

丁雅迪, 缪福俊, 毛德昌, 等. 元江芦荟根际放线菌的分离与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(1): 154–157.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.043

# 元江芦荟根际放线菌的分离与鉴定

丁雅迪<sup>1</sup>, 缪福俊<sup>2</sup>, 毛德昌<sup>1</sup>, 吴正富<sup>1</sup>, 熊智<sup>1</sup>

(1. 西南林业大学, 云南昆明 650224; 2. 云南省林业科学院, 云南昆明 650201)

**摘要:**开展元江芦荟根际放线菌的研究, 为促进元江芦荟的生长及品质的改良提供理论基础。采用涂布平板法对芦荟根际放线菌进行分离纯化, 再对纯化的放线菌进行形态显微结构观察、生理生化及系统发育树构建分析。结果表明, 从元江芦荟根际土壤中共分离鉴定出 3 株放线菌, 属于链霉菌属的小链霉菌 (*Streptomyces parvus*)、早期链霉菌 (*Streptomyces praecox*) 及克兰斯基链霉菌 (*Streptomyces krainskii*)。研究结果将为芦荟病害的生物防治提供应用资源。

**关键词:**元江芦荟; 根际放线菌; 分离鉴定; 系统发育树; 生物防治

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0154-04

放线菌是革兰氏阳性菌, 其物种及 G+C 含量丰富, 具有明显分枝的菌丝体, 广泛分布于自然界, 主要分布于土壤、海洋、植物体内及一些极端环境中<sup>[1]</sup>。随着放线菌在人们生活中的普遍使用, 赋予其巨大的市场经济价值; 并且由于放线菌能够产生丰富的生物活性物质, 其中包含大量抗生素, 使其具有较强的生物修复能力<sup>[2-4]</sup>, 目前有 2/3 的抗生素被广泛应用于农业、林业和临床医学等方面<sup>[5]</sup>。近年来, 随着人们对植物根际区域研究的不断深入, 发现从放线菌的天然栖居地土壤中仅能分离出 1/10 的放线菌, 而根际土壤中含有大量微生物类群, 其数量远多于非根际土壤中的微生物类群<sup>[6]</sup>。根际土壤放线菌形成的生物活性物质也明显高于非根际土壤放线菌, 根际土壤放线菌不仅能够分解土壤有机质, 为植物制造养料, 还具有产生碳酸气、有机酸的能力, 使土壤中难溶性物质溶解<sup>[7-9]</sup>。因此, 开展根际土壤放线菌的研究意义重大, 有望开辟放线菌新药及具有活性的次级代谢产物的新资源。目前对植物根际放线菌研究不多, 主要集中于海洋放线菌<sup>[10-12]</sup>、植物内生放线菌<sup>[13-15]</sup>、特殊环境放线菌<sup>[16-18]</sup>等方面, 国内外针对元江芦荟根际放线菌的研究未有报道。芦荟因具有药用、食用、美容及保健等方面的功能而得到广泛应

用<sup>[19]</sup>, 主要分布于云南、广东、海南、四川、福建等热带地区<sup>[20-21]</sup>。本研究选择云南元江芦荟 (*Aloe yuanjiangensis*) 根际土壤作为研究对象, 采用选择性分离方法、形态结构特征观察法、生理生化性质分析及系统发育树分析法对放线菌进行鉴定, 以期为后期优化出拮抗芦荟根腐病原菌的放线菌奠定基础, 并提高其在农林保护及医学研究等方面的应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选取云南野生元江芦荟 (*A. yuanjiangensis*) 种植地作为目标地, 采集 10 份根际混合土样作为分离样品, 实验室自然风干备用。

主要培养基为: 高氏一号培养基, 配方参见文献[22]; TWYE 培养基 (0.025% 酵母浸膏, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8% 琼脂, 加水至 1 000 mL, 调节 pH 值为 7.2)、YIM38 号培养基 (0.4% 酵母浸膏, 0.4% 葡萄糖, 0.5% 麦芽膏, 微量复合维生素, 1 mL 微量盐, 1.5% 琼脂, 加水至 1 000 mL, 调节 pH 值为 7.2)。为抑制细菌生长, 倒平板前分别于上述 3 种培养基中加入 3.3 mL 无菌 0.01% 重铬酸钾溶液。

### 1.2 主要仪器

主要仪器有: 微波炉 (格兰仕); 高压蒸汽灭菌锅 (上海博迅实业有限公司); 冷冻型台式高速离心机 (MIKRO 220R); 普通离心机 (德国艾本德); 超净工作台 (Airtech); 恒温培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 水浴锅 (天津市泰斯特仪器有限公司); 光学显微镜 (上海比目仪器有限公司); 凝胶成像系统 (英国 Syngene); PCR 自动系列化分析仪 (德国 Biometra)。

收稿日期: 2015-06-01

基金项目: 西南林业大学科技创新基金 (编号: C14116)。

作者简介: 丁雅迪 (1989—), 女, 安徽蚌埠人, 硕士研究生, 主要从事资源微生物的开发利用研究。E-mail: 1203685364@qq.com。

通信作者: 熊智, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事微生物学和分子生物学、农林产品的二次资源利用研究。E-mail: zhix@swfu.edu.cn。

185.

[7] 王忠肃, 华世珍, 欧阳秩. 柑橘炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 潜伏侵染带菌部位研究[J]. 西南农业大学学报, 1992, 13(1): 96–98.

[8] 胡秀荣, 鹿连明, 蒲占渭, 等. 7 种杀菌剂对柑橘炭疽病菌的室内毒力测定[J]. 中国农学通报, 2010, 26(11): 272–275.

[9] 徐红梅, 管兰华, 韩正敏. 不同胶孢炭疽菌菌株比较[J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2004, 28(3): 67–69.

[10] 王柏泉, 邹东霞, 卢宗荣, 等. 樟树、柑橘、冬青卫矛炭疽病病原学比较研究[J]. 西北林学院学报, 2006, 21(3): 78–80.

[11] Pérez-García A, Romero D, de Vicente A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(2): 187–193.

[12] 刘海波, 田世平. 水果采后生物防治拮抗机理的研究进展[J]. 植物学通报, 2001, 18(6): 657–664.

### 1.3 试验方法

**1.3.1 土壤稀释液的制备** 称取 1 g 自然风干的健康芦荟根际土壤,研钵碾碎过筛,高温烘干(100 ℃,1 h),加入已准备好的带有磁珠的 99 mL 无菌水中,低速摇床(170 r/min, 30 ℃)处理 1 h,再微波处理 30 s,混匀后即得稀释 100 倍的土壤悬液。取 1 mL 稀释 100 倍的土壤悬液加入到含有 9 mL 无菌水的试管中,摇匀即得稀释 1 000 倍的土壤悬液。再取 1 mL 稀释 1 000 倍的土壤悬液同样加入到含有 9 mL 无菌水的试管中,摇匀后得到稀释 1 万倍的土壤悬液。根据此法依次得到稀释 10 万倍、100 万倍的土壤悬液。

**1.3.2 放线菌的分离纯化** 采用涂布平板法吸取 1 mL 稀释 1 万倍的健康芦荟根际土壤稀释液,依次涂布于高氏一号、TWYE、YIM38 号平板中。稀释 10 万倍、100 万倍的健康芦荟根际土壤稀释液采用同种方法涂布。28 ℃ 下恒温培养 7 ~ 15 d。将分离出的放线菌菌落挑出,经过多次纯化接种到相应斜面培养基中保存,置于 4 ℃ 冰箱中保存备用。

**1.3.3 放线菌的形态鉴定** 采用分区划线法<sup>[23]</sup>观察放线菌菌落特征,采用插片法<sup>[24]</sup>观察放线菌的形态特征,用无菌镊子取数块无菌盖片,以 45°角分别斜插于接有放线菌的高氏一号、TWYE、YIM38 号平板,每个平板插 4 片,28 ℃ 培养 5 ~ 7 d,结晶紫染色显微镜下观察拍照。

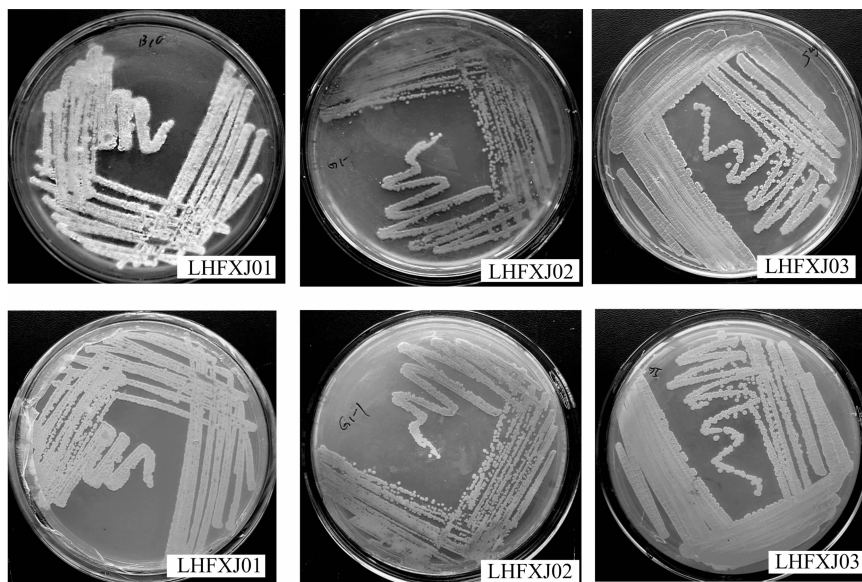
**1.3.4 生理生化鉴定** 按照梁银等的方法<sup>[25-26]</sup>对放线菌进行常规酶学性质的研究,并对碳源利用情况进行研究。

**1.3.5 菌株 DNA 的提取及系统发育树构建** 采用酶解法少量提取芦荟健康根际放线菌 DNA<sup>[27]</sup>。25 μL PCR 反应体系:各 1 μL PA、PB,12.5 μL 2 × Taq PCR Master Mix,1 μL DNA 模板,ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL。16 S rDNA PCR 扩增常用引物及扩增条件参照陈森洲等方法<sup>[28]</sup>。取 4.0 μL PCR 扩增产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测,其余产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司纯化并测序。采用 MEGA5.1 软件进行多序列的比对,对比对结果进行系统发育树的构建,以确定菌株的种属地位。

## 2 结果与分析

### 2.1 放线菌分离的鉴定

从芦荟根际土壤中共分离得到 3 株放线菌,依次命名为 LHFJXJ01、LHFJXJ02、LHFJXJ03。对这 3 株放线菌进行培养发现,菌株生长缓慢,菌落密集如毡、具粉状凸起及明显褶皱,菌落小而不扩散(图 1)。气生菌丝呈现乳白色、灰色、黄白色,基质菌丝的颜色呈现黄色、灰色,可溶性色素包括黄色、灰白色。显微镜下观察可知:菌丝细且发达,逐渐形成孢子丝;孢子丝或长而直,或短而柔曲;孢子成熟后脱落,形成具椭圆形、卵圆形、球形等孢子(图 2)。因此结合培养特征、形态特征初步判定这 3 株放线菌为链霉菌属(*Streptomyces* sp.)的不同种。



上、下排图片分别为 3 种菌株培养皿的正面、反面  
图1 菌落形态特征

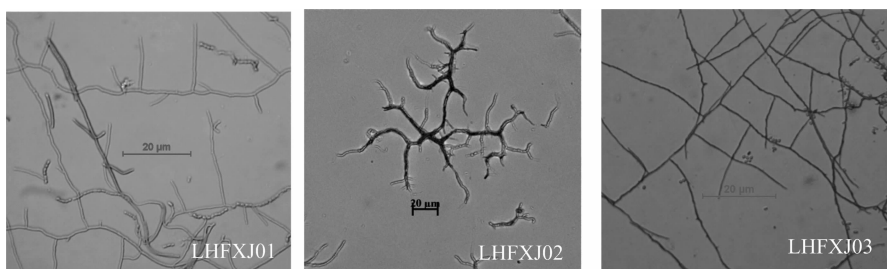


图2 显微形态结构特征

2.2 生理生化特性鉴定

采用常规酶学指标检测试验对菌株 LHFJ01、LHFJ02、LHFJ03 生理生化性质进行检测。由表 1 可知,3 株放线菌均能使明胶液化、牛奶胨化、淀粉水解、硝酸盐还原、纤维素水解,只是部分菌株作用效果缓慢。除菌株 LHFJ02 使牛奶凝

集慢,其他菌株不能使牛奶凝集。3 株菌均能够利用 D-葡萄糖、D-甘露醇、L-阿拉伯糖,不能利用蔗糖、棉子糖和肌醇作为碳源,其中菌株 LHFJ01、LHFJ02 还能够利用 D-果糖、D-木糖、鼠李糖作为碳源,菌株 LHFJ03 则不能。这些结果与链霉菌属特征吻合。

表 1 放线菌的部分生理生化性质

编号	明胶液化	牛奶凝固	牛奶胨化	淀粉水解	硝酸盐还原	纤维素水解	产生 H <sub>2</sub> S	D-葡萄糖	D-甘露醇	D-木糖	D-果糖	L-阿拉伯糖	蔗糖	鼠李糖	棉子糖	肌醇
LHFJ01	±	-	+	+	±	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
LHFJ02	+	±	+	+	±	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-
LHFJ03	±	-	±	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性;“±”表示微弱或缓慢。

2.3 放线菌 16SrDNA PCR 扩增及序列测定

芦荟根际放线菌的 16S rDNA 经 PCR 扩增,获得 1 500 bp 左右 PCR 产物,扩增结果见图 3,剩余产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。所得菌株 16S rDNA 序列在 GenBank 中注册,获得 GenBank 登录号(KR258748 - KR258750)。

2.4 系统发育树的构建

将序列提交至 NCBI 中的 GenBank 中进行 BLAST 同源比对,选取同源性最高的序列进行多序列比对,通过 MEGA 5.1 使用最大简约性法(maximum parsimony)构建系统发育树,确定该菌株的种属地位。从图 4、表 2 可以看出,青霉菌(*Penicillium* sp.) (KJ527027) 为外类群,从系统发育树中可以看出 LHFJ01 (KR258748) 与小链霉菌(*Streptomyces parvus*) (JX203385.1) 在同一个系统发育分支,相似度为 99.9%;LHFJ02 (KR258749) 与早期链霉菌(*Streptomyces praecox*) (JQ924403.1) 在同一个系统发育分支,相似度为 99.8%;LHFJ03 (KR258750) 与克兰斯基链霉菌(*Streptomyces krainskii*) (AB184278.1) 在同一个系统发育分支,相似度为 99.9%。可以判定 LHFJ01 (KR258748) 为 *Streptomyces parvus* (JX203385.1); LHFJ02 (KR258749) 为 *Streptomyces praecox* (JQ924403.1); LHFJ03 (KR258750) 为 *Streptomyces krainskii* (AB184278.1)。

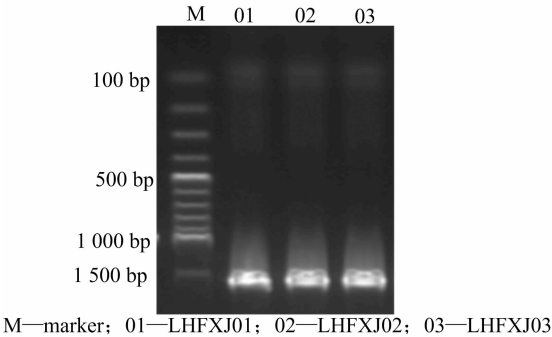


图 3 PCR 扩增产物电泳结果

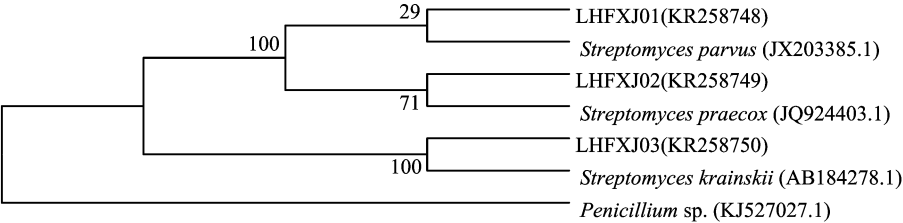


图 4 放线菌系统发育树的构建(最大简约性法)结果

表 2 菌株序列登录号及相似性比对结果

菌株编号	登录号	最大相似度菌株	相似度(%)
LHFJ01	KR258748	<i>Streptomyces parvus</i> (JX203385.1)	99.9
LHFJ02	KR258749	<i>Streptomyces praecox</i> (JQ924403.1)	99.8
LHFJ03	KR258750	<i>Streptomyces krainskii</i> (AB184278.1)	99.9

3 结论与讨论

经培养特征、形态结构特征、部分常规生理生化性质及系统发育分析相结合的方法进行鉴定,结果表明,分离的 3 株放线菌属于链霉菌属(*Streptomyces* sp.) 的 3 个种,分别为 *Streptomyces parvus*、*Streptomyces praecox*、*Streptomyces krainskii*。这

将有助于探索防治芦荟病害的生物途径,使芦荟具有更高的医疗、美容、保健、食用等价值。

分离纯化的 3 株放线菌都是链霉菌属,这与廖振林等从广西北海红树林土壤中分离到链霉菌属占 4/5 的结论<sup>[29]</sup> 一致;也符合司美茹等从济宁市土壤放线菌中分离得到链霉菌属占 70% 以上的研究结果<sup>[30]</sup>。本试验中未分离纯化出放线菌的其他种属,可能与土样的预处理、培养基的选择、采样时间、地点及分离方法等方面因素有关,有待进一步研究。

链霉菌属菌株可为人类源源不断地提供天然活性物质,能够提供约占临床医学 67% 的具有重大应用价值的抗生素<sup>[31]</sup>。前人研究表明:链霉菌属产生的生物活性物质包括抗菌剂<sup>[32-33]</sup>、免疫抑制剂<sup>[34]</sup>、抗肿瘤剂<sup>[35]</sup>、杀虫剂<sup>[36]</sup>等。随着土壤中放线菌菌株的不断发现,从这些普通环境中探索出新

的生物活性物质产生菌难度日益增大,随着人类对活性物质需求的不断增多,加速了探索新的活性物质领域的进程。本试验未对从芦荟根际土壤中分离纯化的3株链霉菌属菌株进行生物活性物质及抗菌能力测定,芦荟根际放线菌菌株链霉菌属具备产生何种生物活性物质的能力还有待于进一步深入研究。

#### 参考文献:

- [1] 宋培勇,郑亚强. 9株土壤放线菌分离鉴定及抗菌活性[J]. 广东农业科学,2012,39(23):186-189.
- [2] 陈森洲,梁爽,刘菁,等. 北海山口·大冠沙红树林放线菌的筛选与鉴定[J]. 安徽农业科学,2010,38(30):16784-16785,16788.
- [3] 蒋莲秀,莫刚,戴支凯,等. 红树林放线菌生物多样性及其代谢产物的研究进展[J]. 贵州农业科学,2014,42(10):158-163.
- [4] 何建清,张格杰,岳海梅. 珠穆朗玛峰自然保护区土壤放线菌的生态分布及拮抗性研究[J]. 安徽农业科学,2010,38(32):18162-18165.
- [5] 曹毅,陆宁,陈兴江,等. 烟草根际放线菌的分离及酶活性和功能基因检测[J]. 东北农业大学学报,2014,45(2):19-23.
- [6] 司美茹,薛泉宏,来航线. 放线菌分离培养基筛选及杂菌抑制方法研究[J]. 微生物学通报,2004,31(2):61-65.
- [7] Bodelier P L E, Wijnhuizen A G, Blom C W P M, et al. Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima*, studied in a gnotobiotic microcosm[J]. Plant Soil, 1997, 190(1): 91-103.
- [8] Basil A J, Strap J L, Knotek-Smith H M, et al. Studies on the microbial populations of the rhizosphere of big sagebrush (*Artemisia tridentata*)[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2004, 31(6): 278-288.
- [9] 刘子雄,朱天辉,张建. 林木根系分泌物与根际微生物研究进展[J]. 世界林业研究,2005,18(6):25-31.
- [10] 陈名洪,王海龙,林如,等. 南海稀有放线菌的分离及其卤化酶基因分析[J]. 中国抗生素杂志,2013,38(9):658-663.
- [11] 张玉便,张改云. 南大西洋深海沉积物中可培养放线菌的多样性[J]. 应用海洋学学报,2014,33(4):508-515.
- [12] 常显波,柳瑞翠,刘文正,等. 北极海洋沉积物中放线菌多样性及抑菌活性筛选[J]. 湖北农业科学,2014,53(13):3014-3018.
- [13] 张波,李小林,江华明,等. 花苜蓿内生放线菌多样性及群落结构[J]. 草业学报,2013,22(5):113-119.
- [14] 冯治翔,栗敏,刘洋,等. 罗汉松及响叶杨内生放线菌的分离、活性及多样性研究[J]. 中国抗生素杂志,2011,36(4):264-268.
- [15] 曹妍,伍建榕. 苏铁珊瑚根结构观察及其内生放线菌分离[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(11):47-50.
- [16] 周慧杰,夏占峰,张娇,等. 拜城盐山免培养放线菌多样性研究[J]. 新疆农业科学,2012,49(7):1272-1278.
- [17] 庾利,旭格拉·哈布丁,郭琳,等. 罗布泊地区沙生植物根际放线菌多样性及生物活性的研究[J]. 中国抗生素杂志,2012,37(1):21-26.
- [18] 欧阳永长,陈泽平,区俊豪. 玉龙雪山土壤样品放线菌分离和研究[J]. 湖北农业科学,2013,52(12):2810-2811,2814.
- [19] 肖玫,曹玉华,刘彪. 芦荟汁天然饮料工艺的研究[J]. 食品科学,2005,26(1):271-274.
- [20] 何忠俊,周琼,张忠萍,等. 库拉索芦荟根腐病与土壤-植株养分状况的关系研究[J]. 云南农业大学学报,2009,24(2):255-259,291.
- [21] 刘广善,刘仲. 云南芦荟的发展现状及未来[J]. 中国科技产业,1998(9):45.
- [22] 徐雅娟,陈森洲,骆耐香,等. 广西红树林放线菌的分离和DNA的提取[J]. 安徽农业科学,2009,37(31):15155-15156.
- [23] 钱存柔,黄仪秀. 微生物学实验教程[M]. 5版. 北京:北京大学出版社.
- [24] 周德庆,胡宝龙. 微生物学实验教程[M]. 2版. 北京:高等教育出版社,2006:275-276.
- [25] 梁银,张谷月,王辰,等. 一株拮抗放线菌的鉴定及其对黄瓜枯萎病的生防效应研究[J]. 土壤学报,2013,50(4):810-817.
- [26] 史晓晶,宿婧,郝宝玲,等. 艾草内生放线菌的分离与拮抗菌株的筛选[J]. 云南农业大学学报:自然科学,2014,29(4):504-507.
- [27] 徐丽华,李文均,刘志恒,等. 放线菌系统学:原理、方法及实践[M]. 北京:科学出版社,2007:41-98.
- [28] 陈森洲,刘菁,陈建宏,等. 红树林海洋淤泥中放线菌的分离与鉴定[J]. 贵州农业科学,2011,39(2):110-113.
- [29] 廖振林,刘菁,陈建宏,等. 广西北海红树林土壤放线菌的分离与鉴定[J]. 安徽农业科学,2010,38(23):12693-12694,12702.
- [30] 司美茹,苏涛,李桂芝. 济宁市土壤放线菌资源调查研究[J]. 山东农业科学,2008(4):68-71,90.
- [31] 陈义光,张晓蓉,张丽,等. 具抗菌活性海洋放线菌菌株JMC06001的分离和鉴定[J]. 微生物学通报,2008,35(1):40-44.
- [32] 袁桂峰,黄大林,徐雅娟,等. 二株具有抗菌活性红树林土壤放线菌的分离与鉴定[J]. 时珍国医国药,2011,22(11):2756-2757.
- [33] 刘伟,徐涛,蔡敬民,等. 海洋小链霉菌DY2741抗菌物质的溶解性质及分离纯化[J]. 食品科学,2010,31(15):177-180.
- [34] 蒋忠科,张洋,郭连宏,等. 具有血管内皮细胞生长因子受体-2酪氨酸激酶抑制作用的链霉菌次生代谢产物2754R的研究[J]. 中国医药生物技术,2014,9(3):180-184.
- [35] 王凌云,蹇晓红,唐功利,等. 抗肿瘤环肽YM-216391在异源宿主中的生物合成[J]. 军事医学,2013,37(7):506-508,513.
- [36] 陈井生,朱峰,鲁旭鹏,等. 南方根结线虫拮抗放线菌的分离、鉴定与杀线虫活性分析[J]. 中国蔬菜,2015(4):41-45.