

放线菌研究专栏

植物内生放线菌的分离方法*

陈华红^{1,2} 杨颖¹ 姜怡¹ 唐蜀昆¹ 徐丽华^{1* *}(云南大学省微生物研究所 昆明 650091)¹ (楚雄师范学院化学与生命科学学院 楚雄 675000)²

摘要: 植物内生放线菌是一类大有开发潜力的微生物资源。目前使用的分离条件和技术尚不完善,容易被外源菌和内生真菌、细菌污染,因此内生放线菌尤其是稀有内生放线菌的选择性分离技术至少是今后一段时间研究的重点。介绍了植物内生放线菌选择性分离方法并提出值得研究的问题。

关键词: 植物内生放线菌, 分离方法

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0182-04

1 植物内生放线菌的定义及其研究意义

对植物内生菌的定义一直争议较多, Bacon 和 White 作出了一个较普遍接受的定义: 植物内生菌 (endophytes) 是指在其生活史的一定阶段或^[1]全部阶段生活于健康植物组织内部或细胞间隙、不引起植物产生明显病症的微生物。植物与其内生菌构成了稳定的共生关系。

植物茎和叶的化石提供的证据表明, 植物与其内生菌之间的内生关系早在高等植物出现在地球上的时候就已存在了。在植物与内生菌长期的协同进化中, 建立了独特的遗传与代谢关系。由于植物与内生菌相互间基因交换的结果, 使内生菌具有产生某些与植物相同或相似化合物的能力, 因此, 可作为天然活性物质的重要来源。地球上数十万种植物, 每一种都有一种或多种内生菌与之共生, 但只有几百种植物的内生菌被较为全面的研究过。因此, 从大量未研究过的植物中发现新内生菌种的机率较高。而新物种通常都会有新的功能基因, 新基因又意味着新的天然产物。研究表明, 近来发现的新的生物活性物质有 51% 分离自内生菌的新物种, 而仅有 38% 来自土壤微生物^[2]。最容易分离到的内生菌是真菌和细菌。由于放线菌的生长较慢, 分离比较困难, 必须用特殊的具有高度选择性的分离条件才能分离到。

放线菌属于细菌域放线菌门, 是抗生素、酶和酶抑制剂等生理活性物质的主要产生菌。迄今为止, 微生物产生的 2 万多种生物活性物质 (如抗生素等), 有近 60% ~ 80% 是放线菌产生的^[3]。初步的研究证实, 从植物内生放线菌已经分离到多种新抗生

* 国家 973 项目 (No. 2004CB719601)

国家自然科学基金项目 (No. 30270004、30560001)

** 通讯作者 Tel: 0871-5035263, Fax: 0871-5173878, E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

收稿日期: 2006-03-08, 修回日期: 2006-04-18

素^[4-8], 可以杀灭多种引起人体、动物及植物病害的细菌、真菌、病毒和原生动物。内生放线菌还可用于控制植物病害, 已分离到的一些内生放线菌菌株, 多数对引起作物病害的真菌具有抗菌活性^[9-12]。此外, 内生放线菌还可用于化工行业和治理环境污染^[14,15]。总体上, 迄今为止对内生放线菌的系统研究仍然较少, 因此植物内生放线菌是具有巨大开发潜力的新资源。

2 植物内生放线菌的多样性

除了研究较多的非弗兰克氏菌属 (*Frankia*) 的内生固 N₂ 放线菌以外, 已有的研究表明, 绝大多数内生放线菌为链霉菌 (*Streptomyces*), 其次是小双孢菌属 (*Microbispora*)、诺卡氏菌 (*Nocardia*) 属、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、链孢囊菌属 (*Streptosporangium*) 和拟诺卡氏菌属 (*Nocardiopsis*) 也较为常见。从一些植物中还可分离到拟无枝酸菌属 (*Amycolatopsis*)、假诺卡氏菌属 (*Pseudonocardia*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、糖霉菌属 (*Glycomyces*) 马杜拉菌属 (*Actinomadura*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、黄球菌属 (*Luteococcus*) 及小月菌属 (*Microclunatus*)、两面神菌属 (*Janibacter*)、迪茨氏菌属 (*Dietzia*)、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*) 微球菌属 (*Micrococcus*)、节杆菌属 (*Arthrobacter*)、短小杆菌属 (*Curtobacterium*)、野野村菌属 (*Nonomura*)、动孢菌属 (*Kineosporia*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 等的菌株。

3 寄主植物的选择

由于植物的种类极为丰富, 植物内生放线菌的研究中, 为了提高获得新物种、新基因和新的生物活性物质的几率, 植物的选择非常重要。可根据植物的生长环境, 生长时间和药用价值等来选择适合研究目的的植物。在独特环境 (或极端环境) 中生长的植物及其内生菌由于长期适应特殊环境的结果, 形成了一些独特的生长及生理机制和遗传基因, 从中较容易分离得到特殊的代谢产物和具有开发潜力的菌株。同时, 在一些生物多样性较为丰富的地区生长的植物, 其内生菌资源通常也较为丰富, 如生活于热带雨林的多年生植物, 其内生菌多样性就比生活于其他地区的植物丰富^[16]。有的研究证实, 从具有独特药用价值的植物中发现可产生新的生物活性物质的菌株的可能性也较高。我国各个民族都有独特的“民族药”, 如藏药、傣药等, 这些民族药用植物也是非常好的研究对象。

4 植物样品的采集及预处理

根据研究目的和经验采取不同部位的植物组织样品。然后修剪成长短适宜的组织块, 使用乙醇擦拭样品表面或用无水乙醇短时间 (根据组织块的大小而定) 浸泡, 灼烧, 使表面干燥后, 放入无菌塑料袋中, 封口, 并保存于低温盒中带回实验室。也可以把经乙醇初步表面消毒后的样品浸入 PBS 缓冲液中, 带回实验室。采样后使用乙醇简单消毒并干燥的目的是为了尽可能避免外源微生物通过植物组织的伤口侵入到植物组织内部, 同时也是为了抑制腐生菌生长。样品接种前通常应保存在 4℃。尽量缩短从采样到接种的时间, 尽量减少组织表面腐生菌对内生菌的影响, 对于维持内生菌的多

样性, 至关重要。

5 表面消毒及样品的处理

5.1 表面消毒 进行表面消毒前, 样品的清洗极为重要, 样品表面残留的土壤等是导致表面消毒不彻底的原因之一, 通常可使用流水冲洗和超声波清洗。建议使用无菌水、乙醇和次氯酸钠进行表面消毒。乙醇的浓度在 99% ~ 70% 之间, 而次氯酸钠的有效氯含量通常为 10% ~ 1% 之间, 各人使用的浓度有所差异。而用乙醇和次氯酸钠处理的时间也随使用试剂的浓度和处理的植物样品不同而异。

除次氯酸钠外, 也可以使用升汞和甲醛作为表面消毒剂。升汞是剧毒物质, 虽然杀菌力极强, 但对组织有刺激性, 在常温下即可蒸发形成汞蒸气, 易引起人慢性汞中毒。甲醛也为较高毒性的物质, 具有强烈的致癌和促癌作用。虽然次氯酸钠放出的游离氯也可引起中毒, 但不如升汞和甲醛毒性大。此外, 也可以使用双氧水作为消毒剂。

5.2 样品处理 表面消毒后的样品通常使用无菌的刀切成边长约为 5mm 的正方形小块放入培养基平板, 也可放入无菌的研钵或研磨仪中捣碎成糊状后, 涂于培养基上。还可把表面消毒后的样品接种于相应的液体培养基, 摇瓶培养 24h 后, 取培养液涂布于平板上。

5.3 表面消毒效果的检查 因为要验证分离物是否是真正的内生菌、而不是外源菌非常困难, 验证流程也很长, 而且未必可靠。因此, 排除外源菌的污染、检验表面消毒的效果非常重要。表面消毒效果的检查方法主要有两类: 一类是将表面消毒后最后一遍清洗的无菌水按 0.1 mL/皿涂布于分离培养基, 或是把表面消毒后的样品置于培养基表面擦拭几下后, 移走样品。28℃ 下培养 2 周后无菌落长出, 表明表面消毒彻底, 已消除了样品表面的附生菌。也可把表面消毒后的样品置于无菌水中, 振荡 1 min 后, 取 0.3 mL 悬液涂布于分离培养基上, 28℃ 培养, 观察是否有菌生长。第二类是把内生放线菌和内生假单孢菌的孢子悬浮液, 经过表面消毒程序处理后, 涂布于平皿, 培养一定时间后, 和未经处理的孢子悬浮液涂布的平皿比较, 并观察两类平皿上菌落的生长情况。如经处理的孢子悬浮液涂布的平皿无菌生长, 则表明表面消毒彻底。或是把内生放线菌和内生假单孢菌涂于经过表面消毒的植物种子表面, 待干燥后, 再把种子用无菌水洗涤后经表面消毒处理, 消毒后的种子置于培养基表面滚动几下后移走, 培养一段时间后, 如无菌落长出, 表明表面消毒彻底^[17]。

6 选择性培养基的设计

在内生放线菌的分离中, 应尽量抑制真菌和细菌的生长, 同时又要尽可能避免影响内生放线菌的生长, 因此选择性分离培养基的设计极为重要。减少培养基中有机物的含量, 使用贫营养的培养基可以有效的抑制内生真菌和细菌的生长。一些“稀有放线菌分离方法”一文中推荐的培养基都可以用于分离植物内生放线菌^[18]。同时在培养基中添加适宜的抑制剂也可较好的抑制细菌和真菌的生长。常用的真菌抑制剂主要为放线菌酮、制霉菌素、苯菌灵和重铬酸钾。常用的细菌抑制剂主要为萘啶酸、青霉素等。

研究表明, 目前可获得纯培养的微生物不到自然界存在的微生物的 1%, 还有 99%

以上的微生物无法纯培养。而免培养技术对植物内生放线菌种群的研究也表明,植物中存在的内生放线菌的多样性远比纯培养得到的要丰富的多^[19]。因此仍然需要不断改进内生放线菌的选择性分离技术,选择未研究过的特种药用植物,从中分离到更多的未知菌,提供给后续开发。

参考文献

- [1] Bacon C W, White J F. Microbial endophytes. New York: Marcel Dekker Inc., 2000.
- [2] Strobel G A. Microbes and Infection, 2003, **5**: 535 ~ 544.
- [3] Schutz B. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites, British Mycological Society, International Symposium Proceedings, Bioactive Fungal Metabolites-Impact and Exploitation, University of Wales, Swansea, 2001.
- [4] 山田晴宙. 生物工学会志, 1998, **76** (2): 58 ~ 81.
- [5] 沈月毛, 甘烦远, 杜良成, 等. 化学进展, 2000, **12**: 401 ~ 408.
- [6] Pullen C, Schmitz P, Meurer K, *et al.* Planta, 2002, **216** (1): 162 ~ 167.
- [7] Castillo U F, Strobel G A, Ford E J, *et al.* Microbiology, 2002, **148** (Pt 9): 2675 ~ 2685.
- [8] Gurney K A, Mantle P G. J Nat Prod, 1993, **56**: 1194 ~ 1198.
- [9] Castillo U, Harper J K, Strobel G A, *et al.* FEMS Lett. 2003, **224**: 183 ~ 190.
- [10] Kunoh H J. Gen Plant Pathol, 2002, **68**: 249 ~ 252.
- [11] Coombs J T, Michelsen P P, Franco C M M. Biological Control, 2004, **29**: 359 ~ 366.
- [12] Lixiang C, Zhiqi Q, Xin D, *et al.* World J Microbiol Biotechnol, 2004, **20**: 501 ~ 504.
- [13] Thongchai T, Peberdy J F, Lumyong S. World J Microbiol Biotechnol, 2003, **19**: 381 ~ 385.
- [14] Stamford T, Stamford N P, Coelho L C, *et al.* Bioresour Technol, 2002, **83** (2): 105 ~ 109.
- [15] Newman L A, Reynolds C M. Trends in Biotechnology, 2005, **23** (1): 6 ~ 8.
- [16] Bills G, Dombrowski A, Pelaez F, *et al.* Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In: Watling R, *et al.* Tropical mycology: micromycetes, **2**: (165 ~ 194). New York: CABI Publishing, 2002.
- [17] Justin T C, Christopher M, Franco M. Appl Environ Microbiol, 2003, **69** (9): 5603 ~ 5608.
- [18] 姜 怡, 段淑蓉, 唐蜀民, 等. 微生物学通报, **33** (1): 181 ~ 183.
- [19] Vanessa M C, Christopher M, Franco M. Appl Environ Microbiol, 2004, **70** (3): 1787 ~ 1794.