

甘草内生细菌多样性研究

张 敏 沈德龙* 饶小莉 曹凤明 姜 昕 李 俊

(中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 北京 100081)

摘 要: 以分离培养的方法对内蒙古鄂尔多斯市甘草基地野生及栽培甘草内生细菌的多样性进行了初步研究。结果表明, 野生及栽培甘草植株内存在大量种群丰富的内生细菌。经 ERIC-PCR 指纹图谱分析, 共分离到 120 株内生细菌, 野生及栽培甘草均表现出根和叶部位的内生细菌数量多于茎部。对其中 82 株进行 16S rDNA 片段测序分析, 结果表明这些内生细菌分别与 GenBank 中 α 、 β 、 γ -Proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria 五类细菌中的 19 个已知属相似性达到 97% ~ 100%。内生细菌的主要优势种群为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、泛菌属(*Pantoea* sp.)和沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)。

关键词: 甘草, 内生细菌, ERIC-PCR, 多样性分析

Diversity of Endophytic Bacteria Isolated from *Glycyrrhiza*

ZHANG Min SHEN De-Long* RAO Xiao-Li CAO Feng-Ming JIANG Xin LI Jun

(Institute of Agricultural Resources and Regional planning, Chinese Academy of Agriculture Science, Beijing 100081)

Abstract: 120 strains of endophytic bacteria identified by ERIC-PCR were isolated from wild and cultivated *Glycyrrhiza uralensis* plants which collected from Erdos Innermongolia province. The identified results indicated that *Glycyrrhiza uralensis* plants has plenty of endophytic bacterium in density and population, and the density is higher in root and leave than in stem. Partial sequence analysis of 16S rDNA gene of 82 strains indicated that these strains were in a high similarity with 19 known genus which belong to α 、 β 、 γ -Proteobacteria、Firmicutes and Actinobacteria. The dominant genus were *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Pantoea* sp. and *Serratia* sp..

Keywords: *Glycyrrhiza*, Endophytic bacteria, ERIC-PCR, Diversity analysis

中华宝草-甘草, 是我国两千多种草药中用量最大的一味药, 素有“十方九草, 无草不成方”之说。甘草为多年生豆科草本植物, 除了具有丰富的药用价值外, 还能生长在低温及夏季酷热的荒漠、半荒漠地带, 发达的地下根系使其能够防风、固沙固土, 是一种优良的生态先锋植物。另外, 近年来甘草在饲料、食品、化妆品等轻工业方面用途也越来越广泛。

长期以来, 我国对甘草的研究主要集中在化学成分、药理作用、临床应用等方面, 并取得了显著成果^[1]。随着人们对甘草需求量的日益扩大, 发展人工种植甘草成为解决野生甘草资源不足, 保护环境的唯一出路。目前, 人们已在甘草的育种, 栽培技术等多方面开展了研究, 而涉及到微生物与甘草之间的研究却开展得不多。

植物内生细菌(Endophytic Bacteria)是能定殖在健康植物组织并与植物建立了和谐联合关系的一类微生物^[2]。内生细菌具有丰富而强大的生物学作用: 固氮作用、促植物生长作用、以及增宿主植物抗逆境, 抗病虫害等作用^[3]。到目前为止, 涉及到内生细菌研究的植物已达上百种, 其中研究较多的植物有牧草, 棉花, 小麦, 高粱, 水稻, 玉米, 马铃薯, 甘蔗, 甜菜等, 但对中草药中内生细菌的研究仍不多见。为此, 本试验室采用微生物和分子生物学手段对甘草内生细菌进行了分离和鉴定, 对其类群及分布规律进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 供试植物

试验用野生及栽培甘草选自内蒙古鄂尔多斯市杭锦旗锡尼镇伊泰制药甘草基地。采样时, 于不同生长点采集多株野生及栽培甘草, 并与根际土一同带回实验室。

1.2 培养基

营养琼脂培养基: 牛肉膏 3 g, 蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1000 mL, pH6.8~7.0。

A4 无氮培养基: $C_{12}H_{22}O_{11}$ 5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, $CaCO_3$ 0.1 g, Na_2HPO_4 2 g, $FeCl_3$ 0.005 g, 琼脂 18 g, 蒸馏水 1000 mL, pH7.0。

TSA 培养基: 胰蛋白胨 15 g, 大豆蛋白胨 5 g, NaCl 5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1000 mL, pH7.1~7.5。

1.3 PCR 扩增所用试剂

PCR 反应体系购自天根生化科技北京有限公司, 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 内生细菌的分离与纯化

取采集到的甘草植株的根、茎、叶部位作为样品研究对象。分别取 1 g 样品用流水冲洗多次, 滤纸吸干水分, 75%酒精浸泡 3 min, 无菌水冲洗 5~6 次, 2% NaClO 浸泡 1 min~20 min, 无菌水再冲洗 5~6 次, 最后一次清洗的水涂 TSA 培养基平板检查灭菌效果。表面灭菌干净的样品放于无菌研钵中, 充分捣碎研磨后, 加入装有 10 mL 无菌水的试管中, 混匀后梯度稀释 3 次, 取 0.1 mL 涂布到营养琼脂培养基和 A4 无氮培养基上, 每个梯度每种培养基 3 个重复, 28 °C 培养 2 d~3 d。根据菌落形态(大小、形状、颜色、表面光泽、透明度和质地等), 菌体形态(形状, 革兰氏染色反应、大小、排列方式和有无芽孢等)分别

挑取不同类细菌, 在相应培养基平板上纯化, 纯化后的内生细菌接于相应培养基斜面上, 4 °C 保存备用。

1.5 内生细菌 DNA 制备

取 5 mL 培养好的菌液于 EP 管中离心收集菌体, $1 \times TE$ 缓冲液洗涤 2 次后, 加入 500 μL GUTC 缓冲液混匀, 室温放置 15 min, 加入 40 μL 硅藻土吸附缓冲液, 振荡混匀, 室温放置 15 min 后, 13000 r/min, 离心 1 min, 弃上清, 沉淀加入 200 μL GUTC 缓冲液混匀, 室温放置 10 min, 13000 r/min, 1 min 离心, 弃上清, 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每次 300 μL , 8000 r/min, 3 min 离心, 200 μL 70%酒精洗涤 1 次, 真空抽干, 加 TE 缓冲液, 65 °C 下复溶, 13000 r/min, 5 min 离心, 吸取上清, 即为细菌 DNA。

1.6 内生细菌的 ERIC-PCR 扩增

ERIC 引物序列^[4]:

ERIC1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'

ERIC2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGC-3'

反应体系(25 μL): 细菌 DNA 模板 50 ng, $10 \times$ buffer 2.5 μL , $MgCl_2$ (25 mmol/L) 5.6 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , 引物(10 $\mu mol/L$)各 1 μL , Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ μL):0.25 μL , 加水补足 25 μL 。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 1 min, 42 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 8 min。反应结束后, 取 5 μL PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳检测。

1.7 内生细菌的 16S rDNA 片段的测序分析

采用细菌通用引物 799f 5'-AACAGGATTA-GATACCCTG-3' 和 1492r 5'-GGCTACCTTGTTACG-ACTT-3' 扩增内生细菌 16S rDNA 中的 V5、V6、V7、V8 及 V9 5 个高变区。反应体系(25 μL): 细菌 DNA 模板 50 ng, $10 \times$ buffer (Mg^{2+}) 2.5 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , 引物(10 $\mu mol/L$)各 1 μL , Taq DNA 聚合酶(2.5 U/ μL) 0.15 μL , 加水补足 25 μL 。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 10 min。得到的序列长度约为 730 bp, 通过琼脂糖凝胶电泳检测后, 送上海生物工程技术服务有限公司测序, 将序列提交到 GenBank 登记, 收录号为 EU088014-EU088095, 在 GenBank 中用 BLAST 进行比对分析, 寻找具有较高同源性的 16S rDNA 序列。

2 结果与分析

2.1 甘草不同部位中内生细菌的分离结果

将采集的野生及栽培甘草不同组织器官根、茎、

叶表面消毒后进行组织内部内生细菌的分离。结果发现,在营养琼脂培养基和 A4 无氮培养基平板上均长出大量菌落,菌落形态存在明显差异,说明甘草组织中存在大量的内生细菌,而且内生细菌的类群丰富。

通过对平板上的菌落计数,发现不同样品之间内生细菌的菌落数分布在 3.10×10^2 CFU/g 鲜重~ 1.37×10^6 CFU/g 鲜重上。将 A4 无氮培养基上得到的内生细菌涂布在营养琼脂培养基平板上,去除与营养琼脂培养基上生长相同的细菌,得到只能在 A4 无氮培养基上生长的内生细菌,这些细菌与从营养琼脂培养基分离得到内生细菌共同经过纯化及镜检,根据菌落和菌体差异,最终获得内生细菌 178 株。内生细菌详细分布情况见表 1。由表可知:内生细菌在甘草根、茎、叶部位的菌落数和种群数量均有差异,无论是野生甘草还是栽培甘草其根部和叶部

的内生细菌种类都比茎部丰富,其中,野生根部内生细菌类群最多,其次是栽培叶,种群密度最大的是野生茎部。总体来说,野生甘草内生细菌菌落数大于栽培甘草,而种群数量没有较大差异;样品的菌落数与种群数量之间没有必然的线性关系,因为观察内生细菌的分离平板时,有的平板上虽然菌落数较多,但菌落大小,颜色,形态均一致,说明细菌的种群数量不丰富,有的平板则相反,菌落数量少却种类丰富。

2.2 ERIC-PCR 图谱及分析

将所得到的 178 株细菌进行 ERIC-PCR 扩增,除 1 株分离自野生甘草根部 A4 无氮培养基的细菌无扩增条带外(原因可能是该株细菌基因组 DNA 不含 ERIC 序列),其他菌株均有扩增条带。图 1 为部分菌株的 ERIC-PCR 电泳图谱。

| 表 1 内生细菌在甘草植株内的分布情况 | | | | | | |
|---|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Table 1 Distribution of endophytic bacterias in <i>Glycyrrhiza uralensis</i> plants | | | | | | |
| | WR*(野生根) | WS(野生茎) | WL(野生叶) | CR(栽培根) | CS(栽培茎) | CL(栽培叶) |
| 内生菌菌落数(CFU/g 鲜重) | | | | | | |
| Population number (CFU/g fresh weight) | 6.75×10^2 | 1.37×10^6 | 2.34×10^4 | 3.10×10^2 | 4.95×10^2 | 2.44×10^3 |
| 种群数量(株) | | | | | | |
| Strain number (Strain) | 46 | 19 | 20 | 28 | 22 | 43 |

注:W: Wild(野生的); C: Cultivated(栽培的); R: Root(根); S: Stem(茎); L: Leaf(叶)

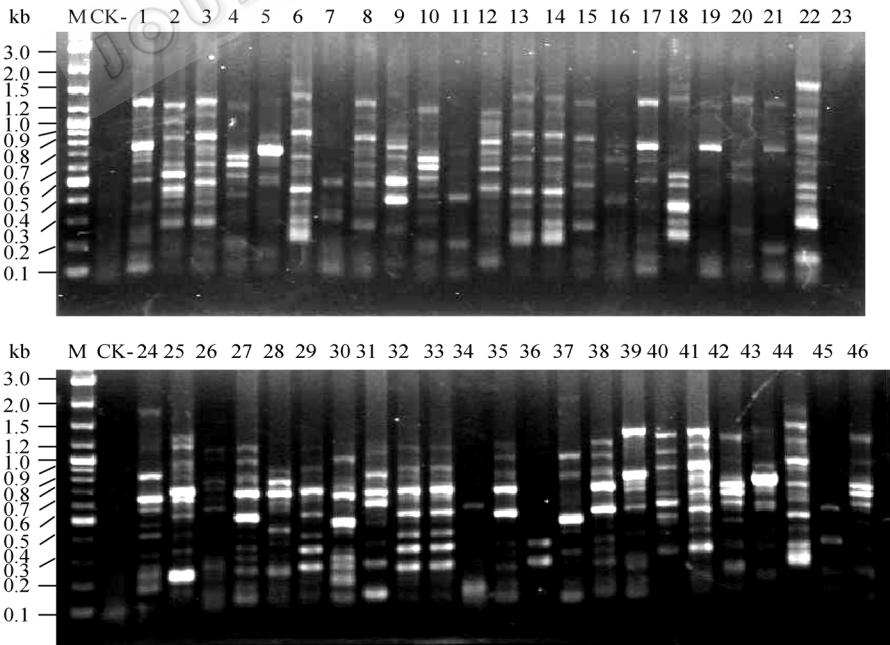


图 1 部分甘草内生细菌的 ERIC-PCR 指纹图谱
Fig. 1 The ERIC-PCR fingerprints of endophytic strains

M: 2-Log DNA Ladder; ck-: 阴性对照; 1-46: 分离到的内生细菌
M: 2-Log DNA Ladder; ck-: Negative control; 1-46: Endophytic bacterias

ERIC-PCR 结果表明, 多数内生细菌之间的指纹图谱是不同的, 说明这些内生细菌属于不同的种, 内生细菌有着丰富的多样性; 部分内生细菌虽然在菌落和菌体形态上有所差异, 但其 ERIC-PCR 指纹图谱却是完全相同的(如: 6、13 和 14; 29、32 和 33), 说明他们是同一种菌。将不同种细菌保留, 同种细菌合并, 最终获得内生细菌 120 株。

2.3 甘草内生细菌多样性及动态分布分析

根据菌落菌体形态, 结合 ERIC-PCR 指纹图谱, 选取其中 82 株内生细菌进行 16S rDNA 片段扩增。PCR 产物经测序后在 GenBank 中用 Blast 进行检索和同源性比较。按 16S rDNA 序列相似性大于 97% 的菌株归于同一物种计, 这 82 株内生细菌分别属于 5 类细菌中的 19 个已知属, 一些内生细菌与部分已知种具有较高相似性。这 5 类细菌包括 α -Proteobacteria、 β -Proteobacteria、 γ -Proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria。其中 γ -Proteobacteria 和 Firmicutes 最多, 分别占 45.78% 和 42.17%, 剩余的 12.05% 为其余 3 类。共有 30 株分离内生细菌与 Firmicutes 中的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)相似性为 97%~100%, 为分离到的甘草内生细菌中的最优势属。 γ -Proteobacteria 做为最优势类群包含了 9 个属的细菌, 其中 15 株与假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)相似性为 99%, 为分离内生细菌中的第二优势属; 有 9 株和 5 株分别与泛菌属(*Pantoea* sp.)和沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)相似性为 98%~100%, 为第三集团的优势属; 剩余 8 株中有 6 株分别与肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella* sp.)、柠檬酸杆菌(*Citrobacter* sp.)、不动杆菌属(*Acinetobacter* sp.)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas* sp.)同源性最高, 1 株与分离自坦桑尼亚的坦噶尼喀湖的非培养 γ -Proteobacteria(*Uncultured gamma proteobacterium*)细菌相似性为 99%, 1 株与布丘氏菌属的 *Buttiauxella warmboldiae*、*Buttiauxella noackiae* 两个种相似性仅为 93%。

4 种主要优势菌群在甘草的根、茎、叶中均有分布。其中, 芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)在根部为绝对优势菌, 茎、叶部也有较多分布。假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)是甘草叶内的主要优势菌, 泛菌属(*Pantoea* sp.)和沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)主要分布在甘草茎和叶内。对比野生及栽培甘草相同部位 4 种优势菌总量分布(图 2)发现: 优势菌群在野生甘草

根部的分布明显高于栽培甘草根部, 而叶部则正好相反, 茎部分布相差不多。另外, 野生和栽培甘草内生细菌分别代表了总计 19 个属中的 13 个属和 12 个属, 其中有 6 个属为二者共有, 除以上 4 种主要优势属外, 另外两种分别是类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.)和节杆菌属(*Arthrobacter* sp.), 其中, 野生甘草内最优势属为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.), 栽培甘草内最优势属为假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。这说明生长环境的不同可能会造成野生和栽培甘草内生细菌种类、数量及分布的差异。

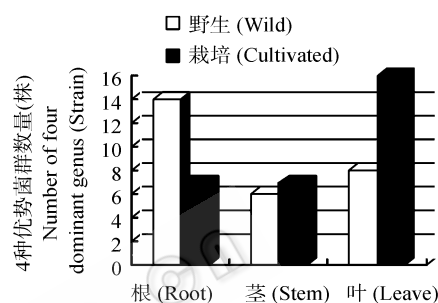


图 2 4 种优势菌总量在野生及栽培甘草内的分布情况
Fig. 2 Distribution of dominant strains in wild and cultivated *Glycyrrhiza uralensis* plants

3 讨论

(1) 在研究植物内生细菌时, 内生细菌的确定是一个重点。目前, 利用化学试剂(低浓度酒精, 次氯酸钠, 升汞等)对材料进行表面灭菌是多数研究者采用的方法。但仍存在灭菌过轻会扩大内生细菌的多样性, 过重又会导致许多内生细菌丢失的问题。罗明^[5]在分离棉花内生细菌时, 用 1%~2% 的次氯酸钠对棉花根、茎、叶灭菌 10 min~20 min, 芦云^[6]用 1%~2% 的次氯酸钠对哈密瓜的根、茎、叶灭菌 10 min~18 min, 都达到较好的内生细菌分离效果。本研究选用了 2% 的次氯酸钠对甘草样品进行表面灭菌, 经过多次的重复试验, 选择了灭菌时间最短而灭菌效果最好的材料作为研究对象, 其中野生根和茎用时最长, 分别为 15 min 和 18 min。

(2) ERIC 序列是在肠道杆菌中发现的一段长为 126 bp 的反向重复序列, 定位于基因组内可转录的非编码区域或与转录有关的区域。在实际工作中, 研究者发现除了肠道细菌, 用 ERIC-PCR 对部分革兰氏阳性细菌、噬菌体、真菌、植物及动物的基因组 DNA 进行扩增时, 发现都有扩增条带。由于仅从

肉眼观察菌落、菌体形态来区分不同细菌具有一定的主观性,因此,利用ERIC-PCR指纹图谱,在分子水平上对细菌进行种间的区分,更加科学与客观。李艳琴^[4]在对番茄内生细菌进行ERIC-PCR扩增时发现某些菌落及菌体形态相似的菌株,ERIC指纹图谱却不相同,这与本试验研究结果一致。

(3) 具不完全文献统计,目前,人们已经从小麦、棉花、水稻、花生、马铃薯、番茄、柠檬、柑桔等50多种植物体内分离鉴定出内生细菌50多个属^[5]。然而对中草药植物内生细菌的研究报道却很少见到。Misaghi等^[7]、John A Mcinroy和Joseph W Kloepper^[8]、鲁素芸等^[9]的研究结果表明,棉花内生细菌具有丰富的种群多样性,已分离出的内生细菌隶属近30个属。本试验对所得到的120株甘草内生细菌中的82株进行了测序分析,一次性检出这些内生细菌与GenBank中19个已知属的细菌具有较高相似性,首次发现中草药植物-甘草也具有丰富的内生细菌资源。本研究分离到的最优势属为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),卢云^[6]从哈密瓜,鲁素芸等^[9]从棉花,高增贵^[10]等从玉米中分离的内生细菌也均以芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)为主。另有报道证明,处于不同地域,不同生长期的同一种植物,其内生细菌数量,种类及优势种属也会不同。Misaghi^[7]等从2个美国的棉花品种中分离出的内生细菌以欧文氏菌属(*Erwinia* sp.)为优势种群,而不是芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),本研究也发现,野生及栽培甘草,或甘草的不同部位其内生细菌的数量、种类及优势属都不相同,这与报道一致。这些优势内生细菌的分布有可能与它们的植物促生作用有关:假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)的一些菌株可以通过调节植物生长激素-乙烯来促进植物的生长^[11];芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)的一些细菌能产生多种不同的抗生素^[12],从而影响植物的生长发育;沙雷氏菌属(*Serratia* sp.)的一些菌株可以分泌进攻病原真菌的酶类^[13]。

参考文献

- [1] 王敏. 甘草研究综述. 齐鲁药事, 2005, 24(10): 614-616.
- [2] Kleoppper JW, Schipper B, Bakker PAHM. Proposed elimination of the term endorhizosphere. *Phytopathol*, 1992, 82: 726-727.
- [3] 何红, 邱思鑫, 胡方平, 等. 植物内生细菌生物学作用研究进展. 微生物学杂志, 2004, 24(3): 40-45.
- [4] 李艳琴, 申泉, 刘彬彬, 等. 番茄内生菌分离及其ERIC-PCR指纹图谱分析. 微生物学通报, 2003, 30(5): 89-93.
- [5] 罗明, 芦云, 张祥林. 棉花内生细菌的分离及生防益菌的筛选. 新疆农业科学, 2004, 41(5): 277-282.
- [6] 芦云, 罗明. 哈密瓜内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. 石河子大学学报, 2004, 22(增刊): 104-109.
- [7] Misaghi IJ, Donndelinger CR. Endophytic bacteria in symptomfree cotton plants. *Phytopathology*, 1990, 80: 808-811.
- [8] John A Mcinroy, Joseph W Kloepper. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. *Plant and Soil*, 1995, 173: 337-342.
- [9] 鲁素芸, 陈延熙. 棉花维管束中主要微生物类群初步分析. 北京农业大学学报, 1989, 15(3): 387-392.
- [10] 高增贵, 庄敬华, 陈捷, 等. 玉米根系内生细菌种群及动态研究. 应用生态学报, 2004, 15(8): 1344-1348.
- [11] Arshad M, Ftankenger WT. Microbial production of plant hormones. *The Rhizosphere and Plant Growth*. 1991, pp.327-334.
- [12] Picard C, Di Cello F, Ventura M, et al. Frequency and biodiversity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing bacteria isolated from the maize rhizosphere at different stage of plant growth. *Appl Environ microbial*, 2000, 66: 948-955.
- [13] Ordentlich A, Elad Y, Chet I. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium Rolfsii*. *Phytopathology*, 1988, 78: 84-88.