

云南重楼内生细菌的分离鉴定及系统发育树分析

魏娟¹, 何冬旭¹, 李国红², 张梁^{*1,3}

(1. 江南大学 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 云南大学 西南微生物多样性教育部重点实验室, 云南 昆明 650091; 3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用云南文山采集的人工栽培和野生云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch) 根茎, 对其内生细菌进行了分离、纯化及鉴定。分离得到 40 和 44 株云南重楼内生细菌。经 16S rDNA 测序, 在 NCBI 中比对, MEGA4 建系统进化树, 所得内生细菌分别鉴定为分属于 6 和 8 个属。其中, 人工栽培云南重楼内生细菌中, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和肠杆菌属 (*Enterobacter*) 分离频率分别为 35%、27.5%, 是其优势内生细菌群; 野生云南重楼内生细菌中, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 分离频率分别为 36.4%、20.4%, 是其优势内生细菌群。本研究结果体现了人工栽培和野生云南重楼内生细菌分布的差异及云南重楼根中内生细菌的多样性, 也为后续重楼内生菌的多样性开发提供了理论和实验基础。

关键词: 内生细菌; 云南重楼; 16S rDNA 测序; 系统发育树分析

中图分类号: Q 93 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2015)02—0165—05

Isolation and Identification of Endophytic Bacteria in *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch) and Phylogenetic Analysis

WEI Juan¹, HE Dongxu¹, LI Guohong², ZHANG Liang^{*1,3}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Microbial Diversity in Southwest China, Ministry of Education and Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan University, Kunming 650091, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this manuscript, the endophyte of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch) was isolated and identified. 40 and 44 endophytic bacteria were isolated from the root of cultivated or wild *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* in Wenshan, Yunnan province. They were then identified and categorized as 6 and 8 genera by 16S rRNA gene sequencing. *Bacillus* and *Enterobacter* were dominant genera in cultivated of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* because they accounted for 35% and 27.5% respectively in the identified bacteria; *Bacillus* and *Klebsiella* were dominant genera in wild *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* and accounted for 36.4% and 20.4% respectively. The results reflected the difference and biodiversity of endophytic bacteria

收稿日期: 2014-01-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31200126; 31371317); 江南大学青年教师基金项目(JUSRP1012)。

* 通信作者: 张梁(1978—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工学与工业微生物研究。

E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

between cultivated *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* and wild ones. This study provides theoretical and experimental basis for subsequent development of *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis*.

Keyword: endophytic bacteria, *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch), 16S rDNA sequence phylogenetic analysis

植物内生菌^[1-2]是指某一段生活史或者全部生活史在植物组织内,而对植物没有引起非常明显病害症状的某类微生物。以往研究表明,部分内生菌具有多重利用价值。例如,内生菌可以促进宿主的种子发芽、开花和生物量积累等生长过程^[3-4]。同时,内生菌能帮助宿主抵抗病虫害,是极具开发价值的“绿色农药”^[5-7]。另外,内生菌本身能产生具有生理活性的次级代谢产物^[8-9],或是转化宿主内具有生理活性的成分^[10-11],有很好的潜在药物利用、开发价值。因此,对植物内生菌的分离、鉴定是对植物培育、开发新资源等方面具有重大价值。

云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch) 为百合科植物,药用价值较高。然而,由于生长周期长、生存条件苛刻,造成云南重楼的产量较低,为云南省地道稀缺名贵药材。因此,研究、开发内生菌对重楼生长的天然促进作用,有望对重楼的产量、质量的提高做出贡献。目前,云南重楼内生真菌的研究已有报道^[12],但对云南重楼内生细菌比较的全面系统研究,国内外未见报道。因此,作者利用人工种植和野外采集的重楼根茎,对云南重楼内生细菌的类群进行了研究,为云南重楼内生细菌进一步开发和应用奠定理论和实践基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物样品来源 于秋冬季节,在云南重楼原产地云南文山分别采集人工栽培和野生云南重楼,去根茎部位进行实验。

1.1.2 培养基 LB:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.2 实验方法

1.2.1 云南重楼根茎表面消毒 分别取新鲜的人工栽培和野生云南重楼根茎,无菌水冲洗 5 min 左右,滤纸吸干表面的水分,无菌水冲洗 2 次;然后以 75%乙醇浸泡 5 min,无菌水冲洗 3 次;最后用 3%

次氯酸钠浸泡 5 min,无菌水冲洗 4 次,以最后一遍无菌水冲洗为菌落筛选对照。

1.2.2 内生菌的分离与纯化 以最后一遍无菌水冲洗为对照;最后用无菌解剖刀将云南重楼根茎去皮,将内部的组织转入研钵中,加入适量的灭菌过的石英砂和无菌水进行研磨,静置一段时间后,取上清液,稀释,涂布于 LB 培养基平板上,30 ℃恒温培养箱中培养 2~5 d,待平板上长出菌落,用平板划线分离方法,经过分离、纯化的反复过程,直至纯化得到典型菌落。

1.2.3 菌株的形态及生理生化鉴定 将细菌培养 48 h,对其形态进行观察,记录菌落大小、颜色、湿润度、透明度、边缘是否光滑以及是否突起等特点。并挑取部分菌落稀释涂片,用结晶紫染色 1 min,在显微镜下观察形态及有无芽孢的产生,再将未产生芽孢的菌株进行革兰氏染色。

1.2.4 菌株 16S rDNA 基因扩增 提取该菌株的基因组,以 8f:5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3',1492r:5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3 为上下游引物,扩增该菌株的 16S rDNA。PCR 反应体系为:DNA 模板 1 uL、10x PCR Buffer 5 uL、dNTP (2.5)4 uL、上游引物 2 uL、下游引物 2 uL、双蒸水 36 uL;PCR 反应条件为:95 ℃ 5 min,94 ℃ 30 s,55 ℃ 40 s,72 ℃ 90 s,经过 30 个循环,72 ℃延伸 10 min。

1.2.5 系统发育树构建 分别选取人工栽培云南重楼根的内生细菌和野生云南重楼根的不同属的内生细菌。将菌株的 16S rDNA 序列用 ClustalX2 进行多重序列对比,再用软件 MEGA4 按 Neighbor_Joining 方法构建 16S rDNA 系统发育树。

2 结果与分析

2.1 内生细菌分离结果

从人工栽培云南重楼的根茎中分纯化得到 40 株内生细菌。其中,14 株产芽孢的菌,3 株革兰氏阳

性菌,23株革兰氏阳性菌。从野生云南重楼根茎中分离纯化得到44株内生细菌。其中,16株芽孢杆菌,3株革兰氏阳性菌,25株革兰氏阴性菌。

2.2 菌株的 16S rDNA 的扩增与测序

提取菌株的基因组 DNA,经 PCR 扩增其 16S rDNA 序列,1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳显示,扩增序列条带在 1 500 bp 左右,见图 1。将琼脂糖电泳清晰的 PCR 产物纯化后转入 JM109 大肠杆菌中,送上海生工测序。84 株云南重楼内生细菌均获得测序结果。

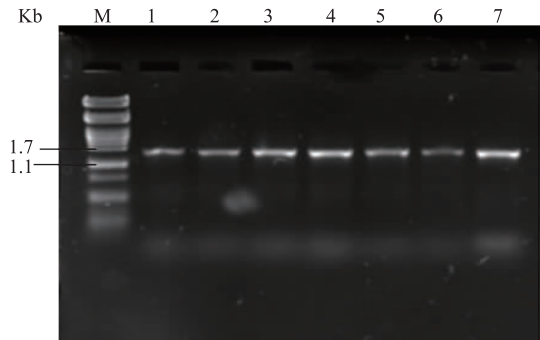


图 1 云南重楼部分内生细菌 16S rDNA 的 PCR 图谱
Fig. 1 Examples of PCR products of 16S rDNA from endophytic bacteria in *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch)

2.3 人工栽培和野生云南重楼根茎内生细菌鉴定

利用 BLAST 将 84 株内生细菌的 16S rDNA 测序结果和 GenBank 中的已知序列比对,查找与其同源性为 100%和 99%的菌株。最终确定人工栽培和野生云南重楼根茎内生细菌分别属于 6 和 8 个属,见表 1。

由表 1 可知:人工栽培的云南重楼内生细菌以芽孢菌属和肠杆菌属(*Enterobacter*)为优势菌,分别占总数的 35%和 27.5%。其次是克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、沙雷氏菌属(*Serratia*),分别占总数的 15%、12.5%。野生云南重楼内生细菌以芽孢杆菌属(*Bacillus*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)为优势菌,分别占总数的 36.4%和 20.4%。其次是克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*),分别占总数的 13.6%、11.4%。可见,一方面,人工栽培云南重楼的内生细菌和野生云南重楼的内生细菌的组成有一定的相似性:芽孢杆菌属(*Bacillus*)在两种云南重楼内生细菌中都是优势菌群;克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)也都是两种云南重楼内生细菌的重要组

成部分。另一方面,人工栽培云南重楼的内生细菌和野生云南重楼的内生细菌存在一定的差异:与野生云南重楼的内生细菌相比,人工栽培云南重楼的内生细菌中黄单孢菌属(*Xanthomonas*)是特有的;与人工栽培云南重楼的内生细菌相比,单胞菌属(*Stenotrophomonas*)、代尔夫特菌属(*Delftia*)和假单孢菌属(*Pseudomonas*)是特有的,体现了云南重楼内生细菌多样性及不同个体内生菌分布的差异。

表 1 云南重楼中内生细菌的属别组成

Table 1 Genus of endophytic bacteria in *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch)

内生细菌来源	属	数量/株	比例
人工栽培云南重楼	芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)	14	35%
	肠杆菌属(<i>Enterobacter</i>)	11	27.5%
	克雷伯氏菌属(<i>Klebsiella</i>)	6	15%
	沙雷氏菌属(<i>Serratia</i>)	5	12.5%
	泛菌属(<i>Pantoea</i>)	3	7.5%
	黄单孢菌属(<i>Xanthomonas</i>)	1	2.5%
野生云南重楼	芽孢杆菌属(<i>Bacillus</i>)	16	36.4%
	沙雷氏菌属(<i>Serratia</i>)	9	20.5%
	克雷伯氏菌属(<i>Klebsiella</i>)	6	13.6%
	肠杆菌属(<i>Enterobacter</i>)	6	13.6%
	假单孢菌属(<i>Pseudomonas</i>)	3	6.8%
	单胞菌属(<i>Stenotrophomonas</i>)	2	4.5%
	泛菌属(<i>Pantoea</i>)	1	2.3%
	代尔夫特菌属(<i>Delftia</i>)	1	2.3%

2.4 云南重楼内生菌系统发育树分析

选取人工栽培云南重楼根的内生细菌 RA13、RA16、RA21、RA22、RA26、RA36,野生云南重楼根的内生细菌中选取 YA01、YA05、YA09、YA11、YA12、YA27、YA29、YA31 的 16 株内生细菌的 16S rDNA 采用 Neighbor_Joining 方法建系统发育树,见图 2。从图 2 可以看出:分别来自于人工栽培和野生云南重楼的内生细菌克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)的 RA13、YA29,肠杆菌属(*Enterobacter*)的 RA36、YA01,泛菌属(*Pantoea*)的 RA21、YA27,沙雷氏菌属(*Serratia*)的 RA16、YA05,这四对同属细菌序列之间显示了较高的一致性,可能来源于相距较近的类群;来自于人工栽培云南重楼的黄单孢菌属(*Xanthomonas*)RA26 与来自于野生云南重楼的单胞

菌属(*Stenotrophomonas*)YA31 不同属细菌序列之间也显示了较高的一致性,可能也来源于相距较近的种类;分别来自于人工栽培和野生云南重楼的内生细菌的芽孢杆菌属(*Bacillus*)的 RA22、YA12 菌株,这一对同属细菌不在同一分支,同源性小,可能来源于相距较远的类群。

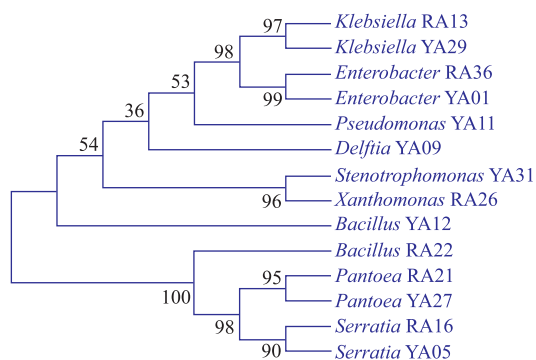


图2 云南重楼内生菌系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic analysis of isolated endophytic bacterial 16S rDNA from *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch)

3 结语

云南重楼是一种传统名贵的中药,为“宫血宁”、“热毒清”、“抗病毒颗粒”、“季德胜蛇药片”等

著名中成药的主要原料。现代科学发现,云南重楼中具有生理活性的成分是云南重楼皂甙,包括云南重楼皂甙 I 至 VII 共七种甾体皂甙。这些皂甙在血栓、高血压、肿瘤以及神经系统失调等多种疾病的治疗中具有卓越的疗效^[13-15]。然而,一方面云南重楼的引种驯化和组织培养没有取得突破性进展,云南重楼原料供不应求,寻找新的、可再生的云南重楼替代资源成为必然。另一方面,一些云南重楼皂甙对消化系统有一定的损害作用^[16]。由于近年来,对植物内生菌的研究,揭示了各种内生菌促进宿主植物生长和质量的机制,因此利用重楼内生菌提高重楼产率、抗病能力,或将云南重楼活性成分加以转化或修饰,是获得高产、高活性、低毒的新型云南重楼皂甙理想途径。

为了探索云南重楼内生细菌的多样性,发现合成重楼皂甙及得到重楼皂甙衍生物提供新菌源。实验共分离到 84 株内生细菌。优势菌为芽孢杆菌属(*Bacillus*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)。其中,代尔夫特菌属(*Delftia*)是第一次报道从云南重楼中分离到的。本研究结果表明,云南重楼内存在着丰富的内生细菌资源,他们很可能是云南重楼内生菌的重要组成部分。为今后云南重楼可持续开发利用,奠定一定的理论和实验基础。

参考文献:

- [1] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Mahaffee W F, et al. Bacterial endophytes in agricultural crops [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, 43(10): 895-914.
- [2] 韩继刚, 宋未. 植物内生细菌研究进展及其应用潜力[J]. *自然科学进展*, 2004, 14(4): 374-379.
HAN Jigang, SONG MO. The research progress and potential application on endophytic bacteria [J]. *Progress in Natural Science*, 2004, 14(4): 374-379. (in Chinese)
- [3] Tan R, Zou W. Endophytes: a rich source of functional metabolites[J]. *Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 448-459.
- [4] 蔡学清, 何红, 胡方平. 内生菌 BS-2 对辣椒苗的促生作用及对内源激素的影响[J]. *亚热带农业研究*, 2005, 1(4): 49-52.
CAI Xueqing, HE Hong, HU Fangping. The effects of endophytes BS-2 (*Bacillus subtilis*) on growth and internal phytohormone of capsicum[J]. *Subtropical Agriculture Research*, 2005, 1(4): 49-52. (in Chinese)
- [5] Castillo U F, Strobel G A, Ford E J, et al. Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigriscans*[J]. *Microbiology*, 2002, 148(9): 2675-2685.
- [6] 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 Yaping, ZONG Zhaofeng, MA Qiang. 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. (in Chinese)
- [7] 顾沛雯. 植物内生菌及其代谢产物在生物农药创制中的应用[J]. *农业科学研究*, 2009, 30(3): 56-59.
GU Peiwen. Plant endophyte and its secondary metabolites in the application of producing bio-pesticides [J]. *Journal of*

- Agricultural Sciences**,2009,30(3):56-59.(in Chinese)
- [8] 任智,张晓喻,祝凯,等.产薯蓣皂甙重楼内生菌的筛选与鉴定[J].微生物杂志,2007,27(2):6-9.
REN Zhi,ZHANG Xiaoyu,ZHU Kai. Screening identification of diosgenin-producing endophytic bacteria from *Paris polyphylla chinensis*[J]. **Journal of Microbiology**,2007,27(2):6-9.(in Chinese)
- [9] 赵明,贺声蓉,陈小静,等.产甾体皂甙重楼内生菌的筛选与鉴定[J].微生物学报,2005,45(5):776-779.
ZHAO Ming,HE Shengrong,CHEN Xiaojing,et al. Screening and identification of steroidal saponins-producing endophytes from *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch[J]. **Acta Microbiologica Sinica**,2005,45(5):776-779.(in Chinese)
- [10] LUO Shaoli,DANG Lizhi,LI Jianfang,et al. Biotransformation of saponins by endophytes isolated from *Panax notoginseng*[J]. **Chemistry & Biodiversity**,2013,10(11):2021-2031.
- [11] 付少彬.药用植物内生菌对乌苏酸的微生物转化筛选[J].中国药理学杂志,2011,46(16):1225-1228.
FU Shaobin. Screening of endophytic from medicinal plant for microbial transformation of ursolic acid[J]. **Chinese Pharmaceutical Journal**,2011,46(16):1225-1228.(in Chinese)
- [12] 孙桂丽,陈有为,夏国兴,等.云南重楼植物内生真菌的分离及抗菌活性筛选[J].微生物学杂志,2005,25(6):59-62.
SUN Guili,CHEN Youwei,XIA Guoxing,et al. Isolation of endophytic fungi in *Paris Polyphylla* Smith var.*yunnanensis* and the screening of its antibilic activity[J]. **Journal of Microbiology**,2005,25(6):59-62.(in Chinese)
- [13] Lee Mei-Sze,Yuet-Wa Judy Chan,Kong Siu-Kai,et al. Effects of polyphyllin D,a steroidal saponin in *Paris Polyphylla*,in growth inhibition of human breast cancer cells and in xenograft[J]. **Cancer Biology & Therapy**,2005,4(11):1248-1254.
- [14] Jenny Yuen-Nei Cheung,Rose Chik-Ying Ong,Yick-Keung Suen,et al. Polyphyllin D is a potent apoptosis inducer in drug-resistant HepG2 cells[J]. **Cancer Letters**,2005,217(2):203-211.
- [15] MAN Shuli,GAO Wenyuan,ZHANG Yanjun,et al. Chemical study and medical application of saponins as anti-cancer agents [J]. **Fitoterapia**,2010,81(7):703-714.
- [16] 王庆淑,徐涟.中西医结合抢救重楼中毒 1 例[J].云南中医学院学报,2003,26(2):49-50.
WANG Qingshu,XU Lian. The case of rescuing polyphylla poisoning in combine traditional Chinese and western medicine[J]. **Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine**,2003,26(2):49-50.(in Chinese)

科技信息

日本发布食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测方法及限量标准

2014 年 11 月 28 日,日本厚生劳动省医药食品局发布食安发 1128 第 3 号:发布食品中单核细胞增生李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的检测方法及限量标准。

根据 2014 年 10 月 21 日召开的食品药品卫生审议会食品卫生分科会议讨论,发布食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测方法及限量标准。设定单核细胞增生李斯特氏菌在非加热食用的肉制品和天然干酪(限软和半硬质的)的基准值为 100 cfu/g。

单核细胞增生李斯特氏菌定量试验法及基准值自公告发布之日起施行。

[信息来源]厦门 WTO 工作站.日本发布食品中单核细胞增生李斯特氏菌的检测方法及限量标准 [EB/OL]. (2014-12-22). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=48064>.