

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

唐依莉^{1Δ} 王蓉^{2Δ} 洪葵^{1,3*}

- (1. 海南大学 农学院 海南 海口 570228)
- (2. 海南省水产研究所 海南 海口 570206)
- (3. 武汉大学 药学院 湖北 武汉 430071)

摘要: 【目的】比较不同红树林地区的老鼠簕内生放线菌的地理分布,了解内生放线菌与其所处环境的相关性。【方法】分别从5个不同地点的红树林采集老鼠簕全株植物,采用9种分离培养基,从植株不同部位分离内生放线菌,用16S rRNA基因序列分析鉴定到属,用添加不同NaCl浓度的ISP 2液体培养基进行耐盐度测试,用无氮基础培养基进行固氮活性测试。【结果】共分离得到内生放线菌52株,其中从叶、茎和根部分别获得5株、2株和45株,花和果中未分离到。52株内生放线菌分别属于小单孢菌属(47株),链霉菌属(3株),疣孢菌属(1株)和继生菌属(1株)。48株菌表现出耐盐或嗜盐特征,其中18株最高耐盐度20%,4株不能在无盐条件下生长,12株菌可在含有3.3% NaCl的培养基上生长良好。4株菌可在无氮培养基下生长。【结论】对47株内生小单孢菌的地理分布分析表明,老鼠簕内生小单孢菌的类群因不同地理位置有很大差异。耐盐和固氮活性测试结果表明了老鼠簕内生放线菌对环境的适应性。

关键词: 内生放线菌, 老鼠簕, 耐盐性, 固氮活性

Isolation and environmental adaptation of endophytic Actinomycetes in *Acanthus ilicifolius* of different mangrove

TANG Yi-Li^{1Δ} WANG Rong^{2Δ} HONG Kui^{1,3*}

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170467)

*通讯作者: Tel: 86-27-68752442; ✉: kuihong31@whu.edu.cn

Δ共同第一作者

收稿日期: 2011-07-18; 接受日期: 2011-11-01

(2. Hainan Provincial Fisheries Research Institute, Haikou 570206, China)

(3. School of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

Abstract: [Objective] To investigate geographical distribution of *Acanthus ilicifolius* endophytic actinomycetes of different mangrove regions, and their environmental adaptation. **[Methods]** Endophytic actinomycete strains were isolated from different part of *Acanthus ilicifolius* plant collected from 5 mangrove sites using 9 different selective isolation media. Isolates were identified to genus level using 16S rRNA gene sequence analysis. NaCl tolerance was tested using ISP 2 liquid medium supplement with different NaCl concentrations. Potential of nitrogen-fixation isolates were surveyed using nitrogen-free medium. **[Results]** A total of 52 endophytic actinomycete strains were successfully isolated from *Acanthus ilicifolius* plant, among which 5 isolates were from surface-sterilized leaves, 2 isolates from stems and the remaining 45 isolates were from roots. Analysis of 16S rRNA gene sequences of these isolates showed that they belonged to members of the genera *Jishengella* (1 isolate), *Micromonospora* (47 isolates), *Streptomyces* (3 isolates) and *Verrucosipora* (1 isolate). Forty eight isolates were halo-tolerant or halophilic, including 18 isolates exhibited highest tolerance come up to 20% NaCl, 4 isolates can't grow in salt-free medium, and 12 isolates exhibited good growth in presence of 3.3% NaCl. Meanwhile, 4 strains can grow on nitrogen-free medium that showed potential of nitrogen-fixation. **[Conclusion]** Analysis of 47 *Micromonospora* isolates from 5 mangrove locations indicated that there were different endophytic *Micromonospora* groups of *Acanthus ilicifolius* among different geographical sites. The results obtained revealed the environmental adaptation of the *Acanthus ilicifolius* endophytic actinomycetes.

Keywords: Endophytic actinomycetes, *Acanthus ilicifolius*, Salt tolerance, Nitrogen-fixation

内生菌是一类存在于健康植物组织中,不表现病症的微生物。研究表明植物内生菌是植物生态系统中的重要组成部分,在健康植物的根、茎、叶及果实中都有分布,内生菌与寄主可以形成共生、互惠或互养关系。内生菌的这些生态功能已经应用到促进植物生长,在植物组织培养中诱导植物抗病和抗旱^[1-2]。

红树林为自然分布于热带和亚热带海岸潮间带的木本植物群落,通常生长在港湾河口地区的淤泥滩涂上,为耐盐、常绿灌木或乔木,是海滩上特有的森林类型。由于红树林周期性受到潮水浸淹,其生境具有高含盐量、强还原性、强酸性、营养丰富等特征^[3]。红树林土壤有机质含量虽高,但由于土壤处于厌氧环境,土壤全氮和速效氮含量不高,C/N 偏大。微生物的固氮作

用在海岸带十分活跃,尤其是在海草草场、岩礁区和红树林地区的沉积物中。许多学者认为微生物固氮是控制海岸带环境初级生产力的重要因素^[4]。

老鼠簕(*Acanthus ilicifolius* L.)是一种生长在热带海岸地带的红树植物,为爵床科(Acanthaceae)老鼠簕属(*Acanthus*),主要分布于东南亚热带各国,在我国主要分布于海南、广东、广西、福建和台湾沿海地区。老鼠簕具有清热解毒、消肿散结、止咳平喘的功效,民间作为传统药用植物还用作治疗乙型肝炎^[5],但对其内生放线菌的研究还不够深入。本研究选择老鼠簕植物全株,分离内生放线菌,检测其耐盐和固氮作用,分析其在不同地点的分布情况,以认识同种植物的内生放线菌对环境的适应性。

1 材料与amp;方法

1.1 红树植物老鼠簕样品的采集

1.1.1 采样时间与地点: 2006–2007 年分别从广东深圳、湛江、广西北海、海南东寨港、清澜港采集老鼠簕全株植物。采集后的样品迅速放于置冰的泡沫盒中带回实验室。

1.1.2 样品预处理: 流水冲洗样品表面, 去除泥土及其它杂物, 样品剪成 10 cm 左右小段, 然后用滤纸吸干表面水分, 先用 75%乙醇消毒后置于 0.1%升汞中 15 min, 用无菌水清洗 5 次以去除残留药剂。以上清洗溶液均加入 1%吐温-80。

1.2 内生放线菌的选择性分离

1.2.1 分离培养基: 根据文献[6], 选择 9 种培养基: 燕麦培养基(OA) 用磷酸缓冲液调 pH 分别为 5、7、9、11, 高氏培养基(Gause), 棉子糖组氨酸培养基(RH), 1/10 ATCC 172, M5 以及 SM2。其中 OA、M5、1/10ATCC 172 培养基分别加入 50 mg/L 放线菌酮、25 mg/L 制霉菌素和 50 mg/L 重铬酸钾。RH 和 Gause 培养基中加入 50 mg/L 重铬酸钾。SM2 培养基加入 10 mg/L 萘啶酮酸、10 mg/L 新生霉素、50 mg/L 放线菌酮、50 mg/L 制霉菌素。

1.2.2 分离培养: 取表面消毒后的样品约 5 g, 无菌条件下剪碎, 加入 45 mL 50%无菌海水充分研磨, 分别取 100 μ L 研磨液直接涂布于各分离培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 30 d。

1.2.3 表面消毒的检验: 取最后一次浸洗表面消毒后植物组织的洗涤液 100 μ L 涂布于各分离培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 30 d, 检查表面消毒效果。

1.2.4 菌株纯化: 将分离培养基上生长的所有菌株(包括形态相同或相似的菌株)转接到 ISP 2 培养基上, 并反复划线培养以得到纯菌。

1.3 菌株的耐盐度实验

在分离菌株能够生长良好的液体培养基(ISP 2)中添加 3.3%、6%、10%、15%和 20%的 NaCl, 接种后于 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 7 d, 每株菌设 3 个

重复, 观察生长情况。

1.4 无氮培养基培养

将分离得到的全部菌株划线接种于阿须贝无氮源培养基^[7]上, 每株菌设 3 个重复, 同时各菌接种一皿含有氮源的基础培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 1 个月, 观察生长情况。

1.5 菌株 DNA 的提取

在装有 500 μ L TE 和 0.5 g 玻璃粉的无菌 Eppendorf 管中加入黄豆大小的菌体; 用 Fastprep 设备以 5.5 m/s 的转速击打 30 s, 12 000 r/min 条件下离心 5–10 min 后, 取上清作为 DNA 模板用于 PCR 扩增。

1.6 16S rRNA 基因序列的 PCR 扩增

采用细菌通用引物 27F 与 1492R 进行 PCR 扩增, 反应总体积为 50 μ L, 其中模板 DNA 1 μ L, 2 \times PCR Mastermix 25 μ L, 1492R (0.02 mmol/L) 1 μ L, 27F (0.02 mmol/L) 1 μ L, ddH₂O 22 μ L。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 60 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物直接送去测序, 测序工作由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.7 基于 16S rRNA 基因序列的聚类分析

测得的菌株序列提交 GenBank (EU437786–EU437834, EU560725–EU560726)。将各菌株的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 中的序列进行 BLAST 比对, 在 EzTaxon (<http://www.Eztaxon.org>)搜索最相似的模式菌株信息, 将分离菌株与 GenBank 中相近的模式菌的 16S rRNA 基因序列一起利用 BioEdit 软件进行多序列比对, 采用 MEGA 3.1 软件中的邻接法(NJ 法)进行聚类分析。

2 结果分析

2.1 菌株分离

从 5 个地点采集的老鼠簕植物样品共分离得到 52 株内生放线菌。在 9 种分离培养基中, 从

OA7 (pH 7)和 1/10 ATCC 172 培养基分离获得的菌株最多, 为 19 株; 从 OA5 (pH 5)和 OA9 (pH 9) 培养基分别获得 2 株; 从 SM2 培养基分离获得 6 株; 从 RH 培养基获得 4 株; Gause 培养基和 RH 培养基添加相同的抑制剂, 但 Gause 培养基未分离到内生放线菌; OA11 (pH 11)和 M5 培养基也未分离到内生放线菌(图 1)。

在 5 个红树林地点中, 从海南清澜港分离获

得的菌株最多, 共 26 株, 根、茎和叶中分别分离获得 20 株、2 株和 4 株; 其次为从海南东寨港采集的根中分离到 11 株; 广东深圳采集的叶和根中分别分离获得 1 株和 8 株; 从广东湛江及广西北海分离获得的菌株最少, 仅为 3 株, 均分离自根。在不同的老鼠簕植物组织中, 从根部分离获得的菌株最多, 从茎中分离获得的菌株较少, 而从花和果实中未分离到菌株(图 2)。

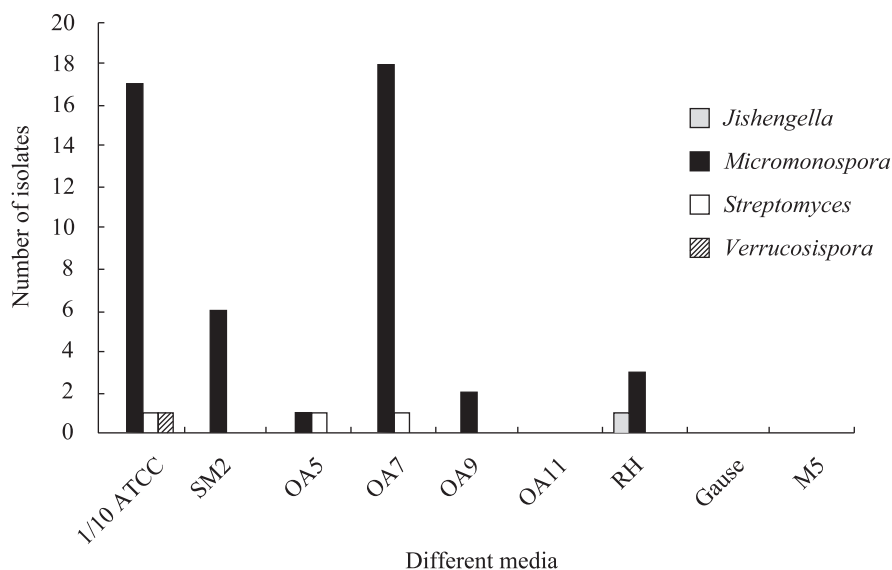


图 1 不同培养基分离到老鼠簕内生放线菌的结果

Fig. 1 Number of *Acanthus illicifolius* endophytic actinomycetes isolated on different media

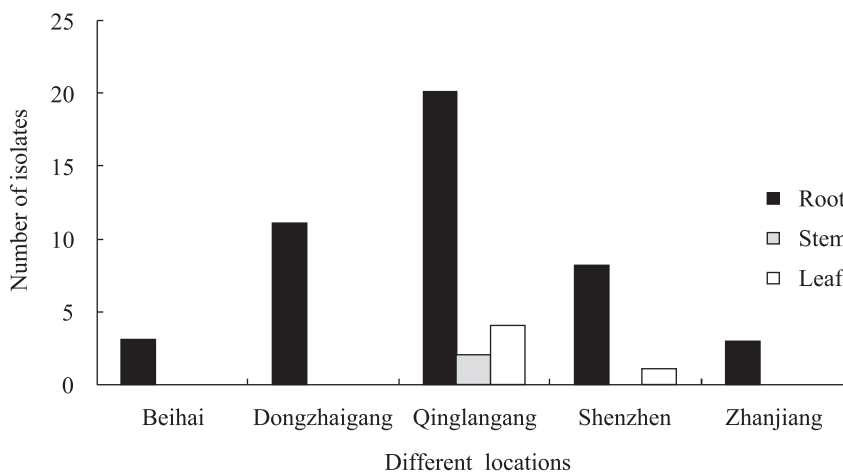


图 2 不同地点分离到老鼠簕内生放线菌的结果

Fig. 2 Number of *Acanthus illicifolius* endophytic actinomycete isolated from samples collected at different locations

2.2 菌种鉴定与小单孢菌在不同地点的分布

经 16S rRNA 基因测序, 并在 EzTaxon 上比对, 结果表明有 47 株属于小单孢菌属(图 3); 3 株属于链霉菌, 菌株 206108 (EU437817)、201206 (EU437790)和 205201 (EU437813)与 *Streptomyces pactum* NBRC 13433^T (AB184398)、*S. carpaticus* NBRC 15390^T (AB184578) 和 *S. qinglanensis* 172205^T (HQ660227) 的序列相似性分别为 99.863%、99.713% 和 99.972%; 菌株 202201 (EU560726) 与 *Micromonospora olivasterospora* DSM 43868^T (X92613) 序列相似性为 98.705%, 已经作为一个新属 *Jishengella* 发表^[8]; 菌株 201803 (EU560725) 与 *Verrucosipora giffhornensis* DSM 44337^T (Y15523) 序列相似性为 99.352%, 属于疣孢菌。

将 47 株小单孢菌的 16S rRNA 基因序列及其相近的模式菌株序列进行聚类分析, 分为 11 个 Clade (图 3)。Clade I、Clade II、Clade III、Clade IV、Clade VI、Clade VIII 和 Clade X 中的菌株序列相似性为 97.2%–100%。从图 3 可以发现, 这些 Clade 中的一些菌株 16S rRNA 基因序列相似性大于 99.2% 有可能是同一个种, 但有些分离自不同的地点, 如 Clade I 中的 ZJ201502、SZ206114 和 QL201209; 有些分离自同一地点, 如 Clade I 中的 ZJ201502 和 ZJ201505; 有些分离自同一株老鼠簕的不同部位, 如 Clade IV 中的 DZ202204 分离自茎, DZ206804 分离自根。同种数量大的以 Clade II 中的 DZ206801 为代表, 属于优势类群。

从表 1 中可以看出, 海南清澜港老鼠簕组织中分离到的菌株在 10 个 Clade (除 Clade VII) 中都有分布, 多样性最丰富, 菌株主要分离自根; 而海南东寨港和广东深圳的小单孢菌只分布在 4 个 Clade 内; 分离自广西北海的小单孢菌菌株分

布在 2 个 Clade; 分离自广东湛江的小单孢菌只在 1 个 Clade 分布。

2.3 菌株的耐盐性与固氮活性测试

针对红树林高盐与高 C/N 比的特点, 对 52 株内生放线菌进行耐盐和固氮活性测试。结果显示, 最高耐盐度达到 20% 的有 18 株, 其中 1 株不能在无盐条件下生长; 最高耐盐度在 15% 的有 4 株, 其中 1 株不能在无盐条件下生长; 最高耐盐度为 10% 的有 2 株; 最高耐盐度为 6% 的有 13 株, 其中 2 株不能在无盐条件下生长; 生长的最高盐度为 3.3% (相当于海水盐浓度) 的 12 株; 只有 3 株不能在 3.3% 以上的盐浓度条件下生长, 表现了对红树林海洋环境的适应性。表 2 为其中的 12 株不同地点的老鼠簕植物的不同组织部位分离到的菌株的耐盐性测试结果, 其中菌株 206108 为链霉菌属, 其余均为小单孢菌属。

利用无氮源基础培养基, 28 °C 培养 1 个月后观察发现, 4 株小单孢菌属的菌株 201101 (广东深圳)、菌株 201211 (海南清澜港)、菌株 201502 (广东湛江) 和菌株 201505 (广东湛江) 能够在氮源基础培养基上生长, 初步表明这 4 株菌株可能具有固氮活性。

表 1 老鼠簕内生小单孢菌主要分支群在不同地点的数量(图 3)

Table 1 The number of endophytic *Micromonospora* of *Acanthus ilicifolius* and isolate sites included in the main clade on the tree (Fig. 3)

位点 Sites	分支 Clade										
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI
北海 BH				2						1	
东寨 DZ		8		3							1 1
清澜 QL	1	1	2	2	1	3		5	1	1	3
深圳 SZ	5					1	1	1			
湛江 ZJ	5										

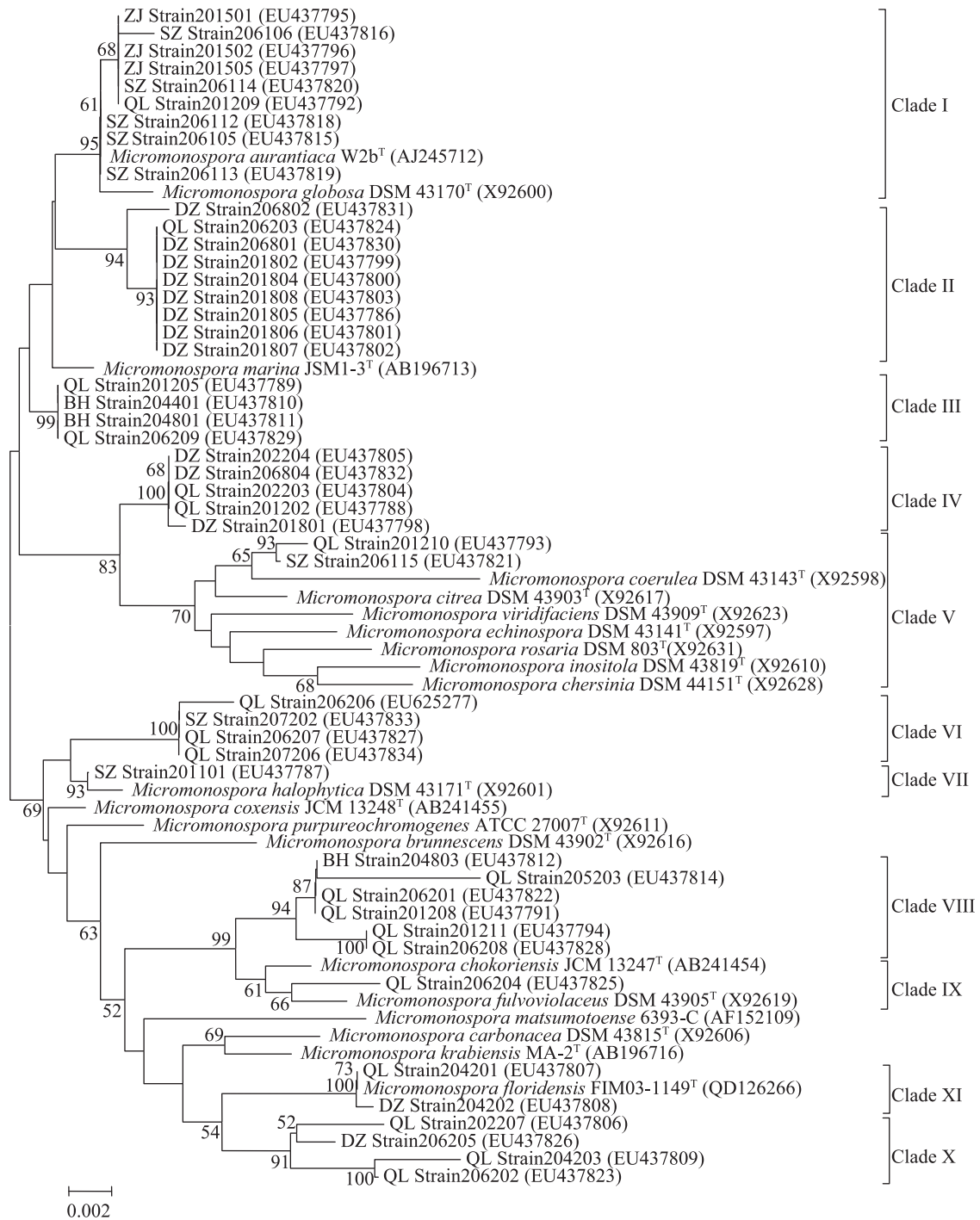


图3 根据 16S rRNA 基因序列构建的 47 株老鼠簕内生小单孢菌的聚类分析图
 Fig. 3 Phylogenetic analysis of 47 endophytic *Micromonospora* of *Acanthus ilicifolius* based on 16S rRNA gene sequences

Note: The unrooted neighbour joining phylogenetic tree of partial 16S rDNA sequences of all 47 endophytic *Micromonospora* isolates and their correlative genera and species available in GenBank database. The numbers at the nodes indicate the levels of bootstrap support based on 1 000 resamplings. Bootstrap values lower than 50 are not shown. The scale bar represents the number of inferred substitutions per 100 nucleotides. And the roman numbers resolve the tree into eleven different clades.

表 2 部分菌株的耐盐度测试结果
Table 2 Test on salinity endurance for partial isolates

菌株 Strains	地点/组织 Sites/Tissue	0	3.3%	6%	10%	15%	20%
204401	北海/根	+++	++	-	-	-	-
206802	东寨/根	+++	++	-	-	-	-
206203	清澜/叶	-	++	+	+	+	+
201202	清澜/叶	++	+	+	+	+	+
202204	清澜/茎	++	+	+	+	+	+
206206	清澜/根	-	++	+	-	-	-
201211	清澜/根	++++	-	-	-	-	-
201205	清澜/根	+++	++	-	-	-	-
201209	清澜/根	+++	+	+	+	+	+
207202	深圳/根	+	-	-	-	-	-
206108	深圳/根	++	++++	+++	+	-	-
201502	湛江/根	+	++	++	++	++	++

3 讨论

植物体内存在着多样性丰富的内生放线菌, 内生放线菌可能对宿主植物的种类有所选择, 也对宿主植物中组织的定殖部位有一定的倾向^[9]。在本研究中, 对 3 省 5 个地点采集的红树植物老鼠簕进行内生放线菌分离, 分别得到小单孢菌、链霉菌、疣孢菌和继生菌属, 获得的所有菌株都是从根、茎和叶中分离出, 未从花和果实中分离到, 说明分离到的这些属的老鼠簕内生放线菌也许不能直接通过果实或种子繁育进行传播分布。其中 82.7% 的菌株分离自老鼠簕的根部, 表明老鼠簕内生放线菌可能是来源于土壤, 而且最先感染部位可能是根部。相关研究结果也表明根部内生放线菌占比例最高, 且链霉菌为优势类群^[10]。本研究中分离到的 52 株内生放线菌中, 小单孢菌 47 株, 占了 90.4%, 链霉菌仅分离到 3 株, 仅占 5.8%, 与其它报道的植物内生放线菌研究结果不同^[11-12]。47 株小单孢菌经过初步聚类分析后, 各类群在不同地点的分布差异较大, 说明老鼠簕

内生小单孢菌在不同采集地点是不一样的, 也间接表明本研究所分离到的这些内生菌不是可遗传的, 与本研究在花和种子部分未分离到内生放线菌而根部分离数量较多的结果比较一致。

与陆栖微生物相比, 海洋微生物耐受盐浓度的范围更广泛(1%–7% NaCl), 适宜生长的盐浓度更高(2%–4% NaCl)。对本研究中所分离得到的菌株进行耐盐性测试, 结果发现多数菌株具有较强的耐盐性甚至嗜盐性。说明这些分离自红树植物老鼠簕的菌株, 与寄主植物一样, 在周期性海水浸泡的环境中具有耐盐或嗜盐的特性。刘美龄等^[13]分析了海南东寨港红树林样地的土壤含盐量, 表明在以老鼠簕为优势植物种类的样地土壤含盐量仅次于以海莲为优势植物种类的样地土壤含盐量, 达 12.103%。这说明实验中所分离得到的菌株特性与其所处的海洋环境相关。

放线菌的固氮功能受到越来越多的研究者的关注。固氮放线菌研究 *Frankia* 的较多, 但随着研究的深入, 其它属的一些固氮放线菌也有见报道, 上世纪 80 年代墨西哥科学家 Maria 从 *Casuarina*

的根瘤分离到一些非弗兰克氏菌属的固氮放线菌^[4], 经过 16S rRNA 基因序列分析, 分别属于 Thermomonosporaceae 和 Micromonosporaceae, 其中一株固氮小单孢菌 *Micromonospora* sp. L5 已经完成了全基因组测序(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_014815.1)。本研究选择无氮基础培养基培养, 初步筛选到 4 株老鼠簕内生小单孢菌可在无氮培养基上生长。弗兰克氏菌属、链霉菌属和小单孢菌属是目前研究较多的固氮放线菌, 但这些菌株均是从豆科和非豆科的根瘤中分离得到, 如果本研究分离到的 4 株老鼠簕内生小单孢菌经进一步检测确定具有固氮活性, 将是首次从非根瘤中分离获得固氮放线菌。本研究从红树植物老鼠簕内生放线菌的生态功能及分布所进行的研究, 将有助于认识内生放线菌在植物对环境适应中的作用。

参 考 文 献

- [1] Compant S, Duffy B, Nowak J, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 4951–4959.
- [2] Hasegawa S, Meguro A, Nishimura T, et al. Drought tolerance of tissue-cultured seedlings of mountain laurel (*Kalmia latifolia* L.) induced by an endophytic actinomycete I. Enhancement of osmotic pressure in leaf cells[J]. *Actinomycetologica*, 2004, 18(2): 43–47
- [3] 曹启民, 郑康振, 陈耿, 等. 红树林生态系统微生物学研究进展[J]. *生态环境*, 2008, 17(2): 839–845
- [4] Ryther JH, Dunstan WM. Nitrogen, phosphorus, and eutrophication in the coastal marine environment[J]. *Science*, 1971, 171(3975): 1008–1013.
- [5] 霍长弘, 赵玉英, 梁鸿, 等. 老鼠簕化学成分的研究[J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(10): 763–765.
- [6] Hong K, Gao AH, Xie QY, et al. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China[J]. *Marine Drugs*, 2009, 7(1): 24–44.
- [7] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 254–255.
- [8] Xie QY, Wang C, Wang R, et al. *Jishengella endophytica* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Micromonosporaceae*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(5): 1153–1159.
- [9] Adams P D, Klopper J W. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. *Plant and Soil*, 2002, 240(1): 181–189.
- [10] 魏玉珍, 张玉琴, 赵莉莉, 等. 广西山口红树林内生放线菌的分离、筛选及初步鉴定[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(6): 823–828.
- [11] 朱文勇, 李洁, 赵国振, 等. 喜树内生放线菌多样性及抗菌活性评价[J]. *微生物学通报*, 2010, 37(2): 211–216.
- [12] 涂璇, 黄丽丽, 高小宁, 等. 黄瓜内生放线菌的分离、筛选及其活性菌株鉴定[J]. *植物病理学报*, 2008, 38(3): 244–251.
- [13] 刘美龄, 叶勇, 曹长青, 等. 海南东寨港红树林土壤粒径分布的分形特征及其影响因素[J]. *生态学杂志*, 2008, 27(9): 1557–1561.
- [14] Valdés M, Pérez N-O, Santos PE, et al. *Non-Frankia* actinomycetes isolated from surface-sterilized roots of *Casuarina equisetifolia* fix nitrogen[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(1): 460–466.