

药用植物内生放线菌的分离和生物学特性*

杜慧竟, 苏静, 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】探索药用植物内生环境可培养放线菌的分离、培养方法, 总结药用植物内生放线菌的生物学特性, 探讨其物种多样性, 挖掘新的微生物资源。【方法】采用 10 种分离培养基对 37 个新鲜的药用植物样品进行内生放线菌的分离; 通过比较, 选择适合植物内生放线菌生长的培养条件; 根据菌落形态和细胞特征观察结果, 选择其中 174 株菌测定 16S rRNA 基因序列, 分析药用植物内生放线菌的多样性; 应用 Biolog GEN III 微孔培养、API 50CH 以及 API ZYM 试剂条测试 27 株代表菌株的生理生化特性。【结果】分离得到 940 株植物内生菌, 分属于 47 个属, 30 个科, 其中放线菌 600 余株, 分属于 34 个属, 共发现潜在的新分类单元有 7 个; 本研究中药用植物内生放线菌的培养条件是: PYG 培养基、pH7.2、28℃-32℃; 菌株间的生物学特性的差异与菌株系统进化关系呈正相关关系; 不同环境植物的内生菌菌株的生物学特性差异较大, 相同环境的不同植物内生菌的生物学特性差异较小。【结论】药用植物内生放线菌物种丰富多样; 药用植物内生放线菌在唯一碳源利用、发酵碳源产酸及酶学活性等生理生化特性方面没有表现出和宿主植物的直接相关性, 而是呈现出和宿主植物的地理分布有一定的相关性。

关键词: 药用植物, 内生放线菌, 生物学特性, 多样性

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 01-0015-09

药用植物有着独特的药理活性, 特别是在治疗一些疑难病症上有着不可替代的作用。如茵陈主治黄疸型肝炎、肝硬化、肝腹水等肝病; 狼毒主治结核、气喘等, 还具有抗肿瘤的作用。药用植物的有效成分的提取和研究一直是国内的热门课题。1993 年, 美国蒙大拿州立大学的 Stierle 研究小组首次从短叶紫杉 (*Taxus brevifolia*) 中分离得到一株能合成抗癌物质紫杉醇的内生真菌新种安德氏紫杉霉菌 (*Taxomyces andreanae*)^[1], 并证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。由此掀起了对药用植物内生菌研究的热潮。《微生物学通

报》编辑部的郝荣乔于 2009 年初对 2008 年的年度点评中报道“植物内生菌成为我国当前微生物研究领域的热点”^[2]。的确, 药用植物内生菌的研究和有效开发对药用植物资源、特别是濒危植物资源的保护具有重要的意义。

本研究选取采集自北京、贵州、云南和西藏等地的药用植物样品 37 份, 经过表面消毒处理后, 应用放线菌分离培养技术从中分离放线菌菌株; 根据菌株的 16S rRNA 基因序列信息以及系统进化关系, 探讨药用植物内生放线菌的物种多样性; 通过生理生化实验测定, 揭示药用植物内生放线菌的生物学

基金项目: 国家自然科学基金 (30970008, 81173026); 国家微生物资源平台建设 (NIMR)

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

作者简介: 杜慧竟 (1985-), 女, 山西省太原市人, 硕士研究生, 从事微生物与生化药学研究。E-mail: dujing5555@gmail.com

收稿日期: 2012-06-05; 修回日期: 2012-11-09

特性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物样品:玉竹、黄精、知母、蒙古黄芪、肥皂草、藿香、薄荷、金银花、仙鹤草、樱桃、大叶玉竹、白芷、紫苏、喷瓜、金银木(橘色果实)、红色果实金银木、虎杖、薯蓣和穿龙薯蓣等 19 份植物样品采集自北京(编号 P1 - P19),大狼毒、狼毒大戟、瑞香狼毒、橙黄瑞香、藏茵陈和云南重楼等 6 份采自云南(P22 - P27),贵州重楼和三七采自贵州(P28, P29),绵头雪莲(P20)、包叶雪莲(P21)以及其余 8 份(P30 - P37)等共 10 份采自西藏。共计 37 份药用植物样品。

1.1.2 培养基:(1)内生菌分离培养基:使用了 10 种分离培养基(M1 - M10),其中 M1 - M8 培养基是本实验室在红树植物内生放线菌研究中使用的 8 种内生放线菌分离培养基^[3],M9 和 M10 的组成如下:

M9 (g/L): 柠檬酸 0.12, 柠檬酸铁铵 0.12, 硝酸钠 1.5, 磷酸氢二钾 0.4, 硫酸镁 0.1g, 碳酸钙 0.05, 碳酸钠 0.2, 琼脂 12, pH 7.2。

M10 (g/L): 甘露聚糖 2.0, 酪素水解物 0.3, 硝酸钾 0.1, 海洋微量盐 微量, 复合维生素 微量, 琼脂 12, pH 7.2。

(2)菌种纯化和继代培养培养基(g/L): 蛋白胨 3, 酵母浸膏粉 5, 甘油 10, 甜菜碱 1.25, 丙酮酸钠 1.25, 复合维生素 微量, 琼脂 12, pH 7.2。

1.1.3 抑制剂:抑制真菌和革兰氏阴性细菌的抑制剂的种类和剂量参见文献[3]。

1.1.4 菌株:参比菌株人参地类诺卡氏菌(*Nocardioides ginsengisegetis*) KCTC 19469^T, 韩国类诺卡氏菌(*Nocardioides koreensis*) KCTC 19272^T和耐碱类诺卡氏菌(*Nocardioides alkaliolerans*) KCTC 19037^T来源于韩国典型培养物保藏中心(KCTC);其它实验菌均为本研究的分离菌株。

1.1.5 主要试剂:硫代硫酸钠、次氯酸钠、碳酸钠、萘啶酮酸、制霉菌素、重铬酸钾等化学试剂均为国产分析纯试剂;PCR 扩增相关试剂和引物测序均来源于生工生物工程(北京),Biolog GEN III 微孔板和基础培养液购于美国 BIOLOG 中国代理,API 50CH 和 ZYM 试剂条及相关试剂购于生物梅里埃公司。

1.2 菌种分离和保藏

具体方法参见文献[3]。

1.3 菌种初步鉴定和多样性分析

菌种初步鉴定参照徐丽华等主编的《放线菌系统学》^[4]相关方法操作。根据菌落和菌丝形态初步观察排除重复菌株,选择代表性菌株测定其 16S rRNA 基因序列,并将结果提交 EzTaxon 网站(<http://www.eztaxon.org>)^[5]与相关属种中有效描述菌株的 16S rRNA 基因序列相比对,初步判定菌株的所属类群。根据 EzTaxon 中序列比对结果,从 GenBank 数据库中调集相关序列,运用 CLUSTAL X 软件进行序列比对并计算供试菌株与参比菌株之间的序列相似性^[6],运用 MEGA version 4.0 软件采用邻接法(Neighbour-Joining)构建实验菌株与参比菌之间的系统进化树^[7-10],分析内生菌的系统发育地位及基因多样性特点。

1.4 菌株的生物学特性实验和结果分析

菌株的培养条件测试按照陈华红^[11]文中描述方法进行。

使用 Biolog GEN III 微孔板测定菌株对唯一碳源的利用情况。BIOLOG GEN III 微孔板是通过检测微生物细胞利用不同碳源进行新陈代谢过程中产生的酶与四唑类物质(如 TTC、TV)发生颜色反应和浊度差异为基础来实现微生物的快速鉴定。BIOLOG GEN III 微孔板中的 71 种碳源可简单分成单糖、二糖和多糖、氨基酸及其衍生物、脂类等 4 大类。

使用 API50CH 试剂条和 API ZYM 试剂条分别测试菌株利用碳源产酸和菌株的酶学特性。API 50 CH 和 API ZYM 为 BioMérieux 公司的微生物快速鉴定系统的系列产品。API 50 CH 试剂条中包含了 49 种碳源底物。用不含碳源的基础培养基(如 API 50 CHB)将待测微生物配制成适宜浓度的菌悬液,菌悬液接种到 API 50 CH 试条中,在合适条件下培养,菌体产生的酶水解目标底物使微环境 pH 值变化从而产生颜色差异,根据 BioMérieux 公司的颜色标准,红色为阴性,黄色为阳性。API ZYM 是一个半定量的微量方法系统,该试剂条中共含有 19 种酶的底物(表 5),通过微生物接种、培养,可快速检测微生物的 19 种酶的活性。

将 BIOLOG GEN III、API 50 CH 以及 API ZYM 的实验结果的 139 项指标串联,用聚类分析软件 NTSYSpc (Numerical taxonomy system for cluster and

ordination analysis, NTSYSpc v. 2.02) 进行分析, 构建表型数值分类聚类图, 分析实验菌株的生物学特性。

2 结果

2.1 菌种分离结果

从 37 份药用植物中共分离、纯化得到 940 株纯培养物(表 1)。从云南、贵州和西藏来源的植物样品中分离得到的放线菌的比例稍高于北京的植物样品; 来源于植物根、茎、叶的菌株数量基本相当, 没有明显差异; 和其它 9 种分离培养基相比较, 丙酸钠分离培养基(M7)分离得到的放线菌数量占显著优势。

表 1 药用植物内生菌分离结果统计

Table 1 The strains isolated from the medicinal plants

Plant number	Number of isolates	Plant number	Number of isolates	Plant number	Number of isolates	Plant number	Number of isolates
P1	34	P11	6	P20	10	P29	64
P2	40	P12	18	P21	15	P30	2
P3	46	P13	10	P22	4	P31	8
P4	43	P14	1	P23	3	P32	44
P5	17	P15	8	P24	77	P33	45
P6	44	P16	15	P25	12	P34	31
P7	8	P17	14	P26	73	P35	34
P8	4	P18	1	P27	98	P36	12
P9	6	P19	12	P28	59	P37	3
P10	19						

通过菌落形态以及菌株细胞显微形态的初步观察结果以及菌株来源, 选择 174 株代表菌株进行 16S rRNA 基因序列测定和比对, 结果显示, 174 株分离菌株隶属于 30 个科、47 个属, 其中的放线菌 139 株, 分属于 34 个属(图 1)。以菌株的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库中有效描述菌种相似性 < 98.2% 作为操作分类单元 (taxonomic operational units, OTU) 的划分界限^[12-13], 其中有 22 株菌代表了 7 个新的操作分类单元。

2.2 药用植物内生菌的生物学特性

为了比较研究药用植物内生放线菌的生物学特性, 选择了 27 株分离菌株进行了生长温度、pH 值、唯一碳源利用、利用碳源产酸以及酶学特性测试, 其中包含了 2 株药用植物内生细菌。来源于韩国菌种保藏中心的 3 个典型培养物 KCTC 19272^T、KCTC 19469^T和 KCTC 19037^T(分离自不同土壤环境)同时

做了平行对照实验(表 2)。

起初, 分离菌株在对应的原始分离培养基和继代培养基 PYG 上生长良好, 但是随着传代次数的增加, 部分内生菌生长变弱, 甚至无法继续传代, 而 3 株来源于土壤样品的对照菌的生长状态则几乎不受传代次数的影响。内生菌菌株的温度生长范围是 10℃ - 37℃, 在 28℃ - 32℃ 生长较好; 多数菌株在 pH 6.0 - 10 范围内都能生长, 在 pH 中性至弱碱性条件下生长最佳。

本实验中 27 株植物内生菌对碳源的利用呈现以下趋势: 菌株对二糖和多糖类的利用率最高, 接下来依次是单糖, 脂类, 氨基酸及衍生物。27 株植物内生菌中, 50% 以上的菌株都能利用以下底物作为唯一碳源和能量来源: 亚碲酸钾, 丁酸钠, 甘露醇, 纤维二糖, 葡萄糖, 麦芽糖, 松二糖, 甘油, 果糖, 海藻糖, 蔗糖, 水杨苷, 甘露糖和醋酸。在菌株 I10A-01402 的分类学研究时, 用来源于土壤环境的近源菌 *N. koreensis* 19272^T, *N. ginsengisegetis* KCTC 19469^T, *N. alkalitolerans* KCTC 19037^T 作为参比进行了 Biolog Gen III 唯一碳源, API 50CH 产酸和 API ZYM 酶学特性测定和比较分析。植物内生菌 I10A-01402 以及其它 26 株内生菌都能够利用 Biolog 微孔板中葡聚糖和 D-麦芽糖, 但是, 来源于土壤环境的 *N. koreensis* 19272^T, *N. ginsengisegetis* KCTC 19469^T 和 *N. alkalitolerans* KCTC 19037^T 等 3 株类诺卡氏菌属的菌株都不能利用这两种糖; I10A-01402 不能利用 N-乙酰类化合物, 其它 26 株内生菌也都不能或很少利用此类化合物, 而这 3 株土壤来源的菌株则全部能利用 N-乙酰类化合物作为唯一碳源和能量来源。27 株药用植物内生菌和 3 株土壤来源的参比菌株同化 API 50 CH 中的碳源并产酸的情况以及酶学特性上也表现出较大的差异。本实验中 2 株药用植物内生细菌和 28 株放线菌相比较, 细菌能够更多地利用 Biolog Gen III 中列举的唯一碳源, 并且同化 API 50 CH 中单个碳源并产酸实验的阳性率也高一些, 但在 API ZYM 酶学特性测试结果中没有明显差异。

16S rRNA 基因序列相似性越高的菌株的部分生理生化特性也趋于相近。例如, 草药菌属菌株 (*Herbiconiux* sp.) I10A-01569、草药菌属菌株 (*Herbiconiux* sp.) I10A-02268、草药菌属菌株 (*Herbiconiux* sp.) I10A-02292、寒冷杆菌属菌株

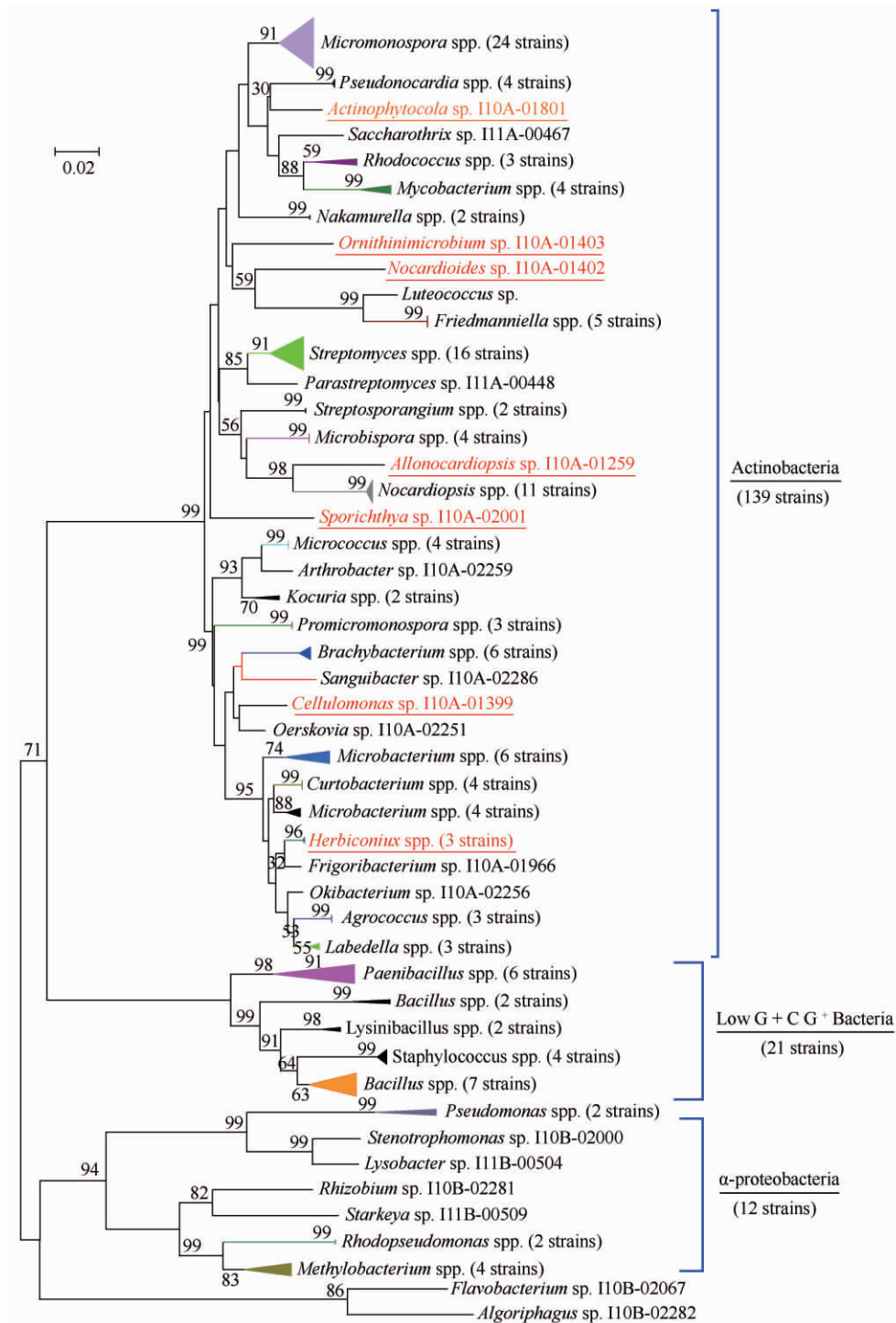


图 1 基于 16S rRNA 基因分析的部分分离菌株和近源菌株的系统发育聚类图

Fig. 1 Phylogenetic dendrogram based on 16S rRNA gene sequences analysis of partial isolates and related strains. Bar indicates 0.02 substitutions per nucleotide position. The strains marked in red indicate they may stand for the potential novel taxa.

表 2 生理生化实验菌相关信息

Table 2 Information of the bacteria for physiological characteristics tests

Strain number	Accession number	Source (Plant number or soil)	16S rRNA genesimilarity with the most related strain (%)	Genus	Family	Suborder	Phylum/Order
I10A-01403	JX273676	P10	97.2	Ornithinimicrobium			
I10A-01275	JX273658	P10	99.7	Kocuria	Micrococcaceae		
I10A-01254	JX273677	P13	99.8	Micrococcus			
I10A-02180	JX273660	P24	99.1	Promicromonospora	Promicromonosporaceae		
I10A-02251	JX273668	P24	97.2	Oerskovia	Cellulomonadaceae		
I10A-01569	JX273670	P25	97.8	Herbiconiux			
I10A-02268	JX273672	P35	97.8	Herbiconiux			
I10A-02292	JX273671	P35	97.5	Herbiconiux		Micrococceinae	
I10A-01966	JX273667	P26	99.2	Frigoribacterium	Microbacteriaceae		
I10A-01942	JX273673	P1	98.9	Microbacterium			
I10A-02256	JX273659	P30	99.5	Okibacterium			
I10A-02267	JX273669	P35	99.5	Labeledella			
I10A-01402	JN869461	P13	95.9	Nocardioides			
KCTC 19272T	EF466115	Soil	100	Nocardioides			
KCTC 19469T	GQ339901	Ginseng field soil	100	Nocardioides			Actinobacteria (phylum)
KCTC 19037T	AY633969	Alkaline serpentinite soil	100	Nocardioides	Nocardioidaceae	Propionibacterineae	Actinomycetales (order)
I10A-01568	JX273680	P16	98.9	Friedmanniella			
I10A-01803	JX273665	P16	97.0	Friedmanniella			
I10B-01996	JX273666	P16	97.1	Friedmanniella			
I10A-01567	JX273661	P26	99.0	Streptosporangium			
I10A-01802	JX273675	P26	98.7	Microbispora	Streptosporangiaceae	Streptosporangineae	
I10A-01259	JQ309825	P16	93.1	novel genus	novel family		
I10A-01801	JX273662	P24	98.6	Actinophytocola	Pseudonocardiaceae	Pseudonocardineae	
I10A-01893	JX273679	P24	97.5	Mycobacterium	Mycobacteriaceae	Corynebacterineae	
I10A-02001	JX273674	P17	93.2	Sporichthya	Sporichthyaceae		
I10A-02501	JX273663	P17	96.3	Nakamurella		Frankineae	
I10A-02502	JX273664	P17	97.0	Nakamurella	Nakamurellaceae		
I10A-01877	JX273681	P24	99.8	Asanoa	Micromonosporaceae	Micromonosporineae	
I10B-02282	JX273678	P26	87.9	Algoriphagus	Cyclobacteriaceae	Cytophagales	Bacteroidetes
I10B-02067	JX273682	P11	99.4	Flavobacterium	Flavobacteriaceae	Flavobacteriales	(phylum)

(*Frigoribacterium* sp.) I10A-01966、微杆菌属菌株 (*Microbacterium* sp.) I10A-01942、奥卡河杆菌属菌株 (*Okibacterium* sp.) I10A-02256 和纳比德氏菌属菌株 (*Labeledella* sp.) I10A-02267 都属于微杆菌科 (*Microbacteriaceae*)。在 API 50CH 实验中这 7 株菌在利用单糖类和醇类碳源产酸方面比较一致, 菌株 I10A-01569、I10A-02268、I10A-02292 三者所利用的碳源更相似, 特别是对二糖的利用, 并且都只能利用个别醇类产酸。而 I10A-02268 与 I10A-02292 更为一致。与 I10A-01942 相比, I10A-02267, I10A-02256 和 I10A-01966 在利用糖苷类, 二糖类以及葡萄糖酸

类等产酸方面更为相似, 只有 I10A-01942 能利用赤藓醇, 但不能利用蔗糖, 龙胆二糖, 松二糖, 以及苦杏仁苷和熊果苷。在同属于草药菌属的菌株 I10A-01569, I10A-02268 和 I10A-02292 中, 后两株菌的相似性更高一些。在 API ZYM 实验中, 除了 3 个菌株都表现出磷酸酶、酯酶、芳胺酶、 β -糖醛酸甙酶和葡萄糖甙酶活性以外, 菌株 I10A-01569 还表现出 β -半乳糖甙酶, N-乙酰-葡萄糖胺酶和岩藻糖甙酶活性。再比如, 鸟氨酸微菌属菌株 (*Ornithinimicrobium* sp.) I10A-01403 和考克氏菌属菌株 (*Kocuria* sp.) I10A-01275 都分离自樱桃果, 微球菌属菌株 (*Micrococcus*

sp.) I10A-01254 来源于紫苏根,在图 2-B 上,I10A-01275 与 I10A-01254 二者之间的进化距离比 I10A-01275 与 I10A-01403 更近,从 API ZYM 的测试结果也显示出前两者更相似,酯酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶、蛋白酶都呈阳性,岩藻糖苷酶和 N-乙酰-葡萄糖胺酶呈阴性。虽然 I10A-01403 与 I10A-01275 都分离在樱桃果实,但二者的酶学特性并没有表现出明显的一致性;菌株 *Labeledella* sp. I10A-02267 虽然和 *Herbiconiux* sp. I10A-02268 及 *Herbiconiux* sp. I10A-02292 来源于相同的宿主植物,但 I10A-02267 的酶活特性确与后两株菌有较大的差异性:比如,菌

株 I10A-02267 具有较强的半乳糖苷酶、N-乙酰-葡萄糖胺酶和 α -甘露糖甙酶活性。

基于菌株生理生化实验的 139 项指标结果而构建的数值分类聚类图(图 2-A)和基于 16S rRNA 基因分析的系统进化树(图 2-B)总体相符。也就是说,系统进化地位相近的菌株在生理学特征上也有着共同特征;图 2 中的两个子图(A 和 B)在细小分支和少数菌株的聚类位置上存在着差异:在数值分类聚类图 2-A 上,来源于相同地域的菌株(相同的文字颜色标注)倾向于聚集在相同的分支上。

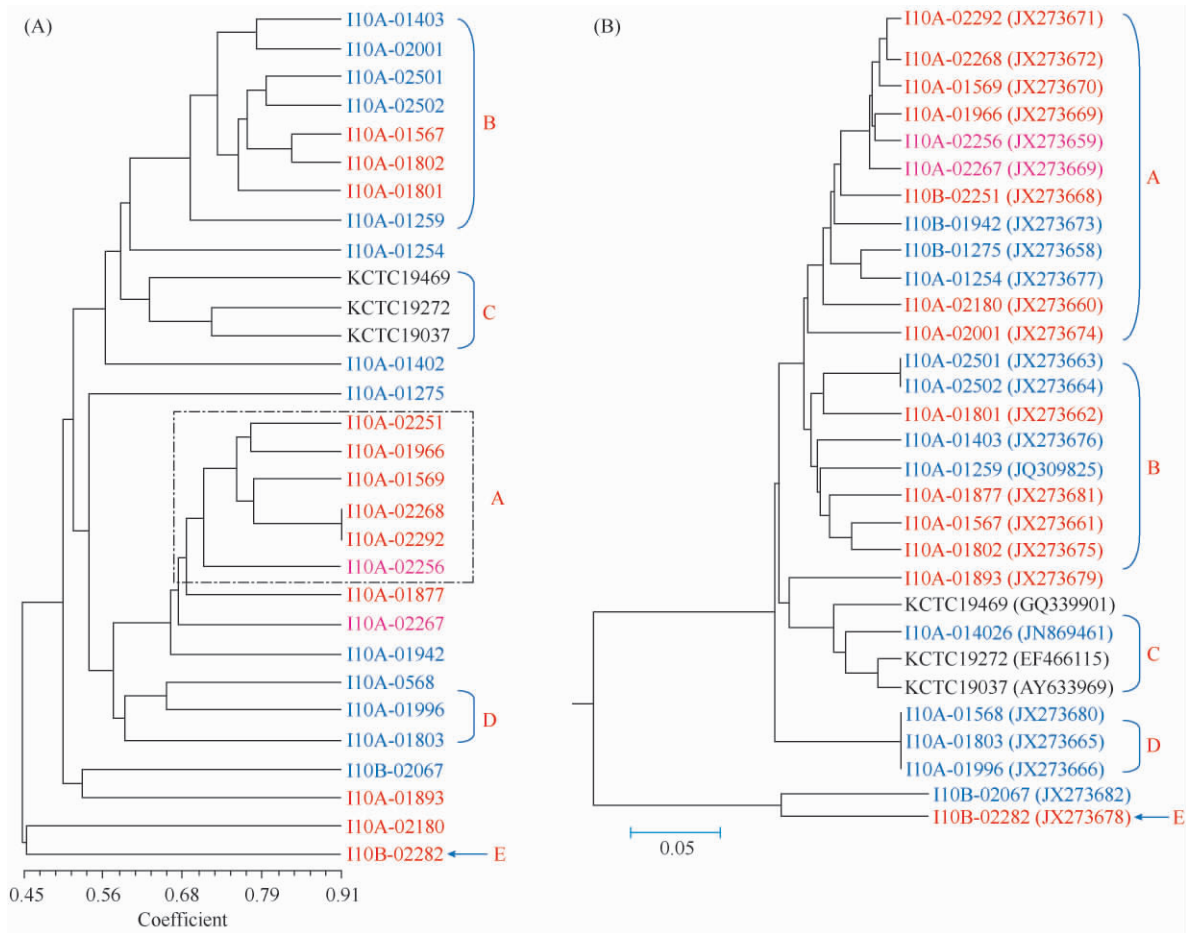


图 2 基于菌株生理生化实验结果(A)和基于菌株 16S rRNA 基因分析(B)而构建的分类聚类图

Fig. 2 Dendrograms of the tested strains based on the physiological characteristics (A) and 16S rRNA gene sequences analysis (B). The strains marked in different colour stand for which from different source or area. Black, from soil; blue, from the medicinal plants collected in Beijing; red, from the medicinal plants collected in Yunnan province; purple, from the medicinal plants collected in Tibet.

3 讨论

微生物资源的研究归根结底还要以纯培养物为

基础。一直以来,放线菌因其丰富的物种多样性、纷繁的形态学特征、多种多样的代谢功能以及各具特色的次生代谢产物,激励着人们的研究热情。

本研究中我们沿用了放线菌研究的基本方法,

设计使用了 10 种添加了抑制真菌和革兰氏阴性细菌的抑制剂、比较适合放线菌生长的分离培养基, 从药用植物组织中分离、纯化得到了分属于 47 个属的 940 株纯培养物, 其中的放线菌菌株 600 余株, 分别隶属于 34 个属, 从中发现了 7 个新分类单元。此外, 分离菌株的 16S rRNA 基因序列比对结果显示: (1) 本研究中分离得到了浅野氏菌属 (*Asanoa*)、植物内生放线菌属 (*Actinophytocola*)、纤维单胞菌 (*Cellulomonas*)、弗莱德氏菌属 (*Friedmanniella*)、寒冷杆菌属 (*Frigoribacterium*)、草药菌属 (*Herbiconiux*)、纳比德氏菌属 (*Labedella*)、苍黄球菌属 (*Luteococcus*)、中村氏菌属 (*Nakamurella*) 和血杆菌属 (*Sanguibacter*) 等比较罕见的稀有放线菌。(2) 分离得到的 *Actinophytocola* 和 *Herbiconiux* 属的菌株, 在以往的研究中也仅从植物组织或其它比较特殊的环境中发现过^[14-15], 那么, 是否提示说这类菌株就仅仅存在于植物内部或者其它特境中呢? 我们希望在后续研究中找到答案。(3) *Luteococcus* 和 *Nakamurella* 属的菌株也是自报道以来的第二例纯培养物^[16], 时隔 15 年之久, 没有相关研究报道。(4) *Sanguibacter* 和 *Friedmanniella* 属的放线菌以前仅从极端环境中分离得到过。(5) 从云南、云贵、西藏等地植物的内生细菌包含有更多的稀有种属, 然而这些稀有种属并没有完全表现出宿主特异性。Cho 等人的研究发现, 不同产地的人参中分离得到的优势菌群都不相同^[17]。因此, 我们推测, 地理阻隔对微生物分布的影响要远大于微环境 (宿主植物) 的影响。(6) 和其它的药用植物相比较, 本实验从藏药植物瑞香狼毒这一种植物中分离到了 12 个属的菌株, 包括 5 株与近源菌的 16S rRNA 基因相似性 < 98.2%, 可视为新的操作分类单元, 它们分别属于分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、厄氏菌属 (*Oerskovia*)、小单孢菌属 (*Micromonospora*)、植物内生放线菌属 (*Actinophytocola*) 和红假单孢菌属 (*Rhodopseudomonas*)。瑞香狼毒全株有毒, 是我国天然牧场的主要毒草, 也是引起优良牧场和草场退化的有害物种。本研究从这种毒草中分离得到了多样性丰富的放线菌这一结果再次提示: 植物内生放线菌的研究也是将植物变废为宝的一种途径。

在菌株的继代培养中, 不少菌株随着传代次数的增加生长状态呈下降趋势。经过不断探索、挽救, 依然有近百株菌在历经 2-3 次传代后就不能形成

可见菌落了。在测序的 174 株菌中, 也有 3 株菌 (*Luteococcus* sp., *Kocuria* sp. 和小短杆菌属 (*Brachybacterium* sp.)) 在没能得到有效保藏时就失活了。Amann R. I. 等人曾经报道, 他们的研究发现 90% - 99% 的植物内生菌很不容易被成功培养^[18]。可能内生菌在体外培养过程中受到某些生长因素与环境条件的限制, 使这部分菌株进入非可培养状态, 以至于原来可在琼脂平板上形成菌落的细胞退化成不能有效分裂形成菌落^[19]。我们希望在以后的研究中能通过系统研究植物内生菌的生理生化特性来进一步改善培养条件, 以提高这类微生物的成活率。比如, 适量添加 Rpf (resuscitation promoting factor) 因子进行复苏培养; 或者尝试采用多细胞共培养的方式使得菌株适应了植物体外环境之后再行二次分离培养。

在后续的研究中, 我们将采用传统的药物模型筛选和基因筛查相结合的策略对药用植物内生放线菌的代谢潜力进行评估, 挖掘药用植物内生放线菌资源的有用性、探索内生放线菌和宿主植物的代谢相关性。

参考文献

- [1] Strobel GA, Daisy B, Castillo, et al. Natural Products from Endophytic Microorganisms. *Journal of Natural Products*, 2004, 67 (2): 257-268.
- [2] Qiao HR. Plant endophyte becomes one of hot topics in the current microbiological study in China. *Microbiology China*, 2009, 36 (1): 1. (in Chinese).
赫荣乔. 植物内生菌成为我国当前微生物研究领域的热点. *微生物学通报*. 2009, 36 (1): 1.
- [3] 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.
- [4] Xu LH, Li WJ, Liu ZH. Actinomycete systematic—principle, methods and practice. Beijing: Press. 2007: 40-47, 66-80, 119-128. (in Chinese)
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: 40-47, 66-80, 119-128.

- [5] 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, 2259-2261.
- [6] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [7] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111-120.
- [8] Kimura M. The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge: Cambridge University Press, 1983.
- [9] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4: 406-425.
- [10] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [11] Chen HH, Li WJ, Zhang YQ, Wang D, Tang SK. Study on isolation and systematic taxonomy of strains of genus *Nesterenkonia*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (6): 811-815. (in Chinese)
陈华红, 李文均, 张玉琴, 王栋, 唐蜀昆. 涅斯捷连科氏菌属菌株的分离及系统学研究. *微生物学报*. 2004, 44 (6): 811-815.
- [12] Keswani J, Whitman WB. Relationship of 16S rRNA sequence similarity to DNA hybridization in prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51 (2): 667-678.
- [13] Stackebrandt E, Ebers J. Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiol Today*, 2006, 33, 152-155.
- [14] Indananda C, Matsumoto A, Inahashi Y, Takahashi Y, Duangmal K, Thamchaipenet A. *Actinophytocola oryzae* gen. nov., sp. nov., isolated from the roots of Thai glutinous rice plants, a new member of the family Pseudonocardiaceae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60 (5): 1141-1146.
- [15] Behrendt U, Schumann P, Hamada M, Suzuki KI, Spröer C, Ulrich A. Reclassification of *Leifsonia ginsengi* (Qiu et al. 2007) as *Herbiconiux ginsengi* gen. nov., comb. nov. and description of *Herbiconiux solani* sp. nov., an actinobacterium associated with the phyllosphere of *Solanum tuberosum* L. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61 (3): 1039-1047.
- [16] Tao TS, Yue YY, Chen WX, Chen WF. Proposal of *Nakamurella* gen. nov. as a substitute for the bacterial genus *Microsphaera* Yoshimi et al. 1996 and *Nakamurellaceae* fam. nov. as a substitute for the illegitimate bacterial family *Microsphaeraceae* Rainey et al. 1997. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 999-1000.
- [17] Cho KM, Hong SY, Lee SM, Kim YH, Kahng GG, Lim YP, Kim H, Yun HD. Endophytic bacterial communities in ginseng and their antifungal activity against pathogens. *Microbial Ecology*, 2007, 54 (2): 341-351.
- [18] Amann RI, Ludwig W, Scheidler KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59 (1): 143-169.
- [19] Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Singleton R, Attwell W, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbial Ecology*, 1982, 8 (4): 313-323.

Isolation and physiological characteristics of endophytic actinobacteria from medicinal plants

Huijing Du, Jing Su, Liyan Yu, Yuqin Zhang*

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

Abstract: [Objective] To isolate, incubate and characterize cultivable endophytic actinobacteria from medicinal plants, and analyze the diversity of the endophytic actinobacteria, then explore the novel microbial resources. [Methods] Ten media were used to isolate endophytic actinobacteria from 37 fresh medicinal plant tissue samples. The optimal cultivation conditions for endophytic actinobacteria were determined by comparison. Based on the morphology of the colonies and cells of the new isolates, we chose 174 isolates to analyze their 16S rRNA gene sequences and the diversity of the medicinal plant endophytic actinobacteria. The physiological characteristics of 27 representative strains were studied using Biolog GEN III MicroPlates, API 50CH and API ZYM kits. [Results] In total 940 endophytes affiliated to 47 genera of 30 families were isolated, among which more than 600 actinobacteria belonged to 34 genera and 7 unknown taxa. Good growth of the endophytic actinobacteria on PYG (peptone-yeast-glycerol) medium with pH 7.2 at 28 – 32°C was observed. Physiological characteristics differences of these isolates related to their phylogenetic relationships. Greater differences were shown among the strains from the same host plants than those from different plants grown in the same area. [Conclusion] There are great diverse endophytic actinobacteria inside the medicinal plants. No direct relationship of the endophytic actinobacteria from medicinal plants with the host plants in the sole carbon source utilization, fermentation of carbon sources to produce acid and the enzyme activities was found, while it seemed that the physiological characteristics of the isolates related to the geographical distribution of their host.

Keywords: medicinal plants, endophytic actinobacteria, physiological characteristics, diversity

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30970008, 81173026) and by the National Infrastructure of Microbial Resources (NIMR)

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

Received : 5 June 2012 / Revised : 9 November 2012