

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
53(7): 657-668; 4 July 2013
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

药用植物根系土壤可培养粘细菌的分离鉴定

赵智颖^{1,2} 张鲜姣¹ 谭志远² 郭俊¹ 朱红惠^{1*}

¹广东省微生物研究所, 广东省菌种保藏与应用重点实验室, 广东省微生物应用新技术公共实验室, 广东华南微生物应用重点实验室-省部共建国家重点实验室培育基地, 广州 510070

²华南农业大学农学院, 广东省植物分子育种重点实验室, 广州 510642

摘要 【目的】对药用植物根系土壤可培养粘细菌进行分离与鉴定, 探讨药用植物根系土壤粘细菌资源多样性。【方法】采集华南植物园和南岭国家森林公园 22 种药用植物根系土, 利用辅助菌诱导分离技术分离样品中可培养粘细菌; 通过菌株显微形态和菌落形态观察, 结合 16S rDNA 基因序列分析, 确定分离粘细菌菌株的系统发育地位。【结果】分离获得 50 株粘细菌, 分属于 3 个科, 7 个属, 其中粘球菌属 (*Myxococcus*) 18 株, 珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 11 株, 孢囊杆菌属 (*Cystobacter*) 7 株, 原囊菌属 (*Archangium*) 8 株, 标桩菌属 (*Stigmatella*) 1 株, 软骨霉状菌属 (*Chondromyces*) 4 株, 匣状球菌属 (*Pyxidicoccus*) 1 株。粘球菌属和珊瑚球菌属分布最为广泛。【结论】研究发现药用植物根系土壤可培养粘细菌与土壤 pH 和有机碳含量等环境因子有一定的相关性。粘细菌更适宜在有机质丰富、pH 近中性的环境中生长; 粘球菌属和珊瑚球菌属的菌株对 pH 适应性较强, 而粘球菌属和孢囊杆菌属的菌株对土壤有机碳含量依赖性不强, 在贫瘠土壤中仍有分布。本研究对后续粘细菌资源的开发和利用提供良好的实验材料和理论基础。

关键词: 药用植物, 土壤, 粘细菌, 多样性

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2013) 07-0657-12

粘细菌 (*Myxobacteria*) 是一类可滑动的、具有多细胞行为的革兰氏阴性细菌, 是变形菌门 (*Proteobacteria*) δ 变形菌亚纲 (*Deltaproteobacteria*) 的成员^[1]。它们具有独特的细胞间信号传递系统和复杂的形态发生过程, 可通过信号感应以协同进食和形成子实体 (*Fruiting Bodies*)^[2-3], 因此可作为研究原核生物多细胞行为和形态发生的模式材料。此外, 粘细菌可产生多种结构新颖、作用机制多样的次级代谢产物^[4-6], 是一类极具应用开发价值的微生物类群^[7-8]。

目前, 已经发现的粘细菌包含了 8 个科, 22 个属, 50 多个种^[9-14], 主要分布于温暖干燥、富含微生物与有机质的地方, 如土壤表层、树皮、腐烂的木材、厩肥和动物粪便等^[9]。粘细菌的粘孢子和子实体具有很强的抗逆性, 因此可生存于海洋、酸性泥沼、低氧条件、高渗透压、盐碱等特殊环境^[15]。特殊环境微生物的分离成为了微生物学研究的热点。Dawid^[1]曾在比利时、德国、美国等国家的沼泽地中分离到 10 多个种的粘细菌, 在南极土样中发现了能在 4℃ 低温下生长的嗜冷粘细菌; Mohr 等^[11]在印度

基金项目: 国家自然科学基金 (31170009); 新疆生产建设兵团塔里木盆地生物资源保护利用重点实验室开放基金课题重点项目 (BRZD1004)

* 通信作者。Tel: +86-20-87676803; Fax: +86-20-37656629 E-mail: zhuhonghui66@yahoo.com.cn

作者简介: 赵智颖 (1987-), 女, 广东广州人, 硕士, 研究方向为微生物遗传学。E-mail: crystal23200@163.com

收稿日期: 2013-01-11; 修回日期: 2013-03-25

采集的样品中分离得到了大量粘细菌,并发现了一个能够降解淀粉的粘细菌新科(Sandaracinus amylolyticus)。在国内,有不少学者曾对多个地区多个环境中的粘细菌进行分离研究,如Li等^[16]在程海湖淤泥中分离得到113株粘细菌,其中大部分为孢囊杆菌亚目(Cystobacterineae)和堆囊菌亚目(Sorangineae)菌株;张鲜姣等^[17]在新疆阿克苏地区盐碱地分离得到50多株耐盐和嗜盐粘细菌种类。

我国药用植物物种丰富^[18],但随着人们对植物药需求的剧增,对药用植物的过度的采集和消费使得药用植物面临灭绝的危险^[19]。研究者对药用植物内生真菌、内生放线菌和根系土壤真菌进行了分离研究,从其代谢产物中筛选了具有药用价值的活性物质或新型化合物以开发新药,丰富了人类的药物宝库^[20-23]。通过寄生或共生在药用植物中的微生物获得药用活性成分的手段为开发药用资源提供了新的思路。在植物根际土壤中蕴含了丰富的粘细菌资源,而药用植物和其根际微生物之间会产生千丝万缕的联系和相互作用。而近年来,从粘细菌次生代谢产物中已鉴定了100多种基本结构以及近600种衍生物,其具有种类丰富多样、结构新颖、生物学活性物质产生菌比率高、作用机制多样等特点^[4,15]。因此,药用植物根系土壤中的粘细菌是发掘药用活性物质和新型化合物的良好材料。但迄今尚未见药用植物根系土壤粘细菌分离鉴定与多样性的相关报道。本研究对药用植物根系土壤中的可培养粘细菌进行分离鉴定,初步探讨了药用植物资源土壤粘细菌的多样性,以期发掘药用植物根系土壤中的粘细菌资源,丰富粘细菌种类,研究结果将为特殊环境的微生物粘细菌资源研究提供理论依据,为后续粘细菌资源的保护和开发利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集: 本研究采集了华南植物园和南岭国家森林公园较为常见的22种药用植物的根系土壤,采样信息见表1。为减少霉菌的污染,土壤采集后立即自然风干,4℃冷库保存。

1.1.2 培养基: 水琼脂培养基(WCX): CaCl₂·2H₂O 1.0 g,琼脂15.0 g,加水定容至1 L,pH 7.2。灭菌后加入放线菌酮至终浓度25 μg/mL^[15]。VY/2

培养基:安琪酵母5.0 g,CaCl₂·2H₂O 1.0 g,维生素B12 琼脂15 g,加水定容至1 L,pH 7.2^[15]。CY培养基:Yeast extract 1.0 g,Casitone 3.0 g,CaCl₂·2H₂O 1.0 g,琼脂15.0 g,加水定容至1 L,pH 7.0^[15]。

1.1.3 主要仪器和试剂: 冷冻离心机3K30C,德国SIGMA公司;PCR扩增仪GeneAmp PCRsystem 2400,德国PE公司;恒温培养箱GHP-9160,上海一恒科技公司;超净工作台SW-CI-4F,AIR TECH公司;凝胶成像系统BST-20,英国UVI公司;冻干机ES-2030;体式显微镜Leica M165C;扫描电镜S-3000N,日立公司;透射电镜H-7650,日立公司;TaqDNA聚合酶、dNTPs由上海生工生物工程技术服务有限公司生产;引物由上海英俊生物公司合成(细菌通用引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R:5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3')。

1.2 样品的预处理

取风干的土壤样品约3 g,用含放线菌酮100 μg/mL的无菌水浸泡土样12 h,8000 r/min离心5 min,弃上清^[9]。

1.3 辅助菌诱导粘细菌子实体

以WCX培养基作为基础培养基,用辅助菌(*Achromobacter* sp.)菌浆在无机盐培养基上划十字交叉线,在交叉线交点处接种扁豆大的经放线菌酮处理的土样,30℃恒温培养,72 h后开始观察子实体的形成^[9]。

1.4 纯化与保藏

采用VY/2培养基反复转接法纯化菌株,将疑似纯化的粘细菌菌株接种于CAS液体培养基中,30℃振荡培养过夜,培养基澄清表明粘细菌已纯,并用VY/2斜面、甘油、冻干保藏粘细菌。

1.5 分类鉴定

根据《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》(9th edition)^[9]粘细菌分类标准,借助光学显微镜、立体解剖镜、扫描电镜、透射电镜等仪器对分离得到的粘细菌菌株的子实体结构、菌落形态、营养细胞和粘孢子形态^[1,9,15]进行观察。根据上述观察的粘细菌形态特征,结合16S rDNA将分离得到的粘细菌鉴定到种,部分菌株鉴定到属。

1.6 分子鉴定

采用CTAB法提取粘细菌总DNA;用细菌通用引物27F和1492R对粘细菌总DNA进行16S rDNA的扩增^[24-25];将PCR产物送到上海英俊生物公司

测序; 将所得序列在 EzTaxon (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) 进行比对, 以鉴定其归属。

1.7 理化指标的测定

利用油浴加热重铬酸钾氧化-容量法^[26] 和水浸法^[27] (土壤: 水 = 1: 5) 测定土壤样品中的土壤有机碳含量以及 pH, 每个样品有两个重复, 取其平均值。

1.8 土样中粘细菌多样性与环境因子的相关性分析

运用生物统计学软件 CANOCO for windows (Version 4.5) 对分离得到的粘细菌数据进行典型对应分析(CCA), 研究各土样中粘细菌多样性与其理

化指标的相关性。

2 结果和分析

2.1 样品理化性质

本实验所测定土样的理化性质如表 1 所示, 华南植物园和南岭国家森林公园土壤 pH 范围在 4.28 - 7.82 之间, 大部分土样呈酸性, 只有个别样品呈碱性; 土样较肥沃, 土壤有机碳含量最高可达 97.25 g/kg, 但也有个别土样较为贫瘠, 土壤的有机碳含量只有 9.89 g/kg。

表 1. 药用植物种类及采样土壤理化性质

Table 1. Information of the medical plant and soil physicochemical property

Sample	Vegetation type	Sampling site	Soil pH	TOC/(g/kg)
1	<i>Zanthoxylum nitidum</i> (Roxb.) DC.	South China Botanical Garden(华南植物园)	4.28	24.30
2	<i>Lasianthus chinensis</i> (Champ.) Benth.	South China Botanical Garden(华南植物园)	4.34	81.25
3	<i>Melastoma candidum</i> D. Don.	Nanling National Forest Park(南岭国家森林公园)	4.38	45.22
4	<i>Pithecellobium clypearia</i> (Jack.) Benth.	South China Botanical Garden(华南植物园)	4.40	97.25
5	<i>Rubus alceaefolius</i> Poir.	Nanling National Forest Park(南岭国家森林公园)	4.52	67.42
6	<i>Canarium pimela</i> Leenhliia.	South China Botanical Garden(华南植物园)	4.68	64.46
7	<i>Pithecellobium lucidum</i> Benth.	South China Botanical Garden(华南植物园)	4.68	60.47
8	<i>Rhodomyrtus tomentosa</i> (Ait.) Hassk.	Nanling National Forest Park(南岭国家森林公园)	4.83	64.52
9	<i>Wrightia pubescens</i> R. Br.	South China Botanical Garden(华南植物园)	5.00	36.50
10	<i>Pinus massoniana</i> Lamb.	Nanling National Forest Park(南岭国家森林公园)	5.03	10.35
11	<i>Cratoxylum cochinchinense</i> (Lour.) Blume	South China Botanical Garden(华南植物园)	5.29	74.53
12	<i>Vitex quinata</i> (Lour.) F. N. Will.	South China Botanical Garden(华南植物园)	5.38	50.17
13	<i>Liquidambar formosana</i> Hance.	Nanling National Forest Park(南岭国家森林公园)	5.53	94.63
14	<i>Quisqualis indica</i> L.	South China Botanical Garden(华南植物园)	5.62	29.77
15	<i>Psychotria rubra</i> (Lour.) Poir.	South China Botanical Garden(华南植物园)	5.82	41.79
16	<i>Alpinia oxyphylla</i> Miq.	South China Botanical Garden(华南植物园)	6.10	36.86
17	<i>Murraya exotica</i> L.	South China Botanical Garden(华南植物园)	6.26	40.43
18	<i>Aporosadioica</i> (Roxb.) Müll. Arg.	South China Botanical Garden(华南植物园)	6.45	61.92
19	<i>Alstonia scholaris</i> (L.) R. Br.	South China Botanical Garden(华南植物园)	7.07	49.48
20	<i>Schima superba</i> Gardn. et Champ.	Nanling National Forest Park(南岭国家森林公园)	7.11	9.89
21	<i>Ophiopogon japonicus</i> (L. f.) Ker-Gawl.	South China Botanical Garden(华南植物园)	7.81	25.81
22	<i>Portulaca oleracea</i> L.	Nanling National Forest Park(南岭国家森林公园)	7.82	41.16

Note: TOC: total organic carbon

2.2 药用植物根系土壤粘细菌的分离及其形态观察

在华南植物园和南岭国家森林公园采集 22 种药用植物的根系土壤, 采用改良的辅助菌诱导法, 对其根系土壤中可培养粘细菌进行分离, 共得到 50 株

粘细菌。根据粘细菌子实体结构、菌落形态、营养细胞和粘孢子形态的观察, 并结合 16S rDNA 序列分析, 将其初步鉴定为: 粘球菌属 18 株, 珊瑚球菌属 11 株, 匣状球菌属 1 株, 孢囊杆菌属 7 株, 原囊菌属 8 株, 标桩菌属 1 株, 软骨霉状菌属 4 株(表 2)。

表 2. 各属粘细菌的主要形态特征

Table 2. Morphological characteristics of the isolated myxobacteria strains

Genus	Fruiting body in crude culture	Fruiting body in pure culture	Vegetative cell	Myxospore	Swarm
<i>Myxococcus</i>	Spherical, soft-slimy mound, with a smooth surface, vivid yellow, orange, pinkish white or yellowish white, some with a long pellucid slime stalk	Spherical, soft-slimy mound, yellow, greenish yellow, orange, pale orange, reddish orange or even light violet	Slender rods with slightly tapering ends, cigar-shaped, 0.5 - 0.8 μm × 3.0 - 8.0 μm	Regular sphere, or ovoid, diameter 1.0 - 2.0 μm, with a heavy capsule	Soft slime sheet, yellow, greenish yellow or orange
<i>Pyxidicoccus</i>	Spherical, contorted ribbon-like or closed circularity, golden brown or olive brown	Mesenteric masses of contorted and convoluted strings, brown or olive brown	Slender rods with slightly tapering ends, 0.5 - 0.6 μm × 5.5 - 7.6 μm	Regular sphere, diameter 1.6 - 1.8 μm, with a heavy capsule	Soft slime sheet, with a undulated edge
<i>Corallococcus</i>	Ridge-like, small pustules, beadlike or spherical, light orange or pink	Ridge-like or spherical, orange reddish orange	Slender rods with slightly tapering ends, cigar-shaped, 0.5 - 0.8 μm × 3.6 - 7.8 μm	Regular sphere or ovoid, diameter 1.0 - 2.0 μm, with a heavy capsule	Soft slime sheet, with undulated edge or wrinkles
<i>Archangium</i>	Branched pellucid slime stalk, bearing a cluster of spherical pastel pink sporangiole	Irregular mass, pale red, brown or dark brown	Long, slender, needle-like rods with tapering ends, 0.5 - 0.7 μm × 6.9 - 16.7 μm	Regular sphere, diameter 1.1 - 1.5 μm, with a heavy capsule	Tough, film-like, with radial veins
<i>Stigmatella</i>	Spherical sporangioles without a stalk, pink	Not form fruiting bodies	Boat-shaped, with tapering ends, 0.7 - 0.8 μm × 3.8 - 8.8 μm	Rods with rounded ends, optically refractile, 0.9 - 1.2 μm × 2 - 4 μm	Soft slime sheet, with undulated edge or wrinkles, pink
<i>Cystobacter</i>	Spherical, solitary, or in long chains that sometimes form three-dimensional networks, brown, chestnut brown or even black	Spherical, solitary, or in long chains that sometimes form three-dimensional networks, with a thick, hyaline, and colorless slime capsule, brown, chestnut brown or even black	Needle-shaped, with tapering ends, 0.6 - 0.9 μm × 6.5 - 14.1 μm	Fat rods with rounded or slightly tapered ends, 0.5 - 0.7 μm × 1.1 - 2.0 μm	Thin tough slime sheet, delicately plicated radial veins, with undulated edge or wrinkles
<i>Chondromys</i>	Sporangiole sturnip-shaped with a single pellucid stalk	No pure strain	-	-	-

Note: - is not be observed.

观察分离得到的粘细菌子实体形态(图1),发现粘细菌的子实体形态多样,结构复杂,不同种属间子实体形态差异较大;颜色鲜艳,主要为黄色、橙色、粉红色和棕色。

分离纯化得到的粘细菌菌落形态如图2所示。经过反复的转接纯化,使得粘细菌子实体有一定程度的退化。除了个别种属外,粘细菌子实体的颜色、形态均有较大的改变;标桩菌属甚至丧失了形成子实体的能力。相同种属的不同菌株在纯培养后的菌落形态、颜色也不尽相同。

粘细菌的营养细胞分为两端削尖、细长、可屈挠的杆菌(细胞I型)或两端钝圆、较硬的圆柱形(细胞II型)^[9]。对粘细菌营养细胞和粘孢子进行透射电镜观察,发现粘球菌属、珊瑚球菌属、原囊菌属、孢囊杆菌属、标桩菌属、匣状球菌属粘细菌的营养细胞均为I型,细胞细长,针形或雪茄形,可弯曲,0.5 - 0.8 μm宽,3.0 - 16.7 μm长(图3)。粘球菌属、珊瑚球菌属、原囊菌属、匣状球菌属粘细菌的粘孢子为球形或近球形,直径为1.0 - 2.0 μm,具折光性,有厚荚膜包被(图4)。

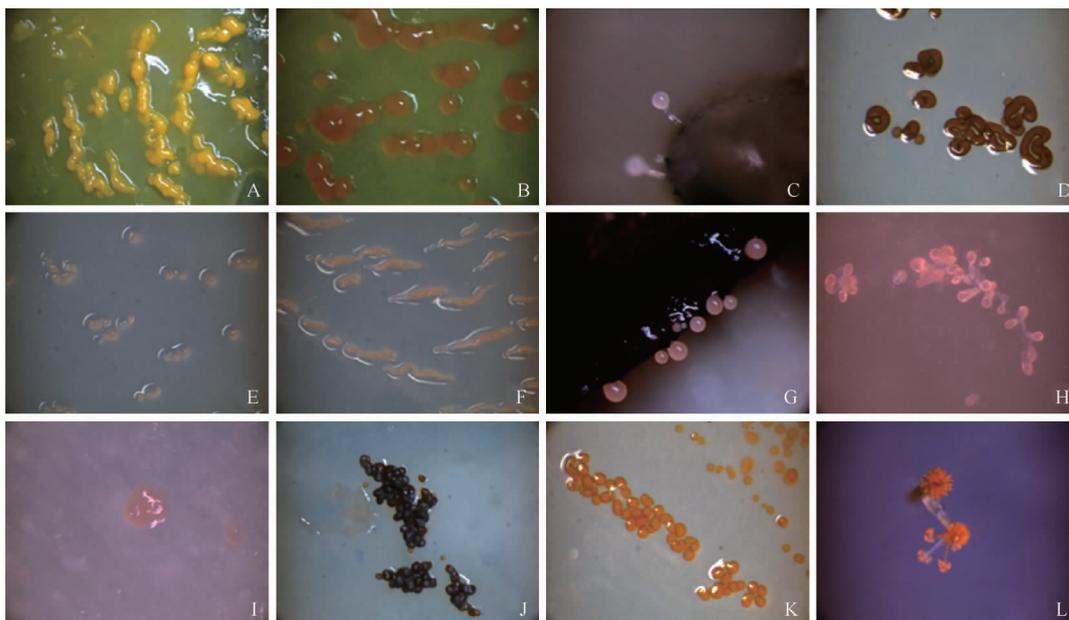


图 1. 部分粘细菌子实体照片

Figure 1. Morphological characteristics of fruiting body of some myxobacteria strains. A: 42-jj-2, *Mx. xanthus*; B: 42-md-4, *Mx. fulvus*; C: 42-heh-4, *Mx. stipitatus*; D: 42-10-3, *Py. fallax*; E: 42-10-4, *Cc. exiguous*; F: 42-10-6, *Cc. coralloides*; G: 42-sjz-1, *Cc. macropsorus*; H: 42-mts-2, *Ar. gephyra*; I: 42-mts-6, *Stigmatella* sp.; J: 42-mts-1, *Cystobacter* sp.; K: 42-10-2, *Cystobacter* sp.; L: 42-heh-5 *Chondromyces* sp. .

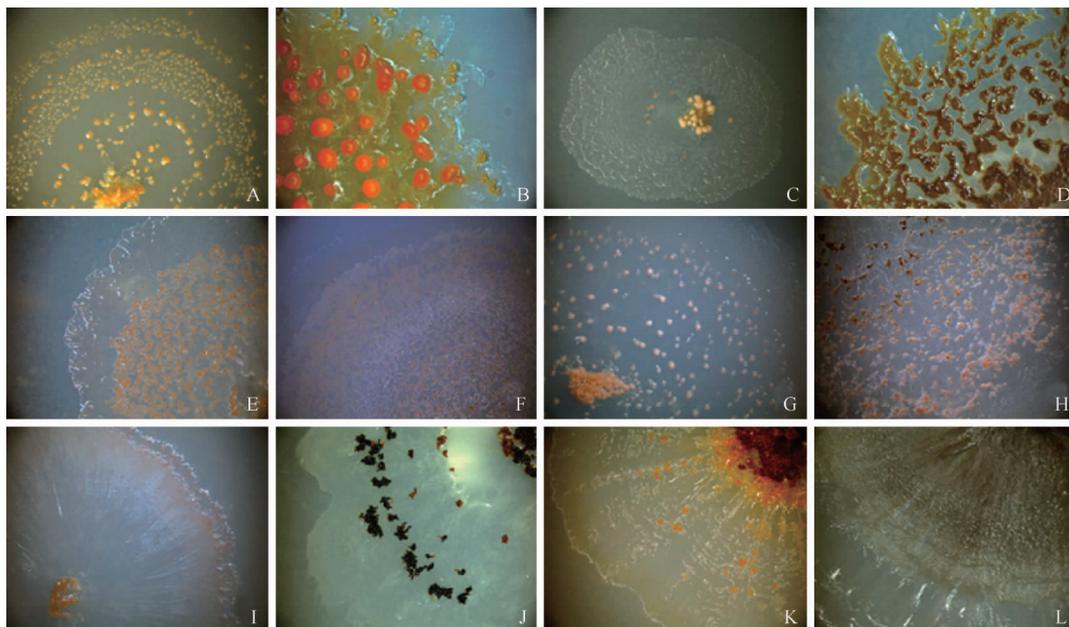


图 2. 部分粘细菌菌落照片

Figure 2. Morphological characteristics of colony of some myxobacteria strains. A: 42-jj-2, *Mx. xanthus*; B: 42-10-3-5 *Mx. fulvus*; C: 42-4-1, *Mx. stipitatus*; D: 42-10-3, *Py. fallax*; E: 42-10-4, *Cc. exiguous*; F: 42-10-6, *Cc. coralloides*; G: 42-sjz-1, *Cc. macropsorus*; H: 42-mts-2, *Ar. gephyra*; I: 42-mts-6, *Stigmatella* sp.; J: e-mts-3, *Cystobacter* sp.; K: e-mts-2, *Cystobacter* sp.; L: 42-cy-1, *Cystobacter* sp. .

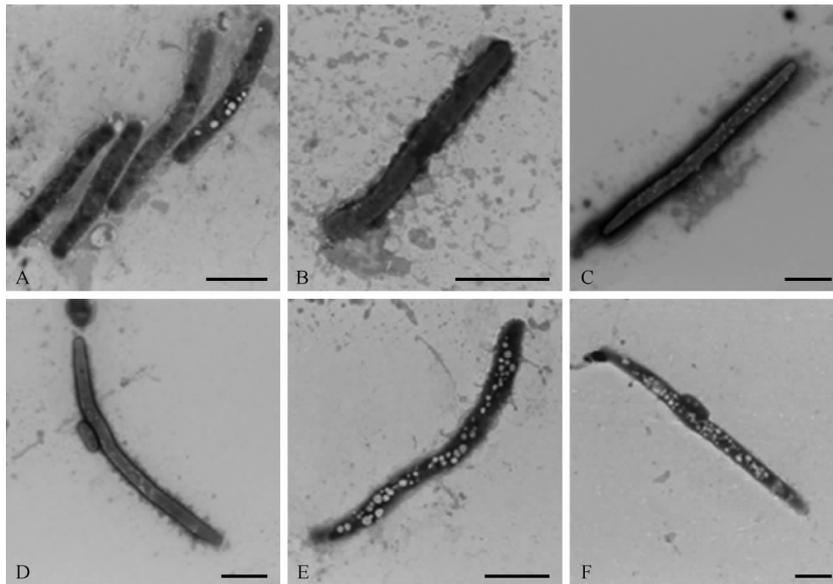


图 3. 部分粘细菌营养细胞的透射电镜观察(bar = 2. 0 μm)

Figure 3. Transmission electricity microscope observation of vegetative cells of some myxobacteria strains(bar = 2. 0 μm) . A: 42-jj-2 , *Mx. xanthus*; B: 42-10-3 , *Py. fallax*; C: 42-10-1-1 , *Ar. gephyra*; D: 42-mts-2 , *Ar. gephyra*; E: e-mts-2 , *Cystobacter* sp. ; F: e-mts-3 , *Cystobacter* sp. .

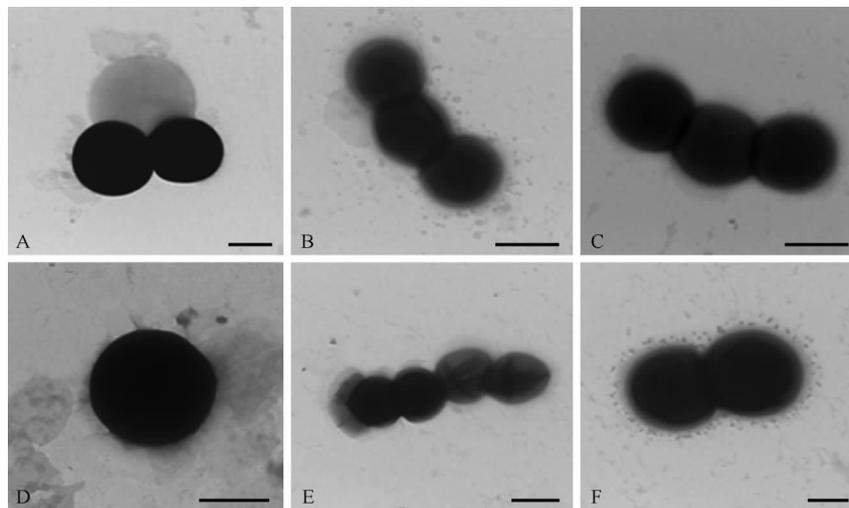


图 4. 部分粘细菌粘孢子的透射电镜观察(bar = 1. 0 μm)

Figure 4. Transmission electricity microscope observation of myxospore of some myxobacteria strains(bar = 1. 0 μm) . A: 42-jj-2 , *Mx. xanthus*; B: 42-1mz-1 , *Mx. fulvus*; C: 42-4-1 , *Mx. stipitatus*; D: 42-10-3 , *Py. fallax*; E: 42-10-1-1 *Ar. gephyra*; F: 42-1mz-2 , *Cc. macropsorus*.

2.3 药用植物根系土壤粘细菌的分子鉴定

将分离得到的其中 36 株粘细菌的 16S rDNA 基因序列与 EzTaxon 数据库中的已知序列进行 Blast 比对, 确定与实验菌株亲缘关系最近的种属。从数据库中获得与其相似性最高且有效发表的典型菌株的 16S rDNA 基因序列, 用 Clustal X 软件进行序列相似性分析和序列比对, 使用 Mega4.1 的

Neighbor-joinig 法构建系统进化树(图 5)。系统进化树表明, 这 36 株粘细菌可以分为 4 大分枝。第一分支是粘球菌属、珊瑚球菌属中的大孢珊瑚球菌和匣状球菌属; 第二分支是珊瑚球菌属; 第三分支是标桩菌属; 第四分支是原囊菌属和孢囊杆菌属。在第一分支中, 由于大孢珊瑚球菌在分类地位上最初是属于粘球菌属, 因而在系统进化树中不能与粘球菌

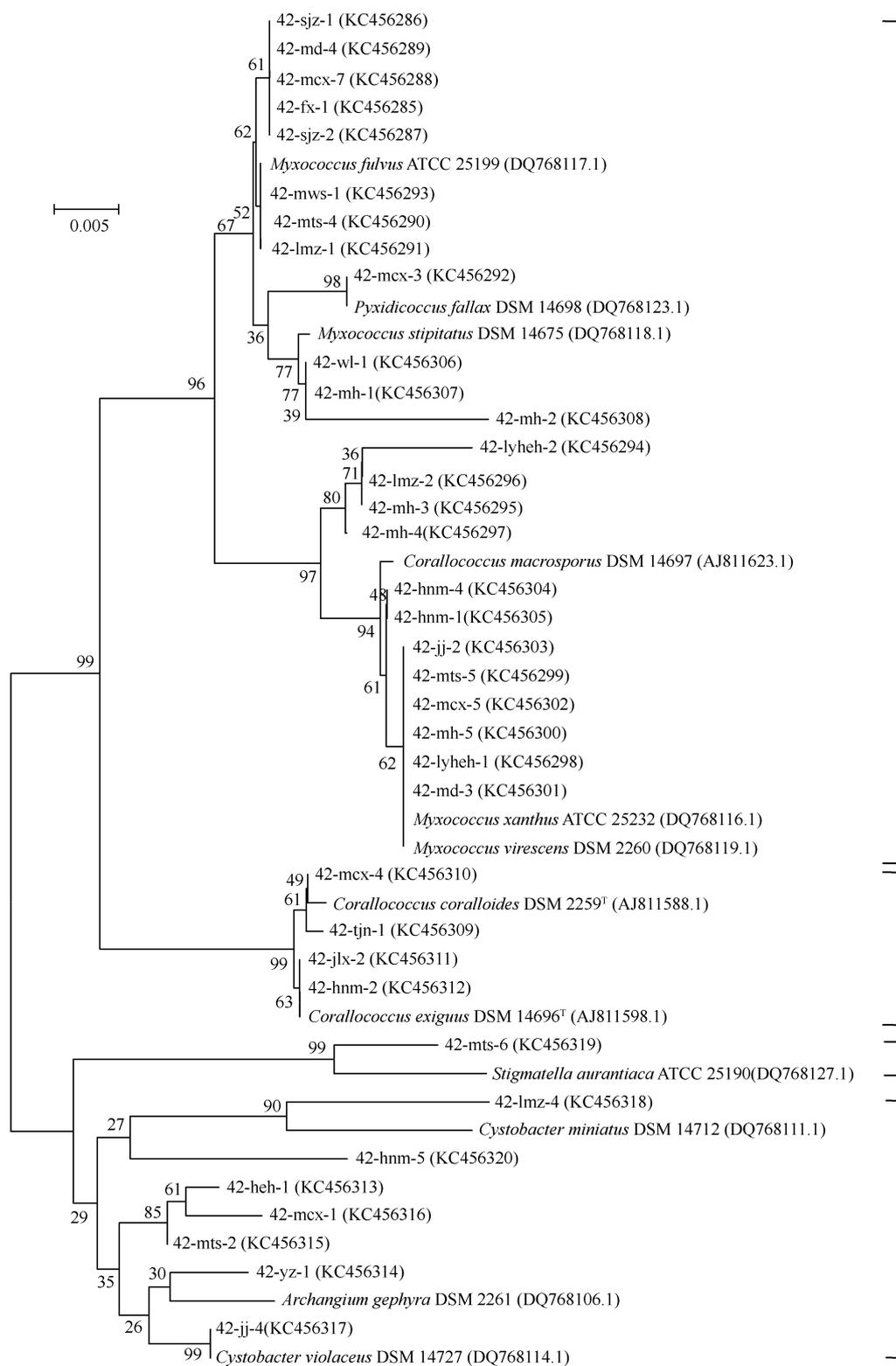


图 5.36 株粘细菌及参考菌株以 16S rDNA 基因序列为基础的系统发育树

Figure 5. Phylogenetic tree of 36 myxobacteria strains and reference strain based on 16S rDNA gene order. The numbers at the nodes indicate the bootstrap values based on neighbor-joining analyses of 1000 sample date sets. The scale bar represents the estimated number of base changes per nucleotide sequence position. The numbers in parentheses are accession numbers of sequences.

属区分开。第四分支中,原囊菌属和孢囊杆菌属在系统进化树中不能分开,形成一个分支。结果表明16S rDNA对粘细菌的个别种属的区分度不高,因此需在16S rDNA测序的基础上结合形态分类来对粘细菌进行鉴定。

2.4 药用植物根系土壤粘细菌多样性与环境因子的相关性分析

华南植物园和南岭国家森林公园,植被丰富多样,保留了较好的自然生态环境,气候温和,为微生物提供了良好的生存环境,适合粘细菌的生长,因此粘细菌种类较为丰富。在22个土壤样品中共分离

得到粘球菌属、珊瑚球菌属、匣状球菌属、孢囊杆菌属、原囊菌属、标桩菌属、软骨霉状菌属7个属的菌株。其中,在华南植物园的4个土样中还分离到了较为罕见的软骨霉状菌属,它们的子实体鲜艳且结构复杂,能在初始子实体上连续形成新的子实体(图6)。该属一般存在于树皮和腐木中^[28],较少存在于土壤中,但本次实验中却在华南植物园的多个土样中分离得到,证明其在华南植物园的土壤中普遍存在。可能由于粘细菌喜好的营养基质会因不同的土壤状况和气候条件而改变,因而粘细菌分布环境具有多样性。

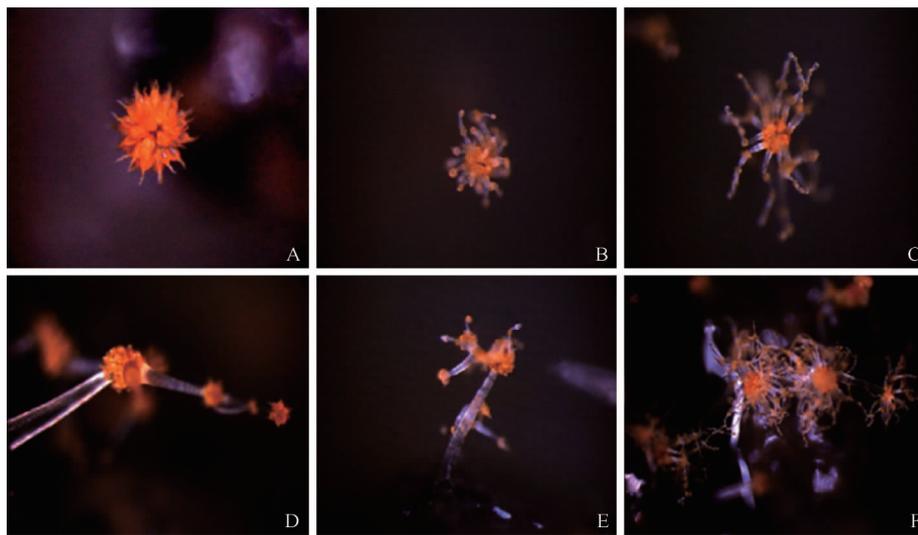


图6. 软骨霉状菌属(*Chondromyces*)子实体形态

Figure 6. Morphological characteristics of *Chondromyces* sp. Strains. A, B, C, D, E, F, G: 42-heh-5, *Chondromyces* sp. .

通过进一步分析土壤pH与粘细菌多样性的关系(表3),发现在接近中性的土壤中,粘细菌的种类比酸性土壤中的丰富,数量也较多,研究结果与前人的研究类似^[15]。在pH较低的土壤中,仍有粘细菌

存在,说明粘细菌对低pH环境有一定的耐受性;其中粘球菌属和珊瑚球菌属在pH值为4.28~7.82的土样中均有分布,说明其生长受pH的影响最小,对环境的适应性最强;其次为原囊菌属和孢囊杆菌属。

表3. 不同pH值土样中粘细菌多样性

Table 3. Diversity of myxobacteria in soil samples with different pH values

Soil pH	<i>Myxococcus</i>	<i>Corallococtu</i>	<i>Pyxidicoccus</i>	<i>Archangium</i>	<i>Cystobacter</i>	<i>Stigmatella</i>	<i>Chondromyces</i>	Total
4.28 - 5.0	5	3	0	1	1	0	1	11
5.03 - 6.10	4	3	0	2	2	0	0	11
6.26 - 7.82	9	5	1	5	4	1	3	28
Total	18	11	1	8	7	1	4	50

本文统计了不同有机碳含量土样中粘细菌的分布情况(表4)。在土壤贫瘠,土壤有机碳含量(9.89~10.35g/kg)较低的土壤中,所分离得到的粘细菌种类较少,只分离得到粘球菌属和珊瑚球菌属

2个属的菌株,说明这2个属的粘细菌对环境有较强的适应性,在贫瘠和肥沃的土壤中均有分布,其分布受土壤有机碳含量的影响较小。较为肥沃的土壤中的粘细菌多样性比贫瘠土壤中的丰富,表明粘细

菌更偏好于有机质丰富的环境。

表 4. 不同有机碳含量(TOC) 土样中粘细菌多样性

Table 4. Diversity of myxobacteria in soil samples with different Total Organic Carbon values

Soil TOC(g/kg)	<i>Myxococcus</i>	<i>Corallococcu</i>	<i>Pyxidicoccus</i>	<i>Archangium</i>	<i>Cystobacter</i>	<i>Stigmatella</i>	<i>Chondromyces</i>	Total
9.89 - 10.0	2	1	0	0	0	0	0	3
10.35 - 20.0	1	0	0	0	0	0	0	1
24.30 - 30.0	4	2	0	1	2	0	1	10
36.50 - 40.0	0	0	0	0	1	0	0	1
40.43 - 50.0	6	4	1	4	3	1	2	21
60.47 - 70.0	2	2	0	1	1	0	0	6
74.53 - 80.0	1	2	0	1	0	0	0	4
94.63 - 100.0	2	0	0	1	0	0	1	4
Total	18	11	1	8	7	1	4	50

对分离得到的粘细菌数据进行典型对应分析 (CCA), 如图 7 所示。在此二维排序图 (Biplot) 中, 样方、样本与环境因子在同一个图上反映出来, 可以直观地看出粘细菌分布与环境变量之间的关系。样方和样本分别用圆圈和三角形表示, 而环境因子用箭头表示。箭头所处象限表示环境因子与排序轴间的正负相关性, 箭头连线长度代表该环境因子与样本分布相关程度的大小, 而箭头连线间的夹角代表环境因子间相关性大小^[29-30]。土样中粘细菌多样性与 pH、土壤总有机碳相关联。其中 pH 与第三排序轴正相关, 其中变绿粘球菌 (*Mx. virescens*)、珊瑚状珊瑚球菌 (*Cc. coralloides*)、标桩菌属和匣状球菌属与土壤 pH 呈正相关, 表明其偏好 pH 呈中性或偏碱性的土壤基质; 而叶柄粘球菌 (*Mx. stipitatus*) 则对酸性土壤有很好的耐受性。总有机碳与第四排序轴正相关, 其中软骨霉状菌属、弱小珊瑚球菌 (*Cc. exiguus*)、过渡原囊菌 (*Ar. gephyra*) 与总有机碳含量呈正相关, 表明其偏好肥沃的土壤环境; 而黄色粘球菌 (*Mx. xanthus*)、橙色粘球菌 (*Mx. fulvus*)、大孢珊瑚球菌 (*Cc. macrosporus*)、孢囊杆菌属对土壤总有机质含量要求不高, 在较为贫瘠的土壤中仍分布广泛。并且从箭头连线长度可以看出 pH 和总有机碳与粘细菌分布有着较大的相关性。可见, 药用植物根系土壤可培养粘细菌多样性与环境因子是有一定相关性的。

3 讨论

用辅助菌诱导法对广东地区 22 份药用植物根系土壤进行可培养粘细菌的分离诱导, 分离到 7 个

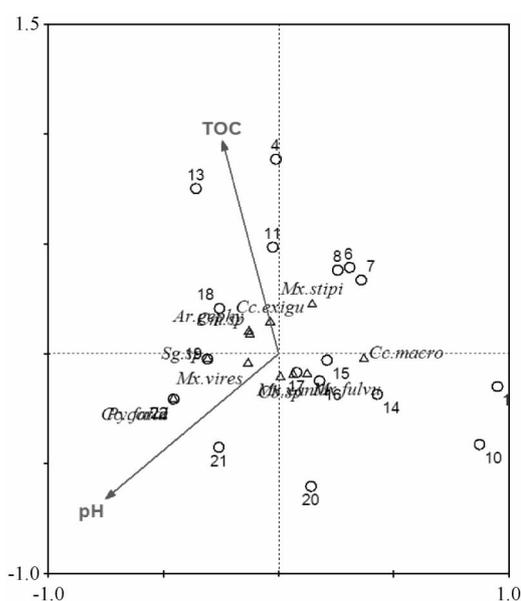


图 7. 药用植物根系土壤可培养粘细菌多样性与环境因子的典型对应性分析图

Figure 7. Canonical correspondence analysis ordination biplots of the variety of the culturable Myxobacteria isolation from the rhizosphere soils of medicinal plants and environmental variables.

属共 50 株菌株。初步鉴定为: 粘球菌属 18 株, 珊瑚球菌属 11 株, 孢囊杆菌属 7 株, 原囊菌属 8 株, 标桩菌属 1 株, 软骨霉状菌属 4 株, 匣状球菌属 1 株。从分离结果看来, 华南植物园和南岭国家森林公园药用植物根系土壤的粘细菌均有一定的多样性。其植被丰富多样, 受到人为活动影响较小, 生态环境保持较好, 微生物多样性丰富, 为粘细菌提供良好的食物基础和生存环境。

实验中采集的华南植物园和南岭国家森林公园药用植物根系土壤 pH 在 4.29 - 7.82 之间, 从实验

结果看来,粘细菌在酸性土壤中仍有分布,但数量和种类均较少,且多为粘球菌属和珊瑚球菌属,可见粘球菌属和珊瑚球菌属的菌株对不同 pH 的适应性较强;而在接近中性的土壤中,粘细菌的数量较多,且种类丰富,粘细菌更适宜在中性或接近中性的环境中生长。样品中总有机碳在 9.89 - 97.25 g/kg 之间,粘细菌在不同的有机质含量中均有分布;在有机碳含量较高的土壤样品中,粘细菌的数量较多,种类也较有机碳含量低的土壤丰富,粘细菌更偏好于有机质丰富的环境。从分离得到的粘细菌数据和环境因子进行典型对应分析(CCA),从二维排序图可以看出药用植物根系土壤可培养粘细菌多样性与环境因子有一定相关性。

本实验分离得到的粘细菌除了软骨霉状菌属属于堆囊菌亚目(Polyangineae)以外,其他粘细菌菌株均属孢囊杆菌亚目(Cystobacterineae)。软骨霉状菌属在土壤中较为罕见,多存在于腐木或新鲜树皮中,而其在华南植物园的土壤中广泛分布;虽然不同种属的粘细菌对特定的营养基质有所偏好,但是可能受到环境、气候等因素的影响,粘细菌的分布环境具有多样性。目前分离到的粘细菌大多属于孢囊杆菌亚目(Cystobacterineae),而侏囊杆菌亚目(Nannocystineae)和堆囊杆菌亚目(Polyangineae)中的很多菌株仍处于未培养状态^[31]。近年来 Müller 等^[10-11, 32]通过改进分离方法获得了若干粘细菌新类群。李越中等^[16, 31]通过非培养方法在不同生境发现粘细菌巨大的多样性。今后,应将多种方法运用到药用植物根际土壤的粘细菌分离筛选当中来,以求获得更多的粘细菌菌株,丰富粘细菌资源库。

研究者发现,特殊生境下的生物与其新颖代谢产物关系紧密^[33]。药用植物根际土壤中蕴含的大量粘细菌资源,是发掘药用活性物质和新型化合物的良好材料。本研究开拓了我们对药用植物根系土壤可培养粘细菌的认识;获得的粘细菌菌株,是一类来自新生境的微生物资源,它丰富了粘细菌药物筛选的资源库。但药用植物根系土壤这一特殊生境中的粘细菌研究目前仍处于起步阶段,还需要不断增加研究的药用植物种类,扩大采样范围和数量;在生态分布、代谢产物以及活性成分开发和利用等领域,还有大量的研究工作需要进一步开展。我们深信,随着分离和纯化技术的发展、完善以及后续的生物活性代谢产物的深入研究,药用植物特殊生境中的粘

细菌资源将会被逐步开发和利用。

参考文献

- [1] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 4(24): 403-427.
- [2] Singh B, Ghosh J, Islam NM, Dasgupta S, Kirsebom LA. Growth, cell division and sporulation in mycobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, 2010, 98: 165-177.
- [3] Sliusarenko O, Chen J, George O. From Biochemistry to Morphogenesis in Myxobacteria. *Bulletin of Mathematical Biology*, 2006, 68: 1039-1051.
- [4] Silke CW, Müller R. Myxobacteria-‘microbial factories’ for the production of bioactive secondary metabolites. *Molecular BioSystems*, 2009, 5: 567-574.
- [5] Wenzel SC, Müller R. The biosynthetic potential of myxobacteria and their impact on drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, 2009, 12(2): 220-230.
- [6] Schmitz A, Felder S, Höver T, Kehraus S, Neu E, Lohr F, König GM, Schäberle TF. Antibiotics from gliding bacteria. *Phytochemistry Reviews*, 2012, DOI 10.1007/s11101-012-9224-x.
- [7] Reichenbach H, Höfle G. Discovery and development of the epothilones—a novel class of antineoplastic drugs. *Drugs in R&D*, 2008, 9(1): 1-10.
- [8] Diez J, Martinez JP, Mestres J, Sasse F, Frank R, Meyerhans A. Myxobacteria: natural pharmaceutical factories. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 52.
- [9] Reichenbach H. The Myxococcales. In: Garrity G M. *Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology*, Part 3: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilon-proteobacteria. (2nd Eds). New York: Springer-Verlag, 2005, 1059-1143.
- [10] Garcia RO, Reichenbach H, Ring MW, Müller R. *Phaselicystis flava* gen. nov., sp. nov., an arachidonic acid-containing soil myxobacterium, and the description of Phaselicystidaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2009, 59: 1524-1530.
- [11] Mohr KI, Garcia RO, Gerth K, Irschik H, Müller R. *Sandaracinus amylolyticus* gen. nov., sp. nov., a starch-degrading soil myxobacterium, and description of Sandaracinaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62: 1191-1198.

- [12] Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Tokura M, Hiraishi A, Yamanaka S. *Enhygromyxa salina* gen. nov., sp. nov., a slightly halophilic myxobacterium isolated from the coastal areas of Japan. *Systematic and Applied Microbiology*, 2003, 26: 189-196.
- [13] Iizuka T, Jojima Y, Fudou R, Hiraishi A, Ahn JM, Yamanaka S. *Plesiocystis pacifica* gen. nov., sp. nov., a marine myxobacterium that contains dihydrogenated menaquinone, isolated from the Pacific coasts of Japan. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53: 189-195.
- [14] Fudou R, Jojima Y, Iizuka T, Yamanaka S. *Haliangium ochraceum* gen. nov., sp. nov. and *Haliangium tepidum* sp. nov. Novel moderately halophilic myxobacteria isolated from coastal saline environments. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 2002, 48: 109-115.
- [15] Shimkets LJ, Reichenbach H, Dworkin M. The myxobacteria. *The Prokaryotes*, 2006, 7: 31-115.
- [16] Li SG, Zhou XW, Li PF, Han K, Li W, Li ZF, Wu ZH, Li YZ. The existence and diversity of myxobacteria in lake mud—a previously unexplored myxobacteria habitat. *Environmental Microbiology Reports*, 2012, 4(6): 587-595.
- [17] Zhang X, Li Z, Tan Z, Guo J, Zhu H. Isolation and identification of myxobacteria in the saline-alkaline soils of Akesu in Xinjiang. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52(2): 160-168. (in Chinese)
张鲜姣 黎志坤 谭志远 郭俊 朱红惠. 新疆阿克苏地区盐碱地粘细菌分离鉴定. *微生物学报* 2012, 52(2): 160-168.
- [18] Ding J, Xia Y. Present situation of Chinese medicinal plant resources. *Resource Development & Market*, 2005, 21(5): 453-454. (in Chinese)
丁建 夏燕莉. 中国药用植物资源现状. 资源开发与市场 2005, 21(5): 453-454.
- [19] Xu R, Xu J, Fan S. The realization of rational development and sustainable utilization of medicinal plants. *China Pharmaceuticals*, 2009, 18(6): 1-2. (in Chinese)
徐荣 陈君 陈士林. 实现药用植物资源的合理开发和可持续利用. *中国药业* 2009, 18(6): 1-2.
- [20] Zhang Q, Yang Y, Tan Z, Xie B. The progress of researches on endophytic functions in vegetations. *Biotechnology Bulletin*, 2010, 7: 28-34. (in Chinese)
张祺玲 杨宇红 谭周进 谢丙炎. 植物内生菌的功能研究进展. *生物技术通报* 2010, 7: 28-34.
- [21] Verma VC, Gond SK, Kumar A, Mishra A, Kharwar RN, Gange AC. Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss: isolation, diversity, and antimicrobial activity. *Microbial Ecology*, 2009, 57: 749-756.
- [22] Igarashi Y, Trujillo ME, Martinez-Molina E, Yanase S, Miyanaga S, Obata T, Saiki H, Fujita T, Furumai T. Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov.. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2007, 17: 3702-3705.
- [23] Yang Q, Xie Y, Zhang H, Li X. Isolation, identification and antagonism on microorganisms and cancer cells by active endophytes from *Rehmannia glutinosa* Libosch. *Microbiology China*, 2010, 37(10): 1467-1474. (in Chinese)
杨清香 谢永生 张昊 李学梅. 怀地黄活性内生菌的分离鉴定及抗菌抗肿瘤活性. *微生物学通报* 2010, 37(10): 1467-1474.
- [24] Brosius JJ, Dull TJ, Sleeter DD, Noller HF. Gene organization and primary structure of a ribosomal DNA operon from *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 1981, 148(20): 107-127.
- [25] Brunel B, Givaudan A, Lanois A, Akhurst RJ, Boemare N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA gene. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 63(2): 574-580.
- [26] 杜森 高祥照. 土壤分析技术规范. 第二版. 北京: 中国农业出版社 2006: 36-74.
- [27] Wang S, She W. The main factors of pH test to the alkaline soil. *Chinese Journal of Soil Science*, 1994, 25(6): 252-255. (in Chinese)
王慎强 余位培. 影响碱性土壤 pH 测定的主要因素. *土壤通报* 1994, 25(6): 252-255.
- [28] Dawid W. Zur Mikroflora der Hochmoore im Hohen Venn (Beigien) unter besonderer Berücksichtigung der Myxobakterien. *Telma*, 1983, 13: 161-171.
- [29] Song W, An D, Liu X, Zhu H, Zhu C. Changes in bacterial community structure of drinking water in dongjiang river valley, determined by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprint and its relationships with environment factors. *Microbiology China*, 2009, 36(9): 1311-1317. (in Chinese)
宋巍 安德荣 刘雪 朱红惠 朱昌雄. DGGE 分析东江流域农村饮用水源中微生物多样性及其与环境因子相关性. *微生物学通报* 2009, 36(9): 1311-1317.
- [30] Yan QY, Yu YH, Feng WS, Yu YZ. Plankton

- community composition in the Three Gorges Reservoir Region revealed by PCR-DGGE and its relationships with environmental factors. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(6):732-738.
- [31] Jiang DM, Wu ZH, Zhao JY, Li YZ. Fruiting and non-fruited myxobacteria: A phylogenetic perspective of cultured and uncultured members of this group. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 2007, 44:545-552.
- [32] Garcia R, Gerth K, Stadler M, Dogma IJ, Müller R. Expanded phylogeny of myxobacteria and evidence for cultivation of the 'unculturable'. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 57:878-887.
- [33] Verma VC, Kharwar RN, Strobel GA. Chemical and functional diversity of natural products from plant associated endophytic fungi. *Natural Product Communications* 2009 4(11):1511-1532.

Isolation and identification of cultivable myxobacteria in the rhizosphere soils of medicinal plants

Zhiying Zhao^{1,2}, Xianjiao Zhang¹, Zhiyuan Tan², Jun Guo¹, Honghui Zhu^{1*}

¹Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangzhou Provincial Open Laboratory of Microbial New Application Technique, State Key Laboratory of Applied Microbiology, Ministry Guangdong Province Jointly Breeding Base, Guangzhou 510070, China

²South China Agricultural University, Guangdong Provincial Key Lab of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, Guangzhou 510462, China

Abstract [Objective] We isolated myxobacteria and explored their diversity from the rhizosphere soils of some medicinal plants. [Methods] We used the helper bacteria baiting technique to isolate myxobacteria from the rhizosphere soils collected in South China Botanical Garden and Nanling National Forest Park. The myxobacteria were identified by morphological characteristics and 16S rDNA gene sequences analysis. [Results] A total of 50 strains were isolated from 22 soil samples, which were identified into 7 genera, *Myxococcus* (18), *Coralloccoccus* (11), *Cystobacter* (7), *Archangium* (8), *Stigmatella* (1), *Chondromyces* (4) and *Pyxidicoccus* (1). The dominant genera were *Myxococcus* and *Coralloccoccus*. [Conclusion] Environmental factors were associated with the diversity of myxobacteria. Myxobacteria better adapt in high organic matter content and neutral pH environments. The strains of *Myxococcus* and *Coralloccoccus* had a good adaptability for different pH. Meanwhile, the dependence of the strains of *Myxococcus* and *Cystobacter* on organic carbon content was not too obvious, and they can also be found in the poor soils. Our findings provided an important scientific base for the development and utilization of myxobacteria resources.

Keywords: medicinal plants, soil, myxobacteria, diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(31170009) and by the Open Foundation of Tarim University (BRZD1004)

* Corresponding author. Tel: +86-20-87676803; Fax: +86-20-37656629; E-mail: zhouhonghui66@yahoo.com.cn

Received: 11 January 2013/Revised: 25 March 2013