

苦豆子内生放线菌产酶特性分析及活性菌株鉴定

胡美娟, 周星辰, 王 丽, 张 伟, 贾 倩, 顾沛雯

(宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021)

摘 要:以宁夏干旱荒漠区的 126 株苦豆子为试材, 采用透明圈法对分离自其内生放线菌进行分泌胞外酶活性检测。结果表明: 有 71 株内生放线菌具有酶活性, 占总菌株数的 56.3%。其中有 3 株菌株酶活性最为显著, 菌株 NDZKDS₇₃、NDZKDS₇ 具有的淀粉酶活性最高, 透明圈半径达到 24.62 mm 和 19.12 mm; 菌株 FJYKDS₅ 具有的蛋白酶活性高, 透明圈半径 16.94 mm; 菌株 FJYKDS₁₁、BJGKDS₂ 具有的纤维素酶活性最高, 透明圈半径为 24.72 mm 和 22.40 mm; 菌株 FJJKDS₂ 具有的几丁质酶活性最高, 透明圈半径 17.76 mm; 菌株 NDZKDS₂₄、NDZKDS₂₀ 对葡聚糖酶活性最高, 透明圈半径为 12.06 mm 和 10.50 mm。通过形态特征和 16S rRNA 基因序列同源性分析, 有 7 株活性菌属链霉菌属(*Streptomyces*), 1 株属拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)。

关键词:苦豆子; 内生放线菌; 产酶活性; 鉴定; 16S rRNA 序列分析

中图分类号:S 503.53 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)16-0098-05

放线菌一直是抗生素、酶和酶抑制剂等有用生理活性物质的主要产生菌^[1]。迄今为止, 微生物产生的 2 万多种生物活性物质, 45% 以上是由放线菌产生的^[2]。近年来, 由于已知化合物重复发现的概率越来越高, 促使人们寻找更为有效的新的生物活性物质^[3]。因此越来越多的研究者开始关注并研究新栖息地的微生物, 如盐碱等各种极端环境、海洋及植物内生环境等。

植物内生放线菌是一类相对未开发的新微生物资源。秦盛等^[4]研究表明植物内生放线菌长期生活在植物体内微环境中, 并与之协同进化, 一方面植物为内生放线菌提供光合作用的产物和矿物质, 另一方面内生放线菌的代谢产物能刺激宿主植物的生长发育, 提高宿主植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力。这种特殊的生态环境决定了物种的特殊性, 新物种必定有新基因, 新基因必然有新产物^[5]。药用植物作为一类特殊的植物, 其内生环境不同于一般植物, 其内生放线菌在与它们协同进化过程中, 可能产生新的基因及代谢产物。

苦豆子(*Sophora alopecuroides* L.) 为我国北方荒漠、半荒漠地区重要的沙生药用植物, 其功效主要有清热解毒、驱风燥湿、抗菌杀虫、抗肿瘤、免疫等, 具有独特的民族药用历史, 是研究沙生药用植物内生放线菌及其活性代谢产物的绝好材料^[6]。目前国内外在苦豆子内生放线菌方面的研究还鲜见报道。

该研究在前期对苦豆子内生放线菌分离、鉴定及多样性研究的基础上, 对其产酶特性进行了分析, 旨在筛选高活性产酶菌株, 并进行分子生物学鉴定, 以期得到新的放线菌物种资源及产功能物质的活性菌株, 为苦豆子内生菌的开发利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2010 年 6 月和 10 月, 从宁夏灵武白芨滩国家级自然保护区 6 个样区, 每样区用 5 点“Z”型方法, 采集健康苦豆子植株和豆荚, 植株保鲜袋 4℃ 保存。分别于采集后 3~4 d 内按根、茎、叶 3 个部位分离内生放线菌。豆荚剥离后, 随机选取饱满圆润、无病虫害的籽粒进行内生放线菌分离。

蛋白胨蔗糖琼胶培养基(NA)、高氏 1 号培养基(GA)、马铃薯葡萄糖琼胶培养基(PDA)、燕麦琼胶培养基(OA)和植物汁液培养基, 成分及配制参照顾沛雯等^[6]的方法。

1.2 试验方法

1.2.1 苦豆子内生放线菌的分离与培养 称取苦豆子样品约 1~2 g, 种子用 50% H₂SO₄ 浸泡 4~5 h 软化种皮, 用清水冲洗数次, 催芽 3~5 d 后, 在超净台中无菌水

第一作者简介:胡美娟(1987-), 女, 宁夏银川人, 硕士研究生, 研究方向为生物防治及微生物资源利用。E-mail: 598315218@qq.com.

责任作者:顾沛雯(1969-), 女, 宁夏银川人, 博士, 教授, 现主要从事植物病理学的教学与科研工作。E-mail: gupeiwen2005@yahoo.com.cn.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960228); 宁夏科技支撑计划资助项目(2007BAD57B02); 宁夏自然科学基金资助项目(nz1002)。

收稿日期:2013-04-10

清洗数 10 次,用 75%酒精浸泡 30 s,再用 5%的次氯酸钠浸泡 3 min 后,立即用无菌水洗涤 3~5 次,加入 5 mL 无菌水,采用组织匀浆法分离内生放线菌,最后一遍无菌水洗涤涂板检测有无杂菌污染。健康植株用清水洗去污泥后,消毒和分离及杂菌检测方法同种子处理。将涂抹好的平板置于 28℃培养箱培养 5~7 d。

1.2.2 产酶菌株的筛选 参照周旭华等^[7]方法并有所改进。分别以 0.2%可溶性淀粉、0.2%脱脂奶粉、0.2%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、0.2%胶体几丁质和 0.2%茯苓粉为淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶的作用底物添加到基础培养基(1 M KH_2PO_4 38.5 mL,1 M K_2HPO_4 61.5 mL,琼脂 18 g,蒸馏水 800 mL,pH 7.0)上制成筛选平板。将新活化的纯种培养物点接在筛选平板上,28℃倒置培养至形成明显菌落,每个菌株每个筛选平板做 3 个平行。观察菌落周围透明圈或白色晕圈的产生情况以定性地判断底物利用状况及菌株产酶能力。具体判定方法如下:淀粉酶:待菌落长成后,用 Lugol's 碘液(1 g 碘和 2 g 碘化钾溶于 300 mL 去离子水中)均匀铺于平板上染色数分钟,之后倒掉碘液,观察透明圈的产生情况,有则为阳性,为淀粉酶产生菌。蛋白酶:待菌落长成后,可直接观察透明圈的产生情况,有则为阳性,为蛋白酶产生菌。纤维素酶:待菌落长成后,用 1%的刚果红染液染色 15~30 min,然后依次用去离子水和 1 mol/L 的 NaCl 溶液彻底洗去染液,再用 5%醋酸固定染色,观察透明圈的产生情况,有则为阳性,为纤维素酶产生菌。几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶:同纤维素酶的方法。

1.2.3 活性菌株 16S rRNA 序列分析 基因组 DNA 的提取:放线菌 DNA 的提取参考姜淑梅等^[8]的改良酶法和 Lee 等^[9]的简单提取细菌 DNA 法。取约 50 mg 菌体加入 500 μL 含有溶菌酶的 1×TE 溶液(使溶菌酶终浓度为 2 g/L),放入 37℃摇床 1~2 h。加入 20% SDS 50 μL 及蛋白酶 K(浓度为 20 mg/L)5 μL 振荡混匀 1 min,放入 37℃金属浴中 30~60 min。加 550 μL 苯酚:氯仿:乙戊醇混合液(25:24:1),振荡混匀,12 000 r/min 离心 10 min,上清液转管,重复抽提 3 次。然后加 800 μL 无水乙醇,加 80 μL 3 mol/L 乙酸钠(pH 4.8~5.2)室温放置 10 min 以上。12 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,加 200 μL 70%乙醇,轻摇洗涤 2 次,12 000 r/min 低温离心 5 min,弃乙醇。真空抽提干燥后加 1×TE 50 μL 溶解 DNA,−20℃保存备用。16S rRNA 扩增:PCR 扩增 16S rRNA 采用通用引物(F8,8-27f;5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3';R1492,1492-1513r;5'-TACGGC-TACCTTGTTACGACTT-3')由上海生物工程公司合成。反应体系(50 μL):2×PCR Mix(北京天根生物科技)25 μL ;引物 F8(25 pmol)0.5 μL ,引物 R1492

(25 pmol)0.5 μL ;模板 DNA(30 $\mu\text{g/L}$)1.0 μL ;双蒸水补足至 50 μL 。PCR 反应条件:94℃、4 min;95℃、1 min;55℃、1 min;72℃、2 min、30 个循环;72℃、10 min。用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测产物。PCR 扩增产物由上海 Invitrogen 生物公司进行测序。构建同源进化树:将所测得的菌株 16S rRNA 序列在 Genbank 数据库中与已知的 16S rRNA 序列进行 BLAST 同源性比较,调出相关模式菌株的 16S rRNA 序列,采用 DNAMAN 6.0.3.48 软件进行多重比对,构建同源进化树,分析其系统发育地位。

2 结果与分析

2.1 苦豆子内生放线菌的产酶活性分析

合并形态相同的内生放线菌株,选择 126 株代表菌株进行酶活性测定。由表 1 可知,有 65.9%的菌株具有纤维素酶活性,透明圈半径大于 10 mm 的菌株占总菌株数的 29.4%,其中有 2 株透明圈半径超过了 20 mm;其次有 60%左右的菌株具有淀粉酶和蛋白酶活性,透明圈半径大于 10 mm 的菌株占总菌株数的 10%以上;具有几丁质酶和葡聚糖酶活性的菌株较少,大于 10 mm 的几丁质酶活性菌株占总菌株数的 15.1%,葡聚糖酶活性菌株仅占 3.2%。

表 1 苦豆子内生放线菌产酶活性分析

Table 1 producing enzyme activities analysis of endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L.

酶	产酶菌株数 /个(%)	≥20 mm 菌株数/个(%)	≥15 mm 菌株数/个(%)	≥10 mm 菌株数/个(%)
淀粉酶	75(59.5)	1(0.8)	12(9.5)	28(22.2)
纤维素酶	83(65.9)	2(1.6)	9(7.1)	37(29.4)
蛋白酶	78(61.9)	1(0.8)	4(3.2)	13(10.3)
几丁质酶	52(41.3)	0(0)	5(4.0)	19(15.1)
葡聚糖酶	12(9.5)	0(0)	0(0)	4(3.2)
总菌株数	126	126	126	126

2.2 苦豆子内生放线菌的产酶活性测定

由表 2 可知,有 71 株内生放线菌菌株具有较高的酶活性,占总菌株数的 56.3%,产 3 种酶以上的菌株有 45 株,占总菌株数的 35.7%。其中菌株 NDZKDS₇₃(图 1 A)、NDZKDS₇ 具有的淀粉酶活性最为显著,透明圈半径分别达到 24.62 mm 和 19.12 mm;菌株 FJYKDS₅(图 1 B)具有的蛋白酶的活性最为显著,透明圈半径达 16.94 mm;菌株 FJYKDS₁₁(图 1 C)、BJGKDS₂(图 1 D)具有的纤维素酶活性最为显著,透明圈半径达到 24.72 mm 和 22.40 mm;菌株 FJJKDS₂(图 1 E)对几丁质酶的活性最为显著,透明圈半径达 17.76 mm;菌株 NDZKDS₂₄(图 1 F)、NDZKDS₂₀ 菌株具有较强的葡聚糖酶活性,透明圈半径分别达 12.06 mm 和 10.50 mm。

表 2 苦豆子内生放线菌产酶活性测定(透明圈半径 ≥ 10 mm)

Table 2 Producing enzyme activities determination of endophytic actinomycetes from <i>Sophora alopecuroides</i> L. (Transparent circle radius ≥ 10 mm) mm											
菌株	淀粉酶	纤维素酶	蛋白酶	几丁质酶	葡聚糖酶	菌株	淀粉酶	纤维素酶	蛋白酶	几丁质酶	葡聚糖酶
YCZKDS ₁	10.66	18.92	—	—	10.30	XKGKDS ₂₃	—	5.80	3.86	10.72	—
YCZKDS ₃	8.62	14.82	—	3.14	—	NDZKDS ₁	15.40	10.38	7.46	—	—
YCZKDS ₄	—	13.84	2.68	—	—	NDZKDS ₂	10.52	9.72	14.12	15.12	—
YWZKDS ₃	15.94	—	5.32	—	—	NDZKDS ₄	6.28	9.48	—	14.74	—
YWZKDS ₇	18.44	—	6.12	—	4.52	NDZKDS ₅	9.42	—	10.32	—	—
YWKYDS ₁	4.32	12.66	—	—	—	NDZKDS ₇	19.12	16.22	9.82	2.84	—
YWKYDS ₂	—	17.34	9.10	—	—	NDZKDS ₈	9.28	10.88	7.52	4.72	6.72
YWGKDS ₆	12.32	4.72	2.30	9.40	—	NDZKDS ₁₀	4.52	8.32	—	10.38	—
BJGKDS ₂	2.32	22.40	9.42	—	—	NDZKDS ₁₁	9.72	14.52	8.84	3.44	5.12
BJJKDS ₉	9.72	12.12	6.96	—	—	NDZKDS ₁₅	17.56	7.16	1.60	—	—
BJYKDS ₁₅	10.88	—	—	—	—	NDZKDS ₂₀	14.32	9.80	3.04	6.54	10.50
FJJKDS ₁	—	6.78	6.82	11.40	—	NDZKDS ₂₂	15.02	—	6.80	—	—
FJJKDS ₂	—	2.26	—	17.76	—	NDZKDS ₂₄	—	5.42	—	—	12.06
FJYKDS ₅	11.68	15.56	16.94	—	—	NDZKDS ₂₅	—	11.02	5.36	6.44	—
FJYKDS ₆	13.28	6.70	1.32	11.34	—	NDZKDS ₂₆	—	11.34	10.72	2.12	3.68
FJYKDS ₁₀	8.54	12.16	—	16.38	—	NDZKDS ₂₉	14.78	—	—	—	—
FJYKDS ₁₁	—	24.72	8.28	—	—	NDZKDS ₃₂	17.16	12.82	8.74	10.02	—
FJJKDS ₁₅	10.22	5.48	1.70	6.64	—	NDZKDS ₃₄	6.48	11.58	3.86	10.10	—
FJJKDS ₁₆	—	18.96	12.16	16.94	—	NDZKDS ₃₅	—	10.90	2.36	7.46	—
FJJKDS ₁₇	12.42	7.76	—	12.78	—	NDZKDS ₃₆	—	10.28	—	—	—
FJYKDS ₂₀	—	10.22	—	—	—	NDZKDS ₃₇	—	14.72	16.62	7.20	—
FJJKDS ₂₃	—	15.78	10.52	8.88	—	NDZKDS ₃₈	5.64	15.28	7.78	8.66	2.24
HMJKDS ₁	12.38	6.80	2.04	—	—	NDZKDS ₃₉	—	7.48	2.86	6.66	—
HMJKDS ₃	10.40	—	4.24	—	—	NDZKDS ₄₁	—	10.38	6.58	—	—
HMJKDS ₆	12.06	—	6.78	—	—	NDZKDS ₄₂	—	11.08	—	—	—
HMYKDS ₈	7.76	—	14.12	—	—	NDZKDS ₄₄	16.08	12.92	8.12	8.05	—
HMJKDS ₁₀	3.46	10.48	—	—	—	NDZKDS ₄₇	14.42	10.80	—	3.74	—
HMJKDS ₁₁	15.40	—	6.06	—	—	NDZKDS ₄₉	—	8.38	5.38	10.42	—
HMYKDS ₁₅	10.48	—	3.66	—	—	NDZKDS ₅₁	—	4.52	2.70	16.38	—
HMJKDS ₁₇	9.42	6.72	12.48	—	—	NDZKDS ₅₃	—	11.78	—	7.06	—
BTZKDS ₁	7.66	10.60	4.52	10.80	—	NDZKDS ₅₆	11.72	—	—	—	—
BTJKDS ₅	17.88	—	5.24	—	—	NDZKDS ₆₂	—	10.82	2.96	3.54	—
XKJKDS ₂	—	10.28	13.70	11.46	—	NDZKDS ₆₇	—	12.86	15.58	8.24	—
XKJKDS ₄	5.80	8.28	—	—	10.34	NDZKDS ₇₀	—	14.90	9.46	10.96	—
XKJKDS ₁₄	—	—	3.54	11.50	—	NDZKDS ₇₃	24.62	16.28	5.78	2.52	2.46
XKJKDS ₁₅	15.58	—	11.26	11.68	—						

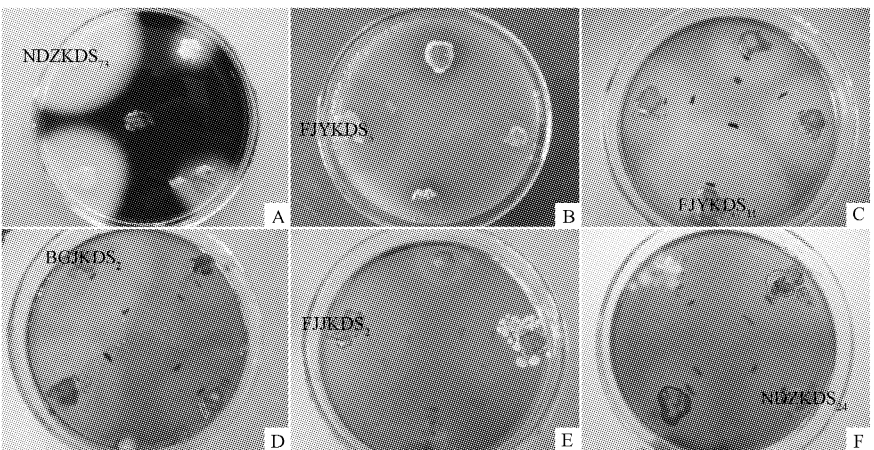


图 1 产酶高活性菌株的筛选

注:A:菌株 NDZKDS₇₃ 淀粉酶测定;B:菌株 FJYKDS₅ 蛋白酶测定;C:菌株 FJYKDS₁₁ 纤维素酶测定;D:菌株 BJGKDS₂ 纤维素酶测定;E:菌株 FJJKDS₂ 几丁质酶测定;F:菌株 NDZKDS₂₄ β -1,3-葡聚糖酶测定。

Fig. 1 Screening of highly active strains producing enzyme

Note: A: Strain NDZKDS₇₃ amylase determination; B: Strain FJYKDS₅ protease determination; C, D: Strain FJYKDS₁₁, BJGKDS₂ cellulose enzyme determination; E: Strain FJJKDS₂ chitinase determination; F: Strain NDZKDS₂₄ glucanase determination.

2.3 活性菌株 16S rRNA 的扩增

对上述筛选的 8 株产酶高活性菌株 NDZKDS₇₃、NDZKDS₂₄ 和 NDZKDS₂₀ 提取基因组 DNA 后,进行 16S

NDZKDS₇、FJYKDS₁₁、BJGKDS₂、FJYKDS₅、FJJKDS₂、

rRNA 序列的 PCR 扩增,获得约 1.5 kp 的基因片段,电泳结果(图 2)。

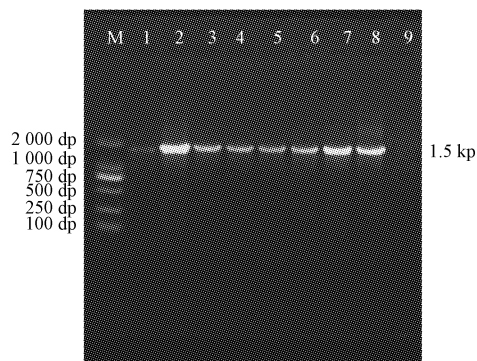


图 2 8 株高活性菌株 16S rRNA 基因的扩增产物

注:M;DL 2 000;1;菌株 NDZKDS₇₃;2;菌株 NDZKDS₇;3;菌株 FJYKDS₁₁;4;菌株 BJGKDS₂;5;菌株 FJYKDS₅;6;菌株 FJJKDS₂;7;菌株 NDZKDS₂₄;8;菌株 NDZKDS₂₀;9:双蒸水对照。

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product amplified

16S rRNA gene from 8 highly active strains

Note:M;DL 2 000;1;Strain NDZKDS₇₃;2;Strain NDZKDS₇;3;Strain FJYKDS₁₁;4;Strain BJGKDS₂;5;Strain FJYKDS₅;6;Strain FJJKDS₂;7;Strain NDZKDS₂₄;8;Strain NDZKDS₂₀;9:Ultrapure water contrast.

2.4 活性菌株 16Sr RNA 同源性分析

经测序,8 株产酶高活性菌株 16S rRNA 基因扩增片段含有约 1 440 个核苷酸。通过 16S rRNA 片段序列的比较,利用 DNAMAN 6.0.3.48 软件得出 8 株产酶高活性菌株和其它 6 株放线菌 16S rRNA 基因片段核苷酸序列的同源关系的系统分类树状图(图 3)。

由图 3 和表 3 可知,8 株产酶高活性菌株分属于链霉菌属(*Streptomyces*)和拟诺卡氏菌属(*Nocardioopsis*),其中菌株 BJGKDS₂、FJJKDS₂ 与 *Streptomyces ambofaciens* 在同一分枝上,亲缘关系很近,序列相似性分别为 99.6% 和 98.5%;菌株 NDZKDS₇₃、NDZKDS₂₀ 与 *Streptomyces olivaceus* 在同一分枝上,序列相似性分别为 99.9% 和

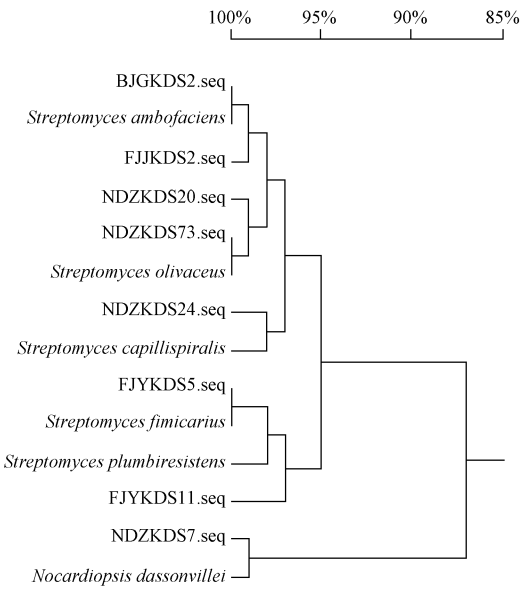


图 3 8 株产酶高活性菌株与代表菌株 16S rRNA 基因序列构建的同源进化树状图

Fig. 3 The homology tree based on 16S rRNA gene sequences of 8 highly active strains and 6 related actinomycetes species

表 3 8 株产酶高活性菌株与代表菌株 16S rRNA 基因序列分析同源矩阵

Table 3 The homology matrix analysis of 8 highly active strains and 6 related actinomycetes species 16S rRNA genes sequences

序列	核苷酸同源性 Nucleotide similarity/ %													
	BJGKDS ₂	FJJKDS ₂	NDZKDS ₂₀	NDZKDS ₇₃	NDZKDS ₂₄	FJYKDS ₅	FJYKDS ₁₁	NDZKDS ₇	S. <i>ambofacins</i>	S. <i>olivaceus</i>	S. <i>capillispiralis</i>	S. <i>fimicarius</i>	S. <i>plumbiresistens</i>	N. <i>dassonvillei</i>
BJGKDS ₂	100													
FJJKDS ₂	99.3	100												
NDZKDS ₂₀	98.2	97.4	100											
NDZKDS ₇₃	98.7	98.0	99.4	100										
NDZKDS ₂₄	96.6	96.1	95.8	96.4	100									
FJYKDS ₅	95.6	95.2	94.9	95.4	93.7	100								
FJYKDS ₁₁	95.1	95.0	94.3	94.6	93.1	96.6	100							
NDZKDS ₇	87.6	87.3	87.3	87.6	85.9	86.8	86.5	100						
<i>Streptomyces ambofacins</i>	99.6	98.9	97.9	98.5	96.8	95.6	94.9	87.4	100					
<i>Streptomyces olivaceus</i>	98.6	98.0	99.3	99.9	96.3	95.5	94.6	87.7	98.5	100				
<i>Streptomyces capillispiralis</i>	98.1	97.4	97.4	98.0	98.2	95.2	94.5	87.3	98.5	98.1	100			
<i>Streptomyces fimicarius</i>	95.9	95.3	95.2	95.8	93.9	99.6	96.7	87.1	96.1	95.9	95.7	100		
<i>Streptomyces plumbiresistens</i>	96.2	95.5	95.5	96.1	94.2	97.9	97.7	86.9	96.3	96.2	96.0	98.3	100	
<i>Nocardioopsis dassonvillei</i>	87.8	87.4	87.6	87.8	86.0	87.1	86.5	99.3	87.6	87.9	87.5	87.4	87.0	100

99.3%;菌株 NDZKDS₂₄、FJYKDS₅ 和 FJYKDS₁₁ 分别与 *Streptomyces capillispiralis*、*Streptomyces fimicarius* 和 *Streptomyces plumbiresistens* 亲缘关系较近,序列相似性为 98.2%、99.6%和 97.7%;此外,有 1 株拟诺卡氏菌属菌株 NDZKDS₇ 与 *Nocardiosis dassonvillei* 亲缘关系最近,序列相似性达到 99.3%。

3 讨论

苦豆子由于其较高的药用价值和生态学功能,目前已成为国内外研究的热点,但在其内生放线菌方面的研究还很少,从苦豆子内生放线菌中筛选新型抗菌及活性物质的可能性很大。2009 年,顾沛雯^[10]从采自宁夏毛乌苏荒漠的沙生药用植物苦豆子中分离得到 26 株内生放线菌,经初步鉴定,链霉菌属和诺卡氏菌属为最多;2010 年,郝丽等^[11]对采自宁夏灵武白芨滩国家自然保护区的野生苦豆子进行内生放线菌分离鉴定,共 125 株,其中链霉菌属最多,而小单孢菌属、游动放线菌属分离较少。

该试验利用 5 种不同的产酶培养基对 126 株苦豆子内生放线菌进行了产酶菌株的筛选,绝大多数苦豆子内生放线菌菌株能分泌胞外淀粉酶、蛋白酶、纤维素酶、几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶,某些菌株还具有同时分泌 3~5 种胞外酶的能力。在所测的 5 种酶中,几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶是重要的水解酶,不仅能在植物抵御真菌病害的防卫反应中发挥着重要作用,还能在植物发育中起到一定作用。

利用分子生物学技术对该试验的 8 株产酶高活性菌株进行了鉴定,发现有 7 株菌株属链霉菌属(*Streptomyces*),1 株属拟诺卡氏菌属(*Nocardiosis*)。结合之前的试验结果,证明了链霉菌属不仅在药用植物苦豆子内为优势

菌群,也可能在提高苦豆子抗逆性中发挥重要作用。

内生放线菌的产酶特性可能与其适应独特的生活环境有关,代谢产生的酶类能刺激宿主植物的生长发育,提高宿主植物对生物胁迫和非生物胁迫的抵抗能力。药用植物苦豆子作为一类特殊的植物,其内生环境不同于一般植物,其内生放线菌在与它们协同进化过程中,可能产生新的基因及代谢产物,因此,全面系统地对苦豆子内生放线菌资源及其活性代谢产物进行研究是非常必要的。

参考文献

- [1] 张秀敏,马友楠,王顺,等.麦冬和菊三七药用植物内生放线菌的多样性及产酶特性的研究[J].河北农业大学学报,2011,34(3):50-55.
- [2] Strobel G, Daisy B, Castillo U. Novel Natural Products From Rainforest Endophytes. In: Barbara S, Christine B, Thomas S. Microbial Root Endophytes [M]. Berlin Heidelberg, Springer, 2006.
- [3] Strobel G A. Rainforest endophytes and bioactive Products[J]. Crit Rev Biotechnol, 2002, 22(4):315-333.
- [4] 秦盛,赵立兴,陈云,等.药用植物内生放线菌的分离、筛选及活性菌株 YIM 61470 鉴定[J].微生物学报,2009,36(11):1693-1699.
- [5] 赵旭,常思静,景春娥.我国植物内生菌研究进展[J].中国沙漠,2010,30(1):87-90.
- [6] 顾沛雯,郝丽,徐润,等.宁夏灵武白芨滩国家级自然保护区苦豆子内生放线菌区系分析[J].宁夏大学学报(自然版),2011,32(4):380-385.
- [7] 周旭华,吴敏,孟凡旭.舟山地区抗 Mn^{2+} 、 Cr^{6+} 和产功能酶嗜盐菌的筛选[J].浙江大学学报(理学版),2010,37(1):92-95.
- [8] 姜淑梅,张龙,戴世颀,等.一种简单、有效的适用于 PCR 操作的放线菌 DNA 提取方法[J].生物技术,2007(1):39-41.
- [9] Lee S B, Tayler J W. Isolation of DNA from fungal mycelia and single spores[M]. A Guide to Methods and Application, 1990.
- [10] 顾沛雯.苦豆子内生放线菌的分离鉴定及其拮抗菌筛选[J].北方园艺,2009(6):12-16.
- [11] 郝丽,胡美娟,马海龙,等.宁夏干旱荒漠区苦豆子内生放线菌的分离鉴定[J].农业科学研究,2011,32(2):18-21.

Producing Enzyme Activity and Identification About Endophytic Actinomycetes Isolated from *Sophora alopecuroides* L.

HU Mei-juan, ZHOU Xing-chen, WANG Li, ZHANG Wei, JIA Qian, GU Pei-wen
(School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: Taking 126 endophytic actinomycetes from *Sophora alopecuroides* L. in arid desert region of Ningxia as material, through transparent circle method, studied the feature of excreting enzyme. The results showed that the 71 strains could produce enzyme, accounting for 56.3% of total isolates, in which 8 strains were the most significantly active. In these strains, NDZKDS₇₃ and NDZKDS₇ strains produced the highest activity amylase, the transparent circle radius were 24.62 mm and 19.12 mm, respectively; FJYKDS₅ strain produced the highest activity protease, the transparent circle radius was 16.94 mm; FJYKDS₁₁ and BJGKDS₂ strains produced the highest activity cellulase, transparent circle radius were 24.72 mm and 22.40 mm, respectively; FJJKDS₂ strains produced the highest activity chitinase, transparent circle radius was 17.76 mm; NDZKDS₂₄ and NDZKDS₂₀ strains produced highest activity glucanase, transparent circle radius were 12.06 mm and 10.50 mm, respectively. By morphological characteristics and 16S rRNA gene sequence similarity analysis, 7 strains were identified as *Streptomyces* and 1 strain were *Nocardiosis* in 8 strains.

Key words: *Sophora alopecuroides* L.; endophytic actinomycetes; enzyme activity; identification; 16S rRNA sequence analysis