

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55 (3) :330 - 340; 4 March 2015
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140387

西洋参内生菌群落结构与多样性

刘学周, 赵智灵, 李绍宾, 张连学*, 田义新*, 孙福仁

吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要:【目的】分析了不同产地西洋参内生菌的组成、结构及其定殖部位差异,明确了吉林省西洋参内生菌的资源状况。【方法】利用组织块法进行内生菌的分离,通过16S rDNA和ITS序列分析,结合培养形态对内生菌鉴定,并对分离得到的内生菌进行生态指数分析。【结果】从西洋参根部分离到内生菌13属26种,茎部分离到10属18种,叶部分离到9属16种。芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)为西洋参内生菌中的优势属,分别占内生菌总种数的17.6%和14.7%。多样性指数显示,珲春>靖宇>抚松>集安>长白;均匀度指数显示,珲春>集安>靖宇>抚松>长白;优势度指数显示,靖宇>珲春>抚松>集安>长白。【结论】西洋参内生菌具有较丰富的遗传多样性,不同海拔高度产地西洋参内生菌种群数量、均匀度、奇异度存在差异,高海拔地区西洋参内生菌优势菌群集中,优势属突出,奇异度较高,而低海拔地区西洋参内生菌奇异度较低,但种群种类较丰富,且分布均匀。

关键词:西洋参,内生菌,分离,鉴定,多样性,群落结构

中图分类号:Q939 **文章编号:**0001-6209(2015)03-0330-11

植物内生菌是指存活于健康植物组织内部,而又不引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物类群,包括真菌、细菌和放线菌^[1-2]。在自然界的长期进化过程中,宿主与内生菌相互选择,互为条件,形成一种共生或互生的关系。其相互作用还受到环境因子的影响,环境条件和宿主基因型决定内生菌的遗传多样性^[3]。许多植物内生菌具有重要的生物学和生态学功能,如通过固氮、分泌生长素、抗病虫害来促进植物生长,或作为潜在的生防资源和外源基因载体,在农业生产中具有重要的应用潜力,这些功能都与植物内生菌复杂的群落结构有关^[4-5]。植物内生菌可产生与宿主植物相同或相似的具生物活性的代谢产物,包括萜类、生物碱、皂苷类、芳香类、

多肽类等化合物,这些物质具有多种生物学活性,如抗肿瘤,抑菌,抗氧化以及胰岛素受体激活等活性,在医学上有重要的应用价值^[6]。内生菌多样性的研究对于探索内生菌与宿主植物间的互动机制、反应宿主植物的生长状态和生存环境、开发具有超常生态和医学功能的生物资源等方面具有重要意义。

西洋参(*Panaxquql quinquefolium* L.)是一种名贵中药材,具有增强机体免疫功能,抗疲劳,抗缺氧和心肌保护等作用,主要成分是人参皂苷。不同产地西洋参药材的品质有差异,据报道,外部环境因子如产地气候土壤等可能是造成产地差异性的因素^[7]。西洋参内生菌作为构成植物内环境的重要组分,对西洋参植物生长、其次生代谢产物积累及药

基金项目:国家自然科学基金项目(31201161);吉林省教育厅科学技术研究项目(2014-61);吉林省中医药管理局中医药科技项目(2013-4)

* 通信作者。张连学, E-mail: zlxbooksea@163.com; 田义新, E-mail: y.x.tian2003@163.com

作者简介:刘学周(1978-),甘肃渭源人,博士,讲师,主要从事药用植物栽培生理生态方面的研究。E-mail:lxzhmail@163.com

收稿日期:2014-08-03; **修回日期:**2014-11-12

材品质等均具有较大的影响, 由于同一种植物生长在不同的环境, 其内生菌的多样性有所不同^[8-10]。调查和开发西洋参内生菌资源, 对西洋参种植业 (如开发生物农药和菌肥), 参地土壤改良, 西洋参内生菌次生代谢产物产品的开发都有重大实践价值。

本研究通过分离吉林省不同产地的西洋参内生菌来揭示内生菌群落结构的多态性, 以期掌握西洋参内生菌资源状况和了解内生菌群落结构与西洋参生长环境、定殖部位的关系, 为深入探讨内生菌与西

洋参间的互相作用机制和西洋参内生菌生物产品的开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物材料: 2013年7-8月, 在吉林珲春、长白、抚松、靖宇、集安采集5年生健康西洋参植株为试验材料 (表1)。均由吉林农业大学中药材学院田义新教授鉴定。

表 1. 采样地点

Table 1. Sampling site

Site	Sample growth years/years	Longitude	Latitude	Altitude/m
Hunchun (珲春)	5	East 130°30'05"	North latitude 42°51'41"	138
Changbai (长白)	5	East 126°25'29"	North latitude 41°43'22"	1086
Fusong (抚松)	5	East 127°33'20"	North latitude 42°03'09"	848
Jingyu (靖宇)	5	East 126°08'11"	North latitude 42°38'16"	384
Jian (集安)	5	East 126°17'24"	North latitude 41°15'31"	328

1.1.2 培养基: PDA (马铃薯葡萄糖培养基) 培养基, NA (牛肉膏蛋白胨培养基) 培养基, 高氏 I 号培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器: 基因组提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司); 2 × Power Tap PCR Master Mix (北京百泰克); 通用引物 (金唯智生物科技 (北京) 有限公司)。TC-XP 型 PCR 扩增仪 (杭州博日科技有限公司); BIS910 凝胶成像系统 (北京东胜创新生物科技有限公司); 超微量紫外可见分光光度计 (北京百泰克生物技术有限公司); 超净工作台 (上海博迅实业有限公司)。

1.2 组织表面消毒

将采集到的西洋参样本先在流水下冲洗, 去除表面的泥土和灰尘。室温晾干, 用灭过菌的滤纸吸干植物表面剩余的水分。选择没有破损且完整的叶片、茎和根, 切成 2 cm 见方的小片 (段、块), 在 50% 乙醇中浸泡 1 min 后置于 75% 乙醇中 1 min, 再对根使用 0.10% HgCl₂ 处理 11 min, 参茎使用 0.10% HgCl₂ 处理 7 min, 叶使用 2% 的 NaClO 处理 5 min 进行表面消毒, 然后用无菌水冲洗 3-5 次。

把处理后的组织接入牛肉膏蛋白胨培养基, 观察两周无污染后, 切去表皮, 切成 0.5 cm 见方的小块 (段、片) 接入牛肉膏蛋白胨培养基, 观察记录, 每个处理设置重复, 每个重复接入 9 块组织。组织块边缘有

菌丝生长, 证明消毒方法可用, 再进行择优选取。

1.3 内生菌的鉴定

1.3.1 内生细菌 16SrDNA 基因组提取与测序: 内生细菌基因组的提取利用 Bio Teke cat#DP2001 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 进行, 用通用引物 27f (5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 扩增细菌 16S RNA。扩增体系为 50 μL: 2 × PCR MIX 25 μL, ddH₂O 15 μL, DNA Template 5 μL, 27f 2.5 μL, 1492r 2.5 μL。PCR 扩增程序: 94°C 5 min; 94°C 40 s, 53°C 60 s, 72°C 90 s, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将 PCR 产物送上海生工进行测序。

1.3.2 内生真菌 ITS 基因组提取与测序: 内生真菌基因组提取利用 Bio Teke cat#DP2031 真菌基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 进行。用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增内生真菌 ITS 序列。扩增体系为 50 μL: 2 × PCR MIX 25 μL, ddH₂O 15 μL, DNA Template 5 μL, ITS1 2.5 μL, ITS4 2.5 μL。PCR 扩增程序: 95°C 5 min; 94°C 45 s, 52°C 45 s, 72°C 90 s, 35 个循环; 72°C 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将其产物送上海生工进行测序。

1.3.3 序列分析构建系统发育树:扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增产物测序结果在 GenBank 中进行 BLAST 分析, 然后用 DNAMAN6.0 进行序列相似性分析, 以 Neighbor-joining 方法构建系统发育树, 用 Bootstrap (1000 次重复) 进行检验。

1.4 西洋参内生菌群落结构多样性分析

将内生菌的种类作为数量测度, 引入生态学多样性测度 Shannon-Wiener (H1)^[11]、Pielou 均匀度 (J)^[11]、Simpson 优势度指数 (D)^[12] 等方法, 分析内生菌的群落结构特性。

1.4.1 Shannon-Wiener 多样性指数 (H'): $H' = - \sum_{i=1}^n P_i \ln P_i$, 式中, $P_i = N_i/N$, N_i 为处理 i 的内生菌个数, N 为该试验中总内生菌个数。

1.4.2 Pielou 均匀度指数 (J): $J = - \sum_{i=1}^n \frac{P_i \ln P_i}{\ln S}$, 式中 S 为群落中的内生菌的总种类数。

1.4.3 Simpson 优势度指数 (D): $D = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$, 式中, P_i 种内生菌占该试验中总的内生菌的个数比例。

2 结果和分析

2.1 内生菌分离鉴定结果

对得到菌株进行 16S rRNA 或 ITS 基因测序。将所得序列在 GenBank 基因库中进行同源性搜索, 然后用 DNAMAN6.0 进行序列相似性分析, 以 Neighbor-joining 方法使用 p-distance 构建系统发育树, 再根据培养特征进行鉴定。结果表明 (表 1, 图 1) 分离得到的西洋参内生菌分为 17 个属 34 种, 包括 10 个属 24 种内生细菌, 7 个属 10 种内生真菌。其中芽孢杆菌 (*Bacillus*) 最多有 6 个种, 其次是假单胞菌 (*Pseudomonas*) 有 5 个种, 土壤杆菌 (*Agrobacterium*)、肠杆菌 (*Enterobacter*)、青霉菌 (*Penicillium*) 各有 3 个种, 沙雷式菌属 (*Serratia*)、炭疽菌 (*Colletotrichum*) 各有 2 个种, 其余 10 个属均包含 1 个种。

2.2 西洋参内生菌进化分析

对分离所得菌株的基因序列用 DNAMAN6.0 进行序列相似性分析, 以 Neighbor-joining 方法使用 Kimura 2-parameter model 构建系统进化树, 用 Bootstrap (1000 次重复) 进行检验。

从内生细菌 16S rDNA 系统进化树 (图 2) 可以看出, 西洋参植株内生细菌分为两大类, 第 I 大类为革兰氏阴性菌, 第 II 大类为革兰氏阳性菌。第 I 大类也可分为两个亚类, 第 I 亚类包括 *Enterobacter*、*Serratia sp.*、*Pseudomonas*、*Luteibacter*、*Lysobacter* 其特点是均属于 γ -变形菌纲细菌; 第 II 亚类包括 *Agrobacterium* 其特点是均属于 α -变形菌纲细菌; 第 II 大类也可分为两个亚类, 第 I 亚类包括 *Microbacterium* 和 *Streptomyces*, 其共同特点是都不产芽孢, 不抗酸, 第 II 亚类包括 *Sporosarcina* 和 *Bacillus*, 其共同特点是都产芽孢。从内生真菌 ITS 系统进化树 (图 3) 可以看出, 西洋参内生真菌的亲缘关系较远, 各层次进化距离不同, 分支复杂。

2.3 西洋参内生菌在各定殖部位的分布

西洋参内生菌在各定殖部位的分布情况统计结果见表 3, 西洋参的根部、茎部和叶部分离到的内生菌分别为 13 属 26 种、10 属 18 种和 9 属 16 种。

以分离到的 34 菌株为样本, 以各菌株在各部位出现与否为指标, 用 IBM SPSS Statistics 19 以 word 法对数据进行系统聚类分析, 结果见表 3、图 4。当 Euclidean 为 14.5 时, 可将 34 株内生菌分为 8 个类群。

类群 I 包括 4 个菌种, 分别是 *Streptomyces laceyi*、*Acremonium alternatum*、*Agrobacterium tumefaciens* 和 *Bacillus pumilus*, 它们的共同特征是均分离自抚松西洋参样本的叶片。

类群 II 包括 6 个菌种, 分别是 *Luteibacter rhizovicinus*、*Pseudomonas geniculata*、*Serratia liquefaciens*、*Agrobacterium radiobacter*、*Bacillus amyloliquefaciens* 和 *Penicillium citreonigrum*, 仅存在于长白西洋参样本的根部。

类群 III 包括 4 个菌种, 分别是 *Pseudomonas oryzihabitans*、*Bacillus subtilis*、*Aphanoascus terreus* 和 *Colletotrichum panacicola*, 其共同特征是在琿春西洋参样本的叶片中均有存在。

类群 IV 包括 5 个菌种, *Pseudomonas veronii*、*Pseudomonas fluorescens*、*Alternaria brassicicola*、*Penicillium daleae* 和 *Bacillus tequilensis*, 共同特征是均存在于靖宇西洋参样本的茎部。

类群 V 包括 3 个菌种, 其中有 *Bacillus methylotrophicus*、*Enterobacter cloacae* 和 *Sporosarcina globispora* syn., 在抚松西洋参样本的根部均存在。

类群 VI 包括 2 个菌种, 分别是 *Enterobacter hormaechei* 和 *Serratia plymuthica*, 均存在于珲春西洋参样本根部、集安西洋参样本根部和茎部。

类群 VII 包括 5 个菌种, 分别是 *Bacillus vallismortis*、*Enterobacter ludwigii*、*Agrobacterium rhizogenes*、*Cladosporium cladosporioides* 和 *Penicillium*

dipodomycicola, 在珲春西洋参样本的根部均存在。

类群 VIII 包括 5 个菌种, 分别是 *Microbacterium arborescens*、*Lysobacter antibioticus*、*Pseudomonas hibiscicola*、*Llyonectria radicolica* 和 *Colletotrichum coccodes*, 在靖宇西洋参样本的根部均存在。

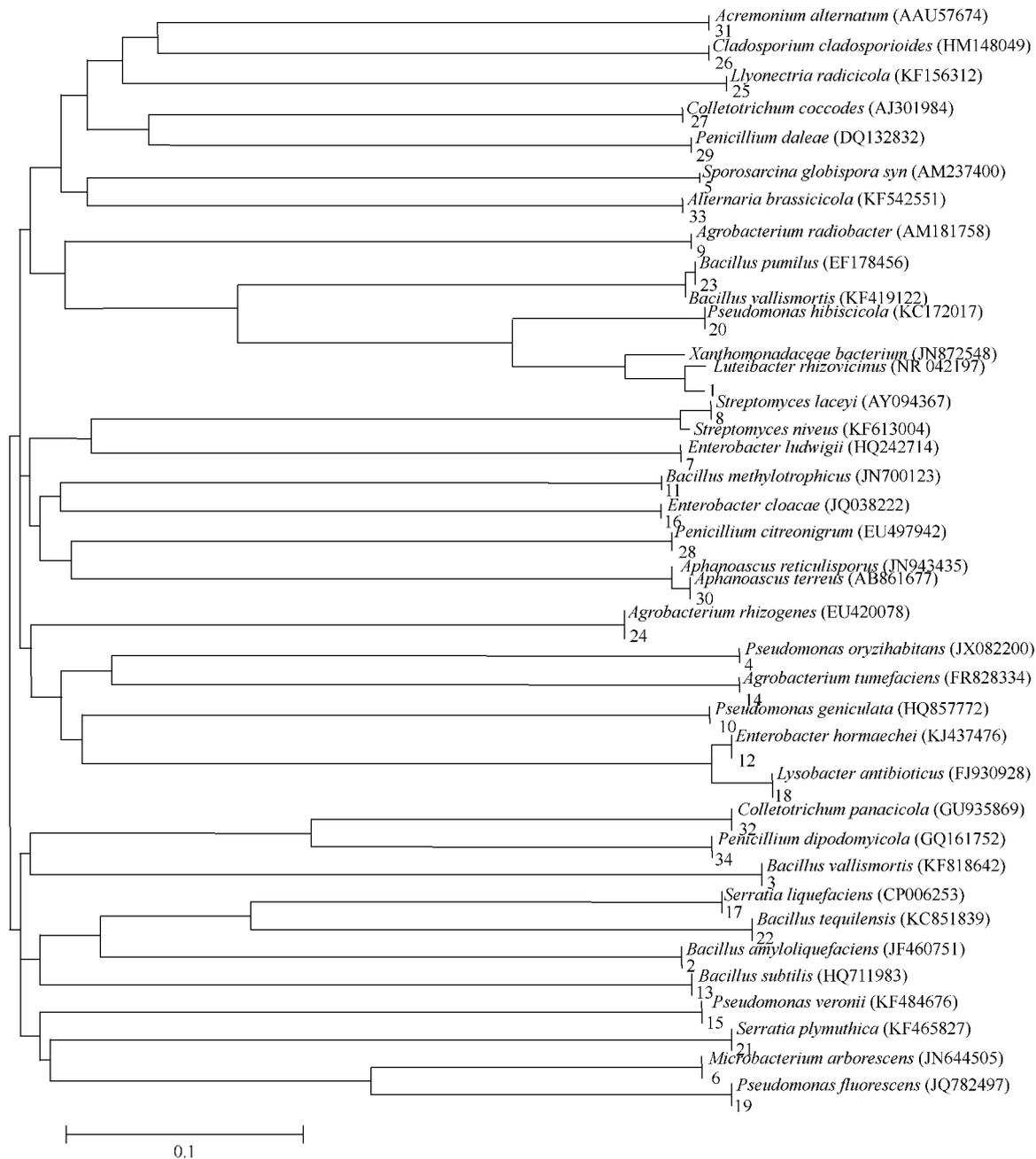


图 1. 西洋参内生菌系统进化树

Figure 1. Phylogenetic tree of endophytes in American ginseng. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap, the '1,2...34' on the right of the figure are the numbers of isolated microorganisms. Bar, 10% sequence divergence.

表 2. 西洋参内生菌分离鉴定结果

Table 2. Isolation and identification result of endophytes in American ginseng

Number	Category	Species	Similarity/ %	Pattern of bacteria number
1	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99	JF460751
		<i>Bacillus vallismortis</i>	99	KF818642
		<i>Bacillus methylophilicus</i>	99	JN700123
		<i>Bacillus subtilis</i>	99	HQ711983
		<i>Bacillus tequilensis</i>	99	KC851839
		<i>Bacillus pumilus</i>	99	EF178456
		<i>Pseudomonas oryzae</i>	99	JX082200
2	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas geniculata</i>	99	HQ857772
		<i>Pseudomonas veronii</i>	99	KF484676
		<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	JQ782497
		<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	99	KC172017
3	<i>Agrobacterium</i>	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	99	AM181758
		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99	FR828334
		<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	99	EU420078
4	<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	99	JQ038222
		<i>Enterobacter ludwigii</i>	99	HQ242714
5	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	99	KJ437476
		<i>Serratia liquefaciens</i>	99	CP006253
		<i>Serratia plymuthica</i>	99	KF465827
6	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium daleae</i>	98	DQ132832
		<i>Penicillium dipodomycicola</i>	98	GQ161752
7	<i>Cladosporium</i>	<i>Penicillium citreonigrum</i>	98	EU497942
		<i>Cladosporium cladosporioides</i>	98	HM148049
8	<i>Luteibacter</i>	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	99	NR042197
9	<i>Sporosarcina</i>	<i>Sporosarcina globispora</i> syn	99	AM237400
10	<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium arborescens</i>	99	JN644505
11	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces laceyi</i>	99	AY094367
12	<i>Lysobacter</i>	<i>Lysobacter antibioticus</i>	99	FJ930928
13	<i>Colletotrichum</i>	<i>Colletotrichum coccodes</i>	95	AJ301984
		<i>Colletotrichum panacicola</i>	97	GU935869
14	<i>Aphanoascus</i>	<i>Aphanoascus terreus</i>	97	AB861677
15	<i>Llyonectria</i>	<i>Llyonectria radicolica</i>	98	KF156312
16	<i>Acremonium</i>	<i>Acremonium alternatum</i>	98	AAU57674
17	<i>Alternaria</i>	<i>Alternaria brassicicola</i>	98	KF542551

2.4 西洋参内生菌在不同产地的分布

不同产地西洋参植株内生菌的种类见表 4。不同产地的西洋参植株内生菌的种类有所差异。分离得到的 17 属 34 种内生菌中,从珲春西洋参植株分离到 9 属 17 种,从长白西洋参植株分离到 7 属 13 种,从抚松西洋参植株分离到 9 属 14 种,从靖宇西洋参植株分离到 10 属 17 种,从集安西洋参植株分离到 6 属 9 种。结果显示,芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*) 在 5 个不同采样地西洋参中均有发现,为西洋参内生菌中的优势属,其所包括的种数分别占内生菌总种数的 17.6% 和 14.7%;青霉属(*Penicillium*) 是真菌中占内生菌总种数比例最高的属,其所包括的种数所占比例为 8.8%;其余

Aphanoascus 仅存在于靖宇西洋参样本中,*Alternaria* 仅存在于长白西洋参样本中,*Acremonium* 仅存在于抚松西洋参样本中,*Llyonectria*、*Lysobacter*、*Microbacterium* 仅存在于靖宇西洋参样本中。

对不同产地分离出的内生菌种群进行分析可知(表 4),珲春、长白和抚松以芽孢杆菌属(*Bacillus*) 为优势属,其所包括的种数分别占该地内生菌总种数的 23.5%、38.4% 和 28.6%,靖宇以假单胞菌属(*Pseudomonas*) 为优势属,占该地内生菌总种数的 23.5%,集安以芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*) 和沙雷氏菌属(*Serratia*) 为优势属,均占该地内生菌总种数的 22.2%。

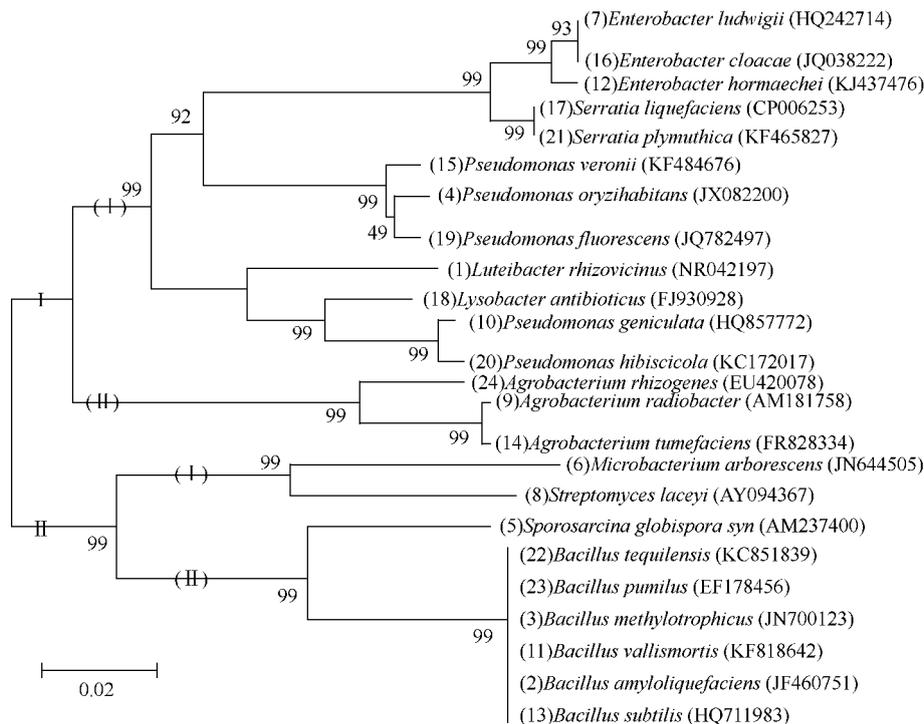


图 2. 西洋参内生细菌 16S rDNA 系统进化树

Figure 2. 16S rDNA phylogenetic tree of endophytic bacteria in American ginseng. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The Arabic numerals '(1), (2), ... (24)' in the brackets are the numbers of bacterial strains, and others after those are the specific names Bar, 2% sequence divergence.

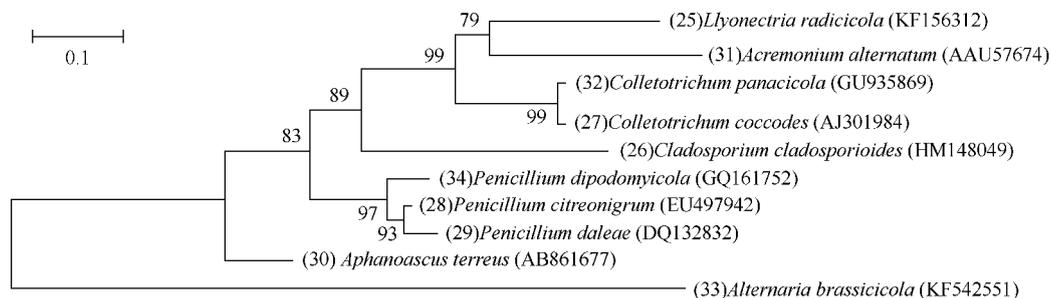


图 3. 西洋参内生真菌 ITS 系统进化树

Figure 3. ITS phylogenetic tree of endophytic fungi in American ginseng. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. The Arabic numerals '(25), (26), ... (34)' in the brackets are the numbers of bacterial strains, and others after those are the specific names Bar, 2% sequence divergence.

植物内生菌的分布与群落结构不仅与植物的种类、基因型有关,还与植物的生长阶段、环境条件有关,存在复杂的多样性。一般来说,生物多样性是衡量生态系统稳定和健康的—个重要指标^[13],适宜的生长环境,其多样性高,优势度低,均匀度高。对不同产地西洋参内生菌的生态指数分析可知(表4),多样性指数显示,珲春>靖宇>抚松>集安>长白;

均匀度指数显示,珲春>集安>靖宇>抚松>长白;优势度指数显示,靖宇>珲春>抚松>集安>长白。说明5个产地西洋参内生菌的优势种群数量存在差异,长白产地的西洋参内生菌优势菌群集中,优势属突出,奇异度较高;珲春产地的西洋参内生菌种群丰富度最高,而且分布较均匀,奇异度较低。

表 3. 西洋参内生菌在各定殖部位的分布情况统计

Table 3. Distribution of endophytes in American ginseng at the colonization parts

Number	Species	Hunchun (珲春)			Changbai (长白)			Fusong (抚松)			Jingyu (靖宇)			Jian (集安)		
		Root	Stem	Leaf	Root	Stem	Leaf	Root	Stem	Leaf	Root	Stem	Leaf	Root	Stem	Leaf
1	<i>Luteibacter rhizovicinus</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
2	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	<i>Bacillus vallismortis</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
5	<i>Sporosarcina globispora</i> syn.	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	<i>Microbacterium arborescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
7	<i>Enterobacter ludwigii</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
8	<i>Streptomyces laceyi</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
9	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	<i>Pseudomonas geniculata</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	<i>Bacillus methylophilus</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
12	<i>Enterobacter hormaechei</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
13	<i>Bacillus subtilis</i>	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
15	<i>Pseudomonas veronii</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
16	<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
17	<i>Serratia liquefaciens</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
18	<i>Lysobacter antibioticus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
19	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
20	<i>Pseudomonas hibiscicola</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0
21	<i>Serratia plymuthica</i>	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
22	<i>Bacillus tequilensis</i>	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1
23	<i>Bacillus pumilus</i>	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0
24	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
25	<i>Llyonectria radicola</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
26	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
27	<i>Colletotrichum coccodes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
28	<i>Penicillium citreonigrum</i>	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
29	<i>Penicillium daleae</i>	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0
30	<i>Aphanoascus terreus</i>	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	<i>Acremonium alternatum</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
32	<i>Colletotrichum panacicola</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	<i>Alternaria brassicicola</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
34	<i>Penicillium dipodomycicola</i>	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0

'1' stands for existence '0' stands for non-existence.

不同产地西洋参植株内生菌的种类见表 4。不同产地的西洋参植株内生菌的种类有所差异。分离得到的 17 属 34 种内生菌中,从珲春西洋参植株分离到 9 属 17 种,从长白西洋参植株分离到 7 属 13 种,从抚松西洋参植株分离到 9 属 14 种,从靖宇西洋参植株分离到 10 属 17 种,从集安西洋参植株分离到 6 属 9 种。结果显示,芽孢杆菌属(*Bacillus*)和假单胞菌属(*Pseudomonas*)在 5 个不同采样地西洋

参中均有发现,为西洋参内生菌中的优势属,其所包括的种数分别占内生菌总种数的 17.6% 和 14.7%;青霉属(*Penicillium*)是真菌中占内生菌总种数比例最高的属,其所包括的种数所占比例为 8.8%;其余 *Aphanoascus* 仅存在于靖宇西洋参样本中, *Alternaria* 仅存在于长白西洋参样本中, *Acremonium* 仅存在于抚松西洋参样本中, *Llyonectria*、*Lysobacter*、*Microbacterium* 仅存在于靖宇西洋参样本中。

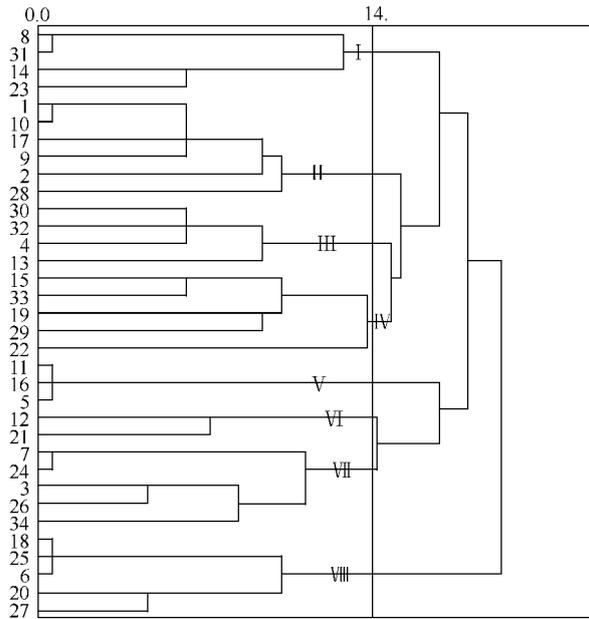


图 4. 西洋参不同产地、定殖部位内生菌聚类分析

Figure 4. Clustering analysis of endophytes in American ginseng of different producing area and the colonization parts. The ‘1,2...34’ on the left of the figure are the numbers of bacterial and fungal strains, while the ‘I, II, ...VIII’ are the numbers of class group.

对不同产地分离出的内生菌种群进行分析可知(表 4), 珲春、长白和抚松以芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 为优势属, 其所包括的种数分别占该地内生菌总种数的 23.5%、38.4% 和 28.6%, 靖宇以假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 为优势属, 占该地内生菌总种数的 23.5%, 集安以芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和沙雷氏菌属 (*Serratia*) 为优势属, 均占该地内生菌总种数的 22.2%。

植物内生菌的分布与群落结构不仅与植物的种类、基因型有关, 还与植物的生长阶段、环境条件有关, 存在复杂的多样性。一般来说, 生物多样性是衡量生态系统稳定和健康的—个重要指标^[13], 适宜的生长环境, 其多样性高, 优势度低, 均匀度高。对不同产地西洋参内生菌的生态指数分析可知(表 4), 多样性指数显示, 珲春 > 靖宇 > 抚松 > 集安 > 长白; 均匀度指数显示, 珲春 > 集安 > 靖宇 > 抚松 > 长白; 优势度指数显示, 靖宇 > 珲春 > 抚松 > 集安 > 长白。说明 5 个产地西洋参内生菌的优势种群数量存在差异, 长白产地的西洋参内生菌优势菌群集中, 优势属突出, 奇异度较高; 珲春产地的西洋参内生菌种群丰富度最高, 而且分布较均匀, 奇异度较低。

表 4. 不同产地西洋参内生菌种类及其生态指数

Table 4. Types and ecological index of endophyte in American ginseng of different producing area

Number	Generic name	Hunchun (珲春)	Changbai (长白)	Fusong (抚松)	Jingyu (靖宇)	Jian (集安)
1	<i>Bacillus</i>	4	5	4	3	2
2	<i>Pseudomonas</i>	2	3	1	4	2
3	<i>Agrobacterium</i>	2	1	1	0	1
4	<i>Enterobacter</i>	2	0	1	0	1
5	<i>Serratia</i>	1	1	0	2	2
6	<i>Penicillium</i>	3	1	3	2	0
7	<i>Cladosporium</i>	1	0	1	0	0
8	<i>Luteibacter</i>	0	1	0	1	0
9	<i>Sporosarcina</i>	0	0	1	0	0
10	<i>Microbacterium</i>	0	0	0	1	0
11	<i>Streptomyces</i>	0	0	1	0	0
12	<i>Lysobacter</i>	0	0	0	1	0
13	<i>Colletotrichum</i>	1	0	0	1	1
14	<i>Aphanoascus</i>	1	0	0	0	0
15	<i>Llyonectria</i>	0	0	0	1	0
16	<i>Acremonium</i>	0	0	1	0	0
17	<i>Alternaria</i>	0	1	0	1	0
	Category	9	7	9	10	6
	Species	17	13	14	17	9
	Diversity index	2.0685	1.6924	1.8191	1.9834	1.7351
	Evenness index	0.7838	0.6598	0.7320	0.7324	0.7536
	Dominance index	0.8581	0.7692	0.8367	0.8651	0.8148

3 讨论和结论

本研究共得到 17 属 34 种内生菌。其中以假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 为世界上普遍存在的内生菌类群,广泛存在于土壤及植物组织中^[14],在茄子^[15]、韭菜^[16]中均有发现。有文献报道,芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 中的枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 能够产生对植物病原菌有良好抗性的脂肽类抗生素和硫醚(羊毛脂)类抗生素等^[17],在病虫害的生物防治研究过程中受到很大关注。荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 产生的藤黄绿脓菌素、2,4-二乙酰基藤黄酚、硝吡咯菌素、吩嗪-1-羧酸等可抑制多种病原物^[18],在农作物土传病害的生物防治研究中具有重要意义。从芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 分离得到的化合物主要有大环内酯类和肽类,大多数次生代谢产物均表现出很强的抗菌、抗病毒和抗肿瘤等生物活性^[19],而且芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、青霉菌属 (*Penicillium*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*) 是产生医用抗生素的 3 个主要来源,在医学上有重要的作用。对于西洋参内生菌次生代谢产物资源,目前远未得到充分开发,本研究对西洋参内生菌次生代谢产物的分析和产品开发将在下一步工作中开展。

西洋参内生细菌可以分为 2 个大类 4 个亚类,而内生真菌亲缘关系较远,各层次进化距离不同,分支复杂。说明西洋参内生菌菌群结构复杂多变,具有较丰富的遗传多样性。根据产地、定殖部位不同,可将 34 个菌种分为 8 个类群。从西洋参定殖部位内生菌种类结构特性来看,西洋参各定殖部位内生菌种类存在较大的差异,总体来说,根部分离到的内生菌种类最多,其次是茎部,叶部分离到的种类最少。这与前人的研究结论一致^[20]。

对内生菌多样性、群落结构以及分布的影响因素,有研究认为内生菌主要来源于土壤,由土壤微生物入侵后和宿主协同进化而来,内生菌组成和数量可能与产地土壤微生物及植物根际微生物的种群结构与数量有关^[13]。也有研究认为可能是因为地区气候特征及周围植被的不同,造成大气中的微生物组成、根际土壤微生物种类分布等的差异影响^[21-24]。植物生长的生态环境不同,内生菌种群结构和分布必然会存在一定的差异^[2]。本研究中,不同海拔高度产地西洋参内生菌种群数量、均匀度、奇

异度存在显著差异,长白产地为高海拔地区,其产地西洋参内生菌优势菌群集中,优势属突出,奇异度较高,即长白产地的西洋参内生菌集中到芽孢杆菌等一些优势属当中,菌属较单一,而且有如 *Luteibacter* 等在其他产区西洋参中并未发现的特异属的存在。而珲春作为低海拔地区,其产地西洋参内生菌奇异度较低,但种群种类较丰富,且分布均匀,即珲春产地的西洋参内生菌种类较多,各个菌属分布比较均匀,并且很少有其他产地所没有的菌属。这可能是由于不同海拔地区同期气温及降水等环境因素造成了土壤微生物种群结构的不同,造成高海拔地区(如长白)西洋参内生菌种类向优势种群芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 集中,有群落单一化趋势。

植物内生菌影响活性成分产生和积累的途径主要有 2 种:一是内生菌自身产生药用植物活性成分;二是内生菌促进药用植物产生活性成分^[25-26]。长春花 [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don] 分离到的内生菌可诱导长春花碱的合成和积累,产量提高了 2-5 倍^[27]。陈雪英^[8]从西洋参根中分离到 3 株能够产生人参皂苷类成分的内生细菌 I、II 和 III,经初步鉴定分属欧文氏菌属 (*Erwinia*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter*)。还有报道表明,西洋参人参皂苷的含量与产地海拔呈现显著正相关^[7],温度与人参皂苷含量呈显著负相关^[28],本研究中,高海拔地区(如长白)西洋参内生菌种类有向优势种群芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 集中的现象,内生菌是否与高海拔产地西洋参中人参皂苷增加有关,将在今后进行进一步的研究探讨。

此外,有研究者从人参中分离到 1 株芽孢杆菌属内生细菌多粘类芽孢杆菌 (*Paenibacillus polymyxa*),并发现该菌在与人参发酵后,可转化提高人参皂苷尤其是 Rd 的量^[29],西洋参内生菌转化提高人参皂苷的研究,也将是一个重要的研究方向。

参考文献

- [1] Jia L, Chen S, Zhai Y, Zhao C. Recent advances in studies on endophytes and their associated bioactive products. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2007, 38(11):1750-1754. (in Chinese)
贾粟,陈疏影,翟永功,赵长琦. 近年国内外植物内生菌产生物活性物质的研究进展. *中草药*, 2007, 38(11):1750-1754.
- [2] Jiang S, Qian D, Duan J, Yan H, Yu G. Research on correlation between plant endophytes and geoherbism.

- Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2008, 39 (8): 1268-1272. (in Chinese)
- 江曙, 钱大玮, 段金殿, 严辉, 于光. 植物内生菌与地道药材的相关性研究. *中草药*, 2008, 39 (8): 1268-1272.
- [3] Ahlholm JU, Helander M, Henriksson J, Metzler, Saikkonen K. Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *venturia ditricha*, a fungal endophyte of birch trees. *Evolution International Journal of Organic Evolution*, 2002, 56 (8): 1566-1573.
- [4] Shi J, Liu A, Li X, Chen W. Identification and antagonistic activities of an endophytic bacterium MGP3 isolated from papaya fruit. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51 (9): 1240-1247. (in Chinese)
- 石晶盈, 刘爱媛, 李雪萍, 陈维信. 番木瓜果实内生细菌 MGP3 菌株的鉴定及拮抗作用. *微生物学报*, 2011, 51 (9): 1240-1247.
- [5] Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ, Dowling DN. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278 (1): 1-9.
- [6] Zhu Y, Ai C, Zhang J, Zhang Z, Zhao C. Bioactive Secondary metabolites from endophytic fungi in plants. *Progress in Chemistry*, 2011, 23 (4): 704-730. (in Chinese)
- 朱妍妍, 艾嫦, 张嘉, 张正旺, 赵长琦. 具有生物活性的植物内生真菌次生代谢产物. *化学进展*, 2011, 23 (4): 704-730.
- [7] Huang L, Suo F, Song J, Wen M, Jia G, Xie C, Chen S. Quality variation and ecotype division of *Panax quinquefolium* in China. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2013, 48 (4): 580-589. (in Chinese)
- 黄林芳, 索风梅, 宋经元, 温美佳, 贾光林, 谢彩香, 陈士林. 中国产西洋参品质变异及生态型划分. *药学学报*, 2013, 48 (4): 580-589.
- [8] 陈雪英. 西洋参内生菌与人参皂苷类成分相关性的初步研究. 黑龙江中医药大学硕士学位论文, 2007.
- [9] 邹雨佳. 西洋参植物的内生真菌研究. 中国农业大学硕士学位论文, 1996.
- [10] Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences. *New Phytologist*, 2000, 147 (3): 193.
- [11] 戈峰. 现代生态学. 第二版. 北京: 科学出版社, 2008: 252-254.
- [12] Sun H, Liu X. Microbes studies of tea rhizosphere. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24 (7): 1353-1357. (in Chinese)
- 孙海新, 刘训理. 茶树根际微生物研究. *生态学报*, 2004, 24 (7): 1353-1357.
- [13] Bertollo P. Assessing landscape health: a case study from northeastern Italy. *Environmental Management*, 2001, 27: 349-365.
- [14] Zou W, Tan R. Recent advances on endophyte research. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43 (9): 881-892. (in Chinese)
- 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展. *植物学报*, 2001, 43 (9): 881-892.
- [15] Lan J, Liu B, Zhu Y, Tang Q, Lin K, Su M, Shi H. Community and diversity of endophytic bacteria inside eggplant. *Ecology and Environmental Sciences*, 2009, 18 (4): 1433-1442. (in Chinese)
- 蓝江林, 刘波, 朱育菁, 唐秋榕, 林抗美, 苏明星, 史怀. 茄子植物内生细菌群落结构与多样性. *生态环境学报*, 2009, 18 (4): 1433-1442.
- [16] Liu G, Jiang R. Isolation and preliminary study on *Pseudomonas fluorescent rhizobacterial* strains from chives. *Microbiology China*, 1999, 26 (3): 189-192. (in Chinese)
- 刘国奇, 蒋如璋. 韭菜根际荧光假单胞菌株的分离和初步研究. *微生物学通报*, 1999, 26 (3): 189-192.
- [17] 李海峰. 枯草芽孢杆菌 7Ze3 次生代谢产物研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2009.
- [18] Yang Y, Li Z, Gao L, Sun Y. The antibiotic metabolites genes of *Pseudomonas fluorescens*. *China Biotechnology*, 2012, 32 (8): 100-106. (in Chinese)
- 杨毅, 李治, 高玲霞, 孙燕. 荧光假单胞菌抗生性代谢产物合成相关基因的研究现状. *中国生物工程杂志*, 2012, 32 (8): 100-106.
- [19] 霍培元. 一株芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* 次生代谢产物研究. 中国医科大学硕士学位论文, 2010.
- [20] 李源. 小麦内生真菌系统发育及生态功能研究. 郑州大学硕士学位论文, 2010.
- [21] Liang X, Zhang S, Zhang P, Peng F, Ke J, Mi Y. Comparative study on distribution of endophytic fungi in *Eucommia* barks from different habitats. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2014, 39 (2): 204-208. (in Chinese)
- 梁雪娟, 张水寒, 张平, 彭菲, 柯健, 糜亚男. 不同产地杜仲皮内生真菌种群结构的比较分析. *中国中药杂志*, 2014, 39 (2): 204-208.
- [22] Aschehoug ET, Metlen KL, Callaway RM, Newcombe G. Fungal endophytes directly increase the competitive effects of an invasive forb. *Journal of Ecology*, 2012, 93 (1): 3-8.

- [23] Brosi GB, McCulley RL, Bush LP, Nelson JA, Classen AT, Norby RJ. Effects of multiple climate change factors on the tall fescue-fungal endophyte symbiosis: infection frequency and tissue chemistry. *New Phytologist*, 2011, 189 (3) :797 – 805.
- [24] Shi Y, Zhang X, Lou K. Endophyte microbial community in *Achnatherum inebrians*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2012, 52 (10) :1297-1308. (in Chinese)
史应武,张雪兵,娄恺. 新疆醉马草内生菌群落结构. 微生物学报, 2012, 52 (10) :1297-1308.
- [25] Zhang Y, Chen X, Zhao W. Advances in studies on biotransformation of ginsenosides. *Journal of Shenyang Pharmaceutical University*, 2008, 25 (5) : 419-422. (in Chinese)
张怡轩,陈晓莹,赵文倩. 人参皂苷生物转化的研究进展. 沈阳药科大学学报, 2008, 25 (5) : 419-422.
- [26] Huang B, Qin B. Biodiversity and active ingredients of the medicinal plant endophyte. *Journal of Pharmaceutical Practice*, 2006, 24 (4) :193-196. (in Chinese)
黄宝康,秦路平. 药用植物内生菌的生物多样性及活性成分. 药学实践杂志, 2006, 24 (4) :193-196.
- [27] Namdeo A, Patil S, Fulzele D P. Influence of fungal elicitors of production of ajmalicine by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Progress*, 2002, 18 (1) :159-163.
- [28] Xie C, Suo F, Jia G, Song J, Huang L, Chen S. Correlation between ecological factors and ginsenosides. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 31 (24) :7551-7563. (in Chinese)
谢彩香,索风梅,贾光林,宋经元,黄林芳,陈士林. 人参皂苷与生态因子的相关性. 生态学报, 2011, 31 (24) : 7551-7563.
- [29] 李学. 内生细菌转化人参皂苷的研究. 吉林农业大学硕士论文, 2013.

The community structure and diversity of the endophytes in American ginseng

Xuezhou Liu, Zhiling Zhao, Shaobin Li, Lianxue Zhang^{*}, Yixin Tian^{*}, Furen Sun
Jilin Agricultural University, College of Traditional Chinese Herbs, Jilin University, Changchun 130118, Jilin Province, China

Abstract: [Objective] To clarify the composition of endophytes community in American ginseng, to know the differences of the endophytes community structure of different producing area and colonization part, and to grasp the resource situation of endophytes in American ginseng of Jilin Province. [Methods] Endophytes were separated with tissue explant and identified with 16S rDNA and ITS sequence analysis, by combining the cultivation forms. Moreover, ecological index analysis was conducted for the endophytes separated. [Results] Endophytes in American ginseng root obtained included 13 genera and 26 species, endophytes of the stem obtained included 10 genera and 18 species, whereas endophytes of the leaves obtained included 9 genera and 16 species. *Bacillus* and *Pseudomonas* were advantageous genera in the endophytes in American ginseng, and the species contained occupied 17.6% and 14.7% of the total endophytes respectively. According to the diversity index (H'), Hunchun > Jingyu > Fusong > Ji'an > Changbai; according to the evenness index (J), Hunchun > Ji'an > Jingyu > Fusong > Changbai; according to the dominance index (D), Jingyu > Hunchun > Fusong > Ji'an > Changbai. [Conclusions] Endophytes in American ginseng were characterized by abundant genetic diversity. The structure of the endophytes community in American ginseng was complicated, there were differences of the endophytes community structure of different producing area and colonization part, the community diversity of producing area with high altitude was decreased.

Keywords: American ginseng, endophytes, isolation, identification, diversity, community structure

(本文责编:王晋芳)