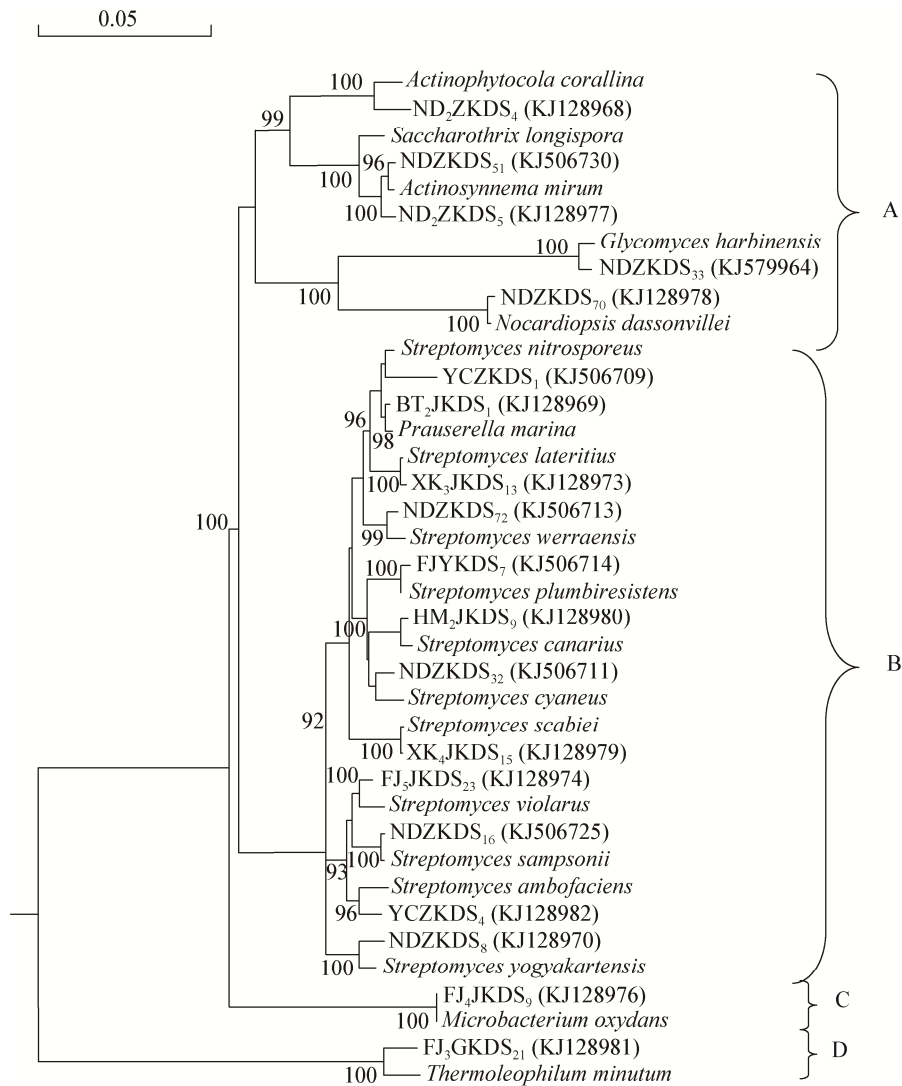


图 2 19 株苦豆子内生放线菌代表菌株基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of 19 representative endophytic actinomycetes strains from *Sophora alopecuroides* L.

注: 分支上的数字是可信度; 比例尺表示 100 个核苷酸里有 5 个替换; 括号中的数字是序列登录号。

Note: The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support (%) based on 1 000 resampled data sets, only values above 50% are given. The scale bar corresponds to 0.05 substitutions per nucleotide position. The numbers in the brackets are accession numbers.

(*Glycomyces harbinensis*)、长孢糖丝菌(*Saccharothrix longispora*)、奇迹束丝放线菌(*Actinosynnema mirum*)和 *Actinophytocola corallina* 在同一发育分支 A 簇上, 亲缘关系最近, 16S rRNA 基因序列相似性在 97.2%–99.0% 之间。有 12 株菌株分属于以链霉菌属(*Streptomyces*)为主的 B 簇, 菌株 YCZKDS₁、BT₂JKDS₁、XK₃JKDS₁₃、NDZKDS₇₂、FJYKDS₇、HM₂JKDS₉、NDZKDS₃₂、XK₄JKDS₁₅、FJ₅JKDS₂₃、NDZKDS₁₆、YCZKDS₄ 和 NDZKDS₈ 分别与硝孢链霉菌(*Streptomyces nitrosporeus*)、普劳氏菌(*Prauserella marina*)、砖红链霉菌(*Streptomyces lateritius*)、韦腊链霉菌(*Streptomyces werraensis*)、抗铅链霉菌(*Streptomyces plumbiresistens*)、黄雀链霉菌(*Streptomyces canarius*)、深蓝紫链霉菌(*Streptomyces cyaneus*)、疮痂链霉菌(*Streptomyces scabiei*)、略紫链霉菌(*Streptomyces violarius*)、桑氏链霉菌(*Streptomyces sampsonii*)、生二素链霉菌(*Streptomyces ambofaciens*)和灰色变异链霉菌(*Streptomyces yogyakartensis*)在同一发育分支上, 亲缘关系最近, 16S rRNA 基因序列相似性在 97.3%–99.5% 之间。菌株 FJKDS₉ 和 FJGKDS₂₁ 分属于 C 簇和 D 簇, 分别与氧化微杆菌(*Microbacterium oxydans*)和微小嗜热油菌(*Thermoleophilum minutum*)在同一进化分支上, 序列相似性分别为 98.4% 和 97.1%。

3 讨论

在植物内生放线菌的研究中, 分离培养基的成分会在很大程度上影响获得的内生放线菌群落组成。由于植物体组织成分比较复杂, 难以模拟, 因此常由于培养基不适合造成一些内生放线菌人工分离培养的困难, 为尽量保持内生放线菌的多样性, 本实验尝试采用在 GA 的基础上添加 1% 苦豆子茎叶汁液的培养基, 补充其内生放线菌可能的特殊营养需求, 获得了较为丰富的内生放线菌类群。

宁夏白芨滩自然保护区属于典型的荒漠类型自然保护区, 由于气候干旱少雨, 蒸发量大, 土壤

类型以灰钙土和风沙土为主, 造成自然植被以沙生植物为主, 植被稀疏, 单一。苦豆子(*S. alopecuroides* L.)作为一种真正的沙生植物, 其干旱的天然生境使得其体内的环境并不适于微生物生存。但我们的研究表明, 苦豆子体内含有丰富的内生放线菌类群, 而且其他植物中常见的链霉菌属(*Streptomyces*)、拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)等内生放线菌种属在苦豆子体内也有分布, 表明一些放线菌在长期的进化过程中已经适应了植物体内的内生生活。研究表明链霉菌属(*Streptomyces*)是土壤生态系统和植物体内的优势放线菌^[23-24], 而本研究中苦豆子内生放线菌优势属也以链霉菌属(*Streptomyces*)为主。

本研究选择保护区内植被特征、土壤类型和荒漠化程度不同的 6 个样区进行调查研究。分离到的 111 株苦豆子内生放线菌中有 83 株属于链霉菌属(*Streptomyces*), 17 株属于拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*), 它们都为宁夏白芨滩自然保护区苦豆子内生放线菌的优势属。此外还分离到了很难从土壤中分离到的糖霉菌属(*Glycomyces*)、束丝放线菌属(*Actinosynnema*)和嗜热菌嗜热油菌属(*Thermoleophilum*), 表明宁夏白芨滩自然保护区苦豆子内生放线菌具有丰富的遗传多样性。尽管关于豆科槐属植物内生放线菌的研究还很少, 但苦豆子体内无疑存在着丰富的内生放线菌资源。

苦豆子内生放线菌在各部位的分布表现出一定的差异, 这充分体现在多样性指数上。所分离到的内生放线菌中, 根部内生放线菌的多样性明显高于茎部、叶部和种子, 这与顾沛雯^[14]对宁夏毛乌苏荒漠的苦豆子内生放线菌的研究结果相吻合。而造成这种差异性的原因可能是各器官组织结构和生理代谢不同, 也可能是环境因素对苦豆子各器官的影响不同。比较植物不同器官可以发现, 不同的内生菌占据不同的生态位。研究中也发现了一些在不同器官中共有的广布菌群, 如链霉菌属(*Streptomyces*)在根部、茎部、叶部和种子中都有分布, 普劳氏菌属(*Prauserella*)在根部、茎部和种子

中都有分布。从各部位内生放线菌的相似性系数来看, 根部与茎部的相似性系数最大, 叶部与种子的相似性系数最小, 体现出一定的组织差异性和专一性。

苦豆子内生放线菌的数量和组成分布与其植被特征、土壤类型有密切关系。Roes 等^[6]认为植被丰富的地区内生放线菌的数量和种类比植被稀疏的地区更为丰富。而我们的研究结果也表明植被丰富度高, 苦豆子及周围伴生植物多样的区域, 内生放线菌的数量多且多样性指数和丰富度指数比较高, 如沙生植被草原(样区IV)的植被覆盖度为 50% 左右, 内生放线菌的数量多、物种多样性指数和丰富度指数最高。荒漠草原(样区III)和林地(样区VI)分别代表植被退化和植被恢复 2 种不同类型的生境, 在这 2 个样区中苦豆子内生放线菌链霉菌属(*Streptomyces*)的相对频率最大, 且以抗生素产生较多的白孢类群和灰灰类群占优势, 这些类群可能在苦豆子等沙生植物的抗逆性中发挥重要的作用。而 Redman 等^[25]也认为, 逆境环境生长的植物内生菌能提高宿主的抗逆性, 这种作用与植物所处的天然生境密切相关。由此可见宿主受其生态环境的影响, 不同生态环境中的同种植株也表现出相应差异^[26]。各样区土壤有机质含量和土壤类型对苦豆子内生放线菌的分布有一定影响, 淡灰钙土通气性和保水性良好, 有机质含量较高, 适于苦豆子等沙生植物生长, 并且伴生植被较丰富, 分离的内生放线菌较多; 而风沙土有机质含量低, 土壤干旱, 保水性差, 再加上部分土壤盐渍化, 导致植被难以生长, 因此分离的内生放线菌数量较少。2012 年顾沛雯等^[27]对苦豆子内生菌进行研究时也表明, 有机质含量较高, 通气性较好的淡灰钙土更适合苦豆子内生菌的生长。

药用植物内生放线菌作为一类新的微生物资源具有很好的开发潜力及潜在的商业价值^[28]。研究药用植物内生放线菌多样性, 对于放线菌生物学功能的研究具有很大的指导意义。而苦豆子作为一类

特殊的药用植物, 其内生环境不同于一般的非药用植物, 内生放线菌在与其共同进化过程中, 在外界环境的胁迫下, 可能产生新的基因和次生代谢产物。在本次研究的基础上, 在后续研究中将进一步对苦豆子内生放线菌的次生代谢产物的生物活性进行深入探索。

参 考 文 献

- [1] Bérday J. Bioactive microbial metabolites, a personal review[J]. The Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1-26
- [2] Wang YZ, Xiao YZ. Endophytes and their bioactive products[J]. Journal of Biology, 2004, 21(4): 1-5 (in Chinese)
王永中, 肖亚中. 植物内生菌及其活性代谢产物[J]. 微生物杂志, 2004, 21(4): 1-5
- [3] Wen CY, Wu YH, Tian XL. Recent advances and issues on the endophyte[J]. Chinese Journal of Ecology, 2004, 23(2): 86-91 (in Chinese)
文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91
- [4] Ruan JS, Huang Y. Rapid Identification and Systematics of Actinobacteria[M]. Beijing: Science Press, 2011: 17-18 (in Chinese)
阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 17-18
- [5] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products[J]. Microbes and Infection, 2003, 5(6): 535-544
- [6] Roes ML, Meyers PR. *Nonomuraea Candida* sp. nov., a new species from South African soil[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2008, 93(1/2): 133-139
- [7] Zhang WM, Zhang YM, Zhang T, et al. Studies on antibacterial and anti-inflammatory effect of alkaloid of *Sophora alopecuroides* L.[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2005, 26(10): 82-85 (in Chinese)
张为民, 张彦明, 张涛, 等. 苦豆子生物碱抑菌抗炎作用研究[J]. 动物医学进展, 2005, 26(10): 82-85
- [8] Zhou FS, Mu Q. Chemical constituents and pharmacological activities of *Sophora alopecuroides* L.[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2006, 25(4): 1-3 (in Chinese)
周福生, 穆青. 野生植物苦豆子的化学成分和主要药理作用[J]. 中国野生植物资源, 2006, 25(4): 1-3
- [9] Li L, Zhang WX, Zhang SL. Progress of immune modulating effect of alkaloids from *Sophora alopecuroides* L. and its mechanisms[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2007, 38(4): 7-8 (in Chinese)
李莉, 张文学, 张顺利. 苦豆子生物碱的免疫调节作用及其作用机制研究进展[J]. 中草药, 2007, 38(4): 7-8
- [10] Gu PW, Hao L, Xu R, et al. Diversity analysis of endophytic actinomycetes isolated from *Sophora alopecuroides* L. of Lingwu Baijitan National Nature Reserve in Ningxia[J]. Journal of Ningxia University (Natural Science Edition), 2011, 32(4): 380-385
顾沛雯, 郝丽, 徐润, 等. 宁夏灵武白芨滩国家级自然保护区苦豆子内生放线菌区系分析[J]. 宁夏大学学报: 自然科学版,

- 2011, 32(4): 380-385
- [11] Shi W, Chen ZG. Development and use of *Sophora alopecuroides* L.[J]. Prataculture & Animal Husbandry, 2007(1): 57-59 (in Chinese)
史伟, 陈志国. 苦豆子的开发与利用[J]. 草业与畜牧, 2007(1): 57-59
- [12] Li YY, Feng JT, Zhang X, et al. Advance in research of chemical ingredients from *Sophora alopecuroides* L. and its bioactivities[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2005, 14(2): 133-136 (in Chinese)
李艳艳, 冯俊涛, 张兴, 等. 苦豆子化学成分及其生物活性研究进展[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 133-136
- [13] Mou XL, Wang WB, Ba H, et al. A review on the progress in the chemical compounds and pharmacology of *Sophora alopecuroides* L.[J]. Journal of Xinjiang Normal University, 2005, 24(1): 45-50 (in Chinese)
牟新利, 王武宝, 巴杭, 等. 中药苦豆子化学成分及生理活性的研究进展[J]. 新疆师范大学学报, 2005, 24(1): 45-50
- [14] Gu PW. Identification of endophytic actinomycetes and screen of antagonist from *Sophora alopecuroides* L.[J]. Northern Horticulture, 2009(6): 12-16 (in Chinese)
顾沛雯. 苦豆子内生放线菌的分离鉴定及其拮抗菌筛选[J]. 北方园艺, 2009(6): 12-16
- [15] Hu MJ, Zhou XC, Wang L, et al. Producing enzyme activity and identification about endophytic actinomycetes isolated from *Sophora alopecuroides* L.[J]. Northern Horticulture, 2013(16): 98-102 (in Chinese)
胡美娟, 周星辰, 王丽, 等. 苦豆子内生放线菌产酶特性分析及活性菌株鉴定[J]. 北方园艺, 2013(16): 98-102
- [16] Shen P, Chen XD. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007: 241-249 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007: 241-249
- [17] Zhou DQ. Microbiology Laboratory Manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1997: 34-36 (in Chinese)
周德庆. 微生物实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1997: 34-36
- [18] Xu LH, Li WJ, Liu ZH. Actinomycetes Systematics-Principle, Method and Practice[M]. Beijing: Science Press, 2007: 62-69 (in Chinese)
徐丽华, 李文均, 刘志恒. 放线菌系统学—原理、方法及实践[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 62-69
- [19] Jiang SM, Zhang L, Dai SK, et al. A quick and efficient method for genomic DNA extraction from actinobacteria[J]. Biotechnology, 2007, 17(1): 39-41 (in Chinese)
姜淑梅, 张龙, 戴世鲲, 等. 一种简单、有效的适于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法[J]. 生物技术, 2007, 17(1): 39-41
- [20] Lee SB, Tayler JW. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores[A]/PCR Protocols: A Guide to Methods and Application[M]. San Diego: Academic Press, 1990: 282-287
- [21] Gao XY, Bei ZL, Lei Q, et al. Basic information resource and the present situation of comprehensive development of *Sophora alopecuroides* L.[J]. Chinese Wild Plant Resources, 2009, 28(2): 17-20 (in Chinese)
高晓原, 贝盏临, 雷茜, 等. 宁夏苦豆子资源基本情况及综合开发现状[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(2): 17-20
- [22] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(4): 846-849
- [23] Xu LH, Li QR, Jiang CL. Diversity of soil actinomycetes in Yunnan, China[J]. Applied and Environment Microbiology, 1996, 62(1): 244-248
- [24] Cao L, Qiu Z, You J, et al. Isolation and characterization of endophytic streptomycete antagonists of Fusarium wilt pathogen from surface-sterilized banana roots[J]. Federation of European Microbiological Societies Microbiology Letters, 2005, 247(2): 147-152
- [25] Redman RS, Sheehan KB, Stout RG, et al. Thermotolerance generated by plant/fungal symbiosis[J]. Science, 2002, 298(5598): 1581
- [26] Huang XH, Li S, Tan ZJ, et al. Progress of study on endophytic actinomycetes in plant[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(1): 42-46 (in Chinese)
黄晓辉, 李珊, 谭周进, 等. 植物内生放线菌研究进展[J]. 生物技术通报, 2008(1): 42-46
- [27] Gu PW, Hao L, Xu R, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic fungi in *Sophora alopecuroides* L. from Baijitan National Nature Reserve of Ningxi[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2012, 40(5): 209-216 (in Chinese)
顾沛雯, 郝丽, 徐润, 等. 宁夏白芨滩自然保护区苦豆子内生真菌的区系组成及其抑菌活性[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2012, 40(5): 209-216
- [28] Yao LA, Hu ZB, Wang LL, et al. Research development of the relationship between plant endophyte and host[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(7): 1750-1754 (in Chinese)
姚领爱, 胡之璧, 王莉莉, 等. 植物内生菌与宿主关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(7): 1750-1754