

川楝内生放线菌多样性及抗菌活性筛选

廖萍¹ 赵翀¹ 张瀚能¹ 刘茂柯² Petri Penttinen³ 张小平¹ 赵珂^{1*}

(1. 四川农业大学资源学院应用微生物学系 四川 成都 611130)

(2. 四川省农科院水稻高粱研究所 四川 泸州 646000)

(3. 芬兰赫尔辛基大学环境科学系 赫尔辛基 00014)

摘要:【目的】探究药用植物川楝内生放线菌多样性,从中挖掘出新的放线菌菌株,发现新的潜在农业生防和医药先导化合物。【方法】从四川境内的资阳、遂宁以及重庆万州采集川楝的根、茎、叶、果、皮,采用纯培养方法,用4种培养基共分离获得148株放线菌。通过形态学观察筛选出60株放线菌进行RFLP分析,选出代表菌株进行16S rRNA基因序列分析。以3株细菌和6株病原真菌作为指示菌株,检测初筛出的60株菌株的抗菌活性以及聚酮合酶(PKS I、PKS II)基因、非核糖体多肽合成酶(NRPS)基因和卤化酶(Halo)基因。【结果】基于16S rRNA-RFLP分析,60株放线菌被分成10簇,筛选出25株代表菌株分别属于7个属,包括*Streptomyces*、*Micromonospora*、*Planotetraspora*、*Streptosporangium*、*Nocardiopsis*、*Prauseria*、*Microbispora*,其中链霉菌占73.3%。供试的川楝内生放线菌对细菌、真菌有不同程度的抗菌活性;其中含有4类化合物合成基因的菌株占10%–55%。【结论】药用植物川楝内生放线菌具有丰富的多样性,且不同地区不同部位川楝组织中放线菌的种群存在差异;分离菌株广谱的抗菌活性证明,川楝内生放线菌在次生代谢产物合成方面具有巨大潜力,这为进一步的药物开发提供了丰富的菌种资源。

关键词: 川楝, 内生放线菌, 多样性, 抗菌活性

Foundation item: Supported by The International Cooperation Program on The Science and Technology Plan Projects in Sichuan Province (No. 2013HH0024); Key Technologies R & D program of Sichuan Province (No. 2014NZ0044)

***Corresponding author:** Tel/Fax: 86-28-86290982; E-mail: zhaoke82@126.com

Received: December 14, 2015; **Accepted:** February 25, 2016; **Published online** (www.cnki.net): March 07, 2016

基金项目: 四川省科技计划项目国际合作计划项目(No. 2013HH0024); 四川省科技支撑计划项目(No. 2014NZ0044)

***通讯作者:** Tel/Fax: 86-28-86290982; E-mail: zhaoke82@126.com

收稿日期: 2015-12-14; 接受日期: 2016-02-25; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-03-07

Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from *Melia toosendan* Sieb. et Zucc.

LIAO Ping¹ ZHAO Chong¹ ZHANG Han-Neng¹ LIU Mao-Ke² Petri Penttinen³
ZHANG Xiao-Ping¹ ZHAO Ke^{1*}

(1. Department of Applied Microbiology, College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130, China)

(2. Rice and Sorghum Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Luzhou, Sichuan 646000, China)

(3. Department of Environmental Sciences, University of Helsinki, Helsinki, Fin-00014, Finland)

Abstract: [Objective] In order to explore new potential agricultural biocontrol actinobacteria strains and discover drug lead compounds, the diversity of endophytic actinobacteria isolated from medicinal *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. were researched. **[Methods]** 148 endophytic actinobacteria were isolated from *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. collected in Ziyang, Suining of Sichuan Province and Chongqing by four isolation medium. Based on morphological characteristic, 60 isolates were selected and analyzed by 16S rRNA-RFLP, the representative strains were further sequenced. Antibacterial activity of 60 strains were evaluated by three bacteria and six pathogenic fungi strains, respectively, and the genes coding for polyketide synthases (PKSI, PKSII), nonribosomal peptide synthetase (NRPS) and halogenated enzyme gene (Halo) were amplified. **[Results]** 60 strains of actinobacteria were divided into 10 clusters based on 16S rRNA-RFLP analysis, 25 strains of representative strains belonging to 7 genera: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Planotetraspora*, *Streptosporangium*, *Nocardiopsis*, *Prauseria*, *Microbispora*, the genus *Streptomyces* accounted for 73.3%. An evaluation of antimicrobial activity showed most isolates possessed activity towards pathogenic bacteria and fungi. The frequency of PCR amplification of 4 synthesis genes was 10%–55%. **[Conclusion]** This study indicated that endophytic actinobacteria associated *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. are abundant and the distribution is influenced by sampling sites and plant organs, which possessed potential diverse bioactivities and can be further explored.

Keywords: *Melia toosendan* Sieb. et Zucc., Endophytic actinobacteria, Diversity, Antibacterial activity

放线菌是产生抗生素及其他生物活性物质的重要微生物资源,其在天然化合物开发方面具有举足轻重的作用。2012年,Bérdy统计出从微生物获得的34 000种天然活性物质中,有35%以上来源于放线菌,其中链霉菌为主要贡献者^[1]。然而经过几十年的筛选,从土壤中筛选出能产生天然活性物质的放线菌日益困难,而去除已知菌和已知化合物就是一大难点。现代基因组研究成果及国内外的经验告诉我们,新的生境必然蕴藏着新的物种,而新物种应该具有合成新化合物的新基因,因此从新的生境中发掘放线菌资源是寻找新化合物的有效途径之一^[2]。目前全世界的植物约有30万种,从中分离得到内生菌的植物不过几百种,分离到内生放线菌的就更少,有学者统计从植物内生菌分离得到的活性物质中,约51%是新化合物^[3]。因此,研究植物

内生菌不仅可以了解菌株与宿主的相互关系,还能获取天然活性产物。

川楝 *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. 是楝科 (Meliaceae) 楝属 *Melia* Linn. 的落叶乔木^[4]。生于平原或丘陵地区,主产于中国南方各地。主要有效成分为川楝素 (Toosendanin, $C_{30}H_{38}O_{11}$), 有驱虫、抗菌消炎、抗癌、抗肉毒毒素等作用^[5]。此外,还是制作无污染无毒残的新型高效植物类农药的重要原料^[6]。迄今为止,在对楝科植物的研究中,苦楝和印楝 (*Azadirachta indica*) 等几种楝科植物杀虫特性的研究最为深入,成果也最为突出^[7]。但对于其内生放线菌的研究尚处于初探阶段,Verma等^[8]从印楝各个部位分离到55株放线菌,其中32株都表现出显著的广谱抗菌活性,4%表现出较强的抑制病原真菌和细菌的活性。陈萌等^[9]从川楝中分离得

到 403 株内生放线菌, 分别属于链霉菌属(*Streptomyces*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、克里布所菌属(*Kribbella*)。本文以采自资阳、遂宁、重庆的川楝为研究材料分离放线菌, 对其进行遗传多样性分析, 初步探索川楝内生放线菌的多样性, 并结合抗菌活性检测和化合物合成基因筛选的方法, 为新药开发提供新的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物样品: 2013 年 10 月采自四川省资阳、遂宁、重庆万州 3 个地区川楝的根、茎、叶、树皮、果样品放入无菌塑料袋, 4 °C 保存, 立即带回实验室尽快进行试验。

1.1.2 培养基: 分离培养基: 自来水酵母琼脂(TWYE)、丙酸钠琼脂(SPA)、木聚糖-精氨酸琼脂(MJ)、海藻糖-脯氨酸琼脂(HF)^[10], 培养基中分别加入制霉菌素和重铬酸钾各 25 mg/L 作为抑菌剂。菌株纯化、活化、保藏培养基: ISP₄ 培养基^[10]。拮抗指示菌培养基^[11]: LB 培养基、马铃薯培养基(PDA)。

1.1.3 主要试剂和仪器: Marker、pMD19-T、限制性内切酶(*Hha* I, *Hae* III)、载体等购自宝生物工程(大连)有限公司; 溶菌酶、蛋白酶 K、MIX、SDS、Tris、EDTA 均购自上海生工生物工程技术服务有限公司; 其余试剂均为国产分析纯试剂。PCR 仪、凝胶成像系统、电泳仪购自 Bio-Rad 公司。

1.1.4 引物: PKSIA (5'-TSAAGTCSAACATC GGBCA-3')和 PKSIB (5'-CGCAGGTTSCSGTACC AGTA-3')^[12], PKSIIA (5'-TSGCSTGCTTCGAYGC SATC-3')和 PKSIIB (5'-TGGAANCCGCCGAABC CGCT-3')^[13], NRPSA (5'-GCSTACSYSATSTACAC STCSGG-3')和 NRPSB (5'-SASG TCVCCSGTSCGG TAS-3')^[12], HaloA (5'-TTCCCSCGSTACCASAT CGGSGAG-3')和 HaloB (5'-GSGGGATSWMCCA GWACCASCC-3')^[14]。4 类化合物合成基因引物与 16S rRNA 基因通用引物 8-27F (5'-GAGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-TACGGCTACC

TTGTTCTCAG-3'), 由苏州金唯智生物科技有限公司合成。

1.1.5 指示菌株: 真菌: 黄瓜炭疽菌(*Colletotrichum orbiculare*)、蕃茄灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*)、西瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum*)、玉米纹枯菌(*Rhizoctonia solani*)、玉米弯孢菌(*Curvularis lunata*); 细菌: 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*), 由四川农业大学植物病理实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 内生放线菌分离: 将采自川渝地区重庆、资阳、遂宁 3 个地区川楝的根、茎、叶、树皮、果等样品, 先用自来水冲洗干净, 再用超声(160 W)清洗 10 min, 去除植物组织表面杂质, 作适当的修剪后, 进行严格的表面消毒及消毒效果检测后^[15], 置于无菌研钵中, 加入无菌石英砂捣碎后, 一部分样品转移至离心管中, 加入 5 mL 磷酸缓冲液混匀, 从离心管中吸取 1 mL 溶液至装有 9 mL 无菌水的试管之中, 做 10⁻¹、10⁻²、10⁻³ 3 个浓度梯度的悬液, 取 3 个浓度梯度的川楝各部位的悬液各 80 μL 涂布于分离培养基上, 于 28 °C 培养 4 周以上, 挑取单菌落于 ISP₄ 培养基上 28 °C 纯化, 保种。

1.2.2 内生放线菌鉴定: 通过观察菌丝、孢子形态等培养特征, 如气丝、基丝、产色素以及孢子丝吸水等情况^[16], 对分离菌株进行分类, 初步筛选重复菌株。

1.2.3 16S rRNA-RFLP 分析和序列分析: 采用 Nie 等的方法提取初筛代表菌株 DNA^[17]。采用 30 μL 反应体系, 用细菌 16S rRNA 基因通用引物对初筛菌株的 16S rRNA 基因进行扩增后, 产物分别在限制性内切酶 *Hha* I、*Hae* III 作用下于 37 °C 反应 2 h, 然后进行琼脂糖凝胶电泳。16S rRNA-RFLP 凝胶图像经电脑扫描处理后, 在同一位置有带记为 1, 没有的记为 0 检测。采用非加权平均法(UPGMA)进行聚类分析并构建树状图谱。根据 16S rRNA-RFLP 分析结果筛选出代表菌株进行 16S rRNA 基因序列分析。代表菌株的 16S rRNA 基因

产物送苏州金唯智生物科技有限公司测序。测序结果在 NCBI 数据库中进行 BLAST 比对, 菌株序列在 GenBank 中提交后获取登录号。

1.2.4 抗菌活性筛选: 通过形态观察初步选代表菌株, 将其接种于 ISP₄ 固体培养基, 指示真菌接种 PDA 培养基, 于 28 °C 培养 1 周, 分别将生长良好的供试内生放线菌与指示真菌用无菌打孔器 ($d=5$ mm) 制成小圆片; 指示细菌于 LB 液体培养基培养 1 d 备用。

(1) 细菌指示菌的检测

取 80 μ L 指示细菌菌悬液均匀涂布于 LB 培养基上, 将供试内生放线菌菌饼倒置于距离平板中心点 3 cm 的 4 个方向, 3 次重复, 于 37 °C 培养 1 d 后, 观察记录抑菌圈大小。

(2) 真菌指示菌的检测

采用对峙生长法对初筛代表菌株的抗菌活性进行检测。将植物病原真菌菌饼接种于 PDA 培养基平皿中央, 后用无菌牙签挑取供试放线菌菌饼置于病原菌等距 ($d=3$ cm) 4 个方向处, 作空白对照, 重复 3 次, 在 28 °C 培养 5–7 d, 观察测定抑菌圈大小。

1.2.5 4 种活性物质合成基因阳性菌筛选: PCR 扩增采用 30 μ L 反应体系: Mix 15 μ L, 10 μ mol/L 引物各 0.3 μ L, 模板 1 μ L, ddH₂O 13.4 μ L。PCR 条件: PKS I: 95 °C 5 min; 95 °C 0.5 min, 55 °C 2 min, 72 °C 4 min。PKS II: 96 °C 2 min; 96 °C 1 min, 60 °C 2 min, 73 °C 1.5 min。NRPS: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 59 °C 1.5 min, 72 °C 2 min。Halo: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 均 35 个循环。扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 电压 120 V。

2 结果与分析

2.1 川楝内生放线菌地分离与多样性分析

经过严格的表面消毒处理, 最后一次洗涤水涂布的平板上无菌落生长, 说明表面消毒彻底。用上述 4 种分离培养基从川楝各组织样品中共分离到 148 株内生放线菌, 根据菌落形态、气生菌丝的有

无以及色素的颜色和溶解性去除重复后, 获得 60 株放线菌纯培养菌株。

60 株内生放线菌 16S rRNA 基因的 RFLP 分析结果用 UPGMA 法聚类分析后发现, 60 个菌株的遗传距离(相似性系数)在 0.51–1.00 之间, 在遗传距离为 0.80 的水平上被分成 10 类(图 1)。选取 25 株代表菌株测定 16S rRNA 基因序列后, 经过 BLAST 比对分析结果显示, 它们分别属于 *Streptomyces*、*Micromonospora*、*Planotetraspora*、*Streptosporangium*、*Nocardiopsis*、*Prauseria*、*Microbispora* 7 个属, 链霉菌占 73.3%, 部分菌株菌落形态如图 2 所示, 菌株序列登录号为 KU204669–KU204693 (表 1)。按 16S rRNA 基因序列相似性小于 97% 的菌株可能是潜在新种的规则^[18], 菌株 L4 和 L55 与对应相似性最高的菌株 *Streptomyces phaeochromogenes* ATCC 23945^T 的相似性分别为 96.9% 和 95.4%, 可能是潜在新种。结果表明, 川楝内生放线菌具有丰富的多样性, 可能蕴藏着新的菌种资源。

2.2 分离培养基对内生放线菌的影响

4 种分离培养基中分离到的内生放线菌结果表明: 不同分离培养基分离获得的内生放线菌的数量不同(图 3), SPA 培养基分离获得的菌株数量最多且种属也最为丰富, 依次是 MJ>HF>TWYE; 此外, 不同培养基在各采样点川楝中分离获得的内生放线菌种属不同(图 4), SPA 培养基在资阳和遂宁样品中分离获得的数量和种属较其它培养基更多, MJ 培养基和 HF 培养基对重庆样品的分离效果要优于其它两种培养基; 川楝不同组织中的内生放线菌在各培养基中的分离结果也不同(图 5), SPA 培养基对根和果的分离效果最好; 对于茎中内生放线菌的分离, 4 种培养基在分离数量上无差异, 但 SPA 培养基能够分离获得更多属的放线菌; 对于树皮的内生放线菌分离, MJ 培养基和 HF 培养基的分离效果更好; MJ 培养基对川楝叶内生放线菌的分离效果最好。可见, SPA 培养基较其它 3 种更适宜于川楝内生放线菌的分离。

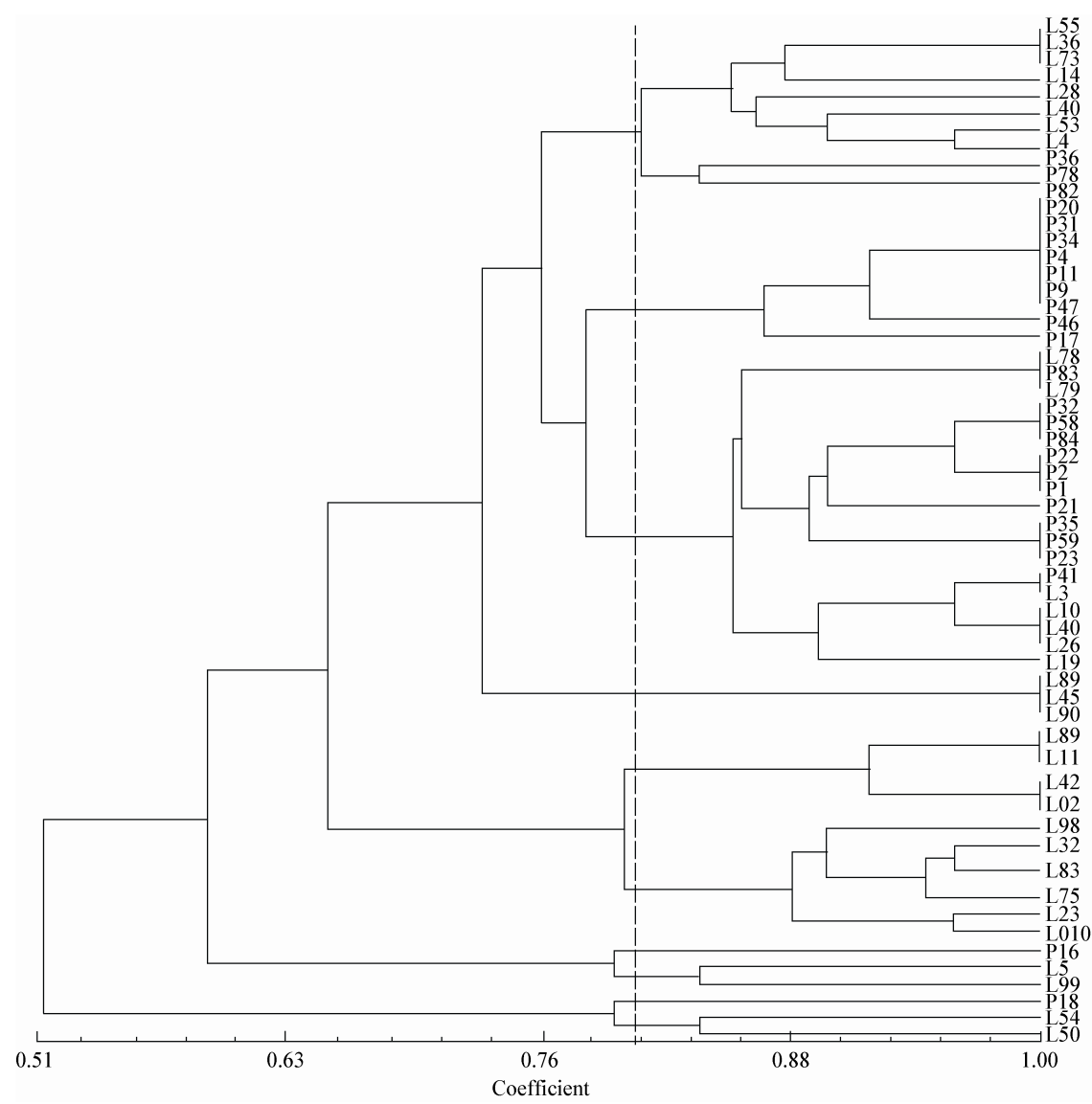


图 1 川楝内生放线菌 16S rRNA-RFLP 聚类树状图
Figure 1 Dendrogram of UPGMA obtained from 16S rRNA-RFLP of endophytic actinobacteria from *Melia toosendan* Sieb. et Zucc.

注：标尺指示遗传距离。
Note: Numbers on the scale bar are reperesent bootstrap values (%).

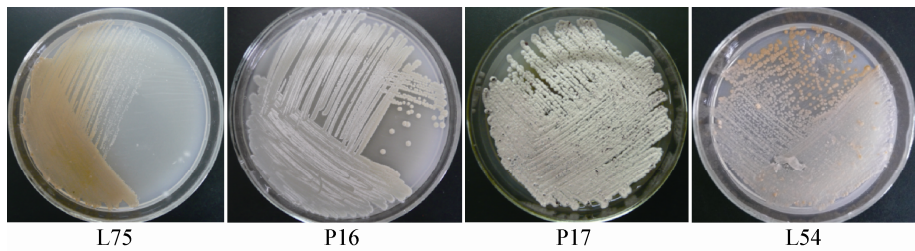


图 2 部分川楝内生放线菌菌落形态
Figure 2 The colonial morphology of endophytic actinobacteria from *Melia toosendan* Sieb. et Zucc.

表 1 川楝内生放线菌的分离鉴定
Table 1 Isolation and identification of endophytic actinobacteria strains

菌株编号 Strains No.	登录号 Accession No.	采样点 Geographic origin	培养基 Medium	部位 Organ	分群 RFLP subgroup	最相近的种 Closest species (GenBank No.)	Similarity (%)
L4	KU204669	资阳	SPA	根	1a	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> ATCC 23945 ^T (AB184738)	96.9
L53		遂宁	HF	果	1a		
L40		重庆	TWYE	果	1a		
L28		资阳	TWYE	根	1a		
L14	KU204670	遂宁	TWYE	叶	1a	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> ATCC 23945 ^T (AB184738)	97.1
L73		资阳	HF	叶	1a		
L36		资阳	MJ	根	1a		
L55	KU204671	资阳	MJ	根	1a	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> ATCC 23945 ^T (AB184738)	95.4
P78	KU204672	资阳	SPA	果	1b	<i>Streptomyces rishiriensis</i> ATCC 14812 ^T (EF178682)	99.4
P36		重庆	HF	皮	1b		
P46	KU204673	重庆	MJ	果	2a	<i>Streptomyces sannanensis</i> ATCC 31530 ^T (AB184579)	98.8
P47		重庆	MJ	根	2a		
P9		资阳	HF	根	2a		
P11		资阳	MJ	根	2a		
P4		资阳	HF	根	2a		
P34		遂宁	SPA	茎	2a		
L31		重庆	HF	叶	2a		
L20	KU204674	遂宁	MJ	根	2a	<i>Streptomyces sannanensis</i> ATCC 31530 ^T (AB184579)	98.4
L82		重庆	SPA	叶	2a		
P17	KU204675	遂宁	MJ	茎	2b	<i>Streptomyces cinereorectus</i> ATCC 43679 ^T (AB184646)	97.7
L79		重庆	SPA	果	3a		
P83	KU204676	重庆	HF	根	3a	<i>Streptomyces parvulus</i> ATCC 12434 ^T (AB184326)	97.4
L78		遂宁	MJ	根	3a		
L23		遂宁	MJ	根	3b		
P59	KU204677	遂宁	MJ	叶	3b	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T (AB184182)	99.1
P35		重庆	MJ	皮	3b		
P21	KU204678	遂宁	SPA	根	3b	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T (AB184182)	98.1
P2		重庆	SPA	根	3b		
P1	KU204679	重庆	SPA	根	3b	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T (AB184182)	100
P22		遂宁	SPA	根	3b		
P84		重庆	HF	果	3b		
P58		遂宁	TWYE	根	3b		
P32	KU204680	重庆	MJ	叶	3b	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T (AB184182)	99.5
L19	KU204681	遂宁	SPA	根	3c	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T (AB184182)	99.2
L26		遂宁	MJ	皮	3c		
L40		遂宁	HF	茎	3c		
L10	KU204682	资阳	HF	皮	3c	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T (AB184182)	99.4

(待续)

						(续表)
LP3		重庆	MJ	叶	3c	
P41	KU204683	遂宁	MJ	皮	3c	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T (AB184182) 99.8
L62	KU204684	资阳	SPA	果	4a	<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712 ^T (AB045890) 99.4
L90		资阳	HF	根	4a	
L45		遂宁	HF	茎	4a	
L11		重庆	HF	皮	5a	
L89	KU204685	重庆	MJ	皮	5a	<i>Micromonospora humi</i> JCM 15292 ^T (GU459068) 100
L42	KU204686	遂宁	SPA	根	5b	<i>Micromonospora coxensis</i> JCM 13248 ^T (AB241455) 99.6
L02		资阳	SPA	皮	5b	
L75	KU204687	重庆	HF	皮	6a	<i>Micromonospora fulviviridis</i> ATCC 35574 ^T (X92620) 99.4
L83		资阳	TWYE	茎	6a	
L32		资阳	TWYE	茎	6a	
L98		资阳	MJ	皮	6a	
L010		资阳	SPA	茎	6b	
P23	KU204688	重庆	TWYE	皮	6b	<i>Micromonospora coxensis</i> JCM 13248 ^T (AB241455) 97.3
P16	KU204690	遂宁	SPA	根	7	<i>Nocardiopsis alba</i> DSM 43377 ^T (X97883) 100
L5	KU204691	资阳	SPA	根	8	<i>Streptosporangium vulgare</i> DSM 43802 ^T (U48999) 99.6
L99		资阳	HF	根	8	
P18	KU204693	遂宁	SPA	根	9	<i>Prauserella aidingensis</i> DSM 45266 ^T (FJ444994) 100
L50	KU204689	遂宁	HF	根	10	<i>Microbispora rosea</i> DSM 43839 ^T (D86936) 99.2
L54	KU204692	资阳	TWYE	根	10	<i>Planotetraspora phitsanulokensis</i> JCM 17937 ^T (FJ426332) 100

注：HF：海藻糖脯氨酸培养基；MJ：木聚糖精氨酸培养基；SPA：丙酸钠培养基；TWYE：酵母浸出粉培养基。
Note: HF: D-(+)-Trehalose-dihydrate L-Proline medium; MJ: Xylan-L-arginine medium; SPA: sodium propionate medium; TWYE: Yeast extract medium.

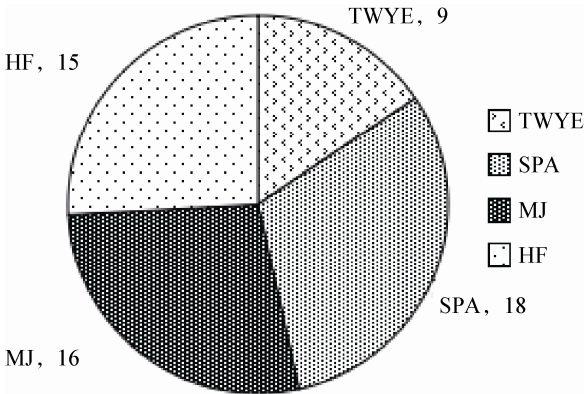


图3 不同培养基的分离菌株
Figure 3 The number of endophytic actinobacteria isolated by four culture medium

注：HF：海藻糖脯氨酸培养基；MJ：木聚糖精氨酸培养基；SPA：丙酸钠培养基；TWYE：酵母浸出粉培养基。
Note: HF: D-(+)-Trehalose-dihydrate L-Proline medium; MJ: Xylan-L-arginine medium; SPA: Sodium propionate medium; TWYE: Yeast extract medium.

2.3 采样点和样品组织对内生放线菌多样性的影响

从不同采样点川楝中分离得到内生放线菌的结果表明(图 6):分离获得的内生菌数量关系为资阳(Z)>遂宁(S)>重庆(C);不同组织中内生放线菌的数量分布不同,遂宁和资阳川楝根中的分得菌株最多,并且与其他组织中内生放线菌的数量差异较大;重庆川楝的皮中内生放线菌的数量最多,除茎以外其它组织中内生放线菌的数量差异不大。同一采样点不同组织中的内生放线菌种类也存在差异(图 7),采自资阳和遂宁川楝中根的内生放线菌其数量和种类均是最多的,其次为茎。采自重庆川楝树皮中的内生放线菌最多,根、果、叶中放线菌差异不大。以上结果表明,内生菌的分离结果与培养基的选择、采样环境、宿主植物部位均有关系。

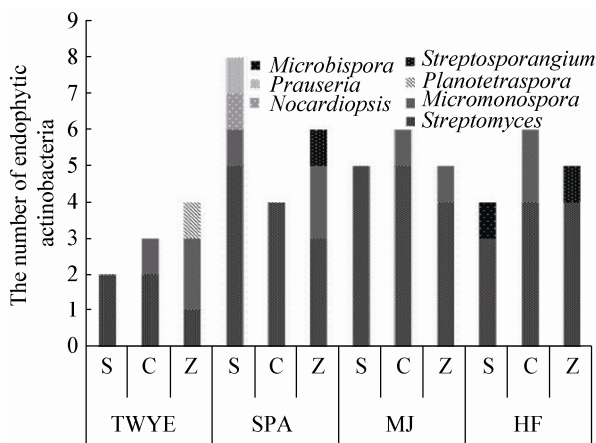


图 4 各采样点川楝内生放线菌在不同培养基中的分离结果

Figure 4 Endophytic actinobacteria of *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. collected in different sites isolated from four medium

注: S: 遂宁; C: 重庆; Z: 资阳. HF: 海藻糖脯氨酸培养基; MJ: 木聚糖精氨酸培养基; SPA: 丙酸钠培养基; TWYE: 酵母浸出粉培养基.

Note: S: Suining; C: Chongqing; Z: Ziyang. HF: D-(+)-Trehalose-dihydrate L-Proline medium; MJ: Xylan-L-arginine medium; SPA: Sodium propionate medium; TWYE: Yeast extract medium.

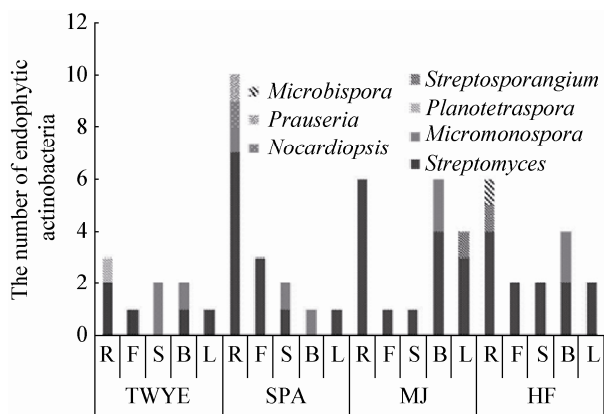


图 5 培养基对川楝不同部位内生放线菌的分离结果

Figure 5 Endophytic actinobacteria of different tissues in *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. isolated by four medium

注: R: 根; F: 果; S: 茎; B: 皮; L: 叶. HF: 海藻糖脯氨酸培养基; MJ: 木聚糖精氨酸培养基; SPA: 丙酸钠培养基; TWYE: 酵母浸出粉培养基.

Note: R: Root; F: Fruit; S: Stem; B: Bark; L: Leaf. HF: D-(+)-Trehalose-dihydrate L-Proline medium; MJ: Xylan-L-arginine medium; SPA: Sodium propionate medium; TWYE: Yeast extract medium.

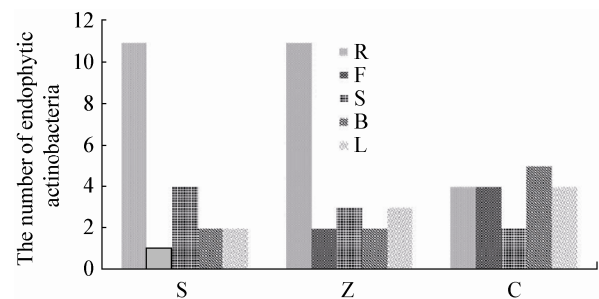


图 6 不同采样点川楝内生放线菌的数量分布

Figure 6 The number of endophytic actinobacteria of *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. at different sampling sites

注: S: 遂宁; C: 重庆; Z: 资阳. R: 根; F: 果; S: 茎; B: 皮; L: 叶.

Note: S: Suining; C: Chongqing; Z: Ziyang. R: Root; F: Fruit; S: Stem; B: Bark; L: Leaf.

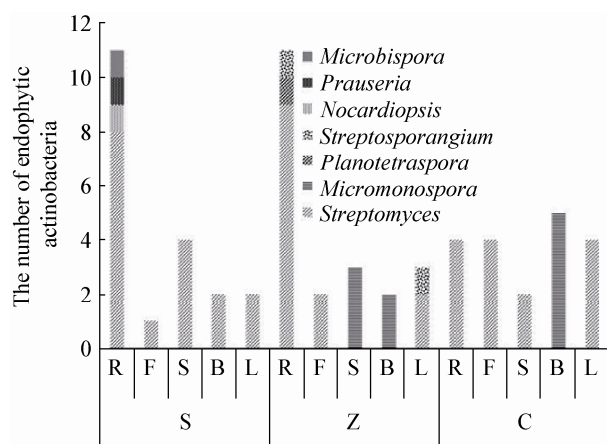


图 7 不同采样点川楝组织中内生放线菌的种属及数量分布

Figure 7 The distribution of the endophytic actinobacteria of *Melia toosendan* Sieb. et Zucc. tissues at sampling sites

注: S: 遂宁; C: 重庆; Z: 资阳. R: 根; F: 果; S: 茎; B: 皮; L: 叶.

Note: S: Suining; C: Chongqing; Z: Ziyang. R: Root; F: Fruit; S: Stem; B: Bark; L: Leaf.

2.4 抗菌活性以及化合物合成基因筛选

川楝内生放线菌抗菌活性筛选结果表明(图 8): 80%的内生放线菌具有抗 1 种及以上指示菌活性, 62%具有抗 1 种及以上真菌活性, 55%具有抗 1 种及以上细菌活性。川楝各部位中, 根的内生放线菌抗真菌与细菌的数量最多, 14 株具有抗 1 种及以上指示真菌活性, 13 株具有抗 1 种及以上指示细菌活

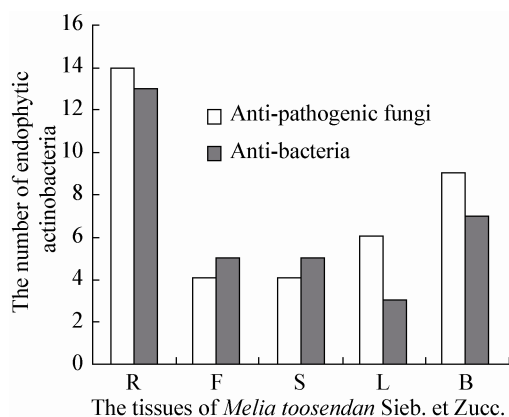


图 8 川楝不同组织中内生放线菌抗菌活性

Figure 8 The antibacterial activity of endophytic actinobacteria from different tissues of *Melia toosendan* Sieb. et Zucc.

性；其次是来自树皮的内生放线菌，9 株具有抗 1 种及以上指示真菌活性，7 株具有抗 1 种及以上指示细菌活性。

化合物合成基因 PCR 筛选扩增结果表明，60 株分离菌株中 10 株(16.7%)含有 Halo 基因；11 株(18.3%)含有 PKS I 基因；33 株(55%)含有 PKS II 基因；6 株(10%)含有 NRPS 基因(图 9)，且均属于链霉菌属，至少有 1 个功能基因为阳性的菌株占 75% (表 2)。

3 讨论

目前对于楝科内生菌的研究主要集中在内生

真菌^[19-20]，对川楝内生放线菌的研究相对较少。陈萌等^[9]从雅安、绵阳、成都、攀枝花、西昌、宜宾、乐山、达州、广元 9 个地区采集的川楝中分离得到 402 株内生放线菌，分别属于 4 个属，分别是链霉菌属(*Streptomyces*)、北里孢菌属(*Kitasatospora*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、克里布所菌属(*Kribbella*)。本实验从资阳、遂宁、重庆采集的川楝中共分得 60 株内生放线菌，分属于 7 个属，包括 *Streptomyces*、*Micromonospora*、*Planotetraspora*、*Streptosporangium*、*Nocardiopsis*、*Prauseria*、*Microbispora*，链霉菌占 73.3%，L4 和 L55 与参比菌株的最大相似性小于 97%，可能为潜在新种。此外我们还对相同采样点川楝内生放线菌进行 DGGE 图谱分析，结果显示，回收条带测序比对后分别属于 11 个属，链霉菌属最多占总数的 25% (此结果另行发表)，揭示了川楝中蕴含着十分丰富的内生放线菌资源且可能存在新的菌种资源。

陈萌等的川楝采样点和内生放线菌的分离培养基比本实验多，但是其分离获得的川楝内生放线菌的多样性却不如本实验的丰富，而且除了链霉菌属以外两实验获得的其它种属放线菌的种类都不相同。其原因可通过本实验多样性分析结果得到解释：(1) 分离培养基对川楝内生放线菌的分离效果有影响；(2) 不同采样点的川楝内生放线菌有差异；

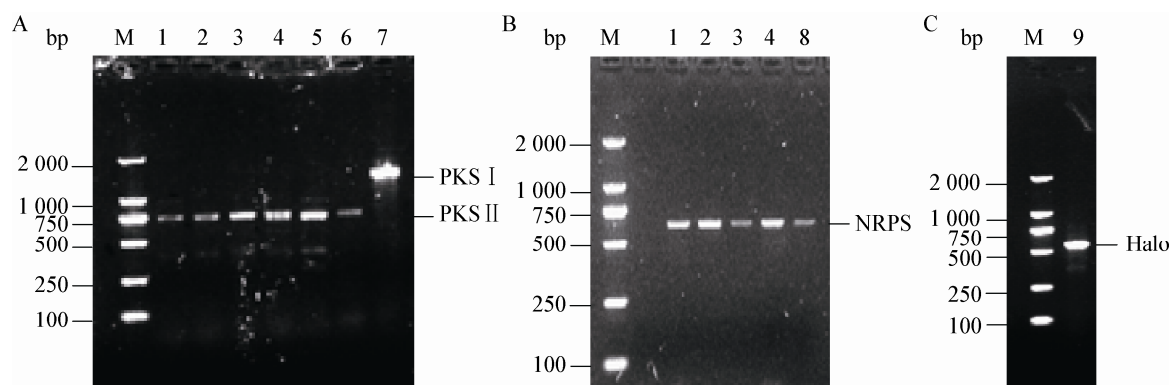


图 9 四种基因筛选扩增产物电泳图谱

Figure 9 PCR products of four synthesis genes

Note: A: PKS I, PKS II; B: NRPS; C: Halo. 1: L45; 2: P34; 3: P31; 4: L28; 5: P16; 6: L19; 7: L26; 8: L06; 9: L11; M: DL2000 marker.

表 2 川楝内生放线菌部分菌株功能基因筛选
Table 2 The tests of the part of isolates for synthesis genes

菌株编号 Strains No.	功能基因筛选 Synthesis genes			
	Halo	PKS I	PKS II	NRPS
L26	-	+	-	-
L45	-	-	+	+
P16	-	+	+	-
L19	-	+	+	-
P20	-	+	+	-
P21	-	-	+	-
P23	-	+	+	-
P34	-	-	+	+
L40	-	-	+	-
P58	-	-	+	-
P59	-	-	+	-
L010	-	-	-	-
L011	-	+	-	-
L06	-	-	-	+
P11	-	+	-	-
L10	+	-	+	-
P2	-	-	+	-
L3	+	-	+	-
P31	-	+	+	+
L14	+	-	+	-
P22	+	-	+	-
L28	-	-	+	+
P83	+	-	+	-
L11	+	-	+	-
L78	-	-	+	-

Note: +: Gene detected; -: Gene not detected.

(3) 川楝不同组织中菌株的分布也不同。除了以上原因还有很多其他因素会影响内生放线菌的分离结果，如宿主的年龄、生长健康状态以及样品预处理等。因此，建立有效的分离方法和设计适宜分离培养基是提高可培养放线菌种类及数量的关键，尽量去模拟内生放线菌的自然生长环境，稀有放线菌在接近自然的条件下可能更具有生长竞争优势，从而能够获得更多类群的放线菌资源^[21]。

植物具有的某些功能其内生菌也可能有，或者

就是内生菌在发挥作用^[3]。长期生存在川楝中的内生放线菌可能具有合成与川楝组织中相同或相似的化合物能力。目前已有很多关于内生放线菌提高宿主抵御病原微生物能力和影响宿主生长的报道^[22-24]。内生菌次级代谢产物可能以媒介传导信号方式作用于宿主，从而提高宿主抵御疾病能力^[25]。Verma 等^[8]从印楝各个部位分离到 55 株放线菌，其中 32 株都表现出显著的广谱抗菌活性，4%表现出较强的抑制病原真菌和细菌的活性。从本实验的抗菌活性结果分析得出：48 株(80%)具有一定的抗菌活性，抗真菌数量是抗细菌数量的 1.13 倍，这可能是因为植物组织中内生病原真菌类群占优势^[26]，表现了内生放线菌与其宿主植物之间互惠互利的共生关系。川楝根中抗菌的内生放线菌数量最多，其次是叶，果中最少，这可能是因为根与土壤直接接触，土壤中的放线菌进入植物根中的可能性很大，这就导致了植根中内生放线菌的数量高于植物其它部位，而果的生长时期本就不长，这可能是导致果中的内生放线菌分布较少的因素。川楝内生放线菌表现出广谱的抗菌活性，这暗示其内生放线菌次级代谢产物的种类丰富，为进一步挖掘抗菌活性物质提供了材料。

化合物合成基因筛选作为一种发现新药先导化合物的方法已被广泛使用^[27-28]，它可以大大提高发现先导化合物的效率。Sun 等^[29]对从软珊瑚湖 *Scleronephthya* sp. 中分离得到的放线菌进行 PKS II 基因筛选，并在其中一株含有该基因的小单孢菌株 *Micromonospora* sp. A5-1 的发酵液中发现了角萜环聚酮化合物 Jadomycin B。目前已有药用植物内生放线菌功能基因筛选的诸多报道，罗红丽等^[30]从百部中分离获得的内生放线菌中 17 株具有 PKS/NRPS 基因，8 株菌具有卤化酶基因，且卤化酶阳性代表菌株的发酵产物具有抗细菌活性和卤代化合物特征。Li 等^[31]从 *Artemisia annua* L. 分离得到的内生放线菌中 21.1%具有 PKS I 基因，45.2%具有 PKS II 基因，32.5%具有 NRPS 基因。Passari 等^[32]从 7 种药用植物中分离获得的内生放线菌具有 PKS 和

NRPS 基因。本研究中功能基因的检测结果显示, 川楝内生放线菌大部分都含有聚酮类化合物合成功能基因, 非核糖体类化合物基因以及卤代酶基因也有一定的阳性检出率。但是具有合成化合物基因的菌株并不都具有相应抗菌活性, 其原因可能是对内生菌生理和发酵条件等的基础研究不足, 而导致功能基因的检测与其活性结果不一致, 但可以在分子水平上对菌株某些化合物合成基因的检测来评价其合成此类化合物的潜力, 同时也可以通过这些合成基因的克隆、测序工作等研究发现新的基因, 并在其指导下发现新的化合物^[33]。

综上所述, 川楝内生放线菌具有丰富的多样性、广谱的抗菌活性和聚酮类、非核糖体类化合物以及卤化物合成基因, 表明川楝内生放线菌在次生代谢产物合成方面拥有巨大潜力, 这为进一步的药物开发提供了丰富的菌种资源。

参 考 文 献

- [1] Bérty J. Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading[J]. *Journal of Antibiotics*, 2012, 65(8): 385-395
- [2] Yang Y, Jiang Y, Yin M, et al. Synthetic genome of secondary metabolites of *Actinomyces*[J]. *Journal of Microbiology*, 2007, 27(6): 68-71 (in Chinese)
杨颖, 姜怡, 尹敏, 等. 放线菌次生代谢产物合成基因组研究[J]. *微生物学杂志*, 2007, 27(6): 68-71
- [3] Strobel GA. Endophytes as sources of bioactive products[J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5(6): 535-544
- [4] Chinese *Herbalism* editorial board, state administration of traditional Chinese medicine of the people's republic of China. Chinese Materia Medica[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1998 (in Chinese)
国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998
- [5] Zhang XF. Studies on embryotoxicity of toosendanin and immunological toxicology mechanism of uterus in pregnant mice[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest Agriculture and Forestry University, 2004 (in Chinese)
张先福. 川楝素对孕鼠的胚胎毒性与子宫局部免疫毒理学研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2004
- [6] Shan SF. Studies on the biodiversity and metabolite bioactivities of the endophytic fungi from melia azedarach[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2009 (in Chinese)
单淑芳. 苦楝内生真菌生物多样性及其代谢产物生物活性的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2009
- [7] Zhang X. Insecticidal properties of chinaberry bark extracts against imported cabbage worm[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 1989, 16(3): 205-210 (in Chinese)
张兴. 几种川楝素提制品对菜青虫的生物活性[J]. *植物保护学报*, 1989, 16(3): 205-210
- [8] Verma VC, Gond SK, Kumar A, et al. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity[J]. *Microbial Ecology*, 2009, 57(4): 749-756
- [9] Chen M, Li XL, Li Q, et al. Isolation and diversity of endophytic actinomycetes from *Melia toosendan*[J]. *Microbiology China*, 2015, 42(2): 264-271 (in Chinese)
陈萌, 李小林, 李强, 等. 川楝内生放线菌的分离及多样性研究[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(2): 264-271
- [10] 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
- [11] Shen P, Chen XD. Microbiology Experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2007 (in Chinese)
沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007
- [12] Ayuso-Sacido A, Genilloud O. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups[J]. *Microbial Ecology*, 2005, 49(1): 10-24
- [13] Metsä-Ketelä M, Salo V, Halo L, et al. An efficient approach for screening minimal PKS genes from *Streptomyces*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1999, 180(1): 1-6
- [14] Hornung A, Bertazzo M, Dziarnowski A, et al. A genomic screening approach to the structure-guided identification of drug candidates from natural sources[J]. *ChemBioChem*, 2007, 8(7): 757-766
- [15] Zhao K, Penttinen P, Guan TW, et al. The diversity and anti-microbial activity of endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants in Panxi plateau, China[J]. *Current Microbiology*, 2011, 62(1): 182-190
- [16] Yan XC. Isolation and Identification of Actinomycetes[M]. Beijing: China Science Press, 1992
- [17] Nie M, Zhang XD, Wang JQ, et al. Rhizosphere effects on soil bacterial abundance and diversity in the Yellow River Deltaic ecosystem as influenced by petroleum contamination and soil salinization[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41(12): 2535-2542
- [18] 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
- [19] Mahesh B, Tejesvi MV, Nalini MS, et al. Endophytic mycoflora of inner bark of *Azadirachta indica* A. Juss[J]. *Current Science*, 2005, 88(2): 218-219
- [20] Verma VC, Gond SK, Kumar A, et al. The endophytic mycoflora of bark, leaf, and stem tissues of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) from Varanasi (India)[J]. *Microbial Ecology*, 2007, 54(1): 119-125
- [21] Tang YL, Wang R, Hong K. Isolation and environmental adaptation of endophytic actinomycetes in *Acanthus ilicifolius* of different mangrove[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(1): 25-32 (in Chinese)
唐依莉, 王蓉, 洪葵. 不同红树林地区老鼠簕内生放线菌的分离及其环境适应性[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(1): 25-32
- [22] Gupta R, Saxena RK, Chaturvedi P, et al. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis[J]. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, 78(4): 378-383
- [23] Katznelson H, Cole SE. Production of gibberellin-like substances by bacteria and actinomycetes[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1965, 11(4): 733-741
- [24] Kolomiets EI, Zdor NA, Romanovskaya TV, et al. Certain aspects

- of the phytoprotective activity of *Streptomyces flavescens* an antagonist of phytopathogenic fungi[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 1997, 33(5): 451-454
- [25] Granér G, Persson P, Meijer J, et al. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*[J]. Fems Microbiology Letters, 2003, 224(2): 269-276
- [26] Strobel GA. Harnessing endophytes for industrial microbiology[J]. Current Opinion in Microbiology, 2006, 9(3): 240-244
- [27] Mestä-Ketelä M, Halo L, Munukka E, et al. Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68 (9): 4472-4479
- [28] Liu W, Ahlert J, Gao QJ, et al. Rapid PCR amplification of minimal enediene polyketide synthase cassettes leads to a predictive familial classification model[J]. Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(21): 11959-11963
- [29] Sun W, Peng CS, Zhao YY, et al. Functional gene-guided discovery of type II polyketides from culturable actinomycetes associated with soft coral *Scleronephthya* sp.[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42847
- [30] Luo HL, Lin XZ, Zhang LM, et al. Isolation, classification and biosynthetic potential of endophytic actinomycetes from *Stemona*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52(3): 389-395 (in Chinese)
- 罗红丽, 林显钊, 张利敏, 等. 百部内生放线菌的分离、分类及次级代谢潜力[J]. 微生物学报, 2012, 52(3): 389-395
- [31] Li J, Zhao GZ, Huang HY, et al. Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L.[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2012, 101(3): 515-527
- [32] Passari AK, Mishra VK, Saikia R, et al. Isolation, abundance and phylogenetic affiliation of endophytic actinomycetes associated with medicinal plants and screening for their *in vitro* antimicrobial biosynthetic potential[J]. Frontiers in Microbiology, 2015, 6: 273
- [33] Amnuaykanjanasin A, Pongphanphot S, Sengpanich N, et al. Discovery of insect-specific polyketide synthases, potential PKS-NRPS hybrids, and novel PKS clades in tropical fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75(11): 3721-3732

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年,月刊,是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办,国内外公开发行人,以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括:基础微生物学研究,农业微生物学研究,工业微生物学研究,医学微生物学研究,食品微生物学研究,环境微生物学研究,微生物功能基因组研究,微生物蛋白组学研究,微生物模式菌株研究,微生物工程与药物研究,微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊。曾获国家优秀科技期刊三等奖,中国科学院优秀科技期刊三等奖,北京优秀科技期刊奖,被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计,本刊2012-2015年以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一名而连续4年获得“百种中国杰出学术期刊奖”,并入选“中国精品科技期刊”,成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。2014年获得中国科学院科技期刊三等出版基金资助;2015年获得中国科协精品科技期刊工程项目资助。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买,2017年每册定价80元,全年960元,我们将免邮费寄刊。

邮购地址:(100101)北京朝阳区北辰西路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
Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

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

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413