

胥成浩,林天兴,管芩澜,等. 峨眉山一把伞南星内生细菌表型多样性[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):228-230.

峨眉山一把伞南星内生细菌表型多样性

胥成浩,林天兴,管芩澜,黄磊,龚明福

(峨眉山特色微生物资源重点实验室/乐山师范学院生命科学学院,四川乐山 614000)

摘要:一把伞南星有多种药用价值,其中的内生细菌具有产生相同活性药用成分的潜力。对分离自峨眉山一把伞南星的 28 株内生细菌进行 68 项表型性状测定,包括唯一碳源利用、唯一氮源利用、对抗生素和染料的抗性、耐盐性、耐酸碱性、生长温度范围等。结果表明:一把伞南星内生细菌具有较强的抗逆性,较强的耐低温和耐弱酸性能力,14% 的菌株能在 4 ℃ 条件下生长,所有菌株均能在 18 ℃ 条件下生长,96% 的菌株能耐受 1% NaCl,86% 的菌株能在 pH 值 5 的条件下生长;聚类分析表明,在 Watson 距离为 0.2 时可聚为 7 个表观群。

关键词:一把伞南星;内生细菌;数值分类法;表型;多样性

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0228-02

植物内生细菌是指能在植物组织内部定殖,并且对宿主植物不产生明显病害或副作用的细菌^[1]。内生细菌与植物协同进化过程中,某些内生细菌具有了产生与宿主植物相同或相似生物活性物质的能力^[2]。一把伞南星 [*Arisaema erubescens* (Wall.) Schott] 是天南星科 (Araceae) 天南星属 (*Arisaema*) 植物,多年生草本,以球状块茎入药^[3]。一把伞南星可被用于临床燥湿化痰、祛风止痉、散结消肿,是重要的解毒中药,还可治疗痈肿及蛇虫咬伤^[4],其提取物草酸钙针晶对钉螺有一定的毒杀作用^[5];另有提取物对 Hella 细胞、肉瘤 180、HCA 肝癌实体型、U14、U27 等有很强的抑制作用或有杀虫活性^[4]。随着该植物药用价值被不断发现,市场需求量不断增长,导致该植物野生资源日益减少,合理开发和保护一把伞南星资源日益重要^[6]。本研究采用纯培养方法从峨眉山一把伞南星中分离内生细菌,并进行多项表型性状测定,对测定结果进行数值分类,以期明确一把伞南星内生细菌的表型多样性,同时为一把伞南星综合开发和保护利用提供菌种资源。

1 材料与方法

1.1 植物样品

一把伞南星采自峨眉山七里坪(海拔约 1 300 m)。

1.2 培养基

1.2.1 分离用培养基 牛肉膏蛋白胨培养基(NA):牛肉膏 5 g,蛋白胨 3 g,NaCl 5 g,葡萄糖 5 g,琼脂粉 18~20 g,蒸馏水 1 L。

1.2.2 表型性状测定用基础培养基 WHITE 培养基。A 组

分:NaNO₃ 2.5 g, CaCl₂ 0.1 g, K₂HPO₄ 2 g, NaCl 0.1 g, FeCl₃ 0.01 g, KH₂PO₄ 1 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.3 g, 纯化琼脂 20 g, 水 1 L; B 组分:叶酸 2 mg, 烟酸 10 mg。牛肉膏蛋白胨培养液:牛肉膏蛋白胨培养基中去除琼脂。

1.3 一把伞南星表面消毒

取健康的一把伞南星植株,用剪刀剪取根、茎、叶各 5 g,自来水冲洗表面的泥土等污物后放于无菌培养皿中,无菌水浸洗 3~5 次,用有效氯含量为 5% 的次氯酸钠处理 3 次,每次 2 min,无菌水冲洗 3~5 次,最后将已完成表面消毒的样品放入无菌搅拌机中,加无菌水打浆,粉碎的组织液置于无菌三角瓶中备用^[7]。将上述表面消毒处理最后 1 遍清洗的无菌水直接涂布于 NA 培养基平板上,与试验组相同条件下培养,观察是否有菌落生长,如果没有菌落生长则表面消毒完全;若有少量菌落生长,则观察菌落形态、颜色等特征,并除去试验组的相同菌落以排除干扰^[1]。

1.4 内生细菌的分离

在紫外消毒后的洁净操作工作台中,取 100 μL 打浆后的组织匀浆于培养基上涂布培养,28 ℃ 培养 2 d 以待细菌长出。观察平板中生长出菌落的形态、颜色、大小等特征,挑取不同单菌落分别划线接种于相应的培养基平板中,28 ℃ 恒温培养 2 d,重复以上步骤直至菌种纯化。平板中无其他菌落,再转接单菌落到斜面培养基,并分别编号为 YBS01 至 YBS028,28 ℃ 培养 2 d,再转至 4 ℃ 保存菌种。

1.5 菌悬液的制备

将保存的菌株在 NA 斜面中活化,再将活化的菌株接种于 NA 培养液(即不加琼脂的 NA)中,28 ℃ 恒温摇床培养 3 d,制备菌悬液,用于表型性状测定。

1.6 表型性状测定

1.6.1 唯一碳源的利用 将供试碳源(D-木糖、L-鼠李糖、D-甘露糖、D-海藻糖、D-阿拉伯糖、甘露醇、D-麦芽糖、D-核糖、D-半乳糖、D-山梨醇、丙酮酸钠)分别加入蒸馏水中溶解,通过过滤法除菌,使碳源终浓度为 0.1%,再将碳源溶液和 0.5 mL WHITE B 组分混合,待冷却至 50 ℃ 左右加入 WHITE A 培养基中,混匀后倒平板。用多点接种器将制备好的菌悬液接种于已制备好的平板上(每接 1 个平板粘 1

收稿日期:2013-11-06

基金项目:四川省教育厅项目(编号:12ZA240);乐山师范学院科研项目(编号:Z1160、Z1223)。

作者简介:胥成浩(1961—),男,四川西充人,硕士,副教授,从事微生物资源及生物化学、分子生物学研究。E-mail:157791327@qq.com。

通信作者:龚明福,博士,教授,主要从事微生物资源及微生物与植物间相互关系研究。E-mail:gongmingfu98@163.com。

次菌液,以保证接种量一致),以 NA 平板为阳性对照,以不加碳源的 WHITE 平板为阴性对照,每个处理 3 次重复,28 ℃ 培养 2 d 观察结果,长势优于阴性对照为“生长”,记录为“1”,否则记录为“0”。

1.6.2 唯一氮源的利用 将 WHITE 培养基 A 组分中的 NaNO_3 去除,加入待测氮源(*L*-苏氨酸、*L*-丝氨酸、*L*-蛋氨酸、*L*-天冬氨酸、*L*-赖氨酸、*L*-半胱氨酸、*L*-丙氨酸、*L*-缬氨酸、*L*-酪氨酸、*L*-谷氨酸、*L*-色氨酸、甘氨酸、硝酸钾、*L*-苯丙氨酸),使其终浓度为 0.1%,另加入 10 g/L 葡萄糖作碳源。其余方法同“1.6.1”节。

1.6.3 抗生素抗性的测定 按说明书要求,将供试抗生素(红霉素、青霉素、庆大霉素、卡那霉素、洁霉素、白霉素)分别配制成 5、30、50、100 mg/L,加入融化冷却至 50 ℃ 左右的 NA 培养基中,制成含不同浓度抗生素的平板,以 NA 平板作为对照,接种后置 28 ℃ 培养,接种、观察、培养方法同“1.6.1”节。长势近似或优于 NA 平板的记录为“1”,否则记录为“0”。

1.6.4 对染料的抗性测定 将染料(刚果红、孟加拉红、甲基橙、亚甲基蓝、甲基红)用水溶解,按终浓度 0.1%、0.2% 加入 NA 培养基灭菌后倒平板,以 NA 平板作为对照,接种、培养、观察、对照的设置及记录方法同“1.6.1”节。

1.6.5 耐盐性的测定 在 NA 培养基中分别加入 1%、5%、10% NaCl,灭菌后倒平板,接种供试菌株,以 NA 平板为对照,培养及观察、记录方法同“1.6.1”节。

1.6.6 耐酸碱性的测定 在 NA 培养基倒平板前用灭菌的 HCl、NaOH 分别调节 pH 值至 3、5、6、8,接种后置 28 ℃ 培养,以 pH 值 7 的 NA 为对照。接种、观察及记录方法同“1.6.1”节。

1.6.7 生长温度范围的测定 将供试菌株接种于 NA 平板上,分别置于 4、18、28、50 ℃ 下培养,以 28 ℃ 下培养为对照。接种、观察及记录方法同“1.6.1”节。

1.7 聚类分析

对测定的表型性状结果按照阳性反应记为“1”、阴性反应记为“0”、不确定反应记为“N”,编码后输入计算机,并去除全同性状,用 DPS 软件^[8]按平均连锁聚类法进行聚类,得

出树状图。

2 结果与分析

2.1 峨眉山一把伞南星内生细菌分离结果

从峨眉山一把伞南星中分离得到 28 株内生细菌,依次编号为 YBS01 至 YBS28。

2.2 供试菌株理化特性

2.2.1 唯一碳源的利用 96% 的供试菌株能利用 *D*-鼠李糖、*D*-甘露糖、*D*-海藻糖、*D*-核糖、*D*-麦芽糖、*D*-山梨醇、丙酮酸钠、甘露醇,部分菌株也能利用 *D*-半乳糖、*D*-木糖。

2.2.2 唯一氮源的利用 所有供试菌株都能利用 *L*-苯丙氨酸、*D*-天冬氨酸;78% 的菌株能利用 *L*-缬氨酸、*L*-丙氨酸、*L*-谷氨酸、*L*-丝氨酸、*L*-苏氨酸、*D*-蛋氨酸、甘氨酸,部分或少部分菌株能利用 *L*-色氨酸、*L*-半胱氨酸、*L*-赖氨酸、*L*-酪氨酸。

2.2.3 抗生素抗性的测定 所有供试菌株都能耐受 5 mg/L 的所有供试抗生素,至少有 30% 菌株能耐受 100 mg/L 的红霉素、白霉素、青霉素、洁霉素,但所有供试菌株对 30 mg/L 以上的庆大霉素和卡那霉素敏感,生长受到抑制。

2.2.4 染料抗性的测定 所有供试菌株都能耐受 0.1%、0.2% 的刚果红、孟加拉红、甲基橙,所有菌株均不能耐受 0.1%、0.2% 的亚甲基蓝、甲基红。

2.2.5 耐酸碱性的测定 本研究中,在 pH 值 3、5、6、8 的条件下分别有 1、24、27、8 株菌株能生长;没有菌株能在 pH 值 10 的环境下生长。

2.2.6 耐盐性 所用供试菌株中没有菌株能耐受 10% NaCl,14% 菌株能耐受 5% NaCl,96% 菌株能在 1% NaCl 中生长。

2.2.7 生长温度范围 14% 菌株能在 4 ℃ 条件下缓慢生长,但长势不如 28 ℃;在 18、28 ℃ 条件下全部菌株都能生长;没有菌株能在 50 ℃ 高温下生长。

2.3 一把伞南星内生细菌数值分类结果

对供试菌株测定的表型性状数据采用平均连锁法进行聚类分析,获得数值分类树状图。从图 1 可以看出,所有内生细

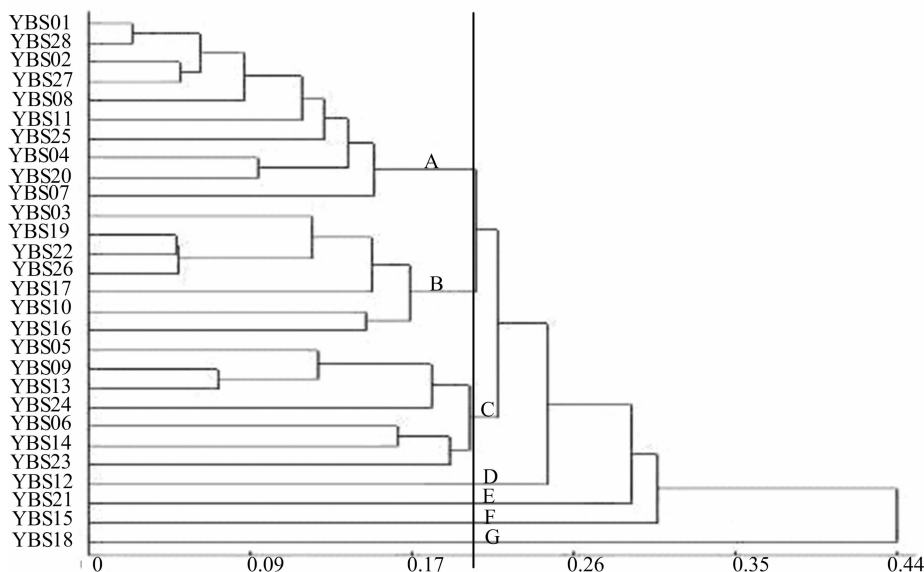


图1 一把伞南星内生细菌数值分类树状图

贺晓龙,李敏艳,任桂梅,等. 维生素 B₁ 对羊肚菌菌丝体生长的影响[J]. 江苏农业科学,2014,42(10):230-231.

维生素 B₁ 对羊肚菌菌丝体生长的影响

贺晓龙^{1,2}, 李敏艳¹, 任桂梅^{1,2}, 张旭辉¹, 刘年强¹

(1. 延安大学生命科学学院,陕西延安 716000; 2. 陕西省区域生物资源保育与利用工程技术研究中心,陕西延安 716000)

摘要:维生素 B₁ 是影响羊肚菌菌丝体生长的环境因素之一,基础培养基中加入适量的维生素 B₁ 可促进菌丝体的生长。试验研究 M_{延-5}、M_{延-12}、M_{川美} 3 种羊肚菌菌丝体生长所需的最适维生素 B₁ 浓度范围,结果表明,M_{延-5}、M_{延-12}、M_{川美} 菌丝体生长最适维生素 B₁ 浓度分别为 25~30、15、15 mg/L。

关键词:维生素 B₁; 羊肚菌; 菌丝体; 生长; 方差分析

中图分类号: S646.701 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)10-0230-02

羊肚菌 (*Morchella esculenta*) 属于囊菌亚门盘菌纲盘菌类,生于阔叶林地上,菌盖圆锥形,高 4~7 cm,表面呈羊肚状,味美,营养价值高。羊肚菌是一种珍稀的野生食用、药用真菌,蛋白质含量极为丰富,必需氨基酸齐全,还含有游离的稀有氨基酸如顺-3-氨基-L-脯氨酸和 2,4-二氨基异丁酸等,风味奇鲜、香味独特^[1-3],羊肚菌还含有多种维生素和铁、锌等矿质元素。羊肚菌作为一种调味品,在国外已采用深层培养法规模化生产,但至今羊肚菌子实体仍然不能进行产业化人工栽培。

羊肚菌菌丝体含有子实体固有的营养素和生理活性组分,能较好地保持子实体的独特风味^[4],研究羊肚菌菌丝体的生长可以促进营养价值和药用价值的开发利用。维生素 B₁ 是影响羊肚菌 M_{延-5}、M_{延-12}、M_{川美} 菌丝体生长的环境因素之一,而关于维生素 B₁ 对羊肚菌菌丝体生长的影响至今尚未见报道。本试验研究 M_{延-5}、M_{延-12}、M_{川美} 3 种羊肚菌菌丝体在不同维生素 B₁ 浓度混合培养基中的生长状况,得到适合这 3 种羊肚菌菌丝体生长各自最佳的维生素 B₁ 浓度。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株 M_{延-5}、M_{延-12},从陕西北泥湾野生羊肚菌菌盖分离筛选而得^[5];菌株 M_{川美} 引自四川绵阳食用菌研究所。维生素 B₁ 片、食用菌制种与培养常用药品、设备等来自市购。

1.2 方法

在葡萄糖硝酸钾基础培养基(葡萄糖 20 g、硝酸钾 2 g、硫酸镁 0.5 g、磷酸二氢钾 0.5 g、氯化钠 0.5 g、琼脂 20 g,蒸馏

水 1000 mL)中加入维生素 B₁ 溶液,此环境是决定内生细菌特性的重要因素。

参考文献:

- [1] 龚明福,马玉红,李超,等. 苦豆子根瘤内生细菌分离及表型多样性分析[J]. 西北植物学报,2009,29(2):408-411.
- [2] 孙剑秋,郭良栋,臧威,等. 药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展[J]. 西北植物学报,2006,26(7):1505-1519.
- [3] 宋良科. 峨眉山天南星科药用植物资源研究[J]. 中国野生植物资源,2006,25(1):35-36,52.
- [4] 黄芳,李波,田珊,等. 天南星和半夏的药理作用及抗虫活性研究进展[J]. 贵州农业科学,2011,39(10):108-112.
- [5] 柯文山,杨金莲,马安宁. 一把伞南星块茎水浸液的杀螺活性初探[J]. 公共卫生与预防医学,2007,18(5):21-22.
- [6] 郭尚敬,冀丽莎,胡鹏. 天南星科植物的研究进展[C]//海口:第九届全国药用植物及植物药学术研讨会会议论文,2010:314.
- [7] 古强,刘宁,邱旦恒,等. 植物叶片内生放线菌的分离、分类与拮抗活性[J]. 微生物学报,2006,46(5):778-782.
- [8] 唐启义,冯明光. DPS 数据处理系统——实验设计,统计分析及数据挖掘[M]. 北京:科学出版社,2007.

收稿日期:2013-12-18

基金项目:陕西省高水平大学建设专项资金(编号:2012SXTS06);陕西科技厅农业攻关(编号:2011K02-11);陕西省延安市科技项目(编号:2012ks-13)。

作者简介:贺晓龙(1982—),男,陕西临潼人,实验师,从事生物技术与食用菌研究。E-mail: ydhelong@163.com。

通信作者:任桂梅(1955—),女,陕西清涧人,教授,从事应用微生物及食用菌研究。E-mail: ydrgm@163.com。

菌在 Watson 距离为 0.2 时可以聚分为 7 个表观群,其中 YBS12(D 群)、YBS21(E 群)、YBS15(F 群)、YBS18(G 群)可以独自形成表观群,A 群有 10 株菌株,B 群有 7 株菌株,C 群也有 7 株菌株。

3 结论

通过对 28 株内生细菌进行的 68 项表型形状测定可知,所有内生细菌在 Watson 距离为 0.2 时可以聚为 7 个表观群,因此具有显著的多样性。在 pH 值 5 的情况下,有 86% 的菌株能生长,也有 14% 的菌株能在 5% NaCl 的环境下生长,在较低温度下也有很大一部分菌株能生长。与一般植物内生细菌相比,一把伞南星内生细菌更具抗性、耐低温,因此一把伞南星内生细菌更具有开发价值。内生细菌有着丰富的多样性,同时还具有许多优良特性,因此在内生细菌的利用上有着丰富的菌种资源,可以利用这一特性,通过生物技术方法定向改变植株内生细菌,从而改变植株的生长环境等,达到实现经济价值的目的。通过内生细菌数值分类树状图可知,内生细菌种类在植株间变化不大,同一地区采集的植株具有极高的相似性,但在不同环境下采集的植株却表现出多个表观群,因