



蛇足石杉内生细菌多样性

孙红敏, 魏玉珍, 方晓梅, 余利岩, 张玉琴*

中国医学科学院北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050

摘要: 【目的】探索国家二级保护野生药用植物蛇足石杉内生细菌的物种和生理活性多样性, 发现并收集药用植物内生菌资源。【方法】分别从四川和福建等不同生态环境采集蛇足石杉植株, 运用纯培养手段, 对经过表面消毒处理的蛇足石杉样品进行内生菌的分离、培养; 根据菌株16S rRNA基因信息, 计算从蛇足石杉不同区系分离获得的内生细菌间的Jaccard指数、多样性指数、优势度指数与均匀度指数等, 分析内生菌物种多样性; 应用6种筛选模型对分离得到的内生菌进行生理活性测定, 初步评价蛇足石杉内生细菌的生理活性多样性和药用价值。【结果】从12份蛇足石杉植物样品中分离获得356株内生菌菌株, 菌株16S rRNA基因序列信息显示, 分离得到的蛇足石杉内生细菌隶属于放线菌门、厚壁菌门和变形菌门等3个门的26个科、41个属, 来源于蛇足石杉地上和地下部位的菌株数目、多样性指数等无明显差异。从中发现了分属于拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、*Angustibacter*、节杆菌属(*Arthrobacter*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、*Fronidhabitans*、*Glaciihabitans*、*Jatrophihabitans*、*Luteimicrobium*、*Massilia*、*Naumannella*和*Tardiphaga*等11个属的11个潜在新物种, 以及皮生球菌科(*Dermacoccaceae*)的1个新属。在抗菌活性筛选中, 356株纯培养物抗粪肠球菌、抗肺炎克雷伯菌、抗耻垢分枝杆菌以及抗水稻白叶枯病菌的阳性率分别是9.0%、1.4%、2.2%、0.8%; 抑制SS04生长的降血脂药物筛选模型上的阳性率是8.1%; 抗HIV-1的初筛阳性率为4.5%。共计74株菌在一个或多个筛选模型中显示出活性, 初筛总阳性率为20.8%。【结论】蛇足石杉内生细菌具有丰富的物种多样性和生理活性多样性, 是进一步发掘新型天然产物的理想菌种资源。

关键词: 蛇足石杉, 植物内生菌, 多样性, 生理活性

药用植物蛇足石杉[*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.]是石杉科(Huperiaceae)、石杉属(*Huperzia Bernh*)的蕨类植物。多生长在山地密林或沟谷等

阴湿环境, 民间常将全草入药, 用于治疗跌打损伤、瘀血肿痛、精神分裂等疾病^[1]。1972年国内首次报道该植物中的生物碱——石杉碱甲(hupenine A,

基金项目: 国家自然科学基金(81173026); 国家微生物资源平台建设(NIMR-2014-3)

*通信作者。Tel/Fax: +86-10-83167110; E-mail: zhyuqin@126.com

收稿日期: 2015-06-18; 修回日期: 2015-09-11; 网络出版日期: 2015-10-19

HupA)具有横纹肌松弛作用, 进一步研究发现该生物碱是一种高效、低毒、可逆并具高选择性的乙酰胆碱酯酶抑制剂, 可用于治疗重症肌无力、提高学习效率以及改善老年人的记忆功能^[2], 并对抑制有机磷酸中毒有一定的作用^[3], 特别是在治疗阿尔兹海默氏病(Alzheimer's disease, AD)方面疗效显著^[4]。石杉碱甲的化学合成步骤繁琐、成本昂贵、活性不高, 目前石杉碱甲几乎全部依赖于蛇足石杉的天然合成。蛇足石杉为丛生的草本植物, 植株生长极为缓慢、生物量小, 野生资源十分有限, 而且, 由于人们对蛇足石杉的掠夺性开发, 加上环境恶化等因素的威胁, 资源再生日益困难, 致使这一珍稀野生资源正在被加速推向灭绝。

近年来的研究发现, 植物内生菌与宿主植物长期共存, 形成稳定的微生态系统。内生菌可能因与植物之间发生基因横向转移或受植物内生环境的影响, 具备产生与药用植物产生的相似结构或功效的天然产物、甚至新结构或新活性的天然活性产物的潜力^[5]。因此, 我们通过对蛇足石杉

内生菌物种多样性及其生理活性多样性探索, 揭示蛇足石杉体内特有的微生物群落结构特征, 发现特色微生物资源, 实现植物药物的微生物生产, 以有效地保护性开发蛇足石杉资源, 为缓解蛇足石杉资源匮乏和生态环境恶化提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物样品: 采自四川与福建地区蛇足石杉植物样品共计6株, 根据植物自然生长状态将样品分为地上部分与地下部分, 共计12份样品。样品详细信息见表1。

1.1.2 培养基: (1) 内生细菌分离培养基: 使用了10种分离培养基, 其中M1–M6对应于本实验室在红树植物内生放线菌研究中使用的M2–M7培养基^[6], 另外4种培养基组成如下。M7 (g/L): 琼脂15, 复合维生素微量, 50%海洋微量盐微量, pH 7.2。M8 (g/L): 淀粉 2, 磷酸氢二钾0.5, 硫酸镁0.5, 硝酸钾1.0, 氯化钠0.4, 硫酸亚铁0.01, 琼脂

表 1. 蛇足石杉植物样品信息

Table 1. The information of the plant *Huperzia serrata* samples

Sample number	Part of plant	Site	Sites information
IMB12-088	Belowground part	Hongya county of Sichuan Province S1	29°41'27.14"N, 103°10'17.56"E, 1205 m H
IMB12-089	Aboveground part	Hongya county of Sichuan Province S1	
IMB13-057	Belowground part	Hongya county of Sichuan Province S1	29°41'25.77"N, 103°10'15.78"E, 1380 m H
IMB13-058	Aboveground part	Hongya county of Sichuan Province S1	
IMB13-062	Belowground part	Hongya county of Sichuan Province S1	29°41'24.98"N, 103°10'16.23"E, 1187 m H
IMB13-063	Aboveground part	Hongya county of Sichuan Province S1	
IMB13-071	Belowground part	Emei mountain of Sichuan Province S2	29°47'23.41"N, 103°16'53.22"E, 1503 m H
IMB13-072	Aboveground part	Emei mountain of Sichuan Province S2	
IMB13-076	Belowground part	Emei mountain of Sichuan Province S2	29°47'21.65"N, 103°16'54.47"E, 1468 m H
IMB13-077	Aboveground part	Emei mountain of Sichuan Province S2	
IMB13-150	Belowground part	Zhenghe county of Fujian Province S3	27°14'39.01"N, 119°5'42.12"E, 1100 m H
IMB13-151	Aboveground part	Zhenghe county of Fujian Province S3	

15.0, 复合维生素微量, 海洋微量盐微量, pH 7.2。M9 (g/L): 酵母浸粉0.25, 磷酸氢二钾0.50, 琼脂15.00, 复合维生素微量, 海洋微量盐微量, pH 7.2。M10 (g/L): 葡萄糖10, 酵母浸粉1, 牛肉膏1, 酪素水解物2, 琼脂20, 复合维生素微量, 海洋微量盐微量, pH 7.3。

(2) 传代培养及形态观察所用培养基: PYG琼脂培养基用作传代培养 (g/L): 蛋白胨3.00, 酵母浸膏粉5.00, 甘油10.00, 甜菜碱1.25, 丙酮酸钠1.25, 复合维生素微量, 琼脂15.00, 海洋微量盐微量, pH 7.2; ISP 2和ISP 4培养基用于菌株形态观察。

(3) 发酵培养基: 放线菌菌株发酵培养基A1和A2的具体组成成分参见文献[6]。

细菌菌株发酵培养基B1和B2的组成如下。B1 (g/L): 葡萄糖20.0, 酵母浸粉3.0, 硫酸镁0.5, 氯化钠0.5, 黄豆饼粉20.0, 磷酸氢二钾1.0, 氯化钾0.5, pH 7.0。B2 (g/L): 大豆蛋白胨20.0, 葡萄糖2.5, 氯化钠5.0, 磷酸氢二钾2.5, pH 7.3。

1.1.3 抑制剂(mg/L): A组: 氨曲南25, 放线菌酮25, 重铬酸钾30; B组: 放线菌酮25, 重铬酸钾30, 新生霉素30。

1.1.4 检定菌: 肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumonia*, ATCC 700603)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*, CICC 240556)、赭色掷孢酵母SS04 (*Sporobolomyces salmonicolor* SS04)、粪肠球菌HH22 (*Enterococcus faecalis* HH22, 临床分离株, 对庆大霉素、青霉素、红霉素和四环素等多重耐药)与水稻白叶枯病菌PXO99A (*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* PXO99A, 为水稻白叶枯菌菲律宾6号小种的代表菌株)均来自于中国药学微生物菌种保藏管理中心。

1.1.5 细胞系: 人T淋巴细胞SupT1由中国医学科学院医药生物技术研究所免疫室提供。

1.1.6 主要试剂: 氨曲南、重铬酸钾等化学试剂为国产分析纯试剂; 放线菌酮购自SIGMA公司;

PCR扩增相关试剂和引物测序均从生工生物工程(北京)股份有限公司订购。

1.2 菌种分离和保藏

1.2.1 植物组织样品处理: 将采集的植物样品先用流动的清水冲洗, 除去植物表面的泥土; 然后, 超声清洗3次, 40 kHz、3 min/次, 去除与植物结合紧密的土壤颗粒; 将清洗干净的植物样品放置于通风阴凉处, 使其表面水分蒸发干燥; 将晾干后的植物参照红树植物内生菌分离采用的表面消毒方法进行处理^[6]。考虑到蛇足石杉植株叶片比较娇嫩, 我们将次氯酸钠消毒时间缩短至3 min, 酒精处理时间调整为1 min; 将消毒后的植物样品置于无菌的铺有滤纸培养皿中, 在无菌通风环境干燥后, 用粉碎机将植物组织粉碎备用。

1.2.2 分离培养基的配制: 根据材料中所述的培养基配方进行分离培养基的配制; 其中, M1-M3、M6、M7培养基, 加入A组抑制剂; M4、M5、M8-M10培养基中, 则分别加入A组与B组抑制剂。

1.2.3 菌种分离与纯化: 取上述处理过的植物组织碎片均匀分散固定到分离培养基上, 置28 °C培养3-8周。3周后, 随时观察分离培养基上菌落状态, 根据菌落形态(形状、颜色、大小、表面光泽等)挑取同一分离平皿菌落形态有差异的放线菌和细菌单菌落, 使用四区划线法纯化分离菌株直至得到纯培养物。

1.2.4 菌种保藏: 纯化菌株分别以斜面4 °C短期保藏; 用20%(V/V)甘油作为保护剂, -80 °C中长期保藏。

1.3 菌株的生理活性测定

使用耻垢分枝杆菌CICC 240556、肺炎克雷伯菌ATCC 700603、水稻白叶枯病菌PXO99A和临床分离的多重耐药菌粪肠球菌HH22等作为检定菌的筛选模型与抑制赭色掷孢酵母SS04生长的降

血脂药物筛选方法以及基于假型病毒系统的抗HIV-1药物筛选模型,对蛇足石杉内生细菌的发酵液样品进行抗菌、降血脂及抗HIV-1等活性的初步检测。

将分离得到内生菌接种于发酵培养基(放线菌接种于A1、A2培养基,细菌接种于B1、B2培养基),28 °C、200 r/min,摇瓶培养6 d,离心后取出发酵液上清部分;用纸片法测定发酵液样品的抗菌、降血脂等生理活性^[7-8]。

菌株抗HIV-1的活性测定方法参考文献[9]。

1.4 蛇足石杉内生细菌的初步鉴定和多样性分析

菌株的初步鉴定参照徐丽华等主编的《放线菌系统学》^[10]和东秀珠等编著的《常见细菌系统鉴定手册》^[11]中的相关方法。根据菌落形态观察初步排除重复菌株,选择代表性菌株测定其16S rRNA基因序列,将结果提交EzTaxon网站(<http://www.eztaxon.org>)^[12]与有效描述菌株的16S rRNA基因序列相对比,初步判定菌株的所属类群。根据EzTaxon中序列比对结果,运用MEGA 5.0软件采用邻接法(Neighbour-Joining)构建实验菌株与模式菌之间的系统进化树^[13-16],分析蛇足石杉内生细菌系统发育地位及物种多样性。

1.5 蛇足石杉内生细菌的区系分析

分别计算蛇足石杉不同组织分离获得的内生细菌间的Jaccard指数公式(1)、多样性指数公式(2)、优势度指数公式(3)与均匀度指数公式(4),分析蛇足石杉内生细菌菌株区系分布的相似性与多样性。

$$\text{Jaccard指数 } C = j/(a+b-j) \quad \text{公式(1)}$$

式中: a 、 b 为来源于不同植物组织的物种数, j 为2种组织共有的物种数。

$$\text{Shannon-Weiner指数(多样性指数)} H' = -\sum P_i \ln P_i \quad \text{公式(2)}$$

式中: $P_i = N_i/N$, 其中 N_i 为来源于植物组织某物种的个体数, N 为个体总数^[17]。

Simpson指数(优势度指数) $D = 1/\sum P_i^2$ 公式(3)
式中: P_i 种的个体数占群落中总个体数的比例。

Pielou指数(均匀度指数) $E = H/H_{\max}$ 公式(4)
式中: H 为实际观察的物种多样性指数, H_{\max} 为最大的物种多样性指数, $H_{\max} = \ln S$ (S 为群落中的总物种数)^[17]。

2 结果和分析

2.1 蛇足石杉内生细菌的分离结果

从12份蛇足石杉植物样品中共分离、纯化得到356株纯培养物(图1-A)。来源于蛇足石杉地上部分的内生细菌共186株,分离自地下部位的菌株总数为170株;10种分离培养基中,从M4(纤维素培养基)与M9(TWYE)培养基上分离获得的菌株数量显著多于其它8种培养基(图1-B)。

2.2 蛇足石杉内生细菌的多样性分析

根据菌落形态初步观察及菌株来源,挑选127株代表菌株进行16S rRNA基因扩增测序。结果显示,它们隶属于放线菌门、厚壁菌门、变形菌门的27个科、41个属(图2),放线菌占80.3%,其中,小单孢菌属(*Micromonospora*) 8株、短杆菌属(*Curtobacterium*) 6株、分枝杆菌属(*Mycobacterium*) 10株、红球菌属(*Rhodococcus*) 5株、链霉菌属(*Streptomyces*) 16株及赖氏菌属(*Leifsonia*) 12株,为蛇足石杉内生细菌的优势类群。

计算结果显示,蛇足石杉地下与地上部分2个区系的丰度、多样性指数、优势度指数与均匀度指数无明显差异(表2)。16S rRNA基因序列分析结果表明,来源于蛇足石杉地上部分的内生细菌隶属于放线菌门、厚壁菌门、变形菌门的29个属(包含1个未知属),优势种属为赖氏菌属、分枝杆菌属、放线菌属、短杆菌属、甲基杆菌属(*Methylobacterium*)与*Fronidihabitans*属;分离自蛇足石杉地下部分的内生细菌归属于放线菌门、厚

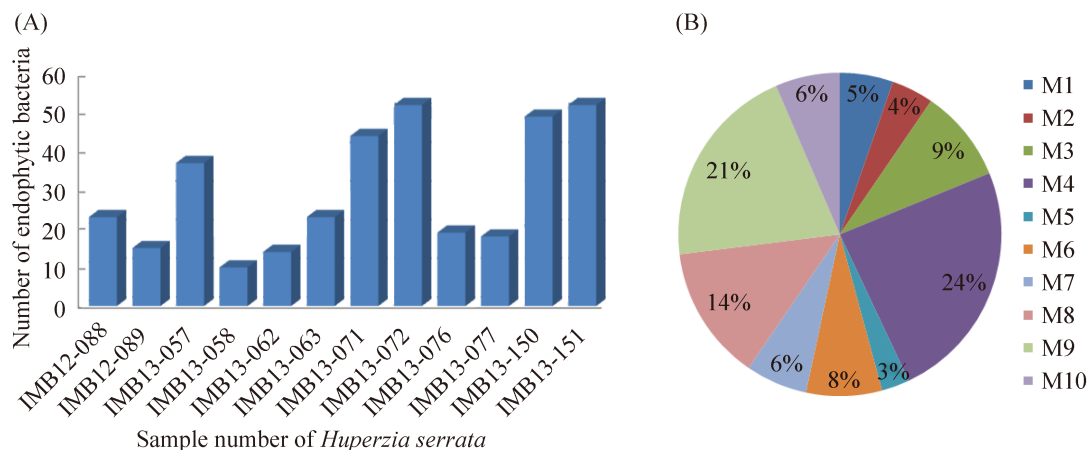


图 1. 不同的蛇足石杉样品和培养基分离内生细菌菌株数量与出菌率

Figure 1. The number and proportion of the endophytic bacteria from different *Huperzia serrata* samples and different isolation media. A: The number of endophytic bacteria from different *Huperzia serrata* samples; B: The proportion of the endophytic bacteria recovered on different isolation media.

表 2. 蛇足石杉内生细菌多样性 Shannon-wiener 指数、Simpson 指数和 Pielou 指数

Table 2. The Shannon-wiener Index (H'), Simpson Index (D) and Pielou Index (E) of the endophytic bacteria from *Huperzia serrata*

Tissue of plant	Number of isolates	Richness	Shannon-wiener Index (H')	Simpson Index (D)	Pielou Index (E)
Belowground part	186	28	3.09	0.041	0.93
Aboveground part	170	29	3.04	0.050	0.96
Total	356	41	3.31	0.044	0.89

壁菌门、变形菌门的28个属，优势菌属为链霉菌属、小单孢菌属和红球菌属(表3)。此外，蛇足石杉地下与地上部分分离获得的内生细菌间的 Jaccard 指数为0.39，相似性较低，表明蛇足石杉地下与地上部分不同区系的内生细菌的来源有显著差异。由于地下部分内生细菌可能多源于土壤微生物，土壤微生物在蛇足石杉的地下部分富集优于蛇足石杉地上部分；而地上部分的内生细菌也有其物种组成的特异性，初步显示出蛇足石杉的地上和地下部分内环境的差异对内生细菌群落结构组成分布产生了较大的影响。

2.3 蛇足石杉内生细菌系统发育分析

16S rRNA 基因序列分析结果显示，菌株 I13A-01625、I15A-00801、I14A-00824、I15A-

00282、I14A-00867、I15A-00287、I13A-01602、I15A-00289、I15B-00833、I15A-00828、I15B-00610等11株菌显示出与其同属内近缘菌间的16S rRNA 基因序列相似性都低于98.65%^[18]，提示它们分别代表了拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、*Angustibacter*、节杆菌属(*Arthrobacter*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、*Frondehabitans*、*Glaciihabitans*、*Jatrophihabitans*、*Luteimicrobium*、*Massilia*、*Naumannella*、*Tardiphaga*等11个属内的11个新物种；菌株I15A-00281的16S rRNA 基因序列和皮生球菌科(*Dermaococaceae*)内菌株的最高相似低于95.0%，并且，在基于16S rRNA 基因序列分析的系统进化树上，菌株I15A-00281在皮生球菌科内单独形成了一个稳定的分支，因此菌株

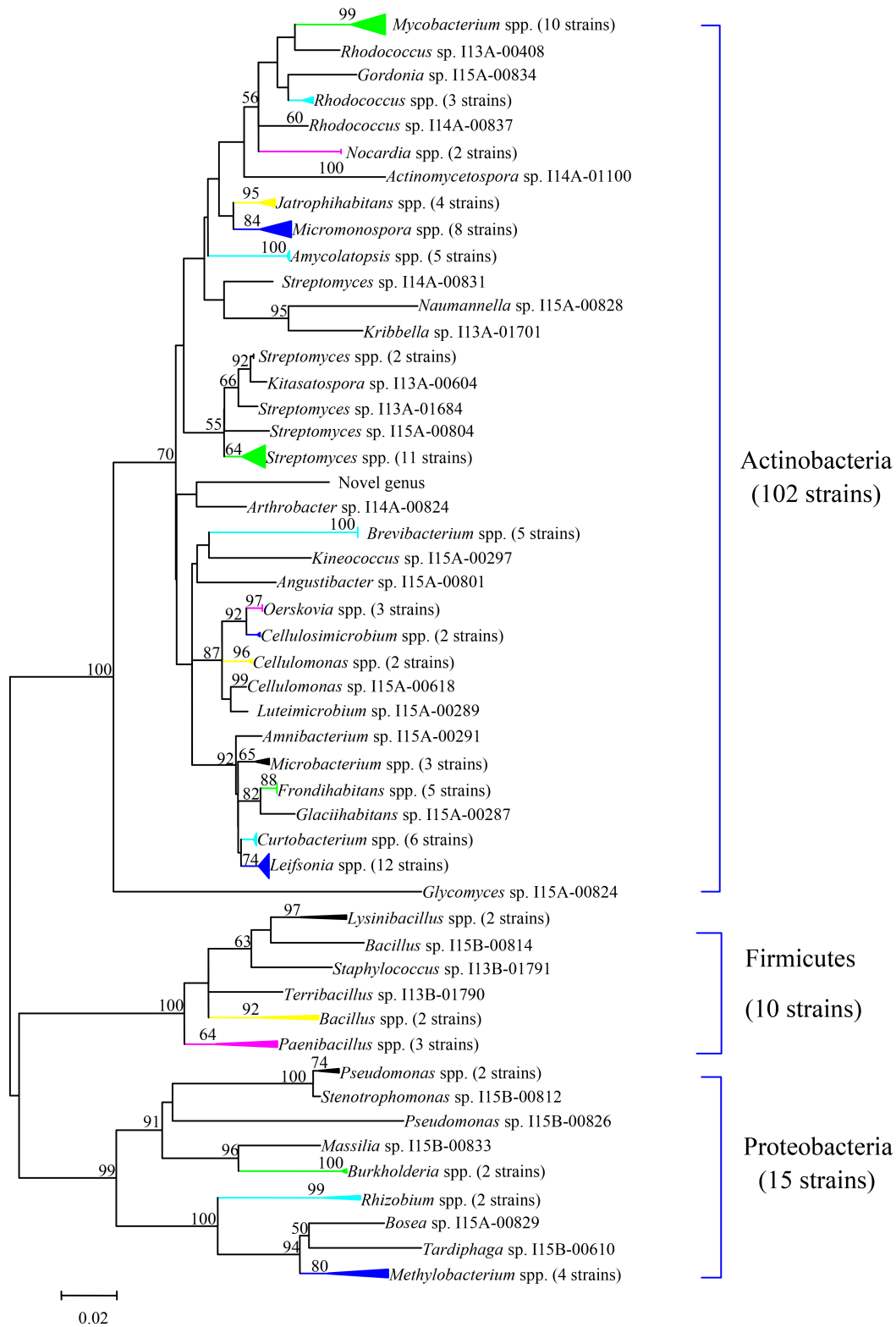


图 2. 蛇足石杉内生细菌16S rRNA系统进化分析

Figure 2. The phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences of the endophytic bacteria from *Huperzia serrata*. Bootstrap values >50% are shown at nodes. Bar, 2 nt substitution per 100 nt.

表 3. 部分蛇足石杉内生细菌的16S rRNA基因序列信息

Table 3. The 16S rRNA genes information of partial endophytic bacteria from *Huperzia serrata*

Strain number	Accession number	Origin	The most related homolog	16S rRNA gene similarity with the most related homolog/%	Phylum
I15A-00291	KR184240	Aboveground part	<i>Amnibacterium kyonggiense</i> KSL51201-037(T)	99.8	Actinobacteria
I13A-01679	KR184311		<i>Amycolatopsis saalfeldensis</i> HK10457(T)	98.8	
I14A-00824	KR184302		<i>Arthrobacter nitroguajacolicus</i> G2-1(T)	98	
I14A-00819	KR184304		<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048(T)	99.8	
I15A-00281	KR184239		<i>Calidifontibacter indicus</i> PC IW02(T)	95	
I15A-00288	KR184237		<i>Cellulomonas biazotea</i> DSM 20112(T)	100	
I15A-00290	KR184252		<i>Cellulosimicrobium funkei</i> ATCC BAA-886(T)	99.7	
I15A-00282	KR184242		<i>Curtobacterium albidum</i> DSM 20512(T)	98.6	
I14A-00867	KR184306		<i>Frondehabitans cladoniiphilus</i> CafT13(T)	98.3	
I15A-00287	KR184247		<i>Glaciihabitans tibetensis</i> MP203(T)	98.1	
I13A-01604	KR184574		<i>Jatrophihabitans endophyticus</i> S9650(T)	96.7	
I15A-00297	KR184234		<i>Kineococcus rhizosphaerae</i> RP-B16(T)	98.8	
I13A-00604	KR184287		<i>Kitasatospora saccharophila</i> SK15(T)	99.5	
I15A-00523	KR184251		<i>Leifsonia aquatica</i> ATCC 14665(T)	100	
I15A-00289	KR184254		<i>Luteimicrobium album</i> RI148-Li105(T)	97.5	
I14A-00848	KR184295		<i>Microbacterium radiodurans</i> GIMN1.002(T)	99.1	
I15A-00809	KR184216		<i>Micromonospora echinospora</i> ATCC 15837(T)	99.5	
I15A-00825	KR184196		<i>Mycobacterium goodii</i> ATCC 700504(T)	98.9	
I15A-00828	KR184192		<i>Naumannella halotolerans</i> WS4616(T)	97.2	
I15A-00495	KR184231		<i>Nocardia asteroides</i> NBRC 15531(T)	100	
I13A-01637	KR184290		<i>Oerskovia enterophila</i> DSM 43852(T)	100	
I15A-00822	KR184199		<i>Rhodococcus canchipurensis</i> MBRL 353(T)	99.4	
I14A-00840	KR184286		<i>Streptomyces bobili</i> JCM 4624(T)	98.8	
I13B-01797	KR184317		<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> XDB9(T)	98.9	Firmicutes
I15B-00830	KR184193		<i>Burkholderia udeis</i> LMG 27134(T)	99.5	Proteobacteria
I15B-00611	KR184260		<i>Methylobacterium aminovorans</i> JCM 8240(T)	100	
I15B-00831	KR184208		<i>Pseudomonas geniculata</i> ATCC 19374(T)	98.8	
I15B-00296	KR184261		<i>Rhizobium radiobacter</i> ATCC 19358(T)	100	
I15B-00812	KR184211		<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> DSM 14405(T)	98.9	
I14A-01100	KR184263	Belowground part	<i>Actinomycetospora rishiriensis</i> RI109-Li102(T)	99.5	Actinobacteria

(待续)

(续表3)

I13A-01625	KR184275	<i>Amycolatopsis saalfeldensis</i> HKI0457(T)	98.1	
I15A-00801	KR184224	<i>Angustibacter luteus</i> TT07R-79(T)	98.6	
I15A-00300	KR184236	<i>Brevibacterium casei</i> NCDO 2048(T)	100	
I15A-00519	KR184253	<i>Cellulosimicrobium funkei</i> ATCC BAA-886(T)	99.8	
I15A-00283	KR184241	<i>Curtobacterium ammoniigenes</i> NBRC 101786(T)	98.9	
I15A-00824	KR184197	<i>Glycomyces lechevalierae</i> NRRL B-16149(T)	98.8	
I15A-00834	KR184201	<i>Gordonia terrae</i> NBRC 100016(T)	100	
I14A-00812	KR184262	<i>Jatrophihabitans endophyticus</i> S9650(T)	96.7	
I13A-01701	KR184298	<i>Kribbella swartbergensis</i> HMC25(T)	99.2	
I13A-01628	KR184277	<i>Leifsonia lichenia</i> 2Sb(T)	99.4	
I13A-00465	KR184267	<i>Microbacterium maritpicum</i> DSM 12512(T)	99.8	
I15A-00808	KR184217	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029(T)	100	
I15A-00823	KR184198	<i>Mycobacterium bacteremicum</i> ATCC 25791(T)	98.8	
I13A-00414	KR184266	<i>Oerskovia enterophila</i> DSM 43852(T)	100	
I14A-00837	KR184272	<i>Rhodococcus fascians</i> DSM 20669(T)	100	
I13A-01627	KR184276	<i>Streptomyces avellaneus</i> NBRC 13451(T)	99.8	Firmicutes
I15B-00814	KR184209	<i>Bacillus flexus</i> IFO 15715(T)	99.8	
I12B-02693	KR184264	<i>Lysinibacillus fusiformis</i> NBRC 15717(T)	100	
I13B-01788	KR184270	<i>Paenibacillus chitinolyticus</i> IFO 15660(T)	99.8	
I13B-01791	KR184283	<i>Staphylococcus warneri</i> ATCC 27836(T)	100	
I13B-01790	KR184282	<i>Terribacillus saccharophilus</i> 002-048(T)	100	
I15B-00829	KR184191	<i>Bosea thiooxidans</i> DSM 9653(T)	99.8	Proteobacteria
I15B-00816	KR184206	<i>Burkholderia sabiae</i> Br3407(T)	98.9	
I15B-00833	KR184214	<i>Massilia aerilata</i> 5516S-11(T)	98.1	
I15B-00827	KR184194	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> ATCC 19867(T)	100	
I15B-00813	KR184210	<i>Rhizobium jaguaris</i> CCGE525(T)	100	
I15B-00610	KR184258	<i>Tardiphaga robiniae</i> LMG 26467(T)	98	

I15A-00281可能代表了皮生球菌科内的一个新属(图3)。

2.4 培养基抑制剂对分离结果的影响

我们统计了分别在相同的分离培养基上添加A组或B组抑制剂针对采自福建的蛇足石杉样品的分离结果(图4)。16S rRNA基因序列分析结果显示,使用添加A组抑制剂的培养基,共分离获得

58株内生菌,它们分属于放线菌门、厚壁菌门与变形菌门的16个科、23个属,优势菌群为分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、赖氏菌属(*Leifsonia*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、*Fronidihabitans*;使用添加B组抑制剂的培养基分离获得43株菌,归属于20个科、22个属,优势菌属为小单孢菌属(*Micromonospora*)与分枝杆菌属(*Mycobacterium*)。也就是说,添加

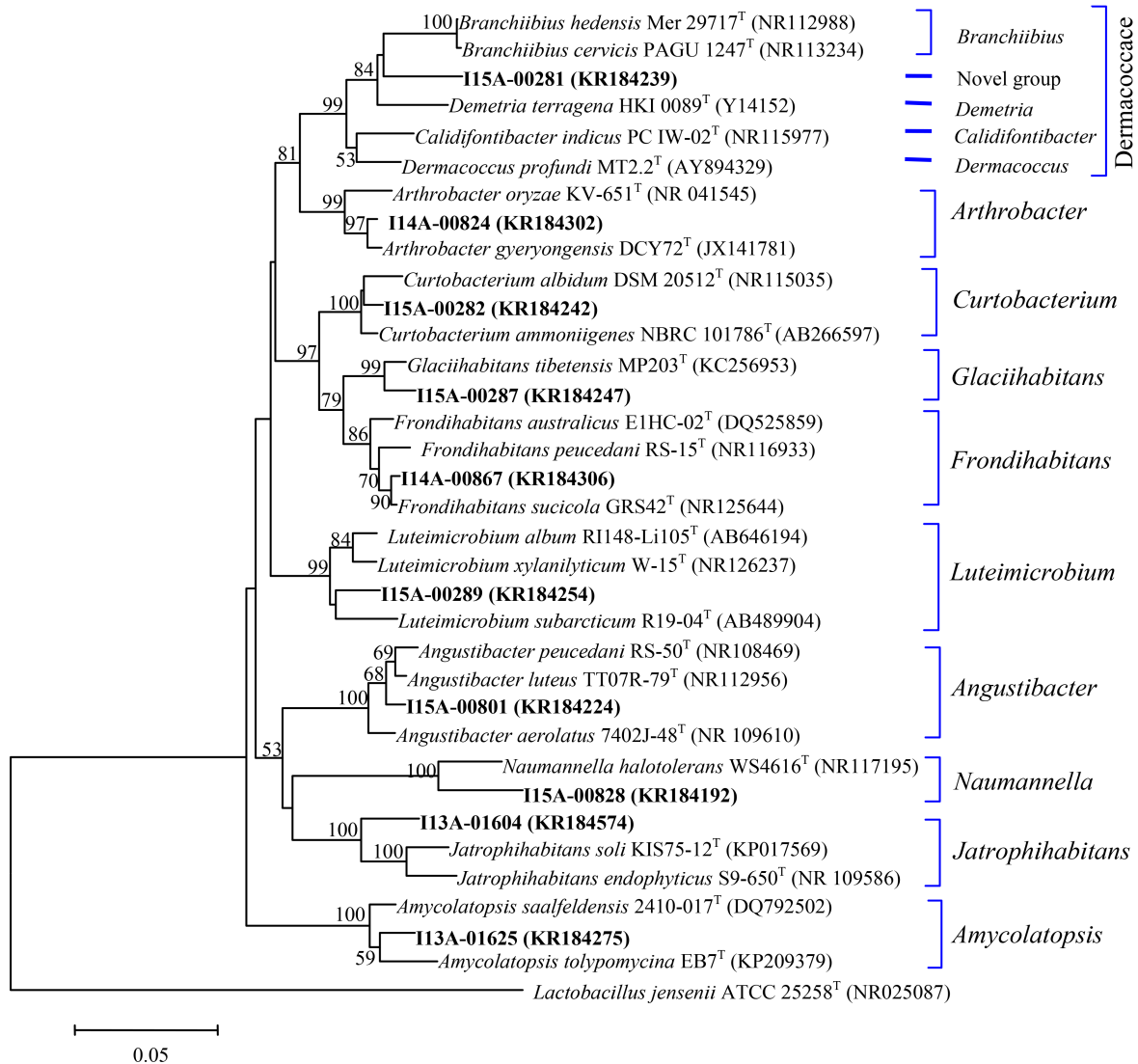


图 3. 基于16S rRNA基因分析构建的关于潜在新分类单元放线菌菌株及其近缘菌的系统进化树

Figure 3. 16S rRNA gene-based Neighbour-Joining tree showing the phylogenetic relationships between the potential novel Actinobacteria taxa and related strains. Bootstrap values >50% are shown at nodes. Bar, 5 nt substitution per 100 nt.

抑制剂新生霉素后，小单孢菌属的出菌率显著增高，进一步证实了新生霉素对小单孢菌的选择性分离效果。另外，两组实验数据对比也可明显看出，在添加了氨曲南的培养基中，革兰氏阴性细菌(变性菌门菌株)的数量(3个属的4株菌)和种类明显少于未添加氨曲南的培养基(8个属的12株菌)。

2.5 生理活性筛选结果

从356株蛇足石杉内生细菌中发现74株内生菌

的发酵液样品在1个或多个的筛选模型中显示出活性，初筛总阳性率为20.8%。

总体上看，用于放线菌菌株发酵的A1、A2发酵液样品在抗菌及抗病毒活性筛选模型上的阳性率都明显高于细菌菌株的发酵液样品B1、B2(表4)。

在抗菌活性方面，放线菌发酵液(A1和A2)和细菌发酵液(B1和B2)对多重耐药菌粪肠球菌HH22以及赭色掷孢酵母SS04的抑制率都高于对肺

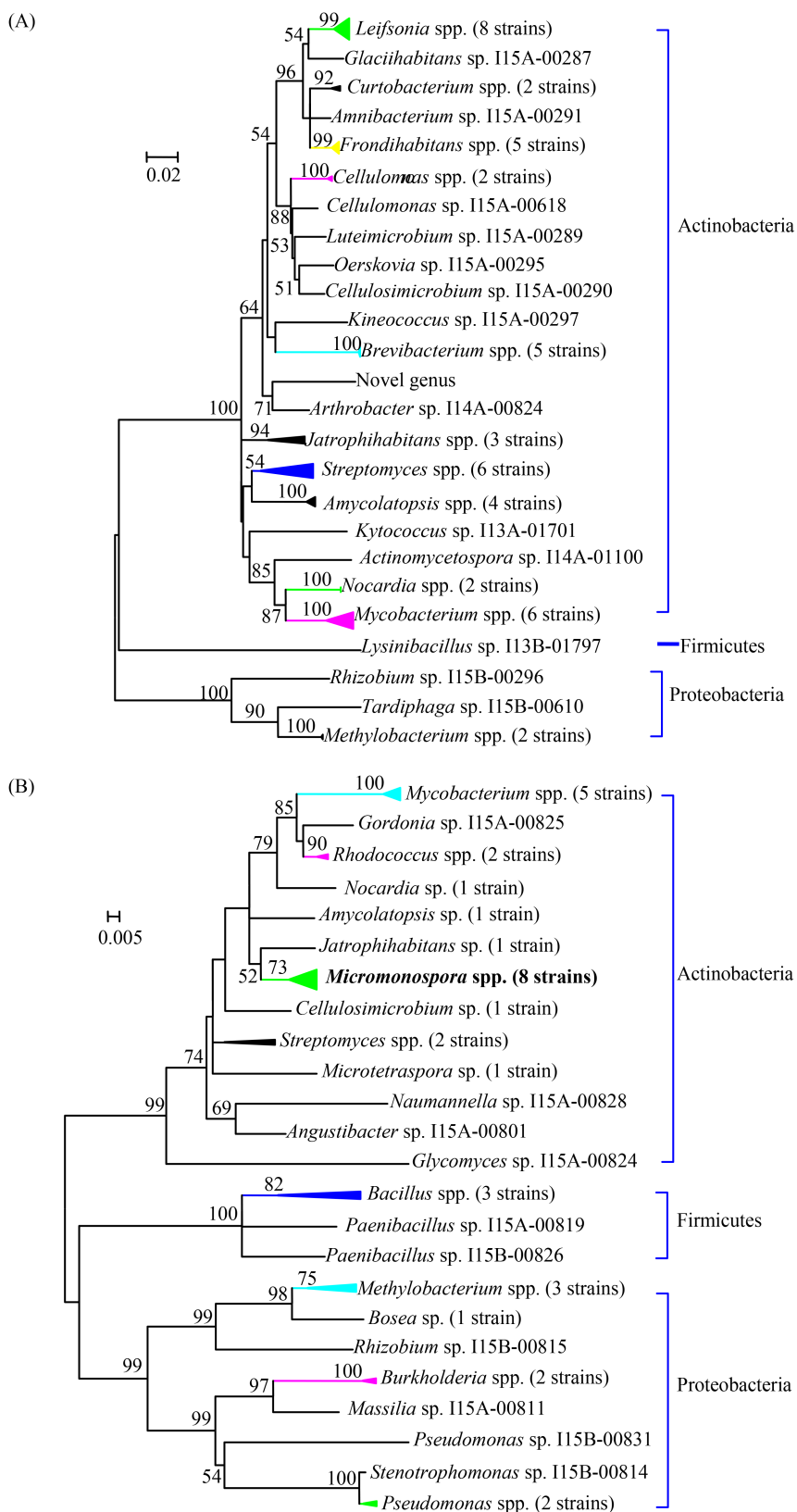


图 4. 基于添加抑制剂分离的蛇足石杉内生细菌16S rDNA系统进化分析

Figure 4. The phylogenetic analysis based on the 16S rRNA gene sequences of the endophytic bacteria recovered on the isolation media supplemented with inhibitors. Bootstrap values >50% are shown at nodes. Bar, 5 nt substitution per 100 nt. A: Inhibitors group A; B: Inhibitors group B.

表 4. 蛇足石杉内生细菌的生理活性筛选结果

Table 4. Physiological activities screening results of the endophytic bacteria from *Huperzia serrata*

The types of media	The positive rate					
	<i>Enterococcus faecalis</i> HH22	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	<i>Mycobacterium smegmatis</i> CPCC 240556	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i> PXO99A	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i> SS04	Anti-HIV
Medium A1	16/291	2/291	5/291	2/291	17/291	8/291
Medium A2	13/291	3/291	2/291	1/291	12/291	7/291
Medium B1	1/65	0/65	1/65	0/65	2/65	1/65
Medium B2	3/65	1/65	1/65	0/65	1/65	0/65
Total	32/356	5/356	8/356	3/356	29/356	16/356

The positive result defined value was that the HIV inhibition ratio was above 90% and the cells survival rate was above 20% in the sample concentration of 1% (V/V).

炎克雷伯菌ATCC 700603、耻垢分枝杆菌CPCC 240556以及水稻白叶枯病菌PXO99A的抑制率。在抗病毒活性筛选模型中，来源于细菌的发酵液中仅从B1中发现了一株细菌具有抗HIV-1活性；从A1和A2发酵液中发现了10株放线菌具有抗HIV-1活性，其中有5株放线菌的A1和A2发酵液都显示阳性，另有3株菌仅在A1发酵液中呈现出抗HIV-1活性，2株菌仅在A2发酵液中呈现出抗HIV-1活性。

3 讨论

药用植物特殊的内环境赋予了内生菌以下独有的特点：(1) 物种多样。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够被检测出来，大量的新物种也已经陆续从植物内生环境中获得。(2) 遗传背景好。内生菌长期生活在植物体内，能够在植物体内稳定生长并进行有序的代谢活动，从而使内生菌成为在植物体内表达外源基因的绝佳载体；另一方面，“内共生理论”还认为，在共生体内，一旦次生代谢中出现有用

的生化途径，便可以其他生物所利用，从而表现出相互作用和“协同进化”(co-evolution)：宿主可将遗传物质或信息传递给其内生菌，使之在一定程度上具有与宿主相同或类似的代谢途径，并导致其产生某些特定物质。(3) 次生代谢产物丰富、活性率高。近年来，先后从红豆杉、长春花等数十种药用植物的内生菌中分离得到了与宿主植物相同或相似的活性成分。例如，Stierle等学者^[19]从短叶紫杉(*Taxus brevifolia*)中发现产紫杉醇的内生真菌*Taxomyces andreanae*，随后，Caruso等^[20]从欧洲红豆杉*Taxus baccata* L.中分离得到一些能够合成紫杉烷类物质的内生放线菌；Zhang等^[21]从长春花(*Catharanthus roseus*)茎皮中分离到能产生长春新碱的内生真菌*Fusarium oxysporum*；Wu等^[22]从美登木内生放线菌*Actinosynnema pretiosum*中分离到美登木素生物碱(maytansinoid)，但与植物来源的美登木素化合物有所不同，其在大环上的C-3位侧链酯基结构相对较简单。(4) 代谢产物对正常的真核细胞低毒性。Weber等^[23]从内生菌中获得的arundifungin、5-(1,3-butadiene-1-y1)-3-(propene-1-y1)-2-(5H)-furanone、

ascosteroside A和ascosieroside B, 显示出与两性霉素B类似的抗真菌活性, 化合物ascosieroside B对于HepG2的细胞毒活性弱于ascosteroside A。

蛇足石杉多生于山顶岩石上或针阔叶混交林下阴湿处, 这种在高海拔、低温环境中生存的植物为其内生菌创造了一个特殊的生态环境, 为新型次生代谢产物的发掘提供了丰富的菌种资源。现代科学研究发现, 蛇足石杉及其它石杉属植物主要含有生物碱、萜类、蛋白质、多糖、有机酸、黄酮和蒽醌等成分。蛇足石杉含有的三萜酸、酯、苷在抗菌消炎, 治疗肿瘤等方面呈现出良好的活性。蛇足石杉是以石杉碱甲为母核开发的抗老年痴呆症疗效最好的药物“希普林”的主要原料来源, 目前尚无有栽培资源及替代品的出现, 主要依赖于野生资源, 因而导致了人们对蛇足石杉等药用植物无节制地采收。我们希望通过对蛇足石杉内生细菌的分离和生理活性研究, 为寻求植物药的微生物化生产、缓解蛇足石杉的资源紧缺等问题提供新思路。

本次研究分离获得的356株内生菌中, 有分属于放线菌门的*Amnibacterium*、纤维菌属(*Cellulosimicrobium*)、*Frondehabitans*、*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; *Tardiphaga*和寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)是较罕见的细菌类群。动球菌属自1993年^[24]建立以来, 仅从高UV辐射环境^[25]、海洋沉积物^[26]、药用植物组织内^[27]等特殊生境中分离获得, *Amnibacterium*^[28]、*Angustibacter*^[29]、*Glaciihabitans*^[30]、*Jatrophihabitans*^[31]、*Luteimicrobium*^[32]及*Naumannella*^[33]等6个属均是在2010年以后才相继被发现、识别, 对这些属的研究少有报道。本实验从蛇足石杉中分离到11株菌与近源菌的16S rRNA基因序列相似性<98.65%。因此, 有望在拟无枝酸菌属(*Amycolatopsis*)、

Angustibacter、节杆菌属(*Arthrobacter*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、*Frondehabitans*、*Glaciihabitans*、*Jatrophihabitans*、*Luteimicrobium*与*Naumannella*等9个稀有放线菌属、以及*Massilia*和*Tardiphaga* 2个细菌属中提议建立11个新种; 菌株I15A-00281的16S rRNA基因序列与其最近缘的菌株*Calidifontibacter indicus* PC IW02^T的最高相似性为95.0%, 在基于菌株I15A-00281及微球菌亚目(*Micrococcineae*)相关菌株的16S rRNA基因序列构建系统进化树中, 菌株I15A-00281在皮生球菌科(*Dermacoccaceae*)内独自形成一个稳定的分支, 代表了一个潜在的新属。这些研究结果再次提示, 植物内生环境是发现未知微生物资源的理想之地。

在纯培养研究中, 分离培养基和抑制剂的选择对菌种分离结果会产生重要影响。本实验中所使用的分离培养基是以有利于提高放线菌的出菌率为出发点而设计的, 菌种分离结果证实了我们设计的培养基对放线菌分离的有效性(放线菌占有所有分离菌株的80.3%)。选择使用的抑制剂则分成了两组, 添加抑制剂新生霉素的一组, 小单孢菌属的出菌率显著增高, 从而进一步证实了新生霉素对小单孢菌的选择性分离效果。

蛇足石杉内生细菌的生理活性筛选结果显示, 菌株I13A-00415、I13B-00706及I15A-00585在1%发酵液样品浓度下, 抗HIV活性高达99.9%, 细胞存活率高于62%; 菌株I14A-00814对肺炎克雷伯菌、粪肠球菌HH22、耻垢分枝杆菌以及掷孢酵母SO4均显示出抑制作用; 另有9株同时在2种筛选模型中显示出良好的活性结果。表明蛇足石杉内生细菌具有丰富的生理活性多样性, 进一步暗示内生菌功能基因的多样性, 为寻找新型抗菌和抗病毒活性药物提供了重要资源。

本研究对我国珍稀药用植物蛇足石杉内生细菌的多样性进行了初步评价, 获得了植物内生菌群落结构及生理活性多样性的重要信息, 从而为

深入了解菌株与宿主植物、群落之间的相互作用，以及进一步探讨内生菌代谢途径和活性成分，提供了有价值的研究结果。

参考文献

- [1] 《湖南植物志》编辑委员会. 湖南植物志. 长沙: 湖南科学技术出版社, 2004.
- [2] Guo SL, Li PL, Fang F, Huang H, Cheng CG. FTIR spectra-principal component analysis of phenetic relationships of *Huperzia serrata* and its closely related species. *Spectroscopy and Spectral Analysis*, 2005, 25(5): 693–697. (in Chinese)
郭水良, 李沛玲, 方芳, 黄华, 程存归. 蛇足石杉及其近缘种表征关系的FT-IR主成分分析. *光谱学与光谱分析*, 2005, 25(5): 693–697.
- [3] Tondul LS, Testylier G, Masqueliez C, Lallement G, Monmaur P. Effects of Huperzine used as pre-treatment against soman-induced seizures. *Neurotoxicology*, 2003, 22(1): 29.
- [4] Ishiuchi K, Park JJ, Long RM, Gang DR. Production of Huperzine A and other Lycopodium alkaloids in *Huperzia* species grown under controlled conditions and in vitro. *Phytochemistry*, 2013, 91: 208–219.
- [5] Igarashi Y, Miura SS, Fujita T, Furumai T. Pterocidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygrosopicus*. *The Journal of Antibiotics*, 2006, 59(3): 193–195.
- [6] Wei YZ, Zhang YQ, Zhao LL, Li QP, Su J, Liu HY, Sun CH, Yu LY. Isolation, screening and preliminary identification of endophytic actinobacteria from mangroves at Shankou of Guangxi Province. *Microbiology China*, 2010, 37(6): 823–828. (in Chinese)
魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 李秋萍, 苏静, 刘红宇, 孙承航, 余利岩. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 823–828.
- [7] Zhao LL, Li QP, Wei YZ, Zhang YQ, Yu LY. The establishment and application of anti-*Pseudomonas aeruginosa* cell-based screening model targeting to SecA. *Microbiology*, 2008, 35(12): 1926–1931. (in Chinese)
赵莉莉, 李秋萍, 魏玉珍, 张玉琴, 余利岩. 以SecA为靶点的新型抗绿脓杆菌药物细胞水平筛选模型的建立和应用. *微生物学通报*, 2008, 35(12): 1926–1931.
- [8] Zhang M, Xiao CL, Hao XQ, Si SY, Yao TJ. Study and primary application of the screening model for antituberculosis drugs with DNA gyrase B subunit as a target. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2004, 29(12): 742–745. (in Chinese)
张明, 肖春玲, 郝雪秦, 司书毅, 姚天爵. 以DNA回旋酶B亚基为靶点的抗结核药物筛选模型的建立及初步应用. *中国抗生素杂志*, 2004, 29(12): 742–745.
- [9] Yang ZJ, Ding JW, Ding KS, Chen DJ, Cen S, Ge M. Phomonaphthalenone A: a novel dihydronaphthalenone with anti-HIV activity from *Phomopsis* sp. HCCB04730. *Phytochemistry Letters*, 2013, 6(2): 257–260.
- [10] 徐丽华, 李文均, 刘志恒. 放线菌系统学——原理、方法及实践. 北京: 科学出版社, 2007.
- [11] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [12] Chun J, Lee JH, Jung Y, Kim M, Kim S, Kim BK, Lim YW. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(10): 2259–2261.
- [13] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111–120.
- [14] Kimura M. The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.
- [15] Saitou NNM, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [16] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [17] Liu FH, Wang SB, Zhang JS, Zhang J, Yan X, Zhou HK, Zhao GP, Zhou ZH. The structure of the bacterial and archaeal community in a biogas digester as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis and 16S rDNA sequencing analysis. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(3): 952–966.
- [18] Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2): 346–351.

- [19] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, 260(5105): 214–216.
- [20] Caruso M, Colombo A L, Fedeli L, Pavesi A, Quaroni S, Saracchi M, Ventrella G. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. *Annals of Microbiology*, 2000, 50(1): 3–13.
- [21] Zhang LQ, Guo B, Li HY, Zeng SR, Shao H, Gu S, Wei RC. Preliminary study on the isolation of endophytic fungus of *Catharanthus roseus* and its fermentation to produce products of therapeutic value. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2000, 31(11): 805–807. (in Chinese)
张玲琪, 郭波, 李海燕, 曾松荣, 邵华, 谷苏, 魏蓉城. 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. *中草药*, 2000, 31(11): 805–807.
- [22] 吴兆贤. 三株放线菌次级代谢产物的初步研究. 厦门大学硕士学位论文, 2007.
- [23] Weber RWS, Kappe R, Paululat T, Mösker E, Anke H. Anti-*Candida* metabolites from endophytic fungi. *Phytochemistry*, 2007, 68(6): 886–892.
- [24] Yokota A, Tamura T, Nishii T, Hasegawa T. *Kineococcus aurantiacus* gen. nov., sp. nov., a new aerobic, gram-positive, motile coccus with meso-diaminopimelic acid and arabinogalactan in the cell wall. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993, 43(1): 52–57.
- [25] Phillips RW, Wiegel J, Berry CJ, Fliermans C, Peacock AD, White DC, Shmkets LJ. *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiation-resistant, gram-positive bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52(3): 933–938.
- [26] Lee SD. *Kineococcus marinus* sp. nov., isolated from marine sediment of the coast of Jeju, Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56(6): 1279–1283.
- [27] Duangmal K, Thamchaipenet A, Ara I, Matsumoto A, Takahashi Y. *Kineococcus gynurae* sp. nov., isolated from a Thai medicinal plant. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2008, 58(10): 2439–2442.
- [28] Kim SJ, Lee SS. *Annibacterium kyonggiense* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Microbacteriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(1): 155–159.
- [29] Tamura T, Ishida Y, Ootoguro M, Yamamura H, Hayakawa M, Suzuki K. *Angustibacter luteus* gen. nov., sp. nov., isolated from subarctic forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(10): 2441–2445.
- [30] Li AH, Liu HC, Xin YH, Kim SG, Zhou YG. *Glaciihabitans tibetensis* gen. nov., sp. nov., a psychrotolerant bacterium of the family *Microbacteriaceae*, isolated from glacier ice water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(2): 579–587.
- [31] Madhaiyan M, Hu CJ, Kim SJ, Weon HY, Kwon SW, Ji L. *Jatrophihabitans endophyticus* gen. nov., sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from a surface-sterilized stem of *Jatropha curcas* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2013, 63(4): 1241–1248.
- [32] Hamada M, Ootoguro M, Yamamura H, Tamura T, Suzuki K, Hayakawa M. *Luteimicrobium subarcticum* gen. nov., sp. nov., a new member of the suborder *Micrococccineae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(4): 796–800.
- [33] Rieser G, Scherer S, Wenning M. *Naumannella halotolerans* gen. nov., sp. nov., a gram-positive coccus of the family *Propionibacteriaceae* isolated from a pharmaceutical clean room and from food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(12): 3042–3048.

Diversity of endophytic bacteria isolated from *Huperzia serrata*

Hongmin Sun, Yuzhen Wei, Xiaomei Fang, Liyan Yu, Yuqin Zhang*

Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

Abstract: [Objective] To explore the diversity of species and biological activities of the endophytes from *Huperzia serrata* that is a wild medicinal plant under state protection (category ii), and to discover and collect endophytic bacteria from medicinal plants. [Methods] *Huperzia serrata* samples were collected from Sichuan and Fujian Provinces. Culture-dependent method was used to obtain endophytes from the surface-sterilized plant samples. The diversity of the isolates was analyzed according to the 16S rRNA gene sequences information. Jaccard index, Shannon-wiener Index, Simpson Index and Pielou Index were calculated. Then six screening models were followed to study the physiological activities of the isolates, based on which we evaluated the diversity of biological activities of the endophytes from *Huperzia serrata* and their potential medicinal value. [Results] A total of 356 endophytic bacteria were purified from *Huperzia serrata*, and the analysis results of their 16S rRNA gene sequences showed that they affiliated to 41 genera of 26 families in the phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes* and *Proteobacteria*. The numbers and biodiversity indexes of endophytes from the aboveground part and belowground part of *Huperzia serrata* were approximately equivalent. Among them 11 potential novel species belonged to the genera *Amycolatopsis*, *Angustibacter*, *Arthrobacter*, *Curtobacterium*, *Fronidhabitans*, *Glaciihabitans*, *Jatrophihabitans*, *Luteimicrobium*, *Massilia*, *Naumannella* and *Tardiphaga*, and 1 novel genus of the family *Dermacoccaceae* was discovered. The screening for anti-microbial results from these 356 isolates were as follows: the activity rates of against *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, *Mycobacterium smegmatis* and *Xanthomonas campestris* were 9.0%, 1.4%, 2.2% and 0.8% respectively. Of them 4.5% exhibited activities on the screening model of statins-like antihyperlipidemics showing inhibition of *Sporobolomyces salmonicolor* SS04; 8.6% of them had the activities of against HIV-1. In total, the fermentation broths from 74 strains exhibited activities on at least one screening model, the positive rate among the isolates was 20.8%. [Conclusion] This study demonstrated that the endophytic bacteria from *Huperzia serrata* were of great significant bio-diversity and antibiotic diversity, therefore, they could be an ideal microbial resource for further discovery of new natural products.

Keywords: *Huperzia serrata*, endophytes, diversity, bio-activity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81173026) and by the National Infrastructure of Microbial Resources (NIMR-2014-3)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-83167110; E-mail: zhyuqin@126.com

Received: 18 June 2015; Revised: 11 September 2015; Published online: 19 October 2015