

川楝内生放线菌多样性及群落结构研究

张瀚能¹, 张金羽¹, 刘茂柯², 李 静¹, 廖 萍¹,
赵 翀¹, 赵 珂¹, Petri Penttinen³

(1. 四川农业大学资源学院微生物学系, 成都 611130; 2. 四川省农科院水稻高粱研究所, 泸州 646000;
3. 芬兰赫尔辛基大学环境科学系, 赫尔辛基 00014)

摘要: 为深入挖掘川楝药材中的微生物资源, 研究分析了川渝地区川楝内生放线菌的多样性和群落结构. 运用 PCR-DGGE 技术对重庆万州、四川资阳、四川遂宁三个地区采集的川楝样品进行分析. DGGE 图谱显示不同地区相同部位的样品以及相同地区的不同部位之间川楝内生放线菌都存在多样性差异, 这种差异来自于地域环境和自身代谢水平的不同. 不同部位总体上呈现树皮的多样性最丰富, 而果实的多样性最差. 对 DGGE 条带进行回收测序, 共获得 24 条序列, 归于 11 个属, 链霉菌属 (*Streptomyces*) 为优势菌属占 25%, 其余的川楝内生放线菌归于为芽球菌属 (*Blastococcus*)、气微菌属 (*Aeromicrobium*)、中村氏菌属 (*Nakamurella*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、冷杆菌属 (*Cryobacterium*)、微杆菌属 (*Microbacterium*)、诺卡氏菌属 (*Nocardioidea*)、利夫森氏菌属 (*Leifsonia*) 等稀有放线菌属, 占总数的 75%. 结果表明分布于不同地域的川楝各组织内生放线菌多样性及群落结构存在差异, 蕴藏着丰富的放线菌资源.

关键词: 川楝; 内生放线菌; PCR-DGGE; 群落结构

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0490-6756(2016)06-1391-07

Diversity and community structure of endophytic actinobacteria of *Melia toosendan*

ZHANG Han-Neng¹, ZHANG Jin-Yu¹, LIU Mao-Ke², LI Jing¹, LIAO Ping¹,
ZHAO Chong¹, ZHAO Ke¹, Petri Penttinen³

(1. Department of Microbiology, College of Resource and Environment, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China;
2. Rice and Sorghum Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Luzhou 646000, China;
3. Department of Environmental Sciences, University of Helsinki, Helsinki, Fin-00014, Finland)

Abstract: The diversity and community structure of endophytic actinobacteria of *Melia Toosendan* collected from Sichuan and Chongqing were studied for exploring the microbial resources from Chinese medicine *Melia Toosendan*. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was employed to analyze endophytic actinobacteria diversity and community structure of *Melia Toosendan* collected from Wanzhou (Chongqing), Ziyang and Suining, respectively. The result of DGGE showed the diversity of endophytic actinobacteria that obtained from whether different tissues of *Melia Toosendan* in one plant or the same tissues collected from different sampling sites were existed different, the main reason was environmental deviation or metabolic differences among plants. The richest diversity of endophytic actinobacteria of

收稿日期: 2015-11-11

基金项目: 四川省科技计划项目(国际合作)(2013HH004)

作者简介: 张瀚能(1991-)男, 重庆人, 硕士生, 研究方向为资源微生物学. E-mail: 343212966@qq.com

通讯作者: 赵珂. E-mail: zhaoke82@126.com

Melia Toosendan was observed in bark and the fruit was fewest. The recovery of DGGE strip series showed the 16S rRNA gene sequence similarity between the 24 stronger bands and the typical strains published in Genbank was 91% to 100%, and those sequences belonged to eleven genera, *Streptomyces* was dominant genera accounting for 25% of all sequences, the remainder belonging to genera *Blastococcus*, *Aeromicrobium*, *Nakamurella*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*, *Cryobacterium*, *Microbacterium*, *Nocardioides*, *Leifsonia*, which account for 75%. This result revealed the endophytic actinobacteria community structure and diversity were different and abundant in different samples.

Keywords: *Melia Toosendan*; Endophytic actinobacteria; PCR-DGGE; Diversity and Community structure

1 引言

放线菌以产生种类繁多的天然产物而闻名,目前为止有 2/3 的天然产物都是由放线菌代谢合成的^[1],而植物内生放线菌指生活于健康植物组织内部、不引发植物产生明显病症的放线菌,内生放线菌与植物内生环境相互作用,在长期演变和进化过程中会影响植物内部化合物的合成,为寻找新的化合物资源提供了可靠的途径^[2,3].

川楝(*Melia toosendan*)为楝科,广泛分布于四川、贵州、云南、湖北、广西等南方地区,川楝作为传统的药用植物在我国药用历史悠久,入药以四川产为地道药材.目前已从川楝中获得具有抗菌消炎、抗病毒、治疗肉毒毒素中毒、抗肿瘤细胞等活性的化合物,为挖掘内生放线菌资源提供了极好的材料^[4,5].但目前对川楝内生放线菌的研究较少,外界因子对放线菌的多样性及系统发育的影响也鲜有报道.

近年来,已有多种分子生物学技术研究植物内生微生物的生物多样性,例如 PCR-DGGE, PCR-SSCP, PCR-RFLP^[6-8],均是以 PCR 技术为基础的分子生物学研究手段,在揭示植物内生微生物种群结构的方面具有传统方法不具备的优势.因此,本研究采用变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)技术结合 DNA 测序技术,对采自川渝不同地区川楝样品的不同部位的内生放线菌群落结构进行分析,旨在揭示川渝地区川楝内生放线菌遗传多样性和系统发育情况,深入挖掘川楝药材中的微生物资源,为潜在的抗肿瘤、抗虫、抗菌资源的筛选提供理论依据.

2 材料与方法

2.1 材料

样品为采自川渝地区重庆万州、四川资阳、四川遂宁三个地点(表 1)的川楝的根、茎、叶、树皮、果.

表 1 采样地信息

Tab. 1 Location of sampling sites

采样地	地理位置	海拔(m)	地形
重庆万州	N 30°54'58.31" E 108°19'24.68"	1259	山地
四川资阳	N 30°08'21.20" E 104°40'03.32"	361	丘陵
四川遂宁	N 30°31'26.72" E 105°33'11.62"	317	丘陵

2.2 方法

2.2.1 表面消毒 称取样品的根、茎、叶、树皮、果各 5 g 左右,作适当的修剪后,参照文献方法^[9]进行表面消毒.同时取 0.2 mL 最后一遍清洗植物样品的水涂布于 ISP2 固体培养基上,28 °C 培养 3~7 d,观察是否有菌长出,进行消毒效果检测.

2.2.2 植物总 DNA 的提取 取经表面消毒后川楝根、茎、叶、果实和树皮经表面消毒后各取 1 g 于无菌研钵中,加入液氮反复研磨将川楝各组织研成粉末;将粉末转移至无菌离心管中,参照秦盛等^[10]的方法提取植物总 DNA.

2.2.3 PCR 扩增 采用巢氏 PCR 对目标片段进行扩增.第一轮 PCR 引物为 F243 (GGATGAGC-CCGCGGCCTA) 和 R1186 (CTTCTCCGAGTT-GACCC)^[11].反应体系为 20 μ L,为减少非特异性产物,采用降落 PCR(Touch-down)程序.第二轮 PCR 引物为 F907GC (AAACTCAAAGGAATTGACGG, GCCGCCCGCCGCGCGCGCGGGCGGGCGGGGGCA CGGGGGG) 和 R1186 (CTTCTCCGAGTT-GACCC)^[11].反应体系为 50 μ L,反应完成后 4°C 保存备用. PCR 完成后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳电压 100 V,电泳时间为 15 min.

2.2.4 DGGE 分析 变性梯度凝胶电泳(DGGE)参照 Heuer 等^[12]的方法对 15 个样品进行分析.所用的凝胶变性梯度从 30 % 到 60 %,电泳结束后,取凝胶在溴化乙锭溶液中染色 20 min,用 Bio-Rad

公司的凝胶成像系统观察样品的电泳条带并拍照.

2.2.5 图像和多样性分析 DGGE 指纹图谱用 Bio-Rad 公司的 Quantity One 分析软件进行分析,多样性指数(H),丰度(S),辛普森指数(D)和优势度指数(C)^[13-15] 指标被用来比较各个植物样品的放线菌多样性.

$$H = -\sum P_i \cdot \ln P_i$$

$$D = 1 - \sum (n_i/N)^2$$

$$C = -\sum (n_i/N)^2$$

公式中, P_i 是某个植物样品中单一条带的强度在该样品中所有条带强度的比率, S 是某个植物样品中所有条带数目的总和^[16].

2.2.6 DGGE 条带测序和系统发育分析 优势条带和特异性的条带切割下后,用无菌去离子水清洗3次,并用 20 μ L 去离子水浸泡过夜,再以浸液为模板进行 PCR 扩增^[17].用第二次 PCR 扩增时用的引物(无 GC 发夹)进行 PCR 扩增,体系和程序同 1.3. PCR 产物用 UNIQ-10 DNA 纯化试剂盒(上海生工)进行纯化,然后用大连宝生物公司的 pMDTM19-TVvector 试剂盒进行克隆.挑选白色菌落进一步测序,测序由上海生工生物工程公司完成.将所测的序列,以及通过 BLAST 程序在 GenBank 获取的相似度较高的序列, Clustal X (Version 1.81) 进行全序列比对,采用 Neighbor-joining 方法在 Mega 5.0 中进行系统发育分析^[18].

2.2.7 核苷酸序列登录号 将测序得到的序列提交 GenBank 数据库,登录号为 KT951857-KT951880.

3 结果与分析

3.1 川楝内生放线菌 DGGE 图谱分析

川楝内生放线菌 DGGE 图谱显示(图 1),各样品经 DGGE 分离出数目不等的条带,而且各条泳道的强度和迁移率各不相同,揭示了川楝内生放线菌的多样性.其中采自四川遂宁川楝果实的图谱最为单一,树皮的图谱条带最为丰富.不同地点以及不同部位的样品中具有共同的条带,说明这些样品中具有共同的内生放线菌种群,例如 15 号、18 号、22 号条带等,除此之外,各样品中还有各自的独有的优势条带,例如 C2 样品的 1 号条带, C4 样品的 6 号条带 Z4 样品的 8 号条带等等,显示了不同样品中的放线菌种群存在差异,体现了样品中内生放线菌的丰富性.

3.2 川楝内生放线菌遗传多样性分析

多样性指数(H)是用于描述种群的个体出现

紊乱和确定性,不确定性越高,多样性就越高.辛普森指数(D)是指群落中种数越多,各种个体之间分配就越均匀,指数越高,多样性就越好.优势度指数(C)也可以在一定程度上反映样品的多样性.本研究依据电泳图谱中条带的强度,以及各样品中放线菌的多样性指数(H)、丰度(S)、辛普森指数(D)和优势度指数(C)指标进行分析(表 2).

不同样品内生放线菌的各个指标都有较大的差异. S3 样品的丰度、多样性指数和辛普森指数最高,而 S5 样品的丰度、多样性指数和辛普森指数最低.优势度最高的是 S5 样品,最低的是 S3 样品.从川楝各部位的多样性看,除果实外,根、茎、叶、树皮的差异并不大,大致体现出树皮>叶>根>茎>果的分布规律.综合四个指标,不同地域的样品,多样性最为丰富的部位不一样.采自重庆万州的样品,多样性最丰富的为叶,其次是根和树皮,采自四川资阳的样品多样性最为丰富的为树皮,其次为茎和叶,而四川遂宁的样品中多样性最为丰富的是树皮,其次是叶和根.这说明植物在不同的生长环境会导致其内生放线菌群落结构的差异.

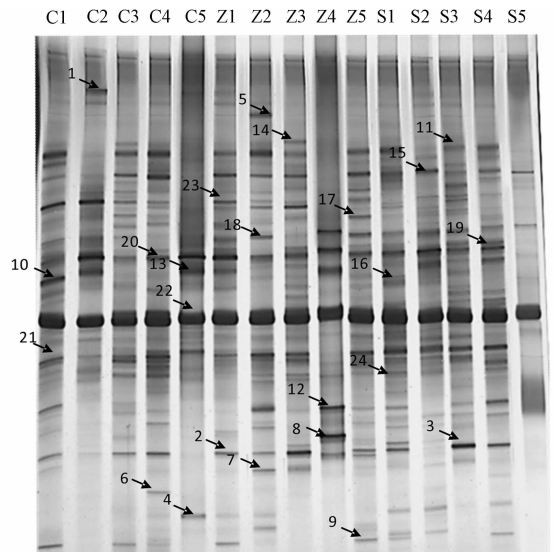


图 1 川楝内生放线菌 DGGE 图谱

C1-C5:采自重庆万州川楝样品根、茎、树皮、叶、果 Z1-Z5:采自四川资阳川楝样品根、茎、树皮、果、叶 S1-S5:采自四川遂宁川楝样品根、茎、树皮、叶、果.

Fig. 1 DGGE profile of *Melia toosendan* endophytic actinobacteria

C1-C5: Samples were taken from Wanzhou of *Melia toosendan* roots, stems, bark, leaf, fruit, respectively Z1-Z5: Samples were taken from Ziyang of *Melia toosendan* roots, stems, bark, leaf, fruit, respectively S1-S5: Samples were taken from Suining of *Melia toosendan* roots, stems, bark, leaf, fruit, respectively

表 3 DGGE 切胶条带序列比对结果

Tab. 3 Phylogenetic identification and distribution of bacteria excised and sequenced from DGGE bands

序列 编号	序列同源性(%)	样品编号														
		C1	C2	C3	C4	C5	Z1	Z2	Z3	Z4	Z5	S1	S2	S3	S4	S5
C2-1	<i>Aeromicrobium marinum</i> (97)				+											
Z1-2	<i>Blastococcus aggregatus</i> (95)		+		+	+		+	+	+		+	+			
S3-3	<i>Blastococcus saxobsidens</i> (95)														+	+
C4-4	<i>Corynebacterium doosanense</i> (96)							+	+	+			+	+		+
Z2-5	<i>Cryobacterium roopkundense</i> (93)									+						
C4-6	<i>Leifsonia aquatica</i> (96)						+									
Z2-7	<i>Leifsonia xyli</i> (95)									+	+		+	+		
Z4-8	<i>Microbacterium paraoxydans</i> (98)											+				
Z5-9	<i>Mycobacterium mageritense</i> (97)		+		+					+			+	+		+
C1-10	<i>Mycobacterium vaccae</i> (98)		+													
S3-11	<i>Nakamurella panacisegetis</i> (97)		+		+	+		+	+	+		+	+		+	+
Z4-12	<i>Nakamurella panacisegetis</i> (98)		+		+	+				+		+	+	+	+	+
C5-13	<i>Nakamurella panacisegetis</i> (98)				+			+	+			+		+		+
Z3-14	<i>Nakamurella panacisegetis</i> (99)					+	+			+						
S2-15	<i>Nocardioides insulae</i> (91)		+		+	+		+	+	+		+	+	+	+	+
S1-16	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (100)					+		+		+		+	+			
Z5-17	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (100)		+		+	+				+		+				
Z2-18	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (99)		+	+				+	+		+	+	+	+	+	+
S4-19	<i>Streptomyces atratus</i> (98)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C4-20	<i>Streptomyces atratus</i> (99)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C1-21	<i>Streptomyces halstedii</i> (99)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C5-22	<i>Streptomyces halstedii</i> (99)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Z1-23	<i>Streptomyces prunicolor</i> (99)		+	+	+	+		+	+	+		+		+	+	+
S1-24	<i>Streptomyces seoulensis</i> (98)		+	+	+	+			+	+		+	+	+		+

4 讨 论

一直以来有关川楝内生放线菌的研究并未受到重视,有关川楝内生放线菌多样性的研究也仅见于陈萌等^[20]的报道,他们采用传统分离方法研究川楝内生放线菌多样性,共分离 403 株内生放线菌,链霉菌为优势菌株,但其占代表菌株数目的比例高达 91%,其稀有菌株只分离出北里孢菌属(*Kitasatospora*)、节杆菌属(*Arthrobacter*)、克里布所菌属(*Kribbella*) 3 个属,菌株数目只占总菌数的 9%,这与本实验结果有差异,主要原因可能与分析手段不同有关,以及采样地区差异会造成植物内生放线菌的组成差异.本研究利用 DGGE 技术进一步揭示出川楝蕴藏着丰富的放线菌资源,共分离得到 11 个属,稀有放线菌占 75%,表明大量的植物内生放线菌资源有待于人们的开发和利用.其中一些属的放线菌广泛分布于不同采样地的川楝样品中,例如链霉菌属(*Streptomyces*),中村氏

菌属(*Nakamurella*)等作为共有的类群普遍存在于川楝各样品中,说明川楝内生放线菌类群组成有一定的相似性.然而,在不同的环境和地域的影响下,川楝内生放线菌群落多样性演替过程会存在差异,例如微杆菌属(*Microbacterium*),气微菌属(*Aeromicrobium*),利夫森氏菌属(*Leifsonia*)和冷杆菌属(*Cryobacterium*) 4 个属的序列只出现在唯一的样品中;气微菌属(*Aeromicrobium*)和利夫森氏菌属(*Leifsonia*)仅在重庆万州采集的川楝样品的茎部和树皮有分布.由于重庆万州采样点位于大巴山区的山地地区,有别于四川资阳与四川遂宁两个采样点所处的丘陵地形,各样品所处生长环境的不同,可能是造成其内生放线菌种属存在较大差异的原因.

DGGE 图谱分析显示,从重庆万州、四川资阳、四川遂宁三个地区采集的川楝样品内生放线菌的多样性、群落结构存在差异.四川资阳和四川遂宁川楝样品中,树皮的多样性最丰富,而重庆万州

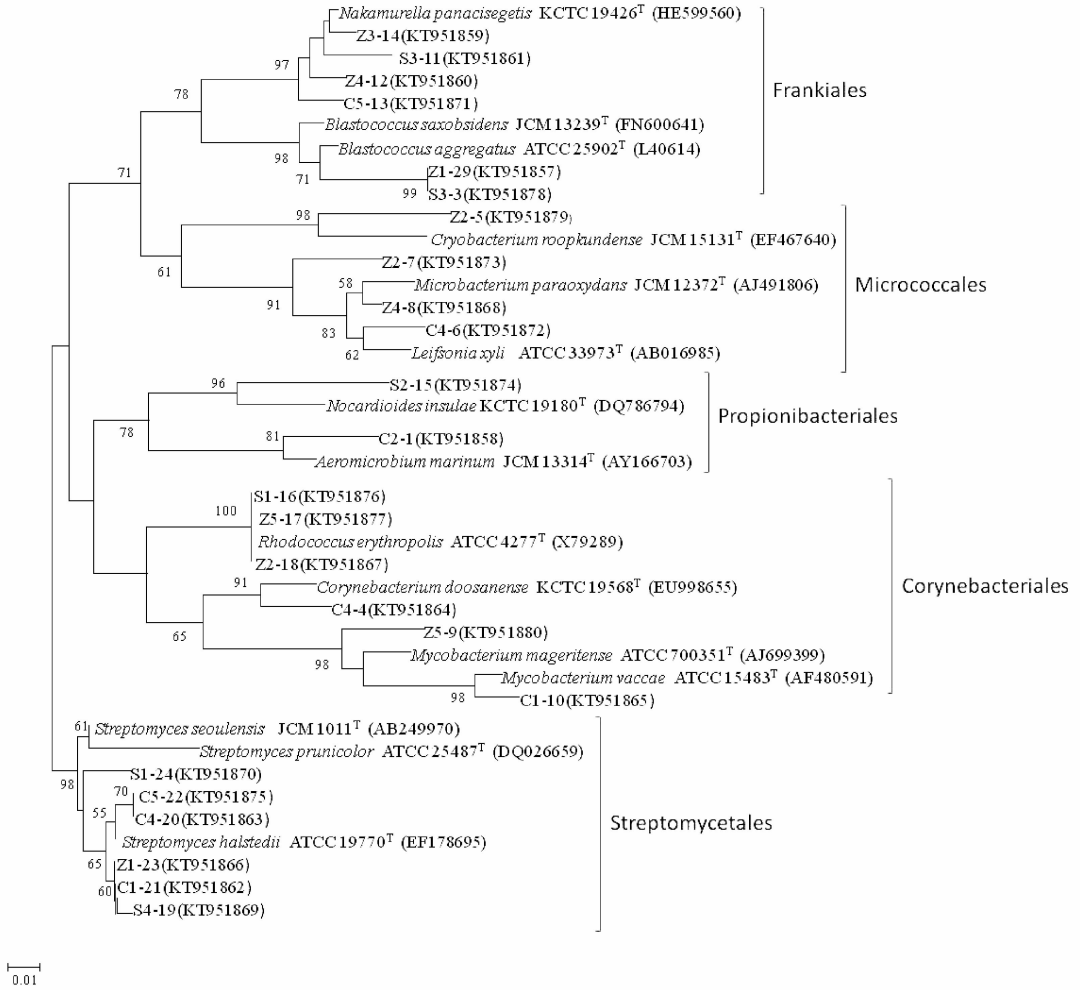


图 3 部分川楝内生放线菌 DGGE 条带序列 N-J 系统发育树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of 16S rRNA of endophytic actinobacteria of *Melia toosendan* from DGGE bands

样品则是叶的多样性最丰富,三个地区川楝样品的各部位群落结构相似性较低,显示植物内生放线菌多样性可能会受各地区环境差异的影响;而从样品的不同部位的内生放线菌的分布来看,树皮和叶的多样性较为丰富,果实的多样性最差.这可能是由于内生放线菌不能直接通过果实等繁育进行传播分布有关^[21].在大量关于植物内生菌分离的报道中,从植物根部分离得到的放线菌数量、种类都应该是最多的^[22-24].Thongchai^[25]等认为这可能跟根围土壤微生物菌群中大部分为放线菌有关,这使它们更易于进入宿主植物中.而本研究样品根部放线菌的多样性并不突出,研究表明,植物生长地区、病理状态、栽培品系,甚至季节变化都会影响植物内生放线菌的体内分布^[26],而本实验的研究对象为野生状态下的川楝,根系庞大、粗壮,纵深可达 1 米以上,所以不能取其完整根系,因而在反映内生放线菌多样性上,可能会存在偏差.

研究川楝的内生放线菌多样性及群落结构可以帮助我们了解川渝地区川楝内生放线菌的遗传多样性和系统发育情况,深入开发川楝药材中的微生物资源,为潜在的抗肿瘤、抗虫资源的筛选提供理论依据.

参考文献:

- [1] János B. Bioactive microbial metabolites. [J]. Journal of Antibiotics, 2005, 58(1): 1.
- [2] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreae*, an endophytic fungus of Pacific yew. [J]. Science, 1993, 260(5105): 214.
- [3] 曹理想,周世宁.植物内生放线菌研究[J].微生物学通报,2004,31(4):93.
- [4] 王小娟,刘妍如,肖炳坤,等.川楝素抗肿瘤作用机制研究进展[J].科学技术与工程,2011,2:1671.
- [5] 鲁静,王璟.川楝素药理作用研究进展[C].第六次

- 临床中药学学术年会暨临床中药学学科建设经验交流论文集,2013.
- [6] Niemi R M, Heiskanen I, Wallenius K, *et al.* Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2001, 45(3): 155.
- [7] Schwieger F, Tebbe C C. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1998, 64(12): 64.
- [8] Lukow T, Dunfield P F, Liesack W. Use of the T-RFLP technique to assess spatial and temporal changes in the bacterial community structure within an agricultural soil planted with transgenic and non-transgenic potato plants. [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2000, 32(3): 241.
- [9] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯. 放线菌研究及应用[M]. 科学出版社,1990: 251.
- [10] Qin S, Chen H H, Zhao G Z, *et al.* Abundant and diverse endophytic actinobacteria associated with medicinal plant *Maytenus austroyunnanensis* in Xishuangbanna tropical rainforest revealed by culture-dependent and culture-independent methods. *Environmental microbiology reports*, 2012, 4(5), 522.
- [11] Schäfer J, Jäckel U, Kämpfer P. Development of a new PCR primer system for selective amplification of *Actinobacteria* [J]. *Fems Microbiology Letters*, 2010, 311(2): 103.
- [12] Heuer H, Krsek M, Baker P *et al.* Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(8): 3233.
- [13] Diallo M D, Martens M, Vloemans N, *et al.* Phylogenetic analysis of the partial bacterial 16S rDNA sequences of tropical grass pasture soil under *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Senegal. *Systematic and Applied Microbiology*, 2004, 27: 238-252
- [14] Saikaly P E, Stroot P G, Oerther D B. Use of 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis to assess the impact of solids retention time on the bacterial diversity of activated sludge[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(10): 5814.
- [15] 陈泽斌, 夏振远, 雷丽萍, 等. 非培养方法解析烟草根部内生细菌的群落结构[J]. *华北农学报*, 2012, 27: 201.
- [16] Eichner CA, Erb RW, Timmis KN, Wagner-Dobler I. Thermal gradient gel electrophoresis analysis of bioprotection from pollutant shocks in the activated sludge microbial community [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1999, 65(1): 102.
- [17] Ampe F, Sirvent A, Zakhia N. Dynamics of the microbial community responsible for traditional sour cassava starch fermentation studied by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative rRNA hybridization. [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2001, 65(1-2): 45.
- [18] 张于光, 王慧敏, 李迪强, 等. 三江源高寒草甸土固氮基因(*nifH*)的多样性和系统发育研究[J]. *微生物学报*, 2005, 45: 166.
- [19] 阮继生. “伯杰氏系统细菌学手册(第二版)”第5卷与我国的放线菌系统学研究[J]. *微生物学报*, 2013, 53(6), 521.
- [20] 陈萌, 李小林, 李强, 等. 川楝内生放线菌的分离及多样性研究[J]. *微生物学通报*, 2015, 42(2): 264.
- [21] 唐依莉, 王蓉, 洪葵. 不同红树林地区老鼠簕内生放线菌的分离及其环境适应性[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(1): 25.
- [22] Bascom-Slack C A, Ma C, Moore E, *et al.* Multiple, novel biologically active endophytic actinomycetes isolated from upper Amazonian rainforests. [J]. *Microbial Ecology*, 2009, 58(2): 374.
- [23] Zhu N, Zhao P, Shen Y. Selective Isolation and Ansamycin-Targeted Screenings of Commensal Actinomycetes from the “Maytansinoids-Producing” Arboreal *Trewia nudiflora* [J]. *Current Microbiology*, 2009, 58(1): 87.
- [24] Verma V C, Gond S K, Kumar A, *et al.* Endophytic actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: isolation, diversity, and anti-microbial activity. [J]. *Microbial Ecology*, 2009, 57(4): 749.
- [25] Taechowisan T, Peberdy J F, Lumyong S. Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2003, 19(4): 381.
- [26] 冯天祥, 陆可茵, 陆兰依塔, 等. 植物内生放线菌多样性研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2015. 35(3): 97.