

## 研究报告

## 8 种贵州药用植物内生放线菌的分离及多样性研究

闫晓睿 杨超 安明彪 石慧昌 李红颖 庾利\*

(遵义医学院医学与生物医学研究中心 遵义市理化分析测试工程研究中心 贵州 遵义 563006)

**摘要:**【背景】药用植物内生菌能产生多种活性较好的次级代谢产物,是新抗生素发现的重要来源。目前,药用植物内生菌的研究主要集中在内生真菌,内生放线菌研究相对较少,是一个尚未充分开发的新领域。【目的】研究贵州药用植物内生放线菌多样性,以期发现新种放线菌或产新活性物质的放线菌,为微生物药物研究奠定基础。【方法】药用植物样品表面消毒后用粉碎机粉碎,采用 9 种不同分离培养基分离放线菌;通过提取放线菌基因组 DNA,PCR 扩增 16S rRNA 基因序列,测定序列并提交 EzBioCloud 数据库进行序列比对,构建系统进化树,进行内生放线菌多样性分析。【结果】通过形态特征初步排重,从 8 种药用植物样品中共分离得到内生菌 62 株,测定其 16S rRNA 基因序列,序列比对结果表明其中的 57 株菌分布于放线菌域的 5 目 8 科 16 属,分别是短小杆菌属(*Curtobacterium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、植物杆菌属(*Plantibacter*)、原小单胞菌属(*Promicromonospora*)、动球菌属(*Kineococcus*)、壤球菌属(*Agrococcus*)、沼杆菌属(*Patulibacter*)、气微菌属(*Aeromicrobium*)、拉贝达氏菌属(*Labeledella*)、叶居菌属(*Fronidhabitans*)、冷杆菌属(*Frigoribacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、动孢菌属(*Kineosporia*)、*Amnibacterium* 属,其中短小杆菌属(*Curtobacterium*)为优势菌属,菌株 M8JJ-5 和 M2KJ-4 的 16S rRNA 基因序列分别与有效发表菌株 *Amnibacterium kyonggiense* KSL51201-037<sup>T</sup> (FJ527819) 和 *Aeromicrobium fastidiosum* DSM10552<sup>T</sup> (Z78209) 的相似性最高,相似性分别为 97.29% 和 98.95%,可能为潜在新物种。【结论】贵州药用植物中蕴藏着多样性丰富的放线菌且具有从中发现新放线菌的潜力,能为新抗生素的发现提供菌种储备,也为今后对该地区放线菌资源的认识和开发利用提供理论依据。

**关键词:** 药用植物, 内生放线菌, 多样性

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (81603079); Youth Science and Technology Personnel Growth Project of Guizhou Provincial Education Department (QianJiaoHe KY Zi[2016]200); Startup Foundation for Doctors of Zunyi Medicinal University (F-749); Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship of Guizhou Province (201710661031); Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship of Zunyi Medical University (Zunyi20163735)

\*Corresponding author: E-mail: tuoli25@163.com

**Received:** January 24, 2018; **Accepted:** May 11, 2018; **Published online** (www.cnki.net): June 06, 2018

**基金项目:** 国家自然科学基金(81603079); 贵州省教育厅青年科技人才成长项目(黔教合 KY 字[2016]200); 遵义医学院博士启动基金(F-749); 贵州省高等学校大学生创新创业训练计划(201710661031); 遵义医学院大学生创新创业训练计划(遵医 20163735)

\*通信作者: E-mail: tuoli25@163.com

**收稿日期:** 2018-01-24; **接受日期:** 2018-05-11; **网络首发日期**(www.cnki.net): 2018-06-06

## Diversity of endophytic actinobacteria isolated from medicinal plants collected from Guizhou Province

YAN Xiao-Rui YANG Chao AN Ming-Biao SHI Hui-Chang LI Hong-Ying TUO Li\*

(Research Center for Medicine & Biology, Zunyi Engineering Research Center of Physical Testing and Chemical Analysis, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563006, China)

**Abstract: [Background]** Endophyte from medicinal plants were important resource for discovery of new antibiotics due to their ability of producing a wide variety of secondary metabolites with good activity. Concerning the endophytic fungi, many studies have been carried out, but few reported about endophytic actinobacteria. **[Objective]** This study is aimed at analyzing the diversity of actinobacteria isolated from medicinal plants in Guizhou Province. **[Methods]** Various tissues from 8 kinds of medicinal plants as samples were collected in Guizhou Province, China. Samples were grinded into powders after surface sterilization and cultured on 9 different media for strain isolation. To determine the phylogenetic position of the strains, 16S rRNA gene sequences were obtained by PCR amplification and direct sequencing, then compared with EzBioCloud database, finally carried out phylogenetic analysis based on 16S rRNA gene sequences. **[Results]** A total of 62 strains were obtained, 57 of which were actinobacteria and were affiliated to 16 genera 8 families 5 order, contained genus *Curtobacterium*, *Streptomyces*, *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Plantibacter*, *Promicromonospora*, *Kineococcus*, *Agrococcus*, *Patulibacter*, *Aeromicrobium*, *Labedella*, *Fronidhabitans*, *Frigoribacterium*, *Arthrobacter*, *Kineosporia* and *Amnibacterium*. The dominant genus is *Curtobacterium*. The highest similarity of 16S rRNA gene sequence between strain M8JJ-5 and the validly described species *Amnibacterium kyonggiense* KSL51201-037<sup>T</sup> (FJ527819), between strain M2KJ-4 and the validly described species *Aeromicrobium fastidiosum* DSM10552<sup>T</sup> (Z78209) was 97.29% and 98.95%, respectively, which indicated that the strains M8JJ-5 and M2KJ-4 were potential new taxa. **[Conclusion]** The study demonstrates that diversity of endophytic actinobacteria from medicinal plants are rich and medicinal plants as a special resource for discovery of new pharmaceutical microorganisms deserved to be further explored.

**Keywords:** Medicinal plants, Endophytic actinobacteria, Diversity

抗生素的不规范使用甚至滥用导致耐药菌日益猖獗,亟需高效、优质的新型抗生素。微生物是抗生素的主要来源,发现包括新物种在内的新微生物资源是发现新抗生素的重要基础。由于从普通环境中发现新微生物资源及新抗生素的几率越来越小,研究者开始将目光转向特殊环境中的微生物,例如沙漠、冰川、极地、海洋、植物内部环境微生物等。植物内生菌是指在其生活史的一定阶段或全部阶段存活于健康植物组织内部或细胞间隙,而不使宿主植物表现出明显感染症状的微生物,包括细菌、真菌和放线菌<sup>[1]</sup>。1993年,Stierle等首次从短叶红豆杉中分离得到一株能合成抗癌物质紫杉醇的内生真菌,表明内生菌具有合成与宿主植物相同

或相似的活性成分的功能<sup>[2]</sup>。这一发现掀起了一场从药用植物中分离内生菌的热潮。研究证明,从土壤微生物分离的新物质仅为38%,而从植物内生菌分离的51%生物活性物质是新的<sup>[3]</sup>,显示植物内生菌具有巨大的开发潜力。目前,药用植物内生菌的研究主要集中在内生真菌,内生放线菌因其生长缓慢、分离困难而研究相对较少,是一个尚未充分开发的新领域<sup>[4-5]</sup>。药用植物内生放线菌能产生包括多肽、大环内酯、有机酸、生物碱、醌、萜类等在内的多种次级代谢产物,其中很多具有强抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗炎、抗疟疾等活性<sup>[1]</sup>。因此,从药用植物中分离放线菌,从中筛选具有药用价值的抗肿瘤、抗菌、抗病毒等活性物质或新型化合物,利

用内生菌快速发酵产生某些紧缺和新型药物, 为新药的研发提供了新途径。同时也为解决某些药用植物特别是珍稀濒危药用植物资源短缺甚至物种灭绝问题提供了新途径, 具有重要的生态学意义和经济价值。

贵州省地处中国西南高原东部, 境内多高山河谷, 地势起伏较大, 平均海拔 1 100 m 左右。气候主要受东南季风影响, 冬无严寒, 夏无酷暑, 阴雨和雾日多, 立体气候明显, 全年降水量 1 100–1 300 mm, 境内河流纵横。特定的山区环境、复杂多样的自然条件、温暖的气候, 蕴藏着丰富而特有的药用植物资源<sup>[6-7]</sup>。药用植物种类和生存环境的多样性使得内生菌具有丰富的物种多样性, 但目前对该地区药用植物内生菌特别是内生放线菌的开发力度还远远不够。丁朋晓等<sup>[8]</sup>对贵州地区采集的鱼腥草、马齿苋、车前草、麦冬 4 种植物进行了内生菌的分离, 共分离到 63 株内生放线菌, 其中 17 株对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌等表现出选择性抑菌作用。为了深入了解贵州地区药用植物内生放线菌的分布特征, 更好地挖掘和利用该地区的药用植物内生放线菌资源, 本研究以贵州 8 种药用植物作为研究对象, 通过分离内生放线菌菌株, 并根据其 16S rRNA 基因序列信息对获得菌株进行分子生物学鉴定及系统发育分析, 获得 8 种药用植物内生放线菌多样性信息, 以期发现特色放线菌资源, 为微生物药物研发提供菌种资源储备及理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 药用植物样品

8 种药用植物样品于 2016 年 11 月采集自贵州省遵义市新浦镇, 详细信息见表 1, 样品装于自封袋中, 封口后带回实验室, 4 °C 保存备用。

#### 1.1.2 培养基

(1) 分离培养基: 参考李静等<sup>[9]</sup>所采用的分离培养基, 设计以下 9 种分离培养基进行菌株分离。酵母膏培养基(M1, g/L): 酵母浸膏 0.25, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

表 1 采集的药用植物样品信息

Table 1 Information of medicinal plants

样品 Sample	植物名称 Plant name	采样部位 Type of sample	采样地点 Site information
1	密蒙花 <i>Buddleja officinalis</i>	茎、根	N27°43'15", E107°3'15"
2	白蔹 <i>Ampelopsis japonica</i>	茎	N27°43'19", E107°3'14"
3	百部 <i>Stemona tuberosa</i>	叶	N27°43'20", E107°3'14"
4	鸡屎藤 <i>Paederia scandens</i>	茎、叶	N27°43'20", E107°3'15"
5	紫苏 <i>Perilla frutescens</i>	叶	N27°43'20", E107°3'15"
6	夹竹桃 <i>Nerium oleander</i>	皮、叶	N27°43'28", E107°3'19"
7	杜仲 <i>Eucommia ulmoides</i>	皮、叶	N27°44'27", E107°3'57"
8	苦楝树 <i>Melia azedarach</i>	皮	N27°44'12", E107°4'9"

0.50, 琼脂 18.00, pH 7.2; 腐殖酸培养基(M2, g/L): 腐殖酸 1.00, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.50, KCl 1.71, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, CaCO<sub>3</sub> 0.02, 琼脂 20.00, pH 7.2; 几丁质培养基(M3, g/L): 几丁质 2.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, ZnSO<sub>4</sub> 0.001, MnCl<sub>2</sub> 0.001, 琼脂 20.0, pH 7.2; 丙酸钠培养基(M4, g/L): 丙酸钠 2.0, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.1, KCl 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, 甜菜碱 1.25, 琼脂 20.0, pH 7.2; 棉子糖组氨酸培养基(M5, g/L): 棉子糖 5.0, L-组氨酸 1.0, KNO<sub>3</sub> 1.0, NaCl 1.0, CaCl<sub>2</sub> 2.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, 琼脂 20.0, pH 7.2; 琥珀酸钠培养基(M6, g/L): 琥珀酸钠 0.90, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.50, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.10, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 琼脂 20.00, pH 7.2; 改良 ISP2 培养基(M7, g/L): 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 5.0, 葡萄糖 4.0, Vitamin mixture (VB1、VB2、VB5、VB6、苯丙氨酸、丙氨酸各 0.001, 生物素 0.0003), 微量盐 微量盐 (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001), 琼脂 20.0, pH 7.2; 改良高氏二号培养基(M8, g/L): 葡萄糖 5.0, 蛋白胨 0.5, 胰蛋白胨 0.3, NaCl 1.0, CaCl<sub>2</sub> 2.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0,

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.0, 复合维生素(VB1、VB2、VB5、VB6、苯丙氨酸、丙氨酸各 0.001 g, 生物素 0.000 3 g), 微量盐 微量盐(FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.002, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.001, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.001), 琼脂 20.0, pH 7.2; R2A 培养基(M9, g/L): 酵母粉 0.5, 胰蛋白胨 0.5, 酪蛋白氨基酸 0.5, 葡萄糖 0.5, 可溶性淀粉 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, 丙酮酸钠 0.3, 琼脂 20.0, pH 7.2。

(2) 纯化及斜面培养基: ISP 2 培养基(g/L): 酵母提取物 4.0, 麦芽提取物 10.0, 葡萄糖 4.0, 琼脂 20.0, pH 7.2。

(3) 感受态细胞培养基: LB 液体培养基(g/L): 酵母提取物 5.0, 胰蛋白胨 10.0, NaCl 10.0, pH 7.0。LB 固体培养基在液体培养基中添加 2%的琼脂。

### 1.1.3 抑制剂

茶啉酮酸 20 mg/L, 重铬酸钾 60 mg/L, 待培养基温度降至 40–50 °C 时加入。

### 1.1.4 主要试剂和仪器

2×EasyTaq SuperMix、High Fidelity PCR SuperMix、pEASY-T1 Cloning Kit、EasyPure Quick Gel Extraction Kit、Trans-T1 感受态细胞、DNA Marker、X-gal 等, 北京全式金生物技术有限公司; PCR 引物 27F 和 1492R、4S Red Plus 核酸染色液, 生工生物工程(上海)股份有限公司; Chelex-100 树脂, Bio-Rad 公司; Agarose、TAE 缓冲液、IPTG、氨苄青霉素, 北京绿泽森公司; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

生化培养箱, 上海智城分析仪器制造有限公司; 高压蒸汽灭菌锅, Tomy 公司; 小型离心机, Eppendorf 公司; PCR 扩增仪、凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京市六一仪器厂; 粉碎机, 永康市天祺盛世工贸有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 药用植物样品处理

参考黄海玉等<sup>[10]</sup>和 Qin 等<sup>[11]</sup>实验方法, 将采集的药用植物样品先用流动的自来水冲洗干净, 再超声清洗, 彻底去除植物表面的杂质, 把植物样品剪

切成 5 cm 左右长度的节段进行表面消毒。样品依次用 1%吐温-20 浸泡 30 s, 次氯酸钠水溶液(含 1%有效氯)浸泡 5 min, 2.5%硫代硫酸钠浸泡 10 min 以中和残留的次氯酸钠, 75%酒精浸泡 5 min, 10%碳酸氢钠浸泡 10 min, 每次浸泡后均用无菌水清洗 3 次。样品在超净工作台中用灭菌的吸水纸吸干表面的水分, 晾干后用无菌粉碎机粉碎备用。

### 1.2.2 菌株分离、纯化与保存

取适量粉碎的植物样品均匀撒在已添加抑制剂的分离培养基平板上, 同时, 为了验证表明消毒效果, 取 200 μL 最后一次用于清洗表面消毒样品的无菌水涂布到 ISP 2 培养基上, 与撒有样品的分离平板一同置于 28 °C 培养箱培养 4–8 周, 及时观察分离培养基上的菌落形态, 并挑取肉眼判断为放线菌的单菌落进行菌株编号, 三区划线法接种于纯化培养基平板上, 重复这一过程, 直至得到纯菌株。纯化好的菌株接种于斜面培养基上, 生长好后置于 4 °C 保藏; 同时以 20% (体积比)甘油作为保护剂, 将菌株接种于其中并置于–80 °C 保藏。

### 1.2.3 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析

(1) 基于 16S rRNA 基因序列的分子鉴定。采用 Chelex-100 法<sup>[12–13]</sup>提取放线菌基因组 DNA, 以提取的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, PCR 扩增引物为通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCT CAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTACGACT T-3'。PCR 反应体系: 2×EasyTaq SuperMix 25 μL, 引物 27F 和 1492R (10 μmol/L)各 2 μL, 模板 2 μL, 无菌水 19 μL。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测, 将电泳检测结果显示为阳性的 PCR 扩增产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行序列测定。潜在新物种的 16S rRNA 基因序列使用 High Fidelity PCR SuperMix 扩增, 反应体系及条件同上; PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 目标阳性条带切胶回收, 将回收 DNA 片段连接到 pEASY-1 克隆载体后, 转化至 Trans1-T1 感受态细胞中; 利

用抗性和蓝白斑筛选挑取 2 个阳性克隆子, 将阳性克隆子接种于添加氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 10 h, 菌液交由生工生物工程(上海)股份有限公司完成测序。

(2) 序列分析和系统发育树构建: 测序获得的 16S rRNA 基因序列利用 EzBioCloud (<http://www.ezbiocloud.net>)数据库中的 EzTaxon 在线比对服务进行相关标准菌株的相似性比对搜索, 确定菌株的分类学地位, 并从中调出相关的标准菌株的序列作为参比对象, 用 ClustalW<sup>[14]</sup>软件进行多序列比对, 采用 MEGA 5.0<sup>[15]</sup>软件以邻接法(Neighbor-Joining)<sup>[16]</sup>进行聚类分析并构建系统发育树, 系统进化矩阵根据 Kimura-2-parameter 模型<sup>[17]</sup>估算, 重复取样 1 000 次进行自展值分析以评估进化树拓扑结构的稳定性<sup>[18]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物表面消毒效果评价

最后一次用于清洗植物表面的无菌水涂布 ISP 2 平板, 28 °C 培养 2 周没有微生物生长, 说明植物表面消毒彻底, 分离到的放线菌为植物内部所有, 而非外界环境污染所致。

### 2.2 菌种分离结果

从贵州地区采集 8 种药用植物, 表面消毒粉碎后, 采用 9 种分离培养基分离内生放线菌。根据菌落形态初步排重, 选择 62 株菌进行 16S rRNA 基因序列扩增和序列分析。16S rRNA 基因序列比对结果表明, 其中的 57 株为放线菌。8 种样品中, 密蒙花和苦楝树分离到的放线菌菌株数最多, 均为 12 株, 其次是从紫苏中分离到放线菌 11 株, 不同植物样品中放线菌出菌数见图 1。9 种分离培养基中, M6 和 M8 号培养基出菌数最高, 均为 10 株, 但在 M8 培养基分离的种属多样性最高, 而 M6 培养基分离菌株较单一, M3 号培养基未分离到放线菌。不同培养基中分离的菌株具有特殊性, 气微菌属(*Aeromicrobium*)、动球菌属(*Kineococcus*)为 M2 培养基所分离, 冷杆菌属(*Frigoribacterium*)为 M4 培养基所分离, 叶居菌属(*Frondihabitans*)为 M7 培

养基所分离, 盐沼菌属(*Patulibacter*)、壤球菌属(*Agrococcus*)、动球菌属(*Kineosporia*)、*Amnibacterium* 为 M7 培养基所分离, 不同培养基中放线菌出菌数见表 2。因此, 根据分离到的种属数目以及菌株数目, 分离效果较好的培养基依次为 M8 培养基、M7 培养基、M2 培养基、M9 培养基、M6 培养基、M1 培养基、M5 培养基、M4 培养基、M3 培养基。

### 2.3 内生放线菌多样性分析

分离到放线菌 57 株, 分布于 5 目 8 科 16 属, 结果如表 3 所示, 包括短小杆菌属(*Curtobacterium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、微杆菌属(*Microbacterium*)、纤维单胞菌属(*Cellulomonas*)、植物杆菌属(*Plantibacter*)、原小单孢菌属(*Promicromonospora*)、动球菌属(*Kineococcus*)、壤球菌属(*Agrococcus*)、沼杆菌属(*Patulibacter*)、气微菌属(*Aeromicrobium*)、拉贝达氏菌属(*Labeledella*)、叶居菌属(*Frondihabitans*)、冷杆菌属(*Frigoribacterium*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、动孢菌属(*Kineosporia*)、*Amnibacterium* 属。其中, 短小杆菌属(*Curtobacterium*) 26 株, 占所分离菌株的 45.6%, 为优势菌属(表 3)。57 株放线菌多样性分布见图 2。

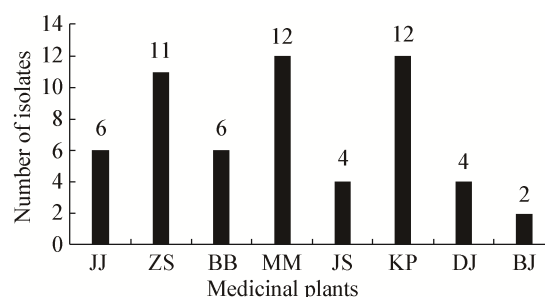


图 1 不同药用植物样品中分离得到的内生放线菌

Figure 1 Endophytic actinobacteria isolated from different medicinal plants

注: JJ: 夹竹桃; ZS: 紫苏; BB: 百部; MM: 密蒙花; JS: 鸡矢藤; KP: 苦楝树; DJ: 杜仲; BJ: 白藜。

Note: JJ: *Nerium oleander*; ZS: *Perilla frutescens*; BB: *Stemona tuberosa*; MM: *Buddleja officinalis*; JS: *Paederia scandens*; KP: *Melia azedarach*; DJ: *Eucommia ulmoides*; BJ: *Ampelopsis japonica*.

表 2 9 种培养基分离内生放线菌的效果

Table 2 Endophytic actinomycetes isolated from medicinal plants by using 9 selective media

培养基 Medium	属 Genus	属数目 Total genus	菌株数目 Strains numbers
M1	<i>Curtobacterium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Streptomyces</i>	3	7
M2	<i>Curtobacterium</i> , <i>Cellulomonas</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Aeromicrobium</i> , <i>Kineococcus</i>	5	8
M3		0	0
M4	<i>Curtobacterium</i> , <i>Frigoribacterium</i>	2	3
M5	<i>Curtobacterium</i> , <i>Plantibacter</i> , <i>Labeledella</i>	3	5
M6	<i>Curtobacterium</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Labeledella</i>	3	10
M7	<i>Curtobacterium</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Streptomyces</i> , <i>Fronidhabitans</i>	5	9
M8	<i>Patulibacter</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Agrococcus</i> , <i>Labeledella</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Amnibacterium</i> , <i>Promicromonospora</i> , <i>Kineosporia</i>	8	10
M9	<i>Labeledella</i> , <i>Curtobacterium</i> , <i>Plantibacter</i> , <i>Arthrobacter</i>	4	5

表 3 57 株放线菌的多样性分布情况

Table 3 Diversity of 57 strains

目 Order	科 Family	属 Genus	菌株数量 Number of strains
链霉菌目 Streptomycetales	链霉菌科 Sterptomycetaceae	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	4
微球菌目 Micrococcales	微杆菌科 Microbacteriaceae	微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	3
		拉贝达氏菌属 <i>Labeledella</i>	4
		短小杆菌属 <i>Curtobacterium</i>	26
		植物杆菌属 <i>Plantibacter</i>	2
		叶居菌属 <i>Fronidhabitans</i>	1
		壤球菌属 <i>Agrococcus</i>	1
		冷杆菌属 <i>Frigoribacterium</i>	1
		<i>Amnibacterium</i>	1
		纤维单孢菌科 Cellulomonadaceae	4
		纤维单孢菌属 <i>Cellulomonas</i>	4
		原小单孢菌科 Promicromonosporaceae	5
		原小单孢菌属 <i>Promicromonospora</i>	5
		微球菌科 Micrococcaceae	1
		节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	1
丙酸杆菌目 Propionibacteriales	类诺卡氏菌科 Nocardioideaceae	气微菌属 <i>Aeromicrobium</i>	1
土壤红杆菌目 Solirubrobacterales	沼杆菌科 Patulibacteraceae	沼杆菌属 <i>Patulibacter</i>	1
动孢菌目 Kineosporiales	动孢菌科 Kineosporiaceae	动球菌属 <i>Kineococcus</i>	1
		动孢菌属 <i>Kineosporia</i>	1

2.4 内生放线菌新颖性分析

菌株 M8JJ-5 与最近有效发表菌株 *Amnibacterium kyonggiense* KSL51201-037<sup>T</sup> (FJ527819)的相似性为 97.29%，在基于 16S rRNA 基因序列构建的 Neighbor-Joining (NJ)系统发育树中，菌株 M8JJ-5 与 *Amnibacterium* 属中有效发表菌株 *Amnibacterium kyonggiense* KSL51201-037<sup>T</sup> 和 *Amnibacterium soli* MB78<sup>T</sup> 聚为一簇并形成一个

独立稳定的分支(图 3)。基于相似性和进化树分析，推测菌株 M8JJ-5 为微杆菌科 *Amnibacterium* 属的潜在新种。菌株 M2KJ-4 与有效发表菌株 *Aeromicrobium fastidiosum* DSM 10552<sup>T</sup> (Z78209)相似性为 98.95%，与 *Aeromicrobium ginsengisoli* Gsoil 098<sup>T</sup> (AB245394)相似性为 98.75%，与 *Aermicrobium* 属中其它菌种的相似性均小于 98.65% (新种界限)<sup>[19]</sup>，在采用邻接法构建的系统进化树中(图 4)，



菌株 M2KJ-4 在 *Aeromicrobium* 属中与 *Aeromicrobium fastidiosum* DSM 10552<sup>T</sup> 形成一个独立稳定的分支, 基于相似性和进化关系分析, 推测菌株 M2KJ-4 可能为类诺卡氏菌科气微菌属中的新

种, 其确切分类地位将通过与菌株 *Aeromicrobium fastidiosum* DSM 10552<sup>T</sup> 和 *Aeromicrobium ginsengisoli* Gsoil 098<sup>T</sup> 进行 DNA-DNA 杂交等多相分类研究确定。

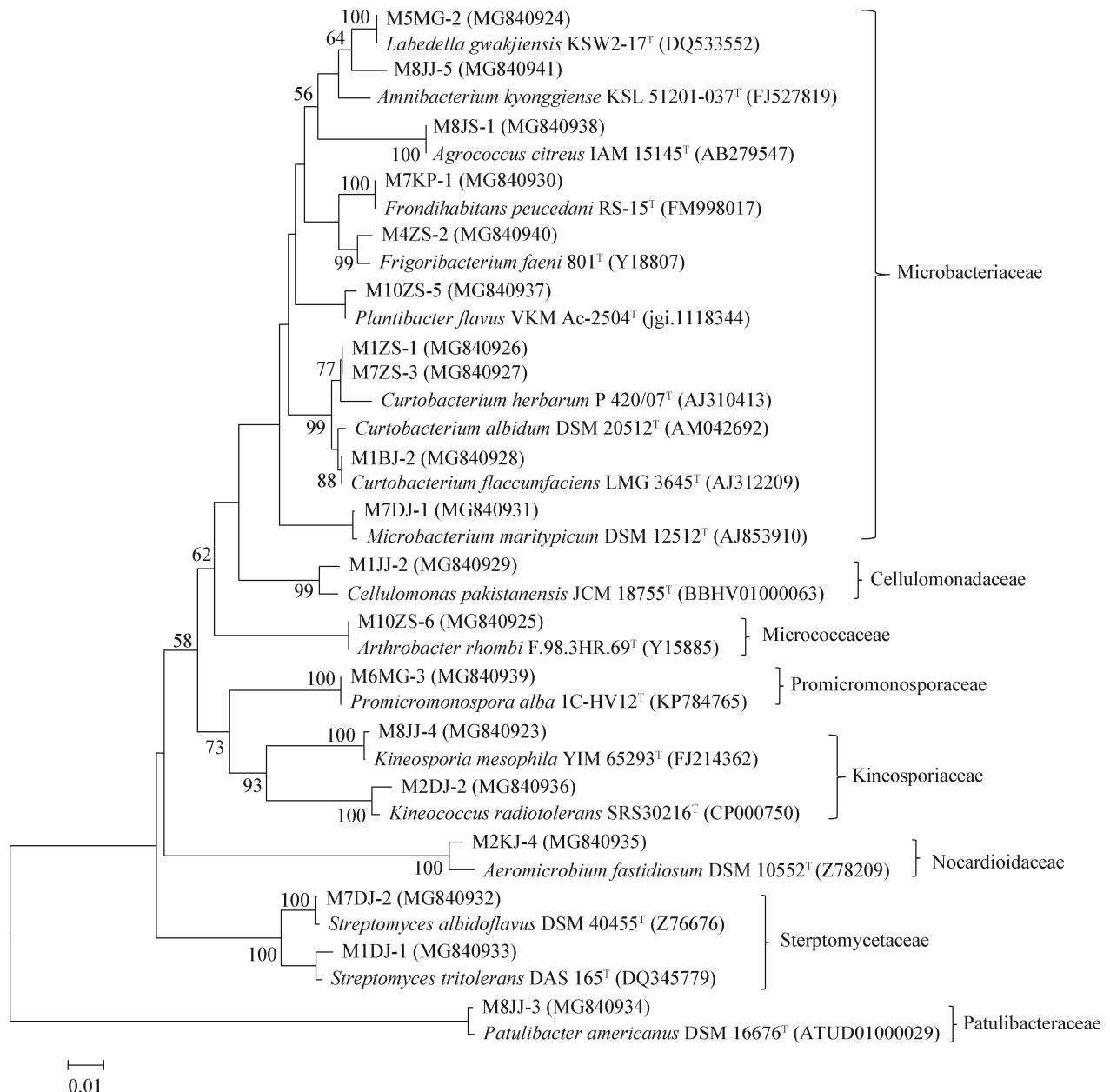


图 2 基于 16S rRNA 基因部分序列构建的部分菌株的 Neighbor-Joining 系统进化树

Figure 2 Neighbor-Joining phylogenetic tree based on partial sequences of 16S rRNA gene of partial strains

注: 分支点上的数值为 1 000 次自展值分析所得值, 仅显示大于 50% 的值; 标尺 0.01 为进化距离。

Note: Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications, only values > 50% are shown. Bar, 10 nt substitutions per 1 000 nt.

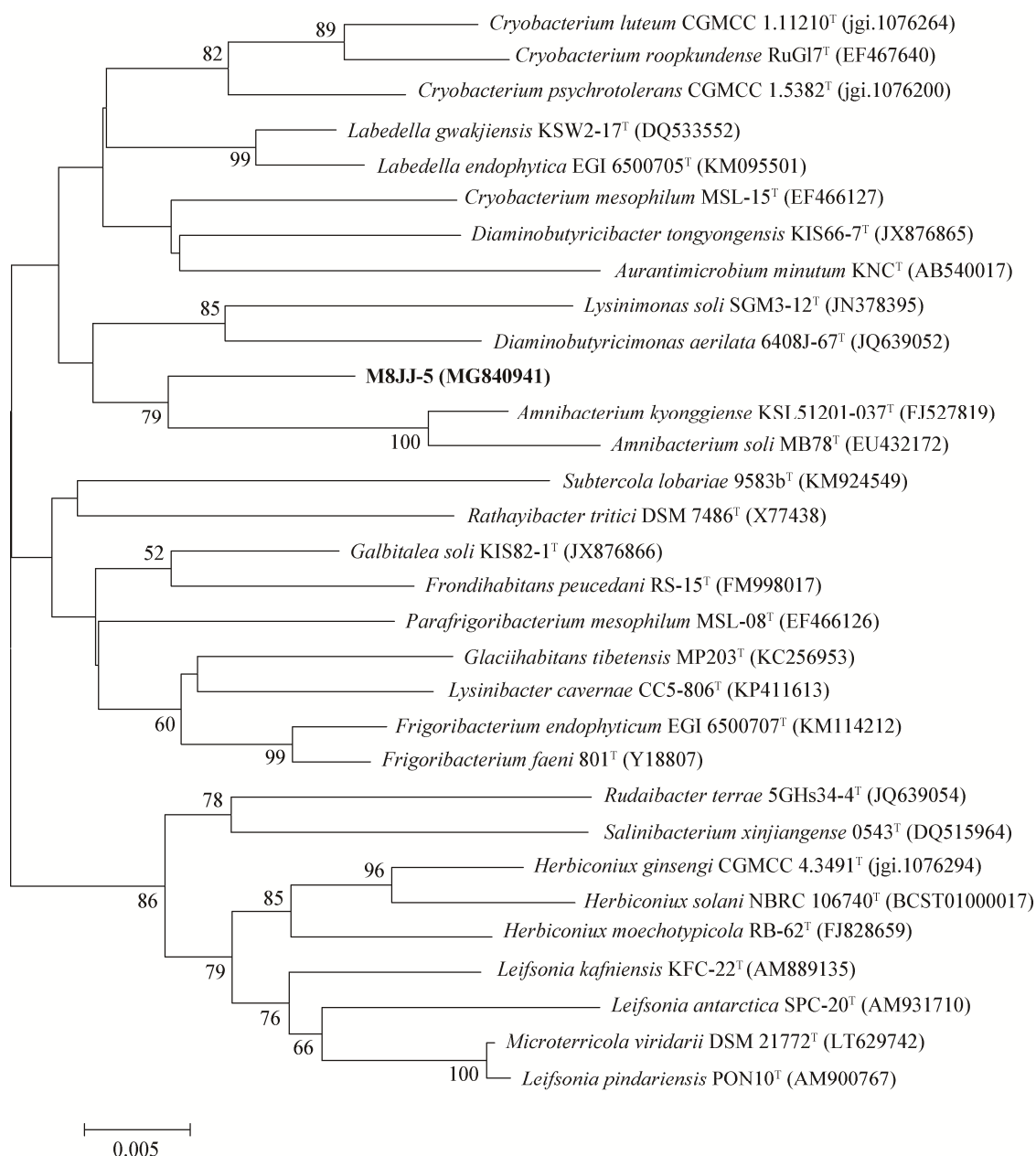


图3 基于16S rRNA基因序列构建的菌株M8JJ-5与其相邻菌株的Neighbor-Joining系统进化树

Figure 3 Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA gene sequences of strain M8JJ-5 and related strains

注：分支点上的数值为1 000次自展值分析所得值，仅显示大于50%的值；标尺0.005为进化距离。

Note: Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications, only values >50% are shown. Bar, 5 nt substitutions per 1 000 nt.

### 3 讨论与结论

药用植物特殊的内环境赋予了内生菌物种多样性的特点，内生放线菌几乎存在于所有研究过的药用植物中，随着分子生态学研究方法和微生物分离、培养技术的不断改进，不但多数普通环境中存

在的微生物在植物组织中能被检测出来，大量的新物种也已陆续从植物内生环境获得。杜慧竞等<sup>[20]</sup>从37种新鲜的药用植物样品中分离到600多株放线菌，分属于34个属，其中潜在新分类单元有7个。廖萍等<sup>[21]</sup>对药用植物川楝内生放线菌进行分离，共



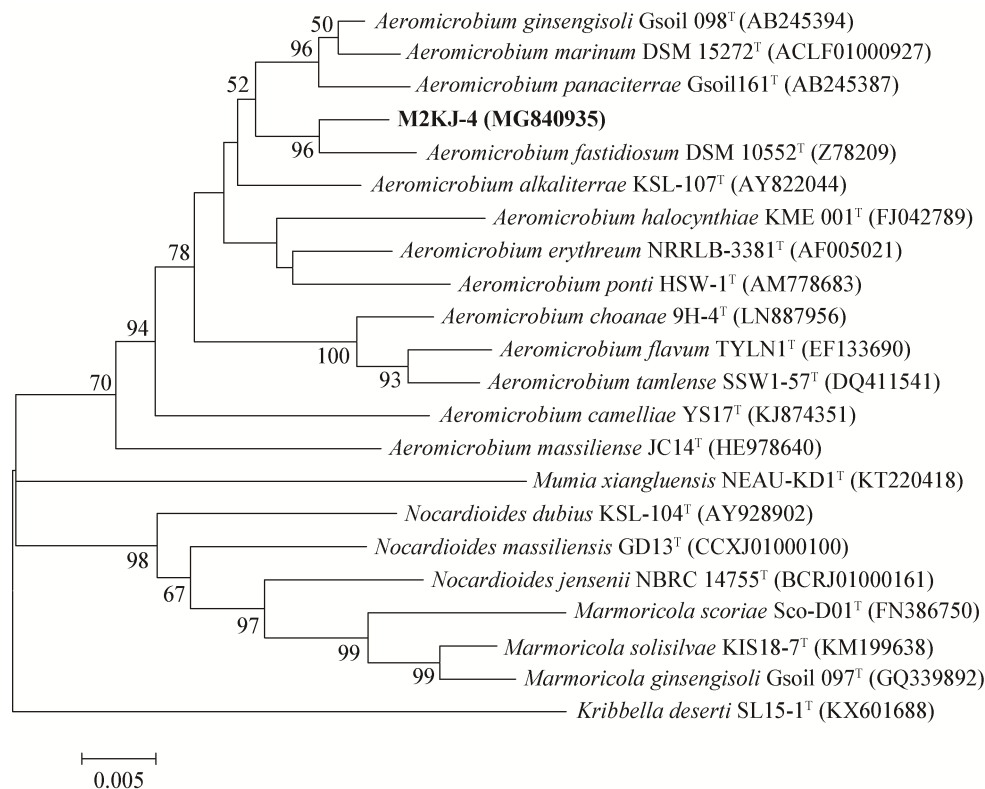


图 4 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 M2KJ-4 与其相邻菌株的 Neighbor-Joining 系统进化树

Figure 4 Neighbor-Joining tree based on 16S rRNA gene sequences of the strain M2KJ-4 and related strains

注: 分支点上的数值为 1 000 次自展值分析所得值, 仅显示大于 50% 的值; 标尺 0.005 为进化距离。

Note: Numbers at the nodes indicate the level of bootstrap values based on 1 000 replications, only values > 50% are shown. Bar, 5 nt substitutions per 1 000 nt.

分离到 60 株放线菌, 其中 25 株代表菌株分别属于 *Streptomyces*、*Micromonospora*、*Plantotetraspora*、*Streptosporangium*、*Nocardiopsis*、*Prauseria*、*Microbispora* 7 个属。孙红敏等<sup>[22]</sup>运用纯培养方法, 从 12 种药用植物蛇足石杉中分离到 102 株放线菌, 其中 *Amnibacterium*、*Cellulosimicrobium*、*Frondihabitans*、*Glaciihabitans*、*Jatrophihabitans*、*Luteimicrobium*、*Massilia* 和 *Naumannella* 等 10 个属是以前纯培养研究中相对罕见的放线菌类群, 并且发现了 9 个稀有放线菌属的潜在新种。Zhao 等<sup>[23]</sup>从攀西地区采集的 26 种药用植物中分离得到内生放线菌 560 株, 经鉴定所有菌株分别属于链霉菌属、厄氏菌属、野野村菌属、小单孢菌属、原小单孢菌属和红球菌属 6 个属, 其中链霉菌为优势菌属。罗红丽等<sup>[24]</sup>从 6 种白

部块根样品中分离到 18 株内生放线菌, 分属于链霉菌属、小单孢菌属、假诺卡氏菌属和甲基杆菌属, 分离到的菌株大多具有抗菌活性和次级代谢产物合成基因。药用植物内生放线菌分布广, 种类多, 内生放线菌的研究极大地扩大了微生物资源的范围。贵州省复杂多样的自然环境和气候, 造就了该地区丰富的药用植物资源, 药用植物种类和生存环境的多样性必然使得内生放线菌具有丰富的物种多样性。本研究共从贵州采集了 8 种药用植物, 部分植物按组织部位分别消毒后进行放线菌的分离。共分离到 57 株放线菌, 其中, 从夹竹桃茎上外皮中分离到 5 株放线菌, 而叶中仅分离到 1 株, 从杜仲茎上外皮中分离到 4 株放线菌, 而叶中未分离到, 从密蒙花的根中分离到 7 株放线菌, 从茎中

分离到 5 株放线菌。说明放线菌在同种植物不同组织器官分布具有特异性,且放线菌在根中分布的数目>茎>叶,此结果与很多研究结论一致<sup>[25-27]</sup>。分离到的放线菌分布在 16 个属中,分别是短小杆菌属、链霉菌属、微杆菌属、纤维单胞菌属、植物杆菌属、原小单胞菌属、动球菌属、壤球菌属、沼杆菌属、气微菌属、拉贝达氏菌属、叶居菌属、冷杆菌属、节杆菌属、动孢菌属、*Amnibacterium* 属,显示贵州地区药用植物内生放线菌丰富的种属多样性。多项研究结果均表明,具有极强环境适应性的链霉菌属和小单胞菌属在各个不同地区的不同植物中均是优势菌群<sup>[28]</sup>,而本研究中短小杆菌属为优势菌属。这可能是因为纯培养技术只能培养很少一部分微生物,大部分微生物难以培养,纯培养技术不能精确反映环境微生物的真实生存状况,所以采用不同的样品预处理方法和分离培养基得到的种属多样性差异较大。也有可能是因为贵州药用植物内生放线菌的分布本身就具有其特殊性。分离到的放线菌中,植物杆菌属、壤球菌属、沼杆菌属、气微菌属、拉贝达氏菌属、叶居菌属、冷杆菌属、*Amnibacterium* 属作为药用植物内生放线菌较为少见,这在某种意义上表明贵州药用植物内生放线菌资源非常丰富。另外,还从夹竹桃和苦楝树茎上外皮中分别分离到一个 *Amnibacterium* 属和 *Aeromicrobium* 属的新种, *Amnibacterium* 属目前有效发表种只有 3 个,其中 2 个分离自土壤和河水<sup>[29-30]</sup>,另一个有效种 *Amnibacterium endophyticum* 也分离自植物<sup>[31]</sup>。2 株菌的多相分类研究正在进行中。本研究结果表明,贵州药用植物中存在着丰富的放线菌资源,具备从中发现放线菌新物种及药用放线菌的潜力。

## REFERENCES

- [1] Zheng YK, Liu K, Xiong ZJ, et al. Research progress on biodiversity of endophytic actinobacteria in medicinal plants and their bioactive substances[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(14): 2089-2099 (in Chinese)  
郑有坤, 刘凯, 熊子君, 等. 药用植物内生放线菌多样性及天然活性物质研究进展[J]. 中草药, 2014, 45(14): 2089-2099
- [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] Li J, Zhao GZ, Wang HB, et al. Antitumour and antimicrobial activities of endophytic *Streptomyces* from pharmaceutical plants in rainforest[J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 47(6): 574-580
- [4] 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
- [5] Ren AZ, Gao YB. Endophyte-a kind of microorganism resource with wide perspective[J]. Microbiology China, 2001, 28(6): 90-93 (in Chinese)  
任安芝, 高玉葆. 植物内生真菌——一类应用前景广阔的资源微生物[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 90-93
- [6] Zhou YJ, Shi S, Feng JC. Environments and biodiversities of medical plants in the south-west part of China[J]. Journal of the Central University for Nationalities (Natural Sciences Edition), 2005, 14(1): 44-48 (in Chinese)  
周宜君, 石莎, 冯金朝. 我国西南地区自然环境与药用植物多样性[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2005, 14(1): 44-48
- [7] Gao PM. Sustainable usage of Guizhou's medicinal plant resources[J]. Journal of Jinzhu University of Guiyang, 2003, 52(4): 36-39 (in Chinese)  
高蓬明. 贵州药用植物资源的可持续利用[J]. 贵阳金筑大学学报, 2003, 52(4): 36-39
- [8] Ding PX, Zeng QH, Luo S, et al. Separation of four kinds of medicinal plant endophytic actinomycetes[J]. China Medicine and Pharmacy, 2016, 6(21): 63-66, 155 (in Chinese)  
丁朋晓, 曾庆华, 罗森, 等. 4 种药用植物内生放线菌的分离与初步研究[J]. 中国医药科学, 2016, 6(21): 63-66, 155
- [9] Li J, Dai SJ, Tuo L, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from eumangroves collected in dongzhaigang of Hainan Province[J]. Microbiology China, 2016, 43(8): 1753-1765 (in Chinese)  
李静, 戴素娟, 庾利, 等. 海南东寨港真红树植物内生放线菌多样性及其抗菌活性[J]. 微生物学通报, 2016, 43(8): 1753-1765
- [10] Huang HY, Li J, Zhao ZG, et al. Diversity and antimicrobial activities of endophytic actinomycetes isolated from *Alstonia scholar*[J]. Microbiology China, 2011, 38(5): 780-785 (in Chinese)  
黄海玉, 李洁, 赵国振, 等. 灯台树内生放线菌多样性及抗菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2011, 38(5): 780-785
- [11] Qin S, Wang HB, Chen HH, et al. *Glycomyces endophyticus* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from the root of *Carex baccans* Nees[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2008, 58: 2525-2528
- [12] Zhang YQ, Li WJ, Chen GZ, et al. Comparison of five PCR template preparation methods for fast identification of actinobacteria[J]. Biotechnology, 2004, 14(5): 37-39 (in Chinese)  
张玉琴, 李文均, 陈国忠, 等. PCR 法快速识别 Actinobacteria 的五种模板制备方法的比较[J]. 生物技术, 2004, 14(5): 37-39

- [13] Zhou SQ, Huang XL, Huang DY, et al. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by Chelex-100[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(2): 123-125 (in Chinese)  
周双清, 黄小龙, 黄东益, 等. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报, 2010(2): 123-125
- [14] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The Clustal\_x windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882
- [15] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731-2739
- [16] Saitou N, Nei M. The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology & Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [17] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120
- [18] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39(4): 783-791
- [19] Kim M, Oh HS, Park SC, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014, 64(2): 346-351
- [20] Du HJ, Su J, Yu LY, et al. Isolation and physiological characteristics of endophytic actinobacteria from medicinal plants[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(1): 15-23 (in Chinese)  
杜慧竞, 苏静, 余利岩, 等. 药用植物内生放线菌的分离和生物学特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(1): 15-23
- [21] Liao P, Zhao C, Zhang HN, et al. Diversity and antimicrobial activity of endophytic actinobacteria isolated from *Melia toosendan* Sieb. et Zucc[J]. Microbiology China, 2016, 43(11): 2374-2385 (in Chinese)  
廖萍, 赵翀, 张瀚能, 等. 川楝内生放线菌多样性及抗菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2016, 43(11): 2374-2385
- [22] Sun HM, Wei YZ, Fang XM, et al. Diversity of endophytic bacteria isolated from *Huperzia serrata*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(4): 614-628 (in Chinese)  
孙红敏, 魏玉珍, 方晓梅, 等. 蛇足石杉内生细菌多样性[J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 614-628
- [23] 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
- [24] 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
- [25] Qi HX, Zhou XC, Hu MJ, et al. Diversity and distribution of endophytic actinomycetes strains in *Sophora alopecuroides* L. from Baijitan Nature Reserve of Ningxia[J]. Microbiology China, 2015, 42(6): 990-1000 (in Chinese)  
祁鹤兴, 周星辰, 胡美娟, 等. 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[J]. 微生物学通报, 2015, 42(6): 990-1000
- [26] Li F, Gao CH, Zhu LB, et al. Diversity and cytotoxic activity of endophytic bacteria isolated from *Sonneratia apetala* of Maowei Sea[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(4): 689-697 (in Chinese)  
李菲, 高程海, 竺利波, 等. 茅尾海无瓣海桑内生细菌多样性及其细胞毒活性[J]. 微生物学报, 2016, 56(4): 689-697
- [27] Xu HY, Liu AH, Wang B, et al. Separation and diversity of endophytic actinomycetes from *Acanthopanax senticosus* Harms[J]. Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition), 2016, 41(5): 28-35 (in Chinese)  
徐红艳, 刘爱华, 王彬, 等. 刺五加内生放线菌的分离与多样性研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2016, 41(5): 28-35
- [28] Hallmann M, Berg G. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes[A]//Schulz BGE, Boyle CJC, Sieber TN. Microbial Root Endophytes[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 2006: 15-31
- [29] Kim SJ, Lee SS. *Amnibacterium kyonggiense* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Microbacteriaceae[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61: 155-159
- [30] Jin L, Lee HG, Kim HS, et al. *Amnibacterium soli* sp. nov., an actinobacterium isolated from grass soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2013, 63: 4750-4753
- [31] Li FN, Tuo L, Lee SMY, et al. *Amnibacterium endophyticum* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from *Aegiceras corniculatum*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2018, 68: 1327-1332