

网络出版时间:2017-05-10 13:39

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2017.06.030

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170510.1339.060.html>

西藏低温放线菌的多样性及其生物活性

尹明远,何建清,张格杰

(西藏农牧学院,西藏 林芝 860000)

【摘要】【目的】研究西藏低温环境下放线菌的组成及其抑菌效果和酶活性,为放线菌新药物先导化合物和高活性酶的筛选提供资源。【方法】从西藏低温地区采集 16 份土样,用平板稀释法分离放线菌,经形态学和培养特征初步鉴定后得到有代表性的低温放线菌,对这些代表性菌株的 16S rRNA 基因序列进行系统发育分析,对其进行鉴定;采用菌丝生长速率法测定代表性低温放线菌菌株发酵液对 11 种农作物真菌的抑菌活性,并对其纤维素酶、蛋白酶、淀粉酶等活性进行测定。【结果】从 16 份土样中共分离到 22 株有代表性的低温放线菌,其在 10~25℃ 均能生长。16S rRNA 基因序列分析表明,这 22 株菌分布于放线菌门放线菌纲 2 个亚目 3 个科的 3 个属,即链霉菌亚目(*Streptomycineae*)链霉菌科(*Streptomycetaceae*)链霉菌属(*Streptomyces*)、假诺卡氏亚目(*Pseudonocardineae*)束丝放线菌科(*Actinosynnemataceae*)伦茨氏菌属(*Lentzea*)和假诺卡氏亚目(*Pseudonocardineae*)假诺卡氏菌科(*Pseudonocardiaceae*)拟无支酸菌属(*Amycolatopsis*),其中以链霉菌属最多,占分离菌的 91%。在分离的 22 株代表性低温放线菌菌株中,27.3% 的菌株有抑菌活性;40.9% 的菌株具有纤维素酶活性,22.7% 的菌株具有淀粉酶活性,18.2% 的菌株具有蛋白酶活性。【结论】西藏低温生境中蕴藏着丰富的低温放线菌资源,其中一些菌株具有拮抗活性和酶活性。

【关键词】 低温放线菌;16S rRNA;生物活性;多样性;西藏

【中图分类号】 X172

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2017)06-0221-07

Biological activity and diversity of psychrophilic actinomycetes in Tibet

YIN Mingyuan, HE Jianqing, ZHANG Gejie

(Tibet Agriculture and Animal Husbandry College, Linzhi, Tibet 860000, China)

Abstract:【Objective】This study investigated the composition, antibacterial effects and enzyme activities of psychrophilic actinomycetes in Tibet to provide resources for lead compounds of new drugs and enzymes with high activities. 【Method】A total of 16 soil samples were collected from low temperature region in Tibet and the actinomycetes were isolated by plate dilution method. Representative psychrophilic actinomycetes were identified by morphological and cultural characteristics, and were analyzed and identified by 16S rRNA gene sequence. Antifungal activities of the representative strains were measured by growth rate method, and cellulase, protease and amylase activities were determined. 【Result】A total of 22 strains of psychrophilic actinomycetes were isolated from 16 soil samples. They can grow at the temperature of 10–25℃. The 16S rRNA gene sequence analysis showed that the 22 isolates belonged to 3 subfamilies of three genera including *Streptomyces* of *Streptomycineae* and *Streptomycetaceae*, *Lentzea* of *Pseudonocardineae* and *Actinosynnemataceae*, and *Amycolatopsis* of *Pseudonocardineae* and *Pseudonocardiaceae*. Most of which *Streptomyces*, accounting for 91% of the isolated psychrophilic actinomycetes. Among the 22 isolates, 40.9% had cellulase activity, 22.7% had amylase activity, 18.2% had protease activity, and

【收稿日期】 2016-11-20

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31260005);西藏农牧学院研究生创新计划项目(YJS2015-02)

【作者简介】 尹明远(1991—),男,内蒙古赤峰人,博士,主要从事极端环境放线菌研究。E-mail:397598979@qq.com

【通信作者】 何建清(1971—),女,四川南充人,教授,主要从事放线菌资源和生物防治研究。E-mail:hejianqingxz@163.com

27.3% had antifungal activity.【Conclusion】Tibet low-temperature habitat had rich low-temperature actinomycetes resources, and some of them had antagonistic and enzyme activities.

Key words: psychrophilic actinomycete; 16S rRNA; biological diversity; biological activity; Tibet

低温微生物可以在较低的温度下生长,它们通常分布在地球两极地区、高山、河流、冰川及冷库等寒冷环境的水域以及土壤中^[1]。低温微生物可分为嗜冷菌(psychrophile)和耐冷菌(psychrotrophie-bacteria)2种。其中嗜冷放线菌是在低温条件(0℃及以下)下可生长繁殖的放线菌,最适生长温度在15℃以下,最高生长温度不超过20℃;耐冷放线菌是在0~5℃可生长繁殖,最适生长温度高于20℃^[2]。20世纪50年代以后,各国学者陆续开展了对低温微生物的研究工作,目前我国低温微生物研究仅处于起步阶段,对低温放线菌的研究更少^[3]。由于低温放线菌长期生长在低温条件下,具有独特的生物学特性和适应机制,因此它们所产生的酶和抗生素等生物活性物质势必有其独特的功能性状,而且低温放线菌在低温环境的物质循环中发挥着重要作用。近年来,低温放线菌得到了各国学者的广泛关注,在水生生态系统和陆生生态系统相继分离出低温放线菌^[4],如Gesheva等^[5]在冰岛和南极洲分离出了耐低温放线菌的代表属链霉菌属(*Streptomyces*)、诺卡氏菌属(*Nocardia*)和地嗜皮菌属(*Geodermatophilus*);Mannisto等^[6]在温度较低的地下水中发现了低温放线菌的一个新属。研究表明,低温放线菌可以产生多种抗生素,有研究者从南极洲的冰川分离了1株嗜冷链霉菌(*Streptomyces* sp. Strain No. 8),其可以产生阿扎霉素B、尼日利亚菌素和大环内酯类抗生素^[6]。可见在温度较低的环境,低温放线菌是潜在的重要生物活性物质生产者。

西藏地域辽阔,具有得天独厚的气候条件,西藏高原平均海拔4 000 m以上,高寒缺氧、降水少、日照长、辐射强、生态环境独特,具有丰富的冰川和冰湖资源;西藏境内冰川面积27 400 km²,占全国冰川面积的46.7%;湖泊总面积25 055 km²,占全国湖泊面积的30%^[7];这些环境因素决定了该地区蕴藏着极为丰富的低温放线菌资源^[8]。目前,人们对西藏低温放线菌的群落组成、多样性、地理分布和天然生物活性的研究还很少。基于此,本试验以西藏低温放线菌为研究对象,探索西藏低温放线菌资源种类、分布、拮抗活性及其酶的应用潜力,为我国低温放线菌资源的开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 根据土质以及植被覆盖的差别,从西藏不同地区采集16份土样,置于4℃冰箱保存,土样详细情况见表1。

1.1.2 分离培养基 分离培养基共5种,分别为无机盐淀粉琼脂培养基、蔗糖察氏琼脂培养基、改良高氏一号培养基、甘油天门冬酰胺培养基(ISP5)和甘油精氨酸培养基^[3]。以上培养基于121℃灭菌30 min后,用10 mol/L NaOH将pH调至7.0,为抑制细菌和真菌生长,在分离培养基中均加入终质量浓度为70 mg/L的重铬酸钾。

1.2 样品预处理与菌株分离

将采集的新鲜土壤,不做风干、加热等预处理,称取10 g,转移至装有90 mL无菌水的三角瓶里,置于摇床120 r/min充分振荡,获得样品悬浮液,用移液枪取0.2 mL分别涂布于装有无机盐淀粉琼脂培养基、蔗糖察氏琼脂培养基、改良高氏一号培养基、甘油天门冬酰胺培养基(ISP5)和甘油精氨酸培养基的分离平板上,放入14℃恒温培养箱中倒置培养15~30 d。根据菌落形态、大小、颜色进行低温放线菌的初步分离,比较5种培养基的分离效果。之后通过形态特征和培养特征去重^[9],从中筛选出具有代表性的低温放线菌。

1.3 菌株生长温度的测定

以蔗糖察氏琼脂培养基作为基础培养基,采用液体试管培养法^[10],将代表性低温放线菌于0,5,10,15,20,25℃培养30 d后,观察各菌株的生长情况。

1.4 低温放线菌代表菌株16S rRNA的鉴定

按照文献[11]的方法提取1.3节菌株总DNA,利用细菌通用引物PA:5'-CAGAGTTTGATCCTGGCT-3'(对应*E. coli*的7—24位点),PB:5'-AGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'(对应*E. coli*的1 540—1 522位点),对菌株16S rRNA序列进行PCR扩增。PCR反应体系50 μL:2×EasyTaq SuperMix 25 μL,PA 1.5 μL,PB 1.5 μL,模板2 μL,无菌水20 μL。扩增条件为:95℃预变性4 min;94℃变性30 s,54℃退火30 s,72℃延伸1.5 min,30

个循环;72 ℃总延伸 6 min。得到的 PCR 产物直接

送到杭州擎科梓熙生物技术有限公司测序,序列碱

基数用 Clustal X^[12] 软件进行比对,然后用 MEGA 4

软件^[13] Neighbour-Joining 法^[14] 进行系统进化树构

建,用于检验支持率的重复抽样次数为 1 000 次。

表 1 西藏不同地区土壤样品基本情况

Table 1 Basic features of soil samples from different areas of Tibet

样品编号 Sample number	采样地点 Sample site	海拔/m Altitude	主要植被 Main vegetation	土壤 pH Soil pH	经纬度 Latitude and longitude
1	错高湖 Cuogao Lake	3 722	高山栎、高山松 <i>Quercus semecarpifolia</i> , <i>Pinus densata</i>	6.33	N30°,E93.5°
2	德姆拉山 Demula Mountain	4 530	雪层杜鹃、高山柳 <i>Rhododendron nivale</i> , <i>Salix cupularis</i>	6.40	N29.2°,E97.5°
3	米堆冰川 Midui Glacier	3 847	无植被 Non-vegetation	6.12	N29.47°,E96.5°
4	然乌湖 Ranwu Lake	3 850	珠芽蓼、胎生早熟禾 <i>Polygonum viviparum</i> , <i>Poa bulbosa</i>	6.52	N29.25°,E96.4°
5	米拉山 Mila Mountains	4 899	雪层杜鹃、矮嵩草 <i>Rhododendron nivale</i> , <i>Kobresia humilis</i>	7.23	N29.5°,E92.4°
6	羊卓雍湖湖滨 Yangzhuoyong Lake	4 441	冰川棘豆 <i>Glacier oxytropis</i>	8.71	N29.0°,E90.6°
7	昂仁县 Ngamring County	4 308	沙蒿、砂生槐 <i>Artemisia</i> , <i>Sophora</i>	9.06	N29.3°,E87.2°
8	卡若拉山冰川 Karuola glacier Mountain	5 198	无植被 Non-vegetation	8.76	N28.5°,E91.1°
9	红河谷 Red river Valley	4 919	大黄、龙胆 <i>Rumex nepalensis</i> Spreng., <i>Gentiana scabra</i> Bunge	8.68	N28.5°,E91.1°
10	昂拉山 Angra Mountain	4 528	委陵菜、冰川棘豆、莎草 <i>Potentilla</i> , <i>Glacier oxytropis</i> , <i>Sedge</i>	8.40	N29.2°,E87.2°
11	帮拉山 Bangla Mountain	4 694	爬地柏、雪灵芝 <i>Sabina procumbens</i> , <i>Arenaria kansuensis</i>	8.28	N29.3°,E86.8°
12	嘎拉山 Galashan	4 777	莎草、冰川棘豆 <i>Sedge</i> , <i>Glacier oxytropis</i>	8.01	N29.3°,E86.8°
13	日喀则萨迦县 Sakya County, Shigatse	3 904	青稞 <i>Hordeum vulgare</i>	8.74	N29.2°,E88.3°
14	日喀则边雄乡 Bianxiong Country, Shigatse	3 823	青稞 <i>Hordeum vulgare</i>	8.76	N29.3°,E89.1°
15	日喀则那布西村 Nabu Village, Shigatse	4 047	油菜 <i>Brassica campestris</i> L.	8.71	N29.1°,E87.5°
16	日喀则居仑村 Julun Village, Shigatse	4 533	车前、莎草 <i>Plantago</i> , <i>Sedge</i>	8.72	N29.3°,E86.8°

1.5 测定指标及方法

1.5.1 酶活性 淀粉酶、纤维素酶、蛋白酶活性测定均参照文献[15]的方法进行。

1.5.2 拮抗活性 参照文献[16-17]的方法,将拮抗放线菌菌株用质量分数 1% 黄豆饼粉浸液振荡培养,获得放线菌发酵液,将其与融化的 PDA 培养基按照 1:9 的体积比混匀,制成含放线菌发酵液的平板。采用菌丝生长速率法^[16],测定放线菌发酵液对靶标菌菌丝生长的抑制作用,以不含发酵液的平板为对照。选用的靶标植物病原真菌为玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、番茄早疫病(*Alternaria solani*)、南瓜枯萎菌(*Fusarium oxysporum*)、小麦赤霉菌(*Fusarium graminearum*)、梨轮纹病菌(*Botryosphaeria berengeriana*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium solani*)、梨黑斑病菌(*Alternaria alternate*)、苹果腐烂病(*Valsa ceratosperma*)、青稞条纹病菌(*Drechslera gramineunm* (Rabenh.) Shoem)、番茄

灰霉菌(*Botrytis cinerea*)、粉红聚端孢(*Trichothecium roseum*)。以上病原菌均由西藏农牧学院真菌实验室保存并提供。用十字交叉法测量拮抗圈直径(*D*,mm),根据拮抗圈的有无及 *D* 的大小,判断供试放线菌有无拮抗性及其拮抗强度,具体标准为:*D*≥15 mm,拮抗性强;10 mm<*D*<15 mm,拮抗性中;*D*≤10 mm,拮抗性弱。

2 结果与分析

2.1 西藏不同土壤样品中低温放线菌数量的分布特征

由表 2 可知,5 种培养基中以蔗糖察氏琼脂培养基的分离效果最好,共计分离到 389 株放线菌,平均每个土样分离到 24 株;其次是无机盐淀粉琼脂培养基,共计分离到 375 株,平均每个土样分离到 23 株;位于第 3 的是甘油天门冬酰胺培养基,共计分离到 292 株,平均每个土样分离到 18 株;分离效果较

差的是甘油精氨酸培养基和改良高氏一号培养基，分别分离到 22 株和 14 株，平均每个土样分离到 1 株。本研究分离到的土壤放线菌数量低于西藏慈巴沟自然保护区、西藏色季拉山和同属于青藏高原内陆本部地区的青海高寒草甸土壤^[18-20]，究其原因

由于不同研究所用土样采集、放线菌分离方法等均存在一定差异，可能造成了各地放线菌数量的差异。此外，本研究中样地的土壤类型、植被类型、植被状况、海拔和 pH 等影响放线菌数量的关键因素与前人研究的样地也不同。

表 2 西藏不同地区土壤样品中分离到的低温放线菌数量

土样编号 Soil sample number	无机盐淀粉 琼脂培养基 Inorganic salts-starch agar	蔗糖察氏 琼脂培养基 Sucrose Czapek dox aga medium	改良高氏一号 培养基 Modified Gause's No. 1 agar medium	甘油天门冬酰胺 培养基 Glycerol asparagine medium	甘油精氨酸 培养基 Glycerol arginine medium	总计 Total
1	9	13	0	10	0	32
2	6	17	0	2	0	25
3	1	3	0	19	0	23
4	14	15	0	11	0	40
5	9	17	0	17	0	43
6	7	8	0	8	6	29
7	109	13	1	18	1	142
8	3	5	1	21	0	30
9	13	2	1	15	10	41
10	13	26	0	16	2	57
11	8	25	0	8	0	41
12	42	21	0	10	0	73
13	11	11	1	23	1	47
14	30	26	5	18	2	81
15	49	51	1	48	0	149
16	51	136	4	48	0	239
合计 Total	375	389	14	292	22	1 092

2.2 西藏不同土壤样品中代表性低温放线菌的生长温度

通过形态特征和培养特征去重后，本试验从西藏 16 份土样中共分离得到 22 株有代表性的低温放线菌，将其于 0,5,10,15,20,25 ℃培养，观察其生长情况，结果见表 3。由表 3 可知，0 ℃能生长的低温

放线菌所占的比例为 36.4%；5 ℃能生长的低温放线菌所占的比例为 86.4%；在 10~25 ℃，供试 22 株低温放线菌均能生长，且生长状况良好。由此可知所分离的 22 株低温放线菌均为耐冷放线菌。它们的生长温度范围均比较宽，这可能是因为西藏昼夜温差较大之故。

表 3 温度对西藏 22 株代表性低温放线菌生长的影响

菌株编号 Strain number	0 ℃	5 ℃	10 ℃	15 ℃	20 ℃	25 ℃
H3	—	+	++	++	++	++
H4	—	+	++	++	++	++
H5	—	+	++	++	++	++
H6	—	+	++	++	++	++
H7	—	+	++	++	++	++
H9	+	+	++	++	++	++
H11	+	+	++	++	++	++
H12	—	+	++	++	++	++
H13	—	—	++	++	++	++
H14	—	+	++	++	++	++
H15	—	+	++	++	++	++
H19	—	+	++	++	++	++
H20	—	—	++	++	++	++
H26	—	—	++	++	++	++
RI-5-4	+	+	++	++	++	++
RI-18-2	+	+	++	++	++	++
RI-13-1	—	+	++	++	++	++

表 3(续) Continued table 3

菌株编号 Strain number	0 ℃	5 ℃	10 ℃	15 ℃	20 ℃	25 ℃
RI-7-2	+	+	++	++	++	++
RI-13-4	+	+	++	++	++	++
H8	—	+	++	++	++	++
RI-5-4-1	+	+	++	++	++	++
RI-26-3	+	+	++	++	++	++
合计 Total	8	19	22	22	22	22
比例/%Percent	36.4	86.4	100	100	100	100

注: +表示生长; ++表示生长良好; —表示不生长。
Note: + means growth; ++ means growth well; — means no growth.

2.3 西藏不同土壤样品中代表性低温放线菌菌株的鉴定

对从西藏土样中分离的 22 株代表性低温放线菌进行 16S rRNA 基因序列测定, 序列保存在 Gen-Bank 相应数据库中。用 Blast 搜索软件在 Gen-

Bank 等数据库进行相似度搜索, 得到相似度最高的相关性菌株的 16S rRNA 基因序列, Clustal X 比对应后, 用 MEGA 4 软件构建系统进化树(图 1), 确定 22 株低温放线菌的系统发育地位。

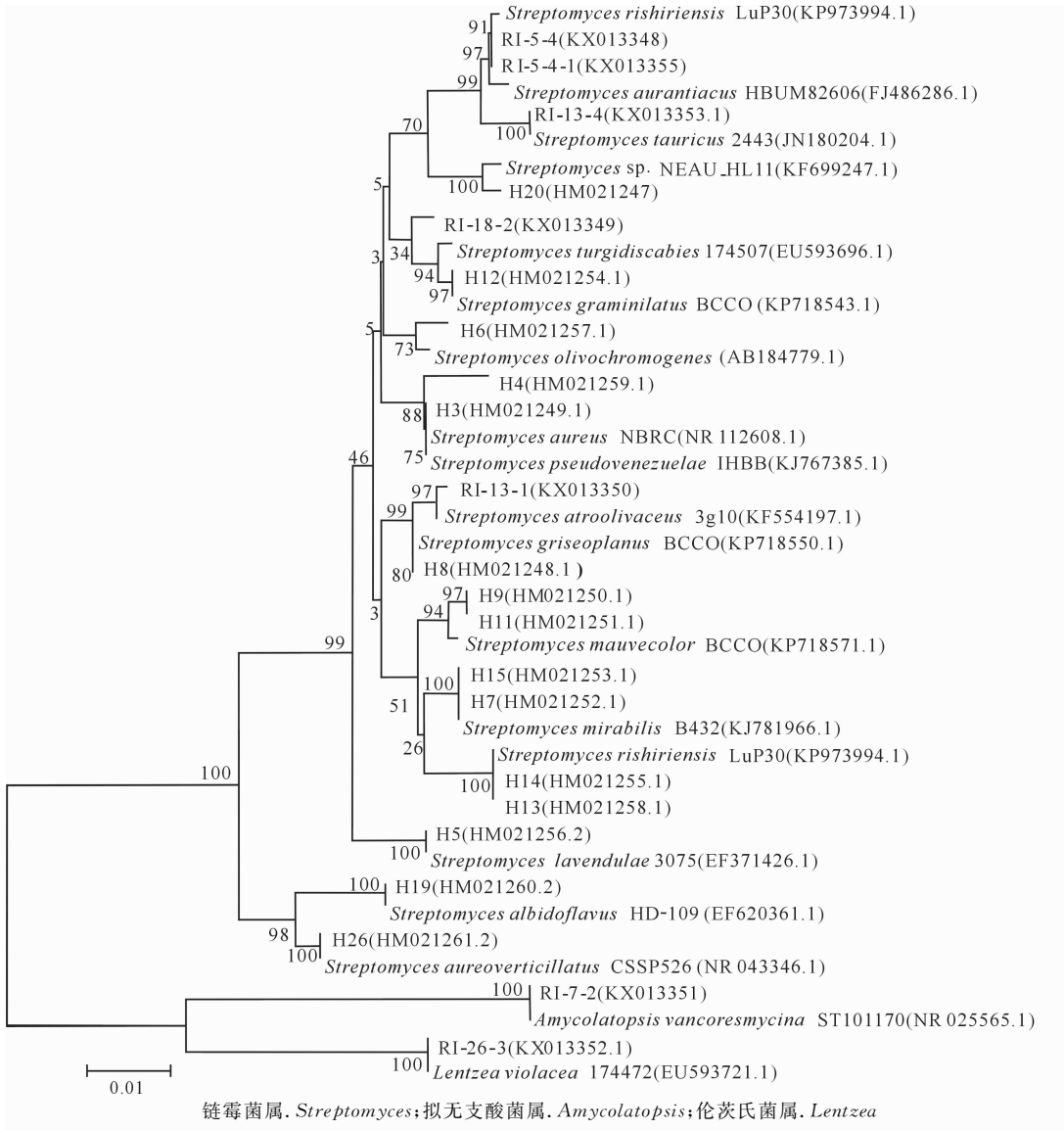


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的西藏 22 株代表性低温放线菌系统进化树
Fig. 1 System evolutionary tree of 22 strains psychrotophilic actinomycetes in Tibet based on 16S rRNA gene sequences

由图 1 可知,西藏 22 株代表性低温放线菌组成较简单,分布于放线菌门放线菌纲 2 个亚目 3 个科的 3 个属,即链霉菌亚目(*Streptomycineae*)链霉菌科(*Streptomycetaceae*)链霉菌属(*Streptomyces*)、假诺卡氏亚目(*Pseudonocardineae*)束丝放线菌科(*Actinosynnemataceae*)伦茨氏菌属(*Lentzea*)和假诺卡氏亚目(*Pseudonocardineae*)假诺卡氏菌科(*Pseudonocardiaceae*)拟无支酸菌属(*Amicolatopsis*);其中链霉菌属(*Streptomyces*)占分离菌的 91%,拟无支酸菌属(*Amicolatopsis*)和伦茨氏菌属(*Lentzea*)各占分离菌株的 4.5%,说明链霉菌数量在低温环境中仍占据主导地位。由图 1 还可知,供试的 22 株低温放线菌 16S rRNA 基因序列与参比菌株的相似度在 98.0%~99.0%。以 16S rRNA 基因序列相似度 $\geq 98.0\%$ 作为同一个物种的标准^[18-19],则可以判断,这 22 株低温放线菌均为已知放线菌属。

2.4 西藏不同土壤样品中代表性低温放线菌的拮抗性活性及酶活性

对分离的 22 株代表性低温放线菌进行拮抗活

性及酶活性测定,结果见表 4。拮抗活性试验结果(表 4)表明,22 株低温放线菌中,6 株具有拮抗活性,占供试菌株数的 27.3%。此外,这 6 株低温放线菌对不同靶标菌的抑制作用差异较大,其中对小麦赤霉菌具拮抗活性的菌株有 6 株,占供试菌株的 27.3%;对青稞条纹病菌具拮抗活性的菌株有 5 株,占供试菌株的 22.7%;对粉红聚端孢、番茄灰霉菌和南瓜枯萎菌有拮抗活性的菌株有 4 株,占供试菌株的 18.2%;对马铃薯干腐病菌、番茄早疫菌、梨轮纹病菌、苹果腐烂病、玉米小斑病菌和梨黑斑病菌有拮抗活性的菌株所占比例均较低。5 株具有拮抗活性的放线菌对青稞条纹病菌的抑制效果最好,抑菌圈直径均大于 20 mm,最大可达 30 mm。可见,西藏低温土壤中具有相对丰富的拮抗放线菌资源。

酶活性试验结果(表 4)表明,22 株低温放线菌中,9 株具有纤维素酶活性,占供试菌株的 40.9%;5 株具有淀粉酶活性,占供试菌株的 22.7%;4 株具有蛋白酶活性,占供试菌株的 18.2%。可见在西藏高寒山区,低温放线菌是其生态系统的重要成员,在土壤有机质的分解中扮演重要角色。

表 4 西藏不同土壤样品中 22 株代表性低温放线菌的拮抗活性及酶活性

Table 4 Antagonistic and enzyme activities of 22 strains of psychrotophilic actinomycetes from Tibet

菌株编号 Strain number	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone											纤维素酶活性 Cellulase activity	淀粉酶活性 Amylase activity	蛋白酶活性 Protease activity
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K			
H3	0	18	4	8	6	0	0	0	0	0	30	—	—	—
H4	0	18	10	10	12	0	0	0	0	0	0	—	—	—
H5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	+	—
H6	0	16	4	20	0	0	0	0	0	0	28	—	—	—
H7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	—	—
H9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	+	—
H11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
H12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	—	—
H13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	+
H14	0	6	14	22	28	0	0	0	0	0	20	—	—	—
H15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	+	—
H19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	+
H20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—
H26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	—	—
RI-5-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	—	—
RI-18-2	22	0	0	20	0	0	0	14	0	4	30	—	—	—
RI-13-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	—	—
RI-7-2	0	0	0	16	3	22	4	8	14	0	24	—	—	—
RI-13-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	++	—	+
H8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	+	—
RI-5-4-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+	—	+
RI-26-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	—	—	—

注: A. 玉米小斑病菌; B. 番茄灰霉菌; C. 南瓜枯萎菌; D. 小麦赤霉菌; E. 粉红聚端孢; F. 番茄早疫菌; G. 梨轮纹病菌; H. 马铃薯干腐病菌; I. 梨黑斑病菌; J. 苹果腐烂病; K. 青稞条纹病菌。—, 无活性; +, 活性弱; ++, 活性强。
Note: A. *Bipolaris maydis*; B. *Botrytis cinerea*; C. *Fusarium oxysporum*; D. *Fusarium graminearum*; E. *Trichothecium roseum*; F. *Alternaria solani*; G. *Botryosphaeria berengeriana*; H. *Fusarium solani*; I. *Alternaria alternata*; J. *Valsa ceratosperma*; K. *Drechslera gramineum* (Rabenh.) Shoem. “—”. No activity; “+”. Low activity; “++”. High activity.

3 结论与讨论

从西藏 16 份土样中分离得到了 22 株代表性低温放线菌,这 22 株菌分布于放线菌纲 2 个亚目 3 个科 3 个属内,其中链霉菌属最多,占分离菌的 91%,可见西藏地区低温放线菌组成较简单,这可能与西藏冰川、农田和雪山海拔高、缺氧、有机质分解缓慢、土壤干旱贫瘠等严酷的生态条件有关,这与前人研究结果^[20-23]一致,即链霉菌属是西藏低温环境的绝对优势菌种,这也是土壤放线菌区系的一个显著特点。分离的 22 株低温放线菌中,40.9% 的菌株具有纤维素酶活性,22.7% 的菌株具有淀粉酶活性,18.2% 的菌株具有蛋白酶活性。分离的 22 株低温放线菌中,6 株具有广谱抗菌活性,占供试菌株的 27.3%,这说明西藏因其环境特殊蕴藏着丰富的低温放线菌资源,有待于进一步的发掘及开发。

〔参考文献〕

- [1] 蒲玲玲. 青藏高原冰川与冻土微生物多样性的研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2006.
Pu L L. The study on microbial diversity from glacier and permafrost of Tibetan Plateau [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2006.
- [2] 徐丽华, 娄 恺, 张 华, 等. 微生物资源学 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2010.
Xu L H, Lou K, Zhang H, et al. Microbial resources [M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2010.
- [3] 杨宇容, 李启任. 低温环境中放线菌的研究 [J]. 云南大学学报 (自然科学版), 1997, 19(4): 397-402.
Yang Y R, Li Q R. A study on psychrophilic environment of actinomycetes [J]. Journal of Yunnan University (Natural Science Edition), 1997, 19(4): 397-402.
- [4] Dubrova M S, Zenova G M, Yakushev A V, et al. Psychrotolerant actinomycetes of plants and organic horizons in tundra and taiga soils [J]. Eurasian Soil Science, 2013, 46(8): 862-868.
- [5] Gesheva V, Negoita T. Psychrotrophic microorganism communities in soils of Haswell Island, Antarctica, and their biosynthetic potential [J]. Polar Biol, 2012, 35(2): 291-297.
- [6] Mannisto M R, Haggblom M M. Characterization of psychrotolerant heterotrophic bacteria from Finnish Lapland [J]. Syst Appl Microbiol, 2000, 29(3): 229-272.
- [7] 李传富, 苏治华, 张玉初. 西藏高原冰湖的保护与开发 [J]. 中国水土保持, 2007(11): 15-16.
Li C F, Su Z H, Zhang Y C. Protection and exploitation of ice lake in Tibet Plateau [J]. China Soil and Water Conservation, 2007(11): 15-16.
- [8] 颜 霞, 薛泉宏, 朱铭羲. 西藏土壤放线菌细胞成分及生理生化特性研究 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2007, 35(10): 213-218.

- Yan X, Xue Q H, Zhu M E. Research of cell component and physiological biochemical characteristics of 23 strains from Tibet soil [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2007, 35(10): 213-218.
- [9] 阮继生, 黄 英. 放线菌快速鉴定与系统分类 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
Ruan J S, Huang Y. Rapid identification and systematics of actinobacteria [M]. Beijing: Science Press, 2011.
- [10] 唐蜀昆, 李文均, 张永光, 等. 嗜盐放线菌生物学特性初步研究 [J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 15-19.
Tang S K, Li W J, Zhang Y G, et al. Study on the biological characteristics of *Halophilic actinomycetes* [J]. Microbiology China, 2003, 30(4): 15-19.
- [11] 徐 平, 李文均, 徐丽华, 等. 微波法快速提取放线菌基因组 DNA [J]. 微生物学通报, 2003, 30(4): 82-84.
Xu P, Li W J, Xu L H, et al. A microwave-based method for genomic DNA extraction from actinomycetes [J]. Microbiology China, 2003, 30(4): 82-84.
- [12] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [14] 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.
- [15] 张永光, 刘 晴, 王宏飞, 等. 新疆阜康盐碱地可培养兼性嗜碱放线菌多样性及其酶活筛选 [J]. 微生物学报, 2014, 54(2): 183-190.
Zhang Y G, Liu Q, Wang H F, et al. Biodiversity and enzymes of culturable facultative-alkaliphilic actinobacteria in saline-alkaline soil in Fukang, Xinjiang [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(2): 183-190.
- [16] 梁亚萍, 宗兆锋, 马 强. 6 株野生植物内生放线菌防病促生作用的初步研究 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2007, 35(7): 131-136.
Liang Y P, Zong Z F, Ma Q. Inhibiting and promoting effect on plants of six strains endophytic actinomycetes isolated from wild plants [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2007, 35(7): 131-136.
- [17] 吴文君. 植物化学保护实验技术指导 [M]. 西安: 陕西科学与技术出版社, 1998.
Wu W J. Laboratory instructor of plant chemical protection [M]. Xi'an: Shaanxi Science and Technology Press, 1998.
- [18] 马赛箭, 安 超, 常 帆, 等. 环青海湖地区可培养放线菌多样性及生物活性 [J]. 西北农业学报, 2015, 24(11): 133-139.
Ma S J, An C, Chang F, et al. Diversity and bioactivity of culturable actinobacteria from region of around Qinghai lake [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2015, 24(11): 133-139.

technique on the genetic diversity of *Paris* [J]. Journal of Si-chuan University (Natural Science Edition), 2006, 43 (5): 1105-1109.

[12] 王建波,张文驹,陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用 [J]. 植物分类学报, 1999, 37(4): 407-416.

Wang J B, Zhang W J, Chen J K. Application of ITS sequences of nuclear rDNA in phylogenetic and evolutionary studies of angiosperms [J]. Acta Phytotaxonomica Sinica, 1999, 37(4): 407-416.

[13] Neves S S, Watson M F. Phylogenetic relationships in *Bupleurum* (Apiaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS sequence data [J]. Ann Bot, 2004, 93: 379-398.

[14] 刘红彬,顾小龙,张海红,等. 基于 ITS 序列的不同产地裂叶荆芥系统发育分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(6): 1073-1077.

Liu H B, Gu X L, Zhang H H, et al. Phylogenetic analysis of *Schizonepeta tenuifolia* from different producing areas based on ITS sequences [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(6): 1073-1077.

[15] 高峰. 荆芥种质资源评价与种子质量标准研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2007.

Gao F. Study on resources enaluation and seed quality standards of *Nepeta cataria* L. [D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2007

[16] 梁丹,吴勇,曾燕如,等. 香榧 AFLP 实验体系的建立 [J]. 福建林业科技, 2007, 34(2): 93-96, 105.

Liang D, Wu Y, Zeng Y R, et al. Establishment of an AFLP system in *Torreya grandis* [J]. Journal of Fujian Forestry Science and Technology, 2007, 34(2): 93-96, 105.

[17] 武莹,刘春生,刘玉法,等. 5 种习用柴胡的 ITS 序列鉴别 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(10): 732-734.

Wu Y, Liu C S, Liu Y F, et al. ITS sequence identification of *Radix bupleuri* [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2005, 30(10): 732-734.

[18] 刘红彬,张丹参. 5 省裂叶荆芥 18S rDNA 全序列测定与系统发育分析 [J]. 广东农业科学, 2012, 39(18): 170-171.

Liu H B, Zhang D S. Sequencing and phylogenetic analysis of 18S rDNA of *Schizonepeta tenuifolia* from five provinces [J]. Agricultural Science of Guangdong Province, 2012, 39 (18): 170-171.

(上接第 227 页)

[19] 徐丽华,李文均,刘志恒,等. 放线菌系统学 [M]. 北京: 科学出版社, 2007.

Xu L H, Li W J, Liu Z H, et al. Actinobacterial systematics [M]. Beijing: Science Press, 2007.

[20] 何建清,岳海梅,张格杰. 慈巴沟自然保护区土壤放线菌区系分析及其生物活性测定 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(8): 83-89.

He J Q, Yue H M, Zhang G J. Diversity and bioactivity analysis of actinomycetes isolated from Cibagou Nature Reserve soil [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2010, 38(8): 83-89.

[21] 王启兰,曹广民,姜文波,等. 青海高寒草甸土壤放线菌区系研究 [J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 733-736.

Wang Q L, Cao G M, Jiang W B, et al. Study on actinomycetes population of alpine meadow soil in Qinghai [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(6): 733-736.

[22] 何建清,张格杰,张新军,等. 西藏色季拉山土壤放线菌的区系 [J]. 山地学报, 2008, 26(4): 503-508.

He J Q, Zhang G J, Zhang X J, et al. Study on actinomycetes distribution of Serkyimla mountainin Tibet [J]. Journal of Mountain Science, 2008, 26(4): 503-508.

[23] 蔡艳,薛泉宏,陈占全,等. 青藏高原东部几种自然土壤放线菌的生态分布 [J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(3): 378-383.

Cai Y, Xue Q H, Chen Z Q, et al. Ecological distribution of soil actinomycetes in eastern part of the Qinghai plateau [J]. China J Appl Environ Biol, 2004, 10(3): 378-383.