



## 研究报告

## 西双版纳、白茫雪山、波罗的海南岸地衣纯培养放线菌多样性

姜龙芊<sup>1</sup> 张坤<sup>1</sup> 李桂鼎<sup>1,2</sup> 王欣宇<sup>3</sup> 姜怡<sup>\*1</sup> 王立松<sup>3</sup> 姜成林<sup>1</sup>

1 云南大学生命科学学院云南省微生物研究所 云南 昆明 650091

2 东北大学生命与健康学院微生物药物研究所 辽宁 沈阳 110819

3 中国科学院昆明植物研究所 东亚植物多样性与生物地理学重点实验室 云南 昆明 650201

**摘要:**【背景】在地衣共生系统中除了共生真菌、藻类以外,还蕴藏着丰富的放线菌资源。【目的】采集来自云南西双版纳、白茫雪山、德国波罗的海南岸3个地区的地衣,对获得的地衣纯培养放线菌进行多样性分析。【方法】采用3种放线菌选择分离培养基,通过平板稀释涂布法分离放线菌。通过比较16S rRNA基因序列相似性以及构建系统发育树,确定纯培养放线菌的分类地位。【结果】共分离菌株1123株,鉴定417株。其中从西双版纳17份地衣样品中分离纯化到107株放线菌,分布在7个目14个科33个属,潜在新种18株,其中链霉菌为优势菌属;从白茫雪山7份地衣样品中分离纯化到103株放线菌,分布在4个目5个科9个属,潜在新种16株。其中链霉菌为优势菌属,占比39%;从波罗的海南岸5份地衣样品中分离纯化到65株放线菌,分布在4个目8个科18个属,潜在新种5株,潜在新种菌和链霉菌为优势菌属。【结论】在本研究条件下,西双版纳可培养地衣放线菌多样性较白茫雪山和波罗的海南岸丰富。白茫雪山地衣链霉菌居多,潜在新种占比15.5%。3个地区地衣放线菌的区系组成各不相同,这与3个地区地衣所处地理环境、完全不同的气候密切相关。

**关键词:** 地衣, 放线菌多样性, 西双版纳, 白茫雪山, 波罗的海南岸

## Diversity of cultivable actinomycetes associated with lichen of Xishuangbanna, Baimang Snow Mountain, and South Bank of the Baltic Sea

JIANG Long-Qian<sup>1</sup> ZHANG Kun<sup>1</sup> LI Gui-Ding<sup>1,2</sup> WANG Xin-Yu<sup>3</sup> JIANG Yi<sup>\*1</sup>  
WANG Li-Song<sup>3</sup> JIANG Cheng-Lin<sup>1</sup>

1 Yunnan Institute of Microbiology, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091, China

2 Institute of Microbial Pharmaceuticals, College of Life and Health Sciences, Northeastern University, Shenyang, Liaoning 110819, China

3 Key Laboratory for Plant Diversity and Biogeography of East Asia, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming, Yunnan 650201, China

**Abstract:** [Background] Apart from symbiotic fungi and algae, the lichens symbiosis system also includes some symbiotic actinomycetes. [Objective] To collect lichen samples from Xishuangbanna,

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (31460005)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-871-65034073; E-mail: jiangyi@ynu.edu.cn

**Received:** 19-03-2019; **Accepted:** 29-05-2019; **Published online:** 11-06-2019  
**基金项目:** 国家自然科学基金(31460005)

**\*通信作者:** Tel: 0871-65034073; E-mail: jiangyi@ynu.edu.cn

**收稿日期:** 2019-03-19; **接受日期:** 2019-05-29; **网络首发日期:** 2019-06-11

Baimang Snow Mountain of Yunnan and South Bank of the Baltic Sea in Germany, and to analyze the diversity of pure cultivate actinomycetes associated with lichens. **[Methods]** Three actinomycetes selective media were used to isolate actinomycetes through plate dilution method. The taxonomic status of pure cultured actinomycetes was determined by comparing 16S rRNA gene sequence similarity and constructing phylogenetic tree. **[Results]** A total of 1 123 strains were isolated and 417 strains were identified. Among them, 107 strains of actinomycetes, including 18 potential new taxa, were isolated and purified from 17 lichen samples of Xishuangbanna which distributed in 7 orders, 14 families and 33 genera. *Streptomyces* was distributed widely. One hundred and three actinomycetes were separated from 7 lichen samples of Baimang Snow Mountain which belonging to 4 orders, 5 families and 9 genera. Sixteen possible new species were acquired. *Streptomyces* was the dominant genus, accounting for 39% of the total number of the actinomycetes. Total 65 strains of actinomycetes were obtained from 5 lichen samples of South Bank of the Baltic Sea which distributed among 4 orders, 8 families and 18 genera. Five potential new taxa and *Streptomyces* were the prime group. **[Conclusion]** In this study, the diversity of actinomycetes associated with lichens in Xishuangbanna was more abundant than Baimang Snow Mountain and South Bank of the Baltic Sea. Members of *Streptomyces* were predominant, and potential new taxa accounting for 15.5% of total actinomycetes associated with lichens in Baimang Snow Mountain. The floristic composition of actinomycetes associated with lichens in the three regions was different, which was closely related to the geographical environment and completely different climate of the three regions.

**Keywords:** Lichen, Actinomycetes diversity, Xishuangbanna, Baimang Snow Mountain, South Bank of the Baltic Sea

放线菌(*Actinomycetes*)是一类高(G+C)mol%含量(>50%)的革兰氏阳性细菌,因其生产各种抗生素、酶和酶抑制剂等天然产物而备受关注。到目前为止,在微生物产生的3万多种生物活性物质中有大约40%的抗生素和38%的活性物质均来自于放线菌,其中又以链霉菌产生的抗生素最多,占放线菌的76%<sup>[1]</sup>。近年来,随着抗生素耐药性的不断增加、顽固疾病和新疾病的不断涌现,急需有效新药的问世。为了应对这些挑战,一些学者提出“新产地、新菌种、新基因、新产物、新用途”的概念,建议从新生境获得新菌种,并从中发现具有开发前景的先导物<sup>[2-5]</sup>。

地衣是由共生菌和共生藻互惠共生形成的一类特殊化真菌复合体,无根、茎、叶的分化,被称为“植物界的拓荒先锋”。目前地球上已知的地衣共有3万余种,据估算仅占全部地衣总数的10%<sup>[6-8]</sup>,因此更多的地衣类群有待不断地被发现。在这些种类丰富的地衣“生境”中蕴藏着数量巨大、种类各异的微生物<sup>[9-13]</sup>。由于地衣菌藻共生的特殊性,地衣中的微生物与地衣共生体间进行着各种相互作用,

使得它们具有与土壤、海洋、植物、动物等环境微生物不同的生理生化特征,同时也表现出多种多样的生物学和生态学功能。因此从这类特殊生境中,寻找具有潜在应用价值的放线菌资源,并从其代谢产物中挖掘结构新颖的先导化合物是目前新药开发和天然产物研究的重要途径之一。

近年来,地衣微生物作为地衣的重要组成部分,受到科学界的关注,但是将其作为资源来研究的却很少,对于地衣放线菌的研究就更少。在研究金沙江干热河谷地衣放线菌的基础上,选择地理、地质、土壤、气候、植被等自然环境跨度很大的3个地区(西双版纳热带雨林、终年积雪的白茫雪山和全年气候温和的波罗的海南岸)采集地衣样品,研究地衣放线菌的多样性,为特色微生物资源的开发利用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 地衣样品信息

从云南西双版纳勐养保护区采集17份地衣样品(编号A1-A17),从云南白茫雪山采集7份地衣

(编号 B1–B7), 从波罗海南岸采集 5 份地衣(编号 C1–C5)。样品采集后立即装入无菌纸袋, 自然风干 7–10 d, 进行地衣放线菌分离。同时对地衣进行鉴定, 具体的地衣信息见表 1。

### 1.1.2 主要试剂和仪器

细菌 16S rRNA 基因扩增的通用引物 PA 和 PB, 昆明擎科生物科技有限公司; 溶菌酶、蛋白酶、dNTP、*Taq* 酶、Marker, 昆明云科生物技术有限公司; 其余试剂为国产分析纯试剂。电泳仪, Bio-Rad 公司; PCR 仪, Biometra 公司; 超声波清洗机, 上海科导超声仪器公司。

### 1.1.3 培养基(g/L)

本实验使用 YIM 171 培养基<sup>[14]</sup> (甘油-天冬酰胺培养基), YIM 91 培养基<sup>[14]</sup> (椰子汁-海藻糖培养基)和分离植物内生放线菌效果较好的 HV

培养基<sup>[15]</sup> (Humic acid-vitamin agar, HV)进行地衣纯培养放线菌的分离, 并添加抑制剂组合(制霉菌素 100 mg/L、重铬酸钾 50 mg/L、萘啶酸 25 mg/L)。同时使用 YIM 38 培养基进行菌株的纯化和保存。

YIM 171 培养基<sup>[14]</sup>: 甘油 10.0, 天冬酰胺 1.0,  $K_2HPO_4$  1.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5,  $CaCO_3$  0.3, 复合维生素 0.03, 微量盐( $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g,  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  0.1 g,  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g, 溶于 100 mL 水) 1.0 mL, 琼脂 9.0, pH 7.2–7.4。

YIM 91 培养基<sup>[14]</sup>: 豚蛋白胨 1.0, 半胱氨酸 1.0, 海藻糖 1.0,  $NaHCO_3$  4.0,  $K_2HPO_4$  0.45,  $KH_2PO_4$  0.45,  $NaCl$  0.9,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.09,  $CaCl_2$  0.09, 氯化血红素 0.01, 生物素 0.01 mg, 新鲜椰子汁 10 mL, 琼脂 9.0, pH 7.2。

表 1 地衣样品信息

Table 1 Information of lichen samples

地衣样品 Lichen samples	地衣学名 Lichen scientific name	采集地点 Collection location	生境 Habitat	海拔 Altitude (m)
A1	<i>Bulbothrix</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On plant	1 220
A2	<i>Anzia</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On bark	2 500
A3	<i>Nephomopsis</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On bark	2 400
A4	<i>Sticta</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On bark	2 300
A5	<i>Stereocaulon</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On rock	2 400
A6	<i>Hypotrachyna</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On bark	2 400
A7	<i>Everniastrum</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On bark	2 400
A8	<i>Leptogium</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On bark	1 400
A9	<i>Coccocarpia</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On bark	1 220
A10	<i>Rhizoplaca</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On plant	1 330
A11	<i>Pilophorus chrysoleuca</i>	Xishuangbanna Mengyang reserve	On rock	4 390
A12	<i>Lepraria</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On plant	3 555
A13	<i>Bryoria</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On soil	3 270
A14	<i>Xanthoparmelia</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On rock	3 920
A15	<i>Xanthoria</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On soil	4 300
A16	<i>Pannaria</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On rock	3 700
A17	<i>Cetraria</i> sp.	Xishuangbanna Mengyang reserve	On rock	4 020
B1	<i>Parmotrema tinctorum</i>	Baimang Snow Mountain	On plant	1 980
B2	<i>Ramalina fastigiata</i>	Baimang Snow Mountain	On plant	4 280
B3	<i>Umbilicaria</i> sp.	Baimang Snow Mountain	On stone	4 280
B4	<i>Cladonia ucialis</i>	Baimang Snow Mountain	On soil	4 270
B5	<i>Cladonia</i> sp.	Baimang Snow Mountain	On soil	4 270
B6	<i>Pertusaria</i> sp.	Baimang Snow Mountain	On soil	4 293
B7	<i>Usnea longissima</i>	Baimang Snow Mountain	On plant	3 520
C1	<i>Candelaria</i> sp.	South Bank of the Baltic Sea	On plant	300
C2	<i>Candelaria</i> sp.	South Bank of the Baltic Sea	On plant	300
C3	<i>Physcia dubia</i>	South Bank of the Baltic Sea	On plant	500
C4	<i>Physcia</i> sp.	South Bank of the Baltic Sea	On plant	500
C5	<i>Physcia</i> sp.	South Bank of the Baltic Sea	On plant	800

HV 培养基<sup>[15]</sup>: 腐殖酸 1.0 g 溶解于 10 mL 0.2 mol/L 的 NaOH 中过夜, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5, KCl 1.71, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05, CaCO<sub>3</sub> 0.02, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.01, 复合维生素 3.7 mg, 琼脂 10, pH 7.2。

YIM 38 培养基: Yeast extract 4.0, Glucose 4.0, Malt extract 2.5, 复合维生素 1.0 mg, 琼脂 12, pH 7.2。

## 1.2 方法

### 1.2.1 地衣样品预处理

取地衣样品先用流水冲洗 5 min, 再用无菌水(每次 20 mL)浸洗 3 次, 最后将其置于铺有滤纸的无菌培养皿中晾干。

### 1.2.2 放线菌分离及保存

经预处理后的地衣样品, 称 0.2 g 加入到装有 1.8 mL 无菌 0.1% 焦磷酸钠(Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)的无菌管中, 8 000 r/min 匀浆 1 min, 将匀浆液加入到预先放有玻璃珠的 18 mL 无菌的 0.1% 焦磷酸钠溶液中, 180 r/min 振荡 1 h, 用 0.1% 焦磷酸钠溶液进行系列梯度稀释, 使终浓度为 10<sup>-2</sup>、10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>, 吸取 200 μL 均匀涂布于预先配制好的固体培养平板上, 28 °C 倒置培养 1-4 周, 待菌落长出后, 挑取单菌落, 接种于 YIM 38 斜面上, 28 °C 培养 7-10 d, 4 °C 保存。根据菌株在 YIM 38 培养基上的特征去重复后, 对要进行鉴定的菌株用无菌的 20% 甘油(体积比)和脱脂牛奶保存。

### 1.2.3 DNA 的提取与鉴定

用 Orsini<sup>[16]</sup>的方法提取放线菌的基因组 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因的通用引物 PA (5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3')和 PB (5'-AGGAGGTGATCCAGCCGC-3')进行 PCR 扩增<sup>[14]</sup>。扩增产物送往昆明擎科生物科技有限公司进行测序。测序得到的 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud 数据库中进行序列比对, 获取菌株与有效发表菌种的相似性。使用 MEGA 7.0<sup>[17]</sup>软件采用邻接法(Neighbour-Joining)<sup>[18]</sup>构建系统进化树, 自展值(Bootstrap value)设置为 1 000。根据 16S rRNA 基因序列相似度和系统发育树来确定菌株的系统发育地位。

## 2 结果与分析

### 2.1 西双版纳地衣放线菌多样性分析

西双版纳位于云南的最南端, 北纬 21°08'-22°36', 东经 99°56'-101°50'之间, 它拥有中国唯一的热带雨林国家级自然保护区, 气候温暖湿润, 年平均气温在 18-22 °C 之间, 长夏无冬, 湿热的气候为热带植物的生长提供了良好的条件。从勐养国家自然保护区采集 17 属 17 个种的地衣样品(表 1), 采用 3 种选择性培养基分离其中的放线菌, 共获得 596 株地衣菌。根据菌落形态和培养特征去重复后, 对 213 株地衣菌进行 16S rRNA 基因测序, 放线菌 107 株。经过 EzBioCloud 数据库在线比对, 这 107 株放线菌分属于放线菌纲的 7 个目 14 个科 33 个属。从目水平分析, 微球菌目(*Micrococcales*)的物种多样性最丰富, 共分离得到 14 个属的放线菌(表 2), 占全部放线菌属的 42.4%。在获得的 33 个地衣放线菌属中链霉菌属、小单孢菌属、纤维微菌属和微杆菌属是西双版纳地衣样品中主要的放线菌类群, 这与文献[10]报道基本一致。其中草药菌属、*Paenarthrobacter*、植物杆菌属和威廉姆斯氏菌属在自然界是比较罕见的放线菌类群。潜在新种 18 株, 占比 8.5%。这些结果说明, 西双版纳地衣中蕴藏着丰富的放线菌资源, 与动物、植物、其他微生物共处于这片生物王国。

### 2.2 白茫雪山地衣放线菌多样性分析

白茫雪山位于云南西北部的德钦县, 面积 190 144 hm<sup>2</sup>, 海拔最高处的扎拉雀尼峰保护区(5 640 m)与最低处的霞若乡海拔差高差达 3 380 m。白茫雪山国家级自然保护区属于寒温性森林生态系统类型, 是中国低纬度高海拔地区生物资源保存比较完整而原始的高山针叶林区, 雪线以上终年积雪不化。保护区植物区系的科、属、种繁多, 并几乎包含了世界温带分布的所有木本属, 是生物多样性丰富的地区之一。从白茫雪山海拔 4 000 m 附近采集 6 个属 7 个种的地衣样品(表 1), 从中共分离得到 268 株地衣菌, 经形态和培养特征观察除去重

表 2 3 个地区地衣分离到的纯培养放线菌分布情况

Table 2 Composition of cultivate actinobacteria associated with three regions of lichens

目 Order	科 Family	属 Genus	西双版纳 Xishuangbanna	白茫雪山 Baimang Snow Mountain	波罗的海南岸 South Bank of the Baltic Sea
棒状杆菌目 <i>Corynebacteriales</i>	棒状杆菌科 <i>Corynebacteriaceae</i>	棒状杆菌属 <i>Corynebacterium</i>	+	-	-
	诺卡氏菌科 <i>Nocardiaceae</i>	戈登氏菌属 <i>Gordonia</i>	+	-	+
		诺卡氏菌属 <i>Nocardia</i>	+	-	-
		红球菌属 <i>Rhodococcus</i>	+	+	+
		威廉姆斯氏菌属 <i>Williamsia</i>	+	+	+
微球菌目 <i>Micrococcales</i>	短杆菌科 <i>Brevibacteriaceae</i>	短杆菌属 <i>Brevibacterium</i>	+	-	+
	纤维单胞菌科 <i>Cellulomonadaceae</i>	纤维单胞菌属 <i>Cellulomonas</i>	+	-	-
	<i>Dermacoccaceae</i>	<i>Flexivirga</i>	-	+	-
	微杆菌科 <i>Microbacteriaceae</i>	农球菌属 <i>Agrococcus</i>	+	-	-
		棍状杆菌属 <i>Clavibacter</i>	-	-	+
		短小杆菌属 <i>Curtobacterium</i>	-	-	+
		<i>Glaciibacter</i>	-	-	+
		拉贝达氏菌属 <i>Labedella</i>	-	-	+
		微杆菌属 <i>Microbacterium</i>	+	+	+
		草药菌属 <i>Herbiconiux</i>	+	-	-
		考克氏菌属 <i>Kocuria</i>	+	+	-
		亮杆菌属 <i>Leucobacter</i>	+	-	-
		植物杆菌属 <i>Plantibacter</i>	+	+	-
		<i>Naasia</i>	-	-	+
	微球菌科 <i>Micrococcaceae</i>	节杆菌属 <i>Arthrobacter</i>	+	-	+
		<i>Pseudarthrobacter</i>	+	-	+
		微球菌属 <i>Micrococcus</i>	+	-	-
		<i>Paenarthrobacter</i>	+	-	-
	原小单胞菌科 <i>Promicromonosporaceae</i>	纤维微菌属 <i>Cellulosimicrobium</i>	+	-	+
		居白蚁菌属 <i>Isoptricola</i>	+	-	-
	血杆菌科 <i>Sanguibacteraceae</i>	血杆菌属 <i>Sanguibacter</i>	-	-	+
小单胞菌目 <i>Micromonosporales</i>	小单胞菌科 <i>Micromonosporaceae</i>	游动放线菌属 <i>Actinoplanes</i>	+	-	-
		小单胞菌属 <i>Micromonospora</i>	+	-	-
丙酸杆菌目 <i>Propionibacteriales</i>	类诺卡氏菌科 <i>Nocardioideaceae</i>	气微菌属 <i>Aeromicrobium</i>	+	-	+
		类诺卡氏菌属 <i>Nocardioides</i>	-	-	+
	丙酸杆菌科 <i>Propionibacteriaceae</i>	弗莱德门氏菌 <i>Friedmanniella</i>	+	-	-
		四合球菌属 <i>Tessaracoccus</i>	+	-	-
假诺卡氏菌目 <i>Pseudonocardiales</i>	假诺卡氏菌科 <i>Pseudonocardiaceae</i>	拟无枝酸菌属 <i>Amycolatopsis</i>	+	+	-
		拟孢囊菌 <i>Kibdelosporangium</i>	+	-	-
		假诺卡氏菌属 <i>Pseudonocardia</i>	+	-	-
		糖多孢菌属 <i>Saccharopolyspora</i>	+	-	-
链霉菌目 <i>Streptomycetales</i>	链霉菌科 <i>Streptomycetaceae</i>	北里孢菌属 <i>Kitasatospora</i>	+	-	+
		链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	+	+	+
		链孢囊菌属 <i>Streptosporangium</i>	+	+	-
链孢霉目 <i>Streptosporangiales</i>	嗜热单胞菌科 <i>Thermomonosporaceae</i>	马杜拉放线菌属 <i>Actinomadura</i>	+	-	-
	拟诺卡氏菌科 <i>Nocardiopsaceae</i>	拟诺卡氏菌属 <i>Nocardiopsis</i>	+	-	-
Total of genus		41	33	9	18

注: +: 分离到; -: 未分离到.

Note: +: Strains represent; -: Strains absent.

复后,对 103 株放线菌进行 16S rRNA 基因测序,并鉴定其分类地位。这些菌株分别属于放线菌纲的 4 个目 5 个科 9 个属(表 2)。其中链霉菌为优势菌群,在鉴定的 103 株放线菌中有 40 株链霉菌,占比 39%。皮生球菌科的 *Flexivirga* 属是唯一只在白茫雪山地衣中被分离到的属;迄今为止,植物杆菌属只有 2 个种,它们属于罕见类群。潜在新种有 16 株,占比 15.5%。这说明,白茫雪山海拔 4 000 m 高山上尽管放线菌组成相对单调,但未知菌占的比重较大。

### 2.3 波罗的海南岸地衣放线菌多样性分析

波罗的海(54°32'21"N, 10°12'41"E)是北欧的内海、北冰洋的边缘海和大西洋的属海,它是世界最大的半咸水海,属温带海洋性气候。波罗的海四面几乎均为陆地环抱,其南岸森林属海洋性向大陆性气候过度的温带阔叶林气候。通常情况下,全年气候温和,冬无严寒,夏无酷热,年平均气温 6–6.8 °C,平均海拔 300 m。从波罗的海南岸的基尔湾附近采集 2 属 5 种的地衣样品,从中共分离得到 259 株地衣菌,鉴定 101 株,其中放线菌 65 株。这些菌株分属于放线菌纲的 4 个目 8 个科 18 个属(表 2)。其中链霉菌属、红球菌属、微杆菌属的成员出现频率较多。到目前为止,*Naasia*、*Glaciibacter*、拉贝达氏菌属仅有一两个种,属非常罕见的放线菌。有 5 个菌株与已知种的 16S rRNA 基因相似性在 98.6%–96.4%之间,属潜在新种,所占比例为 5%。除了对潜在新种的系统发育分析外,潜在新种的其他鉴定指标正在进行,将另文发表。这些数据说明,波罗的海南岸地衣中蕴藏着丰富的稀有放线菌资源。部分菌株在属水平采用邻接法构建系统发育树示如图 1 所示。

### 2.4 3 个地区地衣放线菌多样性比较分析

从西双版纳、白茫雪山、波罗的海南岸 3 个地区采集的地衣样品共有 25 个属 29 个种。从中共分离到 1 123 个菌株,去重复后,共鉴定 417 株,放线菌 275 株,它们属于放线菌纲的 7 个目 16 个科

41 个属,其组成见表 2 和图 2。从表 2 和图 2 可以看出,西双版纳勐养自然保护区属热带雨林,常年雨量充沛,气温高,适于各类生物的繁衍生息,从采自西双版纳 17 属 17 个种地衣中,获得了 33 个属的放线菌,是本研究放线菌区系组成最为复杂的地域。其中 *Actinomadura*、*Actinoplanes*、*Agrococcus*、*Cellulomonas*、*Corynebacterium*、*Friedmanniella*、*Herbiconiux*、*Isopterocola*、*Kibdelosporangium*、*Micrococcus*、*Micromonospora*、*Nocardia*、*Nocardiopsis*、*Leucobacter*、*Paenarthrobacter*、*Pseudonocardia*、*Saccharopolyspora*、*Tessaracoccus* 等 18 个属(占 33 个属的 55%)另外两个地区的地衣中未被分离到。白茫雪山采样地段位于海拔 4 000 m 以上高寒山区,终年积雪,年均气温零度以下。从 6 属 7 个种地衣仅获得 9 个属的放线菌,区系组成相对单调,其中 *Flexivirga* 归属于 *Dermacoccaceae*,目前仅有 4 个典型种,分离自土壤、植物样品中,这是第一次从严寒地区采集的地衣样品分离到,在另外两个地区的地衣中没有获得该属,属于特有的分布。波罗的海采样地段在北纬 55°附近的基尔湾,地处温带北缘,春秋短而冬夏长,最高温度可达 28 °C,植被丰富多样。从波罗的海南岸的 2 属 5 个种地衣样品中,共分离到 18 个属的放线菌,地衣放线菌多样性处于西双版纳和白茫雪山之间。其中 *Clavibacter*、*Curtobacterium*、*Glaciibacter*、*Labedella*、*Naasia*、*Sanguibaacter*、*Nocardioides* 等 7 个属没有在另外两处的地衣分离到。地衣放线菌的组成不算复杂,但与另外两个地区放线菌的组成显著不同,差别达 44%。在 3 个地区地衣样品都同时分离到 *Streptomyces*、*Microbacterium*、*Rhodococcus* 和 *Williamsia* 等 4 个属(仅占 42 个属的 9.5%)的成员,说明这 4 个属在北纬 22°至 55°从海平面到 4 000 m 高山的地衣中都有广泛分布。*Williamsia* 属是 Kämpfer 等<sup>[19]</sup>1999 年从托儿所发现的,目前有 11 个种,广泛分布在海洋、湖沼、植

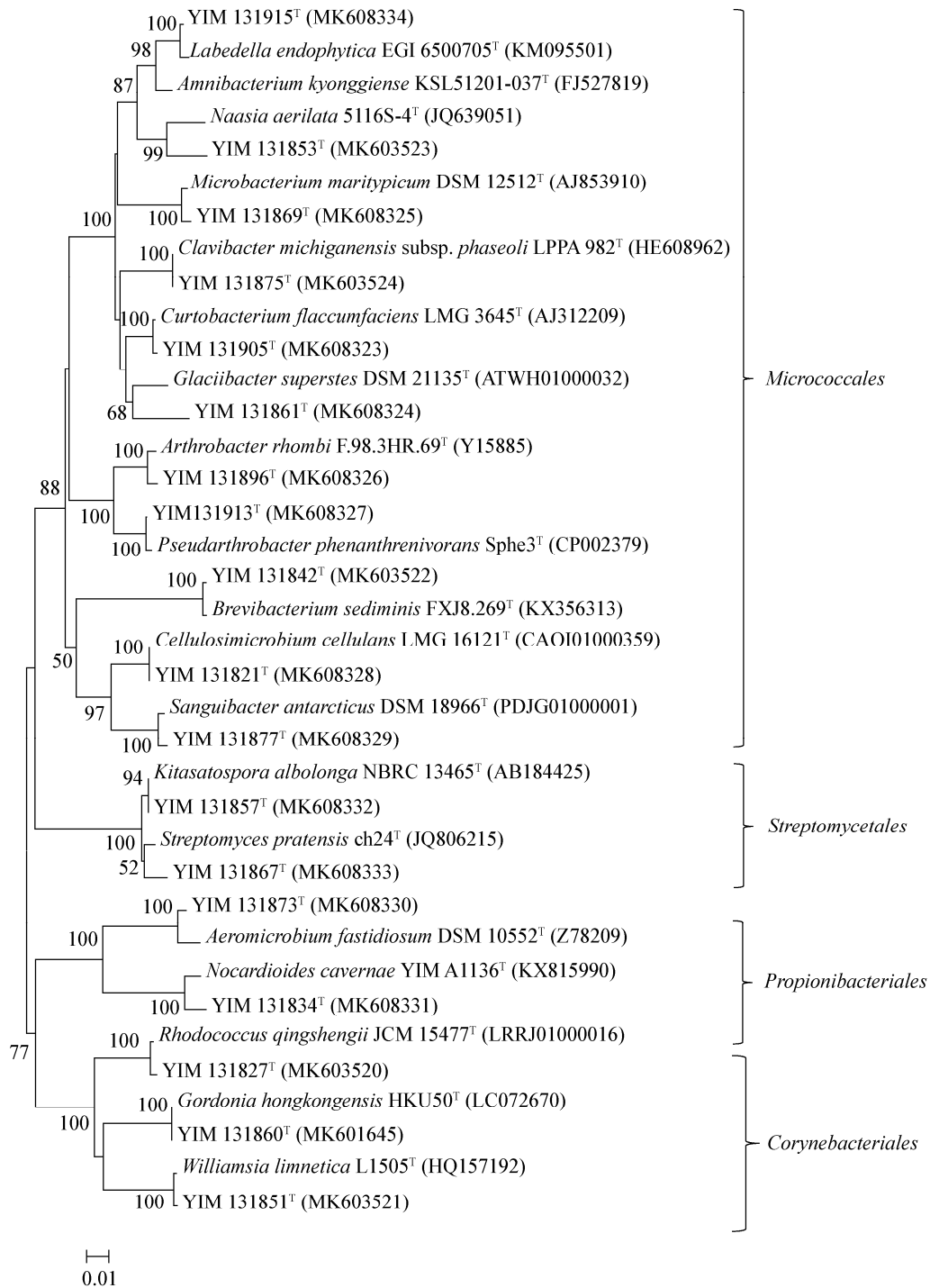


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建波罗的海南岸地衣部分放线菌的系统进化树

Figure 1 Neighbour-Joining phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences of partial actinomycetes isolated from lichens collected from South Bank of the Baltic Sea

注: 分支点上的数值表示自展值计算 1 000 次分析所得值, 小于 50% 的值隐藏; 标尺为 0.01 进化距离; 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号。

Note: Bootstrap values based on 1 000 replications are shown on branch nodes, Bootstrap values <50% are hidden; Bar 0.01 substitutions per nucleotide positions; The accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of these strains are listed in brackets.

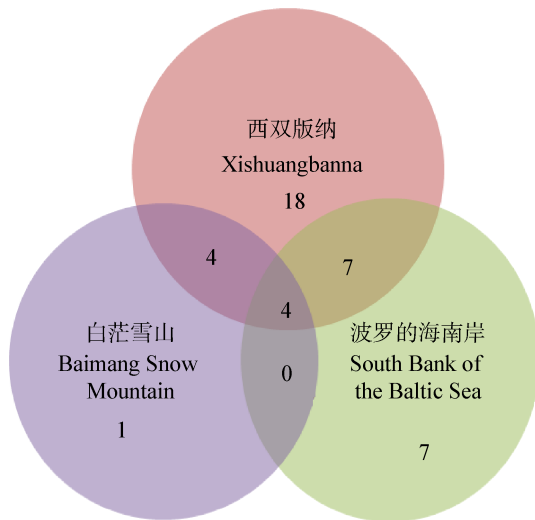


图 2 3 个地区纯培养地衣放线菌的相似性比较

Figure 2 Similarity comparison of pure cultured actinomycetes associated with lichens in three regions

注: 图中数字表示 3 个地区地衣分离到的放线菌菌属数。

Note: Numbers in the figure show the quantities of actinomycetes genera isolated from lichens in three regions.

物、海绵甚至人血和油田土壤,这是首次从地衣中获得。这 3 个地区的气候、土壤、植被等自然条件差别很大,采集的地衣样品分属 25 个属,而且地区之间没有采集到相同的地衣属,亲缘关系较远,导致地衣放线菌的区系组成不同,共性很小。与土壤放线菌的组成比较,除了以上 4 个共有属以外,杆球状的 *Corynebacteriales* 和 *Micrococcales* 两个目的放线菌组成最为复杂,这是地衣放线菌区系的主要特征。值得一提的是,在此次分离工作中有 8.5%–15.5% 的菌株属于潜在新种。

### 3 讨论与结论

部分学者在前期对地衣微生物的免培养调查中检测到了丰富的放线菌<sup>[9,13,20]</sup>,同时也分离获得了部分放线菌纯培养菌株<sup>[10-11,21]</sup>。2005 年,默沙东制药的研究者 González 等<sup>[22]</sup>对 25 份地衣样品进行了地衣放线菌的选择性分离,共获得 337 株放线菌,分布在 11 个属(游动放线菌属、小单孢菌属、链霉菌属、拟无枝酸菌属、假诺卡氏菌属、糖多孢菌属、红球菌属、游动双孢菌属、链孢囊

菌属、马杜拉放线菌属、地嗜皮菌属)。Cardinale 等<sup>[9]</sup>2006 年从 11 份地衣样品中分离得到了 7 株放线菌,隶属放线菌的 5 个属:短杆菌属、纤维菌属、小单孢菌属、链霉菌属和链孢囊菌属。2017 年 Liu 等<sup>[23]</sup>从云南金沙江中段 35 份地衣样品中分离纯化到 213 株放线菌,分布在 9 个目 19 个科 38 个属,其中 13 个属[*Actinophytocola*、*Angustibacter*、草药菌属、拟孢囊菌属、动球菌属、北里孢菌属、*Nakamuraella*、野野村菌属(*Nonomuraea*)、拉贝达氏菌属、列舍瓦里尔菌属(*Lechevalieria*)、伦茨氏菌属、舒曼氏菌属(*Schumannella*)、梅泽宾夫氏菌属(*Umezawaea*)]是首次从地衣里面发现。这些结果表明,地衣中蕴藏着多样性极其丰富的放线菌资源亟待我们发掘。

在本次研究中,使用 3 种放线菌选择分离培养基分别从西双版纳、白茫雪山、波罗的海南岸地衣样品获得 33、9、18 属的放线菌,共计 7 个目 16 个科 41 个属,西双版纳地衣放线菌的群落结构最为复杂,白茫雪山最为单调;分别有 18、1、7 属的成员在另外两个地区地衣中未被分离到。3 个地区地衣放线菌区系的共性很小,西双版纳与波罗的海南岸共有的地衣放线菌仅 11 个属,分别有 18 和 7 个属在对方地衣样品未分离到,且它们的相似度不到 30%。3 个地区都分离到的放线菌仅 *Streptomyces*、*Microbacterium*、*Rhodococcus* 和 *Williamsia* 4 个属的成员,前 3 个属是常见的放线菌属。这 3 个地区地衣放线菌的组成与金沙江中段地衣放线菌的组成差别也比较大。*Leucobacter*、*Paenarthrobacter*、*Friedmanniella*、*Tessaracoccus*、*Clavibacter*、*Curtobacterium*、*Glaciibacter*、*Naasia*、*Sanguibacter* 等 9 个属的成员是首次从地衣中分离到。这 3 个地区地衣放线菌约有 8.5%–15.5% 属于潜在新种,甚至可能是新属,这说明地衣放线菌区系组成不但复杂,而且未知菌种类甚多。此外,在使用的 3 种放线菌分离培养基中,以 YIM 91 培养基<sup>[14]</sup>获得的放线菌种类最为复杂,未知菌也较多。



目前对地衣微生物的研究主要还是集中在免培养,利用免培养的手段对获得的资料进行多样性和功能分析,从而推断其与地衣的关系。这些工作克服了纯培养的局限,丰富了我们在地衣微生物多样性的认识与理解。但在大多数情况下,如果我们想从地衣微生物中挖掘新的活性物质并加以开发和利用,获得纯培养物是必不可少的基础工作。

## REFERENCES

- [1] Lee YM, Kim EH, Lee HK, et al. Biodiversity and physiological characteristics of Antarctic and Arctic lichens-associated bacteria[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2014, 30(10): 2711-2721
- [2] Jiang Y, Cao YR, Zhao LX, et al. Large numbers of new bacterial taxa found by Yunnan Institute of Microbiology[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2011, 56(8): 709-712
- [3] Goodfellow M, Fiedler HP. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2010, 98(2): 119-142
- [4] Jensen PR. Linking species concepts to natural product discovery in the post-genomic era[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2010, 37(3): 219-224
- [5] Czárán TL, Hoekstra RF, Pagie L. Chemical warfare between microbes promotes biodiversity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, 99(2): 786-790
- [6] Wei JC. *Chinese Lichens Overview*[M]. Beijing: International Academic Publishers, 1991: 1-278 (in Chinese)  
魏江春. *中国地衣综览*[M]. 北京: 万国学术出版社, 1991: 1-278
- [7] Wang LS. *Lichens of Yunnan in China*[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2012: 1-238 (in Chinese)  
王立松. *中国云南地衣*[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 1-238
- [8] Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation[J]. *Mycological Research*, 1991, 95(6): 641-655
- [9] Cardinale M, de Castro JV Jr, Müller H, et al. *In situ* analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of *Alphaproteobacteria*[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2008, 66(1): 63-71
- [10] Cardinale M, Puglia AM, Grube M. Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2006, 57(3): 484-495
- [11] Grube M, Cardinale M, de Castro JV Jr, et al. Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses[J]. *The ISME Journal*, 2009, 3(9): 1105-1115
- [12] Hodkinson BP, Lutzoni F. A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales[J]. *Symbiosis*, 2009, 49(3): 163-180
- [13] Bates ST, Cropsey GWG, Caporaso JG, et al. Bacterial communities associated with the lichen symbiosis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(4): 1309-1314
- [14] Shi SB, Yang LF, Jiang MG, et al. A comparison of actinomycetes isolation medium with samples from mangrove habitats in Maowei Sea, Guangxi Beibu Gulf[J]. *Microbiology China*, 2018, 45(11): 2331-2340 (in Chinese)  
石松标, 杨立芳, 姜明国, 等. 广西北部湾茅尾海红树林生境放线菌分离培养基的比较[J]. *微生物学通报*, 2018, 45(11): 2331-2340
- [15] Hayakawa M, Nonomura H. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes[J]. *Journal of Fermentation Technology*, 1987, 65(5): 501-509
- [16] Orsini M, Romano-Spica V. A microwave-based method for nucleic acid isolation from environmental samples[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2001, 33(1): 17-20
- [17] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425
- [19] Kämpfer P, Andersson MA, Rainey FA, et al. *Williamsia muralis* gen. nov., sp. nov., isolated from the indoor environment of a children's day care centre[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1999, 49(Pt 2): 681-687
- [20] Grube M, Cernava T, Soh J, et al. Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics[J]. *The ISME Journal*, 2015, 9(2): 412-424
- [21] Selbmann L, Zucconi L, Ruisi S, et al. Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance[J]. *Polar Biology*, 2010, 33(1): 71-83
- [22] González I, Ayuso-Sacido A, Anderson A, et al. Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 54(3): 401-415
- [23] Liu CB, Jiang Y, Wang XY, et al. Diversity, antimicrobial activity, and biosynthetic potential of cultivable actinomycetes associated with lichen symbiosis[J]. *Microbial Ecology*, 2017, 74(3): 570-584