

新疆胀果甘草内生菌的分离和鉴定*

宋素琴** 欧提库尔·玛合木提 张志东 唐琦勇

(新疆农业科学院微生物应用研究所 乌鲁木齐 830091)

摘要 对采自新疆的健康野生胀果甘草不同组织中的内生菌进行分离,确立了分离的条件为 5% NaClO₄ 浸 5min,分离纯化得到 149 株细菌和 2 种真菌。通过形态学观察和革兰氏染色,细菌中芽孢杆菌为 93 株,杆状菌 56 株,使用法国梅里埃细菌自动鉴定仪对其进行鉴定,得到鉴定结果的细菌属于 13 个属,真菌显微形态鉴定属于 *Penicillium* 青霉菌属和 *Fusarium* 镰刀菌属。

关键词 内生菌,胀果甘草,健康甘草组织

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)05-0867-04

Isolation and Characterization of Endophytic Microorganisms in *Glaycyrrhiza inflat* Bat. from Xinjiang*

SONG Su-Qin** OTKUR Mahmut ZHANG Zhi-Dong TANG Qi-Yong

(Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091)

Abstract The present investigation was undertaken in order to select the surface-sterilization technique most efficient for eliminating epiphytes, to document endophytes of healthy tissues from *Glaycyrrhiza inflat* Bat. in Xinjiang. Surface sterilization with 5% commercial solution of sodium hypochlorite for 5 minutes was reaffirmed as adequate for removing epiphytes on licorice roots. From the 151 segments incubated, 149 bacterial isolates and 2 fungal isolates were obtained. From all the isolates, Bacterial isolates were identified by VITEK-AMS. Part of Bacteria were identified in 13 different genus. Fungal species were characterized as *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. with microscope.

Key words Endophytes, *Glaycyrrhiza inflat* Bat., Symptomless licorice tissues

内生菌广泛分布于植物体根、茎、叶、花、果实和种子等器官组织的细胞或细胞间隙中,其种类、数量、分布定植都因植物种类不同而异。在植物体内,不同的内生菌占据不同的生态位并相互作用,建立一种生态平衡。内生菌与寄主植物协同进化,在演化过程中二者形成了互惠关系,一方面植物为内生菌提供光合作用产物和矿物质,另一方面内生菌的代谢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。内生菌不仅能够参与植物次生成分的合成或对植物次生代谢产物进行转化,而且还能够独立产生丰富的次生代谢产物,是天然产物的重要来源^[1,2]。几乎所有的植物中都有生活的内生菌,目前学者们仅仅对极少数植物内生菌进行了完全的研究,因此从植

物内生菌中找到新物质几率是很大的,并且植物内生菌本身作为新的微生物资源也具有广泛的研究价值^[3]。

胀果甘草(*Glaycyrrhiza inflat* Bat.)为豆科多年生草本植物,在新疆主要分布于天山南坡的哈密盆地、吐鲁番盆地和塔里木盆地的河流两岸,其根茎的甘草酸含量较高,是甘草酸的主要原料。由于野生胀果甘草生长在南疆干旱、炎热、温差大、土壤盐碱重的暖温带荒漠区,它具有适应恶劣自然条件的许多特性和优良的经济性状^[4]。目前对甘草的研究主要集中在甘草酸和甘草黄酮的提取工艺、人工栽培、组织培养等方面,而未见对野生分布的胀果甘草内生菌的研究。本研究对分布在新疆的胀果甘草不同组织的内生菌进行分离和鉴定,对其内生菌

* 新疆维吾尔自治区新疆特殊环境微生物重点实验室开放课题(No. XJYS0203-2005-05)

** 通讯作者 E-mail: suqin-song@sohu.com

收稿日期:2007-01-23,修回日期:2007-04-02

在寄主中的种类和分布做初步的研究报道。

1 材料和方法

1.1 材料

胀果甘草(*Glaycyrrhiza inflat* Bat.)采自新疆焉耆甘草自然保护区,采集时间为2005年10月,由新疆石河子大学生物学院阎平教授鉴定。

1.2 试剂和仪器

Yj-875型医用净化工作台(苏州净化设备公司)、灭菌锅和9082-B型电热恒温培养箱(上海福玛实验设备有限公司)、培养皿(9cm×9cm)、试管(15mm×150mm)、解剖刀、革兰氏染色试剂盒、显微镜、VITEK-AMS仪(法国梅里埃细菌自动鉴定仪)、BAC(芽孢杆菌鉴定卡)、GNI(革兰氏阴性菌鉴定卡)、GPI(革兰氏阳性菌鉴定卡)均购自法国梅里埃公司。

1.3 培养基

(1)马铃薯葡萄糖培养基(PDA):马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂粉16g,水1000mL。

(2)肉汁冻培养基(NA):牛肉浸膏3g,蛋白胨8g,琼脂粉16g,水1000mL。

(3)高氏一号培养基:可溶性淀粉20g,可溶性淀粉2g, K_2HPO_4 0.05g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05g, KNO_3 0.1g, $NaCl$ 0.05g, $FeSO_4$ 0.001g,琼脂2g,水100mL, pH 7.2~7.4。

1.4 内生菌的分离和纯化

1.4.1 分离条件的确立 (1)70%酒精浸5s,0.1% $HgCl_2$ 浸5min,再用无菌水冲洗5遍。(2)70%酒精浸5s,5% $NaClO_4$ 浸5min,再用无菌水冲洗5遍。

取新鲜洗净的胀果甘草的根用刀横切成0.5cm长的小块,按上述两种条件进行表面消毒,然后将表面消毒过的小块用灭菌的解剖刀切去表面一层,再切成0.5cm×0.5cm小块,用灭过菌的镊子移放在PDA、NA和高氏一号培养基上,每皿均匀放置6~8块,每种培养基设3个重复,28℃暗培养。同时将最后一遍冲洗的无菌水用移液枪取0.5mL移入培养基上,用灭菌的刮铲均匀涂布于3种培养基上,每种培养基设3个重复,28℃暗培养,作为表面消毒的对照。24h后观察是否有菌长出,未长菌说明表面消毒彻底,有菌生长说明表面消毒不够彻底。两种表面消毒条件比较,确定条件(2)为理想的表面消毒条件^[5,6,7]。

1.4.2 内生菌的分离和纯化:分别取新鲜洗净的胀果甘草的根、茎、果荚用解剖刀切割成0.5cm×0.5cm的小块,再按上述的条件(2)进行表面消毒,再用灭菌的解剖刀将其剖开,用灭菌的镊子将靠内侧的面贴放在PDA、NA和高氏一号培养基上,每皿均匀摆放6~8块,再将培养皿放入恒温培养箱中,28℃暗培养。每隔12h进行观察,48h后将长出的菌体转接在与之相同的培养基上,28℃暗培养48h后进行纯化,采用划线和梯度稀释两种方法反复纯化得到纯培养的菌株。

1.5 内生菌的形态学观察和归类鉴定

1.5.1 内生细菌的鉴定:细菌纯化后按照梅里埃细菌自动鉴定仪的鉴定要求归类为革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌和芽孢杆菌。将纯化的菌株培养24h,涂片用结晶紫染色2min,在显微镜下观察形态和有无芽孢的产生,初步归类,再将未产生芽孢的菌株进行革兰氏染色。

将已纯化的细菌在28℃恒温培养16h,预处理菌悬液,分别对应使用GPI卡、GNI卡和BAC卡,放入VITEK-AMS仪,24h后获得生理生化反应结果和部分鉴定结果。

BAC测试卡:蔗糖、四氮唑红、半乳糖、阿拉伯糖、木糖、甘露醇、果胶、7%氯化钠、七叶苷等31项生理生化反应。

GNI测试卡:氧化酶、葡萄糖氧化、葡萄糖发酵、阿拉伯糖、七叶树苷、甘露醇、麦芽糖、蔗糖等30项生理生化反应。

1.5.2 内生真菌的鉴定:(1)I菌:菌落黄绿色,分生孢子梗直立,顶端一至多次分枝,形成扫帚状,分枝顶端产生瓶状小梗,小梗顶端产生成串的分生孢子。其菌落形态和显微结构的描述与参考书中青霉属*Penicillium*特征表述一致^[9,10],因此将其归入*Penicillium*。

(2)II菌:菌落白色,圆形,在PDA平板上产红色水溶性色素。显微观察分生孢子梗无色单生,细长,有分枝,产生瓶形小梗。分生孢子无色,孢子多数单细胞,卵形或长圆形,单生,其菌落形态和显微结构的描述与参考书镰孢霉属*Fusarium*表述一致^[9,10],因此将其归入*Fusarium*。

2 结果与分析

分离纯化得到可培养的149株细菌和2种真

菌 ,从茎中分离得到 21 株细菌 ,果荚中得到 21 株细菌和 1 种青霉菌 ,根中 107 株细菌和 2 种真菌。通过菌丝形态和显微镜观察孢子形态和着生方式 ,确定真菌为青霉菌和镰刀菌两种 ,具体种类和分布见表 1 和表 2。

表 1 不同组织的胀果甘草内生细菌种类 ^[8,9]	
分离部位	内生细菌种类
根	<i>Serratia</i> 沙雷氏菌属
	<i>Yersinia</i> 耶尔森菌属
	<i>Pantoea</i> 泛菌属
	<i>Enterobacter</i> 肠杆菌属
茎	
果荚	

表 2 不同组织的胀果甘草内生真菌种类		
分离部位	内生真菌种类	
根	<i>Penicillium</i> 青霉菌属	<i>P. sp.</i> 青霉菌
	<i>Fusarium</i> 镰刀菌属	<i>F. sp.</i> 镰刀菌
果荚	<i>Penicillium</i> 青霉菌属	<i>P. sp.</i> 青霉菌

3 讨论

可培养的内生菌中来自茎的有 21 株细菌 ,果荚有 21 株细菌和 1 种青霉菌 ,根有 107 株细菌和 2 株真菌 ,分别占分离总数的 13.8%、14.5% 和 71.7% ,表明根中内生菌的数量最多 ,其次为果荚和茎。

从表 1 中可以看出 :根中内生菌分属于 14 个属 ,18 个种 ;茎中内生菌分属于 3 个属 ,10 个种 ;果荚内生菌为 2 个属 ,3 个种。根中的菌株种类较多 ,果荚菌株的种类较少 ,茎中的菌株主要为芽孢杆菌。对照《伯杰细菌鉴定手册》,革兰氏阴性兼性厌氧杆菌的肠杆菌科中有 4 个属 ,弧菌科有 2 个属 ,革兰氏阴性球菌和杆菌中有不动杆菌属^[8]。

本实验没有得到放线菌 ,主要原因可能是采用的培养基和培养条件不合适。在菌株的纯化过程中 ,由于人工培养条件的有限 ,导致有些菌株丢失。得到的革兰氏阳性菌株的生理生化反应结果 ,为进一步鉴定提供依据。我们在纯化和鉴定过程中发现 :*B. subtilis* 枯草芽孢杆菌和 *B. licheniformis* 地衣芽孢杆菌、*B. amyloliquefaciens* 淀粉液化芽孢杆菌混生 ,*B. pumilus* 短小芽孢杆菌和 *B. amyloliquefaciens* 淀粉液化芽孢杆菌、*Paenibacillus* (*Bacillus*) *thiaminolyticus* 解硫氨素芽孢杆菌混生 ,*B. cereus group* 蜡质芽孢杆菌和 *Paenibacillus* (*Bacillus*) *alvei* 蜂房芽孢杆菌、*Virgibacillus* (*Bacillus*) *pantothenics* 枝芽孢杆菌混生等现象。在分离和纯化过程中 ,由于人工培养打破了这些菌株自然分布的数量 ,使其中有些菌株成为人工培养条件下数量占优势的群体。

结合得到的鉴定结果和相关查询 ,我们还发现有些菌株是动物的致病病原菌 ,例如 :*K. ozaenae* 臭鼻克雷伯菌^[12,13] 和 *M. morgani* 摩氏摩根氏菌^[14] 等 ,但这些菌株对胀果甘草却是安全的 ,并且从根中分离和鉴定出的内生细菌大多与土壤中得到的细菌种类相同 ,例如 :*S. plymuthica*、*P. agglomerans* ,这为内生菌起源于外部自然环境的论断提供了依

据^[15,16,17]。

当前对内生菌的研究较多的是内生真菌,内生菌的开发利用始于生物防治及其对寄主植物的促生作用等,药用植物内生菌的研究主要集中在次生代谢产物的研究^[18,19]。对以上菌株的次生代谢产物的研究将在后续的文章中详细报道。

致谢 本研究得到了石河子大学阎平教授的大力帮助,在此表示衷心的感谢。

参考文献

- [1] Gary A. Strobel, *Microbes and Infection*, 2003, **5**(6): 535 ~ 544.
- [2] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 2004, **23**(2): 86 ~ 91.
- [3] 李能章, 彭远义. 生物技术, 2004, **14**(2): 69 ~ 71.
- [4] 李兴莲, 钱建江. 巴州科技, 2001, **2**: 15 ~ 17.
- [5] L Cao, Z Qiu, J You, *et al.* Letters in applied microbiology, 2004, **39**: 25 ~ 430.
- [6] Lixiang Cao, Zhiqi Qiu, Jianlan You, *et al.* Microbiology Letters, 2005, **247**: 147 ~ 152.
- [7] 方中达. 植病研究方法(第三版). 北京: 中国农业出版社, 1998. pp. 179 ~ 182.
- [8] R E 布坎南, N E 吉本斯. 伯杰细菌鉴定手册(第八版). 1984. pp. 274 ~ 604.
- [9] 魏景超著. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 下册, 1979. pp. 501 ~ 602.
- [10] 许志刚著. 普通植物病理学. 北京: 农业出版社, 1997. pp. 93 ~ 97.
- [11] George M Garrity, Julia A Bell, Timothy G Lilburn. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*(2nd Edition) 2004. pp. 98 ~ 99.
- [12] 李相新, 彭理年. 遵义医学院学报, 1997, **20**(1): 40 ~ 41.
- [13] 马佳毓, 张文莉, 付英梅. 微生物学杂志, 2004, **24**(5): 106 ~ 107.
- [14] 陆小茜, 邹为民, 谭爱萍, 等. 淡水渔业, 2005, **35**(2): 1 ~ 5.
- [15] 王茂法, 朱家新, 王琪, 等. 中国动物检疫, 1999, **16**(3): 11 ~ 12.
- [16] 沈德龙, 冯永君, 宋未. 微生物学杂志, 2002, **22**(1): 40 ~ 42.
- [17] 洪永聪, 胡方平, 黄晓南. 福建农林大学学报, 2002, **31**(1): 32 ~ 36.
- [18] Stefano Mocali, Emanuela Bertelli, Francescopaolo Di Cello, *et al.* Research in Microbiology, 2003, **154**: 105 ~ 114.
- [19] S Larran1, A Perello, M R Simon, *et al.* World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2002, **18**: 683 ~ 686.