

## 植物内生放线菌的选择性分离

张金丽 秦玉丽 熊子君 赵国振 朱文勇 赵立兴 徐丽华\*

(云南大学 云南省微生物研究所 云南省微生物资源保护与利用重点实验室 云南 昆明 650091)

**摘要:** 【目的】更好地发掘内生菌资源, 建立有效的植物内生放线菌分离方法。【方法】比较不同消毒剂 and 消毒程序、样品预处理、选择性分离培养基等分离内生放线菌的效果, 通过形态及 16S rRNA 基因序列分析进行菌种鉴定。【结果】用 5% 的次氯酸钠处理样品 4–7 min 消毒效果最好; 100 °C 处理样品 15 min 能较好地减少真菌和细菌的干扰。丙酸钠、琥珀酸钠等培养基分离放线菌出菌率较高且类群多样性丰富。【结论】植物样品表面消毒干燥后, 100 °C 处理 15 min, 用无菌搅拌杯打碎, 直接撒植物于分离培养基中的分离方法效果较好。

**关键词:** 植物内生放线菌, 表面消毒, 预处理, 分离培养基

## The selective isolation of endophytic actinomycetes

ZHANG Jin-Li QIN Yu-Li XIONG Zi-Jun ZHAO Guo-Zhen ZHU Wen-Yong  
ZHAO Li-Xing XU Li-Hua\*

(Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China)

**Abstract:** [Objective] In order to obtain more resources of endophytic actinomycetes, the aim of the study is to establish an effective method of isolating endophytic actinomycetes. [Methods] Disinfectant and sterilization procedures, pretreatment method, isolation medium were compared. The isolates were identified based on morphology and 16S rRNA gene sequence analysis. [Results] It is very effective for samples sterilized 4–7 minute with 5% NaClO. The

基金项目: NSCF-云南联合基金项目(No. U0932601)

\*通讯作者: Tel: 86-871-5935263; ✉: lihxu@ynu.edu.cn

收稿日期: 2012-09-13; 接受日期: 2012-11-21

pretreatment method of processing sample 15 minutes at 100 °C have a good effect on reducing the interference of fungi and bacteria. Isolation mediums containing sodium propionate and sodium succinate have good effect on isolation. **[Conclusion]** The isolation method that plant samples were surface sterilized and dried, processed 15 minutes at 100 °C, broken in a sterile mixing cup, and then were separated on isolation medium is very useful.

**Keywords:** Endophytic actinomycetes, Surface sterilization, Pretreatment, Isolation medium

植物内生菌(Edophytes)是指在生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物组织内部或细胞间隙,不引起植物产生明显症状的微生物<sup>[1]</sup>。植物内生菌与植物在长期协同进化过程中相互依存和相互作用,不仅对寄主植物有促生、防病和内生固氮等有益的生物学作用<sup>[2-4]</sup>,而且由于基因的转移<sup>[5]</sup>或植物成分的诱导,使植物内生菌形成了产生某些与宿主植物相同或相似化合物的能力<sup>[6-8]</sup>。因此,发掘内生菌资源具有重要的科学价值和应用潜力。研究表明,植物内生放线菌不仅宿主分布广泛、种类丰富多样<sup>[9-10]</sup>而且还能产生多种多样的活性物质,在农业生产、医药等领域都显示出广泛的应用前景<sup>[11]</sup>。但由于放线菌较真菌和细菌生长缓慢,在分离中既要抑制真菌和细菌的生长,又要尽量避免影响内生放线菌的生长。为此,建立有效的内生放线菌分离方法是开展植物内生放线菌资源研究的首要前提。本实验室近年在开展云南药用植物内生放线菌的研究过程中,通过对植物样品表面消毒、预处理、分离培养基等关键分离因素的比较研究,建立了一系列分离植物内生放线菌的有效方法。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品来源:** 实验植物样品美登木(*Maytenus austroyunnanensis*)、哥纳香(*Goniothalamus yunnanensis*)、露水草(*Cyanotis arachnoidea*)、土党参

(*Campanumoea javanica*)、金粟兰(*Chloranthus spicatus*)、木麻黄(*Casuarina naequisetifolia* L.)等采集于云南西双版纳景洪、勐海等地。

**1.1.2 分离培养基:** A (酵母膏培养基, g/L): 酵母浸膏 0.25, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, 琼脂 15, pH 7.2。

B (腐植酸培养基, g/L): 腐植酸 1 (溶解于 10 mL 0.2 mol/L 的 NaOH 中), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, KCl 1.71, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, CaCO<sub>3</sub> 0.02, 琼脂 15, pH 7.2。

C (天门冬酰胺-酪素-丙酸钠培养基, g/L): L-天门冬酰胺 1, 酪素 2, 丙酸钠 4, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 琼脂 15, pH 7.2。

D (几丁质培养基, g/L): 几丁质 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.7, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1, ZnSO<sub>4</sub> 0.001, MnCl<sub>2</sub> 0.001, 琼脂 15, pH 7.2。

E (海藻糖培养基, g/L): 海藻糖 6, KNO<sub>3</sub> 0.5, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.3, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, CaCl<sub>2</sub> 0.3, 琼脂 15, pH 7.2。

F (丙酸钠培养基, g/L): 丙酸钠 2, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 0.1, KCl 0.1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, 琼脂 15, pH 7.2。

G (改良无机盐淀粉培养基, g/L): 可溶性淀粉 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, MgSO<sub>4</sub> 0.5, KNO<sub>3</sub> 1, NaCl 0.4, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 琼脂 15, pH 7.2。

H (棉子糖-组氨酸培养基, g/L): 棉子糖 5, L-组氨酸 1, KNO<sub>3</sub> 1, NaCl 1, CaCl<sub>2</sub> 2, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1, 琼脂 15, pH 7.2。

I (琥珀酸钠培养基, g/L): 琥珀酸钠 0.9,

$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.5,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01, 琼脂 15, pH 7.2。

J (柠檬酸盐培养基, g/L): 柠檬酸 0.12,  $\text{NaNO}_3$  1.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1,  $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.05, EDTA (乙二胺四乙酸) 0.02,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.2, 琼脂 15, pH 7.2。

K (水琼脂培养基, g/L): 琼脂 15, pH 7.2。

所有培养基中均加入抑制剂: 萘啶酮酸 25 mg/L, 制霉菌素 50 mg/L, 重铬酸钾 25 mg/L。

## 1.2 方法<sup>[12-14]</sup>

**1.2.1 样品表面消毒:** 用清水冲洗植物样品表面, 随后再用超声波反复清洗, 直至水呈清澈。

消毒程序: 清洗好的样品 → 0.01%吐温 20 处理 30 s → 有效氯含量为 5%的次氯酸钠处理 4-7 min (根、茎、叶处理时间不同) → 无菌水清洗多次 → 无菌 2.5%硫代硫酸钠处理 10 min → 75%乙醇处理 5 min → 无菌水清洗多次 → 无菌 5%-10%碳酸氢钠处理 10 min → 置于无菌铺有滤纸的培养皿中干燥。

表面消毒效率的检测: 取最后一次清洗植物组织的洗涤水 0.2 mL 涂布于麦芽膏-酵母膏固体培养基上, 置 28 °C 培养 3 周, 检测表面消毒的效果。

**1.2.2 样品预处理:** (1) 高温处理。样品表面消毒干燥后, 置 100 °C 处理 15 min, 然后进行菌种分离。

(2) 冷冻处理。样品表面消毒干燥后, -80 °C 冷冻 7 d, 然后进行菌种分离。

(3) 液氮研磨涂布。样品表面消毒干燥后, 在无菌研钵中加入液氮研磨, 然后进行菌种分离。

(4) 抑制剂浸泡。样品表面消毒干燥后, 置于抑制剂水溶液中浸泡 7 min, 然后进行菌种分离。抑制剂浓度分别为:

I: 萘啶酮酸 25 mg/L, 制霉菌素 50 mg/L, 重铬酸钾 25 mg/L;

II: 萘啶酮酸 50 mg/L, 制霉菌素 100 mg/L, 重铬酸钾 50 mg/L;

III: 萘啶酮酸 75 mg/L, 制霉菌素 150 mg/L, 重铬酸钾 75 mg/L;

IV: 萘啶酮酸 100 mg/L, 制霉菌素 200 mg/L, 重铬酸钾 100 mg/L。

**1.2.3 菌种分离:** 表面消毒后的样品放入无菌搅拌杯中捣碎, 涂布于分离培养基上, 28 °C 培养 4 周以上, 待放线菌长出后, 挑取少量菌体用改良无机盐淀粉培养基纯化。纯化后的菌株接种于麦芽膏-酵母膏培养基。

**1.2.4 菌种鉴定:** 菌株通过培养、形态特征的观察后初步归类, 选取代表性菌株提取 DNA<sup>[15]</sup>, 用细菌通用引物扩增 16S rRNA 基因。用 PA (8-27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 作正向引物, 测定 16S rRNA 基因 5'端部分序列(953-1 134 bp)。利用 BLAST 程序, 从 GenBank、EMBL、NCBI 等公共数据库中进行相似性比对, 初步鉴定到属。

## 2 结果与讨论

### 2.1 样品表面消毒

表面消毒是植物内生菌研究中一个非常重要的环节, 旨在杀死外源菌的情况下, 尽量减少对内生菌的伤害。不同的消毒剂类型、消毒剂浓度和消毒时间等均直接影响表面消毒效果。

在对样品进行表面消毒前, 其样品表面残留的土壤颗粒等是导致表面消毒不彻底, 引起污染的主要原因之一。为了有效避免根际土壤和植物表面微生物的干扰, 我们在用清水冲洗的基础上, 随后采用超声波处理样品 3-5 min, 能有效减少腐生菌的干扰, 空白对照基本为阴性。

比较了次氯酸钠、乙醇、吐温 20、硫代硫酸钠、碳酸氢钠的不同浓度, 不同组合以及处理时间, 对样品表面消毒效果的影响, 研究发现: 用

有效氯含量为 5%的次氯酸钠处理样品作用较为温和,当处理时间为 4-7 min 时,分离得到的内生菌数量和种类差别不大,当处理时间延长至 8 min 以上时,分离到的内生菌数量和种类随着时间的延长明显减少。

为了降低残留的次氯酸钠对内生菌的毒害,在消毒后采用 2.5%浓度的硫代硫酸钠代替无菌水冲洗植物,实验组较对照组内生放线菌的菌落有明显的增加,其效果具有普遍性。

研究结果显示,采用 5%-10%的碳酸氢钠浸泡植物样品,能够抑制真菌,处理后虽然放线菌的出菌时间略有延长,但能有效地抑制内生真菌的干扰,提高了放线菌的出菌率。究其原因可能是由于 10%浓度的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液呈略碱性,起到了平衡植物组织表面酸碱度的作用,同时抑制了真菌的生长。

## 2.2 样品预处理

由于内生放线菌的生长较细菌和真菌缓慢,为提高稀有内生放线菌的出菌率,有效抑制细菌和真菌的干扰,比较了高温、冷冻、液氮研磨涂布、抑制剂浸泡等样品预处理方法。

**2.2.1 高温处理:** 研究结果表明(表 1),通过高温处理后,从哥纳香、露水草和金粟兰样品中分离到的内生放线菌数量都有不同程度的增加;未处理的哥纳香、露水草细菌生长极为旺盛,基本不能分离到放线菌。表明适当的高温处理可有效地抑制细菌的生长,对放线菌的分离有一定促进作用。而美登木、土党参经高温处理后分离到的放线菌数量反而减少,其原因可能是植物组织块中含水分较多,影响了高温处理的效果,因此对于水分含量较高的植物不适合采用高温预处理。

**2.2.2 冷冻处理:** 样品经过冷冻处理后,分离培养基上细菌的数量显著减少,分离到的放线菌数量明显增加(表 1),且生长较为良好。这可能是由于革兰氏阳性菌对低温的抵抗力较阴性菌强,而革兰氏阳性菌中产孢类型的抵抗力又比不产孢子的细菌强。放线菌产生的孢子抗逆性较强,因此通过冷冻处理,可杀死大部分革兰氏阴性菌和不产孢的革兰氏阳性菌。

**2.2.3 液氮研磨涂布:** 该方法较切块插埋法分离效果明显提高,减少了细菌和真菌的污染,分离到的放线菌种群多样性明显增加。可能是因为经

表 1 冷冻和高温处理样品后,内生放线菌分离效果比较(重复 2 次后取平均值, CFU/皿)  
Table 1 Number of endophytic actinomycetes from different samples and media by heat and freeze treatment (average number from two repetitive experiments, CFU/plate)

样品 Samples	未处理 No treatment					高温处理 Heat treatment					冷冻处理 Freeze treatment				
	E	F	H	I	J	E	F	H	I	J	E	F	H	I	J
美登木 <i>Maytenus austroyunnanensis</i>	11	8	4	7	8	10	4	7	5	3	8	12	64	11	56
哥纳香 <i>Goniothalamus yunnanensis</i>	0	0	0	0	0	12	10	8	6	12	22	14	72	52	62
露水草 <i>Cyanotis arachnoidea</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	24	16	60	13	58
金粟兰 <i>Chloranthus spicatus</i>	4	5	2	5	7	3	2	20	5	4	18	14	58	15	64
土党参 <i>Campanumoea javanica</i>	3	2	3	5	3	0	0	0	0	0	22	15	46	56	12

注: E, F, H, I, J 与材料与方法中的分离培养基相对应。

Note: E, F, H, I, J correspond with isolation mediums in materials and methods.

过液氮研磨, 有利于释放植物组织中的内生菌。

**2.2.4 抑制剂浸泡:** 由于内生菌可利用植物组织块中的营养生长于组织块上, 因此在培养基中加入抑制剂对组织块上生长的内生菌难以发挥作用。我们尝试用抗生素制剂浸泡消毒后的植物组织块, 抑制细菌和真菌的生长, 来提高放线菌的出菌率。研究表明(表 2), 菝葜经 II 级浸泡, 薯蓣经 III 级浸泡, 百部经 III、IV 级浸泡, 木麻黄经 III 级浸泡后放线菌的出菌率都显著增加。用抑制剂浸泡植物组织可有效的提高植物内生放线菌的出菌率, 进一步证实抑制内生真菌、细菌的生长有利于内生放线菌的分离。实验中各种植物最适的抑制剂浸泡浓度不同, 其分离放线菌的效果不同, 这可能与植物组织特性和抑制剂的渗透性有关。为此, 应根据不同的植物组织特性选择合适的抑制剂浓度处理植物样品。

除了上述 4 种比较有效的预处理方法外, 我们还尝试了一些其他预处理方法可供参考。一般

从单宁类物质含量较高的植物组织中分离到的内生菌数量较少, 我们用 0.2% 的 PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 水溶液对单宁含量较高的植物进行预处理, 可有效地提高内生菌的出菌数量和种类。植物样品表面消毒干燥, 置于 100 °C 高温处理 15 min, 打碎后取约 1 g 置于 9 mL 孢子诱导剂中(1% 腐殖酸 + 0.05% SDS (十二烷基硫酸钠) + 9 mL pH 7.4 的 PBS (磷酸盐缓冲液) + 0.005% 制霉菌素或 6% 酵母膏 + 0.05% SDS + 9 mL pH 7.4 PBS + 0.005% 制霉菌素), 37 °C 摇床培养 30 min, 静置沉淀后, 取上清稀释至 10<sup>-1</sup> 涂板, 能大大缩短放线菌的出菌时间, 经处理过的样品在出菌率和多样性上均比对照组显著提高。用该方法<sup>[16]</sup>从喜树中分离到了一些稀有放线菌类群, 包括糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)、糖多孢菌属(*Saccharopolyspora*)、芽球菌属(*Blastococcus*)、假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)和小单孢菌属(*Micromonospora*)等。钙离子具有

表 2 抑制剂浸泡处理后, 分离到的放线菌数量(重复 2 次后取平均值, CFU/皿)

Table 2 Number of endophytic actinomycetes from different samples and media by treatment with chemical germicides (average number from two repetitive experiments, CFU/plate)

样品 Samples	处理方法 Processing method	分离培养基 Isolation medium					样品 Samples	处理方法 Processing method	分离培养基 Isolation medium				
		A	B	G	E	F			A	B	G	E	F
拔契 <i>Smilax Glabra Roxb.</i>	Control	0	0	0	0	0	薯蓣 <i>Dio- scorea cirrhosa</i>	Control	2	1	1	1	1
	I	0	0	0	0	0		I	1	1	2	1	1
	II	17	13	12	8	5		II	1	1	1	1	1
	III	6	7	3	3	2		III	5	2	2	3	2
	IV	0	1	0	0	1		IV	0	0	0	2	1
百部 <i>Stemona tuberosa Lour.</i>	Control	0	0	1	0	0	木麻黄 <i>Casuari naequi- setifolia L.</i>	Control	0	1	0	0	0
	I	0	0	0	0	0		I	1	2	0	1	0
	II	1	0	1	0	0		II	1	3	2	1	2
	III	2	2	1	1	2		III	5	5	6	5	4
	IV	5	2	3	0	0		IV	1	0	1	0	0

注: A, B, G, E, F 与材料与方法中的分离培养基相对应。I, II, III, IV 在材料与方法中有详细介绍。

Note: A, B, G, E, F correspond with isolation mediums in materials and methods. I, II, III, IV have a detailed introduction in materials and methods.

刺激放线菌产生孢子、气生菌丝萌发的作用<sup>[17-18]</sup>。采用碳酸钙粉末富集的方法<sup>[19]</sup>处理美登木, 对小单孢菌属 (*Micromonospora*)、原小单孢菌属 (*Promicromonospora*)、链孢囊菌属 (*Streptosporangium*) 有较好的分离效果。

### 2.3 分离培养基的比较

分离培养基是选择性分离的关键。相对于土壤环境, 植物内生放线菌的生长环境中营养成分较为贫乏, 为此选用含有机碳较少的培养基可有效的抑制真菌和细菌, 有利于内生放线菌的分离<sup>[20-21]</sup>。在采用植物表面消毒→高温预处理→无菌搅拌杯中打碎→直接撒植物分离程序的基础上, 我们选用或设计了 10 多种培养基对内生菌进行分离效果的比较, 希望能发现一些分离效果较好的培养基。结果显示采用自行设计的丙酸钠培养基、琥珀酸钠培养基、柠檬酸盐培养基分离效果很好, 其放线菌出菌率较高(表 3), 且种类丰

富(表 4), 从这 3 种培养基中分离到了除链霉菌属以外的假诺卡氏菌属(*Pseudonocardia*)、野野村菌属(*Nonomurae*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)、原小单孢菌属、拟诺卡氏菌属(*Nocardiosis*)、糖霉菌属(*Glycomyces*); 一些经典的培养基(如腐植酸培养基、酵母膏培养基、几丁质培养基)分离效果也较好, 分离到的内生放线菌数量和种类均较为丰富, 也分离到了一些稀有放线菌属(表 4)。海藻糖-脯氨酸培养基、棉子糖-组氨酸培养基等有机碳含量较高的培养基分离到的放线菌数量虽然不多, 但可分离到一些颜色和形态较为特殊的稀有类群, 研究发现, 细菌在这两种培养基上生长较旺盛, 影响了放线菌的分离, 因此应用于内生菌分离时可适当减少有机碳源和氮源的含量。

### 2.4 分离方法的比较

**2.4.1 直接撒植物:** 在内生菌的分离中植物组织插埋法是比较常用的方法, 此方法操作简便, 但

表 3 不同培养基分离到的内生放线菌数目(重复 2 次取平均值, CFU/皿)  
Table 3 Number of endophytic actinomycetes from the different medium and plant samples (average number from two repetitive experiments, CFU/plate)

培养基 Media	A	B	C	K	D	E	F	G	H	I	J	合计 Total
美登木 <i>Maytenus austroyunnanensis</i>	11	8	3	4	15	7	8	4	7	15	26	108
血满草 <i>Sambucus adnata</i>	8	10	0	4	10	5	8	2	3	11	13	74
大叶仙茅 <i>Curculigo capitulata</i>	14	9	3	5	9	6	6	3	4	13	17	89
两面青 <i>Maesa indica</i>	11	8	1	3	5	3	6	4	4	15	8	68
马莲鞍 <i>Streptocaulon griffithii</i>	14	8	2	4	4	9	12	0	5	6	12	76
土党参 <i>Campanumoea javanica</i>	3	2	0	3	6	5	3	3	5	12	7	49
穿破石 <i>Cudrania cochinchinensis</i>	7	5	4	3	5	6	5	2	2	3	12	54
金粟兰 <i>Chloranthus spicatus</i>	4	5	1	4	9	5	7	2	5	6	11	59
合计 Total	79	60	15	33	69	51	60	21	39	88	119	634
百分比 Percentage (%)	12.5	9.5	2.4	5.2	10.9	8.0	9.5	3.3	6.2	13.9	18.8	

注: A, B, C, K, D, E, F, G, H, I, J 与材料与方法中的分离培养基相对应。

Note: A, B, C, K, D, E, F, G, H, I, J correspond with isolation mediums in materials and methods.

表 4 不同培养基分离的内生放线菌类群及数目(重复 2 次取平均值, CFU/皿)  
Table 4 Species and number of endophytic actinomycetes from the different medium  
(average number from two repetitive experiments, CFU/plate)

属/培养基 Genus/Media	A	B	C	K	D	E	F	G	H	I	J	合计 Total	百分比 Percentage (%)
链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	32	24	12	21	33	30	32	10	27	44	48	313	49.4
假诺卡氏菌属 <i>Pseudonocardia</i>	9	3	0	2	7	2	3	0	0	5	14	45	7.1
野野村菌属 <i>Nonomuraea</i>	8	7	0	0	8	2	5	0	2	7	17	57	9.0
糖霉菌属 <i>Glycomyces</i>	9	9	0	3	7	7	5	3	0	15	13	62	9.8
诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>	7	5	2	2	5	5	6	3	7	5	11	58	9.1
拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>	7	7	1	3	4	5	6	5	3	7	7	55	8.7
原小单孢菌属 <i>Promicromonospora</i>	7	5	0	2	5	0	3	0	0	5	9	35	5.5
合计 Total	79	60	15	33	69	51	60	21	39	88	119	634	

注: A, B, C, K, D, E, F, G, H, I, J 与材料与方法中的分离培养基相对应。

Note: A, B, C, K, D, E, F, G, H, I, J correspond with isolation mediums in materials and methods.

对于从植物组织上长出附着在组织块上的内生真菌、细菌的干扰较难控制, 因为培养基中的抑制剂很难起到作用, 我们把表面消毒后的样品放入无菌搅拌杯中充分捣碎, 再撒于分离培养基上, 相比组织插埋法, 小而薄的植物组织能够更好地与分离培养基贴合, 使培养基中的抑制剂更好的发挥作用, 还能为内生菌的生长提供更大的表面积。

**2.4.2 稀释涂布:** 该方法能有效的减轻内生真菌的干扰, 但内生细菌的生长十分旺盛。梯度稀释能在一定程度上避免密度大的细菌类群迅速覆盖培养基, 但同时也可能丢失一些本来在植物组织内密度就较低的放线菌类群。

以上两种方法各有优势, 研究结果表明, 直接撒植物的方法分离到的放线菌无论在数量还是种类上都是比较丰富, 我们通常选用的方法是: 植物表面消毒→高温处理(在抑制细菌干扰方面效果具有普遍性)→无菌搅拌杯中打碎→直

接撒植物分离。

## 2.5 菌株鉴定结果

采用上述分离方法, 本课题组多年来在鉴定分离菌株的过程中, 发现很多稀有放线菌类群, 至少分离到 39 个属, 发表了 2 个新属和 30 多个新物种。

## 3 结论

综合上述结果, 我们推荐采取以下方法分离植物内生放线菌:

(1) 选用 0.01%吐温 20 处理 30 s→有效氯含量为 5%的次氯酸钠处理 4-7 min (根、茎、叶处理时间不同)→无菌水清洗多次→无菌 2.5%硫代硫酸钠处理 10 min→75%乙醇处理 5 min→无菌水清洗多次→无菌 5%-10%碳酸氢钠处理 10 min 分步处理的程序, 能确保植物样品表面消毒彻底, 没有外源菌污染。

(2) 采用高温、冷冻、液氮研磨、抑制剂浸

泡处理的方式对植物样品进行预处理,能显著抑制细菌和真菌生长,有利于释放植物组织中的放线菌,提高内生放线菌的出菌率。

(3) 冷冻处理程序对部分样本效果较好(上述提及的植物),对其它植物效果不具备普遍性,仅适合少量样品的预处理;高温处理程序效果具有普遍性,适用于绝大部分植物的预处理。

(4) 以丙酸盐等小分子有机酸和柠檬酸盐、琥珀酸盐等三羧酸循环的中间产物作为碳源的培养基对内生放线菌的分离效果较好;由于内生真菌、细菌在有机碳、氮源含量较高的培养基上生长较为旺盛,不利于内生放线菌的生长;土壤放线菌分离中所使用的经典培养基,如腐植酸培养基和几丁质培养基等均适合于分离内生放线菌。

本实验室秦盛<sup>[19]</sup>分别用免培养和纯培养方法,对滇南美登木内生放线菌的群落组成进行了较系统的研究,结果表明,植物样品中存在着大量的未知内生放线菌新类群,但目前尚不能被分离纯培养,需要我们进一步设计更有效的分离程序,不断改进分离方法,以期获得更多的内生放线菌新资源。由于植物间的差异性,每种植物内生放线菌的最佳分离程序不尽相同,实验中需要综合考虑各个分离因素,结合多种分离方法,尽可能获得更多的放线菌资源。

**致谢:** 感谢陈华红、秦盛、李洁为本文提供部分实验数据。

## 参 考 文 献

- [1] Stone JK, Bacon CW, White JF. Microbial Endophytes[M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29.
- [2] 冯永君, 宋末. 植物内生细菌[J]. 自然杂志, 2001, 23(5): 249-252.
- [3] Daisy BH, Strobel GA, Castillo U, et al. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus[J].

Microbiology, 2002, 148(11): 3737-3741.

- [4] 陈丽梅, 樊妙姬, 李玲. 甘蔗固氮内生菌——重氮营养醋杆菌的研究进展[J]. 微生物学通报, 2000, 27(1): 63-66.
- [5] Germaine K, Keogh E, Garcia-Cabellos G, et al. Colonisation of poplar trees by *gfp* expressing bacterial endophytes[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2004, 48(1): 109-118.
- [6] Shrestha K, Strobel GA, Shrivastava SP, et al. Evidence for paclitaxel from three new endophytic fungi of Himalayan yew of Nepal[J]. Planta Medica, 2001, 67(4): 374-376.
- [7] Strobel GA, Hess WM, Li JY, et al. *Pestalotiopsis guepinii*, a taxol-producing endophyte of the Wollemi pine, *Wollemia nobilis*[J]. Australian Journal of Botany, 1997, 45(6): 1073-1082.
- [8] Wang JF, Li GL, Lu HY, et al. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2000, 193(2): 249-253.
- [9] Qin S, Li J, Zhang YQ, et al. *Plantactinospora maytenigen*. nov., sp. nov., a member of the family *Micromonosporaceae*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(10): 2527-2533.
- [10] Li J, Zhao GZ, Zhu WY, et al. *Phytomonospora endophytica* gen. nov., sp. nov., a novel actinomycete of the family *Micromonosporaceae* isolated from the roots of *Artemisia annua* L.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2011, 61(12): 2967-2973.
- [11] Ryan RP, Germaine K, Franks A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(1): 1-9.
- [12] 徐丽华, 娄恺, 张华, 等. 微生物资源学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2010: 207-210.
- [13] 姜怡, 段淑蓉, 唐蜀昆, 等. 稀有放线菌分离方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 181-183.
- [14] 陈华红, 杨颖, 姜怡, 等. 植物内生放线菌的分离方法[J]. 微生物学通报, 2006, 33(4): 182-185.

- [15] Li WJ, Xu P, Schumann P, et al. *Georgenia ruanii* sp. nov., a novel actinobacterium isolated from forest soil in Yunnan (China), and emended description of the genus *Georgenia*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(7): 1424–1428.
- [16] 朱文勇. 喜树纯培养内生放线菌多样性及活性评价[D]. 昆明: 云南大学硕士学位论文, 2010.
- [17] Natsume M, Yasui K, Marumo S. Calcium ion regulates aerial mycelium formation in actinomycetes[J]. The Journal of Antibiotics, 1989, 42(3): 440–447.
- [18] Otoguro M, Hayakawa M, Yamazaki T, et al. An integrated method for the enrichment and selective isolation of *Actinokineospora* spp. in soil and plant litter[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 91(1): 118–130.
- [19] 秦盛. 滇南美登木内生放线菌多样性及生物活性初步研究[D]. 昆明: 云南大学博士学位论文, 2009.
- [20] EL-Nakeeb MA, Lechvalier HA. Selective isolation of aerobic actinomycetes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1963, 11(2): 75–77.
- [21] Janssen PH, Yates PS, Grinton BE, et al. Improved culturability of soil bacteria and isolation in pure culture of novel members of the divisions *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Verrucomicrobia*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(5): 2391–2396.

~~~~~  
(上接 p.1278)

## 征 稿 简 则

### 3.3 摘要写作注意事项

3.3.1 英文摘要: 1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者得出的; 2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; 3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; 4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; 6) 在英文摘要中, 不要使用中文字体标点符号。

3.3.2 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如基因、表达……

## 4 特别说明

### 4.1 关于测序类论文

凡涉及测定 DNA、RNA 或蛋白质序列的论文, 请先通过国际基因库 EMBL (欧洲)或 GenBank (美国)或 DDBJ (日本), 申请得到国际基因库登录号 (Accession No.)后再投来。

### 4.2 关于版权

4.2.1 本刊只接受未公开发表的文章, 请勿一稿两投。

4.2.2 凡在本刊通过审稿、同意刊出的文章, 所有形式的 (即各种文字、各种介质的)版权均属本刊编辑部所有。作者如有异议, 敬请事先声明。

4.2.3 对录用的稿件编辑部有权进行文字加工, 但如涉及内容的大量改动, 将请作者过目同意。

4.2.4 文责自负。作者必须保证论文的真实性, 因抄袭剽窃、弄虚作假等行为引发的一切后果, 由作者自负。

### 4.3 审稿程序及提前发表

4.3.1 来稿刊登与否由编委会最后审定。对不录用的稿件, 一般在收稿 2 个月之内通过 E-mail 说明原因, 作者登陆我刊系统也可查看。稿件经过初审、终审通过后, 作者根据编辑部返回的退修意见进行修改补充, 然后以投稿时的用户名和密码登陆我刊系统上传修改稿, 待编辑部复审后将给作者发稿件录用通知单, 稿件按照投稿先后排队发表。

4.3.2 对投稿的个人和单位一视同仁。坚持文稿质量为唯一标准, 对稿件采取择优先登的原则。如作者要求提前发表, 请在投稿的同时提出书面报告, 说明该研究成果的重要性、创新性、竞争性和提前发表的必要性, 经过我刊的严格审查并通过后, 可予提前刊出。

## 5 发表费及稿费

论文一经录用, 将在发表前根据版面收取一定的发表费并酌付稿酬、赠送样刊。

## 6 联系方式

地址: 北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部(100101)

Tel: 010-64807511

E-mail: tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>