

程贤利, 钱雪婷, 陈文强, 等. 秦巴山区虎杖内生放线菌的分离及鉴定[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 392–395.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.124

秦巴山区虎杖内生放线菌的分离及鉴定

程贤利¹, 钱雪婷², 陈文强², 彭浩²

(1. 汉中职业技术学院药学与医学技术系, 陕西汉中 723000; 2. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001)

摘要:采用平板划线法从秦巴山区虎杖根状茎中分离内生放线菌, 依照形态学常规分类方法和 16S rDNA 序列分析法进行鉴定, 并以大肠埃希杆菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 为靶标菌, 采用滤纸片扩散法研究虎杖内生放线菌发酵产物的抗菌活性。结果表明, 分离得到的 16 株放线菌中, 菌株 PEA005 和 PEA006 分属于拟诺卡菌属 (*Nocardopsis*) 和小单孢菌属 (*Micromonospora*), 对枯草芽孢杆菌的抑菌圈达到 21 ~ 28 mm, 对金黄色葡萄球菌的抑制圈达到 13 ~ 20 mm, 而对大肠杆菌和铜绿假单胞菌抑制作用不显著。

关键词:虎杖; 内生放线菌; 分离; 鉴定; 秦巴山区; 拟诺卡菌属; 小单孢菌属

中图分类号: S567.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0392-03

虎杖 (*Polygonum cuspidatum*) 为蓼科植物, 主要分布在我国湖北、四川、陕西等 20 多个省份, 其根茎味微苦、微寒, 归肝、胆、肺经, 具活血散瘀定痛、清热解毒利湿、化痰止咳通喘之功效^[1-2]。虎杖提取物中的有效成分是芪类和蒽醌类化合物, 其中, 芪类化合物包括白藜芦醇及白藜芦醇苷^[3]。据报道, 白藜芦醇具有抑制肿瘤、抗氧化、抗血栓及防治冠心病等作用^[4-6], 被列为抗心血管疾病、抗癌最有前途的药物之一。

植物内生菌是指存活于健康植物组织内部、不引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物类群, 主要包括真菌、细菌和放线菌^[7-8], 分布于植物根、茎、叶、花、果实和种子等器官组织的细胞或细胞间隙中^[9]。植物与内生菌在长期协同进化中建立起独特的遗传与代谢关系, 由于植物与内生菌相互间的基因交换, 使得内生菌具有产生某些与植物相同或相似化合物的能力。目前发现并具有抗菌活性的代谢产物大多数来源于放线菌^[10-11], 其种类多样性和丰富的代谢产物可以产生重要的生理活性物质, 因此, 从传统药用植物内生放线菌的次生代谢产物中, 筛选出具有药用价值的活性物质或新型化合物, 对新型药物开发及濒危植物资源保护具有重要意义^[12]。

目前, 国内外对虎杖资源的研究主要集中在虎杖内生真细菌方面^[13-15], 对内生放线菌的研究却鲜有报道。本试验以秦巴山区珍稀药用植物虎杖为材料, 对其内生放线菌进行分离鉴定, 并对内生放线菌次生代谢产物的抗菌活性进行初步研究, 旨在为虎杖内生放线菌资源的开发和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 虎杖采自陕西留坝县火烧店乡和陕西汉

收稿日期: 2014-04-07

基金项目: 陕西省教育厅专项科研计划 (编号: 2014JK1150)。

作者简介: 程贤利 (1962—), 男, 陕西汉中中人, 讲师, 主要从事秦巴山区生物资源的开发与利用。E-mail: chx6555@126.com。

通信作者: 陈文强, 教授, 主要从事微生物资源研究开发与利用。

E-mail: wenqiangc@126.com。

台区黄花河景区。靶标菌株: 大肠埃希杆菌 (*Escherichia coli*, ATCC8739)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, ATCC6633)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC6538)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, ATCC9027), 均由陕西省食药用药工程技术研究中心提供。

1.1.2 培养基 改良高氏 I 号培养基: 可溶性淀粉 20.0 g、KNO₃ 1.0 g、NaCl 0.5 g、K₂HPO₄ 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g、琼脂 15.0 g、H₂O 1 000.0 mL, pH 值为 7.2 ~ 7.4; 改良高氏 II 号培养基: 葡萄糖 1.0 g、蛋白胨 0.5 g、胰蛋白胨 0.3 g、NaCl 0.5 g、复合维生素 0.5 g、琼脂 15.0 g、H₂O 1 000.0 mL, pH 值为 7.2 ~ 7.4; 1/10 ATCC172 合成培养基: 葡萄糖 1.0 g、可溶性淀粉 2.0 g、酵母浸汁 0.5 g、CaCO₃ 1.5 g、N-Z-Amine A 0.5 g、琼脂 15.0 g、H₂O 1 000.0 mL, pH 值为 7.2 ~ 7.4; 酵母膏-麦芽汁琼脂培养基 (YE): 酵母粉 4.0 g、麦芽汁提物 6.0 g、葡萄糖 4.0 g、复合维生素 3.75 mg、琼脂 20.0 g、H₂O 1 000 mL, pH 值为 7.2; 液体酵母膏-麦芽汁琼脂培养基, YE 中不含琼脂。

1.1.3 主要仪器设备 LS-B50L 高压蒸汽灭菌锅, 上海申安医疗器械厂; ZHWY-2102C 数显式恒温摇床, 上海志成有限公司; Mycycler PCR 扩增仪、Gel Doc 凝胶成像系统, 美国 Bio-rad 公司; Allegra6 低温高速离心机, 美国 Beckman 公司。

1.2 方法

1.2.1 样品预处理 将新鲜虎杖根表面泥沙清除, 裁成合适大小, 置于 500 mL 烧杯内, 流水冲洗 2 h; 2% Tween-80 溶液清洗表面, 无菌环境下依次用 75% 乙醇浸泡 30 s, 无菌水冲洗; 加含有 1% Tween-80 的 0.1% HgCl₂ 溶液分别浸泡 0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 min; 无菌水冲洗 5 次, 用手术刀取其韧皮部, 研钵中研磨至匀浆, 按 1:50 比例加入无菌水, 制备成匀浆液。

1.2.2 菌株分离 分别在改良高氏 I 号培养基、改良高氏 II 号培养基、1/10 ATCC172 合成培养基中加入表 1 中的抑菌剂制成平板, 吸取 100 μL 匀浆液, 涂布, 重复 5 次; 取最后 1 次冲洗用的无菌水 100 μL, 涂布于各分离纯化培养基平板作为

空白对照,以检测表面消毒情况。将平板倒置,28 ℃ 培养,随时观察平板菌落状态;将放线菌菌落挑在酵母膏-麦芽汁琼脂培养基上,采用平板划线法纯化至单个菌落。

表 1 在分离培养基中加入的选择性抑制剂及作用

名称	浓度 (mg/L)	作用
重铬酸钾 $K_2Cr_2O_7$	75.0	抑制真菌和细菌
制霉菌素 nystatin	75.0	抑制霉菌
萘啶酮酸 nalidixic acid	20.0	抑制细菌

1.2.3 抑菌试验 分别将 16 株内生放线菌于 28 ℃、160 r/min 发酵 7 d;将发酵液 12 000 r/min 离心 15 min,取上清,0.22 μm 微孔滤膜过滤;滤液 4 ℃ 冰箱保存,备用。挑取少量活化 24 h 的供试菌,在装有 10.0 mL 无菌水的试管中反复摇匀,制成菌悬液;用微量取液器分别取大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌菌悬液各 0.2 mL 注入牛肉膏蛋白胨培养基平板表面,涂布均匀;将直径为 8.0 mm 的无菌滤纸片在发酵液中浸泡 1 h,贴到培养基表面,每平板贴 4 片,其中每 2 片代表 1 种株菌,每处理做 5 个平板;将平板倒置,(36 ± 1) ℃ 培养 24 h,测量抑菌圈直径。

1.2.4 菌株鉴定

1.2.4.1 形态学鉴定 观察记录分离菌株的菌落形态,菌丝体生长状态及可溶性色素的产生情况,依据阮继生等方法^[16]进行初步鉴定。

1.2.4.2 分子生物学鉴定 采用 CTAB 法提取菌株 DNA,利用 PCR 引物 799F 和 1492R 对菌株 16S rRNA 基因进行扩增。PCR 反应体系 (25.0 μL): 2 × Taq PCR Mix 12.0 μL、10.0 μmol/mL 引物各 1.0 μL、 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 约等于 1.80 的 DNA 模板 2.0 μL、灭菌双蒸水 9.0 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min、56 ℃ 1 min、72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃

延伸 10 min。PCR 扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,将纯化的 PCR 产物交上海生工生物科技有限公司进行双向测序;将所测序列提交 GenBank 数据库进行 Blast 检索;下载与分离菌株具有较高同源性的模式菌株数据,利用 Clusta-X 和 Mega 5.1 软件对所得序列进行人工校正及比对分析,按聚类分析法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 虎杖不同消毒时间效果比较

使用含有 1% Tween-80 的 0.1% $HgCl_2$ 溶液,分别浸泡虎杖样品 0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 min 进行表面消毒,观察培养基上杂菌菌落的生长情况以考察消毒效果。结果表明,不使用 $HgCl_2$ 对虎杖样品进行表面消毒的对照组,即消毒 0 min,培养基上的杂菌菌落很多,无法进行统计;随着 $HgCl_2$ 消毒时间的延长,菌落数逐渐减少,消毒 3.5 min,菌落数在 10 个以上;消毒 4.0 min,菌落数为 5~10 个;消毒 4.5 min,菌落数少于 5 个;消毒时间超过 5 min 时,无菌落生长,但是,消毒时间过长,可能会导致内生菌被杀死。因此,虎杖样品表面消毒最佳时间为 5 min。

2.2 分离出的虎杖内生放线菌菌株形态

本试验共分离纯化出虎杖内生放线菌菌株 16 株,图 1 至图 4 为部分菌株的菌落形态。由图 1 至图 4、表 2 可见,菌株 PEA005 表面干燥无突起,菌落较小,边缘规则,近似圆形,呈墨蓝色,产生可溶性色素;菌株 PEA006 表面有突起,湿润油状,菌落较细小,不规则小圆形,呈橙黄色,不产生可溶性色素;菌株 PEA014 表面无突起,干粉状,菌落较细小,较规则的圆形,边缘无晕圈,呈灰白色,不产生可溶性色素;菌株 PEA023 表面有小的突起,褶皱状,菌落较小,较规则圆形;呈褐色,产生的可溶性色素为酱红色。

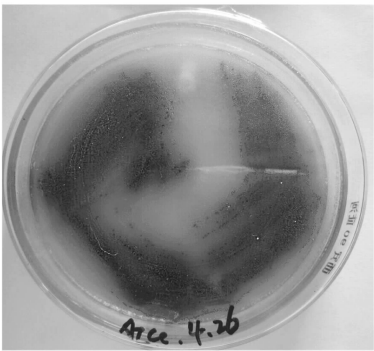


图1 菌株 PEA005 在 YE 平板上的菌落形态

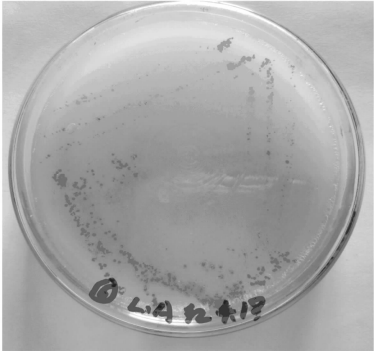


图2 菌株 PEA006 在 YE 平板上的菌落形态



图3 菌株 PEA014 在 YE 平板上的菌落形态

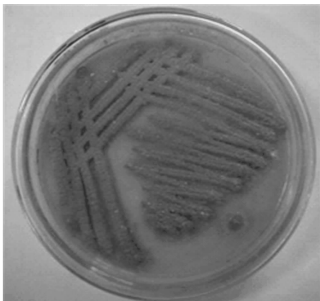


图4 菌株 PEA023 在 YE 平板上的菌落形态

2.3 虎杖内生放线菌的抑菌活性

采用滤纸片法对内生放线菌发酵液进行抑菌活性试验,结果由表 3 可见,菌株 PEA005 和 PEA006 对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌等革兰氏阳性菌抑菌效果显著,而对大肠杆菌、铜绿假单胞菌等革兰氏阴性菌抑菌作用不显著。

2.4 抑菌菌株的分子生物学鉴定

对 2 株具有较强抑菌作用的菌株 PEA005、PEA006 进行液体发酵培养,利用 SDS-溶菌酶法提取菌株总 DNA,并使用引物 799F 和 1492R 对 16S rDNA 进行 PCR 扩增,经上海生工生物科技有限公司进行双向测序,采用 Mega 5.5 软件,按

表 2 虎杖内生放线菌菌株的形态学特征

菌株编号	菌落形态	基内菌丝	气生菌丝	可溶性色素
PEA005	菌落较小,表面干燥,无突起,边缘规则,近似圆形	蓝绿色;有分支,无横隔	深蓝色,菌丝波曲状排列,顶端着生 1 个圆形孢子囊	墨蓝色
PEA006	表面有突起,湿润油状,不规则圆形	橙黄色;有分支,不断裂,具孢子梗,顶端着生 1 个球形孢子	无	无
PEA014	表面无突起,干粉状,菌落较小,较规则圆形,边缘无晕圈	无色;有分支,无断裂	灰白色;菌丝波曲状	无
PEA023	菌落较小,较规则圆形,表面有突起,褶皱状	黄褐色;有分支,无横隔	褐色;菌丝成丛排列,顶端着生 1 个圆形孢子囊	酱红色

表 3 虎杖内生放线菌发酵液对供试菌株的抑制作用

菌株编号	枯草芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	大肠杆菌	铜绿假单胞菌
PEA005	+++	++	+	+
PEA006	+++	++	-	+

注:+++ :抑菌直径为 21 ~ 28 mm; ++ :抑菌直径为 13 ~ 20 mm; + :抑菌直径为 8 ~ 12 mm; - :无抑菌活性。

照进化树构建法聚类,选择 1 000 个重复做 Bootstrap 值分析,构建系统发育树,结果(图 5)显示,菌株 PEA006 与模式菌株

Micromonospora saelicesensis strain Y51、*Micromonospora yulongensis* strain QA30 聚在同一进化分支上;菌株 PEA005 与 *Nocardiosis dassonvillei* HBUM175146 聚在同一进化分支上且亲缘关系最为相近。经 NCBI 序列比对,2 株放线菌与模式菌株的相似度均在 98% 以上。结合放线菌形态学常规分类和分子生物学特征,初步鉴定菌株 PEA005 为拟诺卡菌属(*Nocardiosis*),菌株 PEA006 为小单孢菌属(*Micromonospora*)。

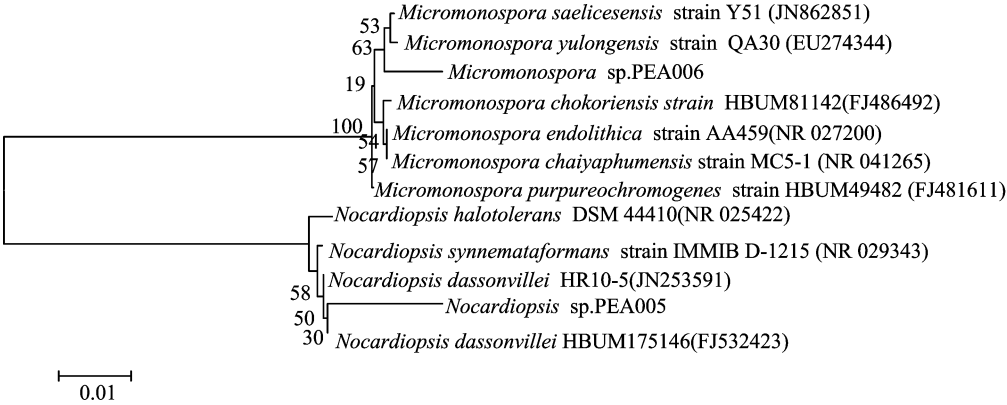


图5 2株虎杖内生放线菌 16S rDNA 构建的系统发育树

3 结论与讨论

相关研究表明,较容易分离得到的植物内生菌是细菌和真菌,由于放线菌生长十分缓慢,且易被外源菌污染,许多放线菌特别是稀有放线菌未被发现^[17-18]。选择性分离是虎杖内生放线菌分离的难点。

近年来,人们开展了大量有关植物内生放线菌的研究,并从药用植物虎杖中分离出许多新的放线菌。孔亚男等采用涂布法从虎杖组织中分离出 47 株内生放线菌,其中 17 株菌株对大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌具有不同程度的抗菌活性,占有分离菌株的 36.2%,其中 6 株具有较明显的抑菌活性^[19]。陈文强等对分离获得的 41 株内生放线菌进行抑菌试验时发现,有 13 株菌株至少对 1 种靶标菌表现出不同的抑菌活性,其中 2 株菌株发酵液对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢菌、大肠杆菌、沙门氏菌等 4 种靶标菌表现出不同程度的抑菌活性,显示了广谱的抗菌活性,可能具有很好的生物防治潜力^[20]。

本研究采用平板划线法从秦巴山区药用植物虎杖根茎中分离得到 16 株内生放线菌,对其进行抗菌试验结果表明,菌株 PEA005 和 PEA006 对枯草芽孢杆菌的抑菌圈达到 21 ~

28 mm,对金黄色葡萄球菌的抑制圈达到 13 ~ 20 mm,而对大肠杆菌和铜绿假单胞菌的抑制作用不显著。经鉴定,菌株 PEA005 和 PEA006 分属于拟诺卡菌属(*Nocardiosis*)和小单孢菌属(*Micromonospora*)。

参考文献:

[1]李菁雯,陈祥龙,孟祥智.虎杖及其提取物的研究进展[J]. 中医药学报,2011,39(3):103-106.

[2]薛 岚.中药虎杖的药理研究进展[J]. 中国中药杂志,2000,25(11):11-13.

[3]孔晓华,周玲芝.中药虎杖的研究进展[J]. 中医药导报,2009,15(5):107-110.

[4]王宏强,杨 峰,杨慧龄.白藜芦醇对鼻咽癌细胞 ATP 酶抑制作用研究[J]. 中国医药科学,2013,3(3):44-46.

[5]Jang M,Cai L,Udeani G O,et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol,a natural product derived from grapes[J]. Science,1997,275(5297):218-220.

[6]Klibanov A M. Improving enzymes by using them in organic solvents [J]. Nature,2001,409(6817):241-246.

[7]Herre E A,Mejía L C,Kyllo D A,et al. Ecological implications of anti-pathogen effects of tropical fungal endophytes and mycorrhizae [J]. Ecology,2007,88(3):550-558.

何淑玲,赵垦田,马令法,等. 影响冬虫夏草分布的土壤理化因子分析——以甘南州合作地区为例[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):395-398. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.125

影响冬虫夏草分布的土壤理化因子分析 ——以甘南州合作地区为例

何淑玲^{1,2}, 赵垦田², 马令法¹, 杨敬军¹, 傅育红¹, 常毓巍¹

(1. 甘肃民族师范学院高寒生态研究所,甘肃合作 74700; 2. 西藏大学农牧学院资源环境学院,西藏林芝 86000)

摘要:采用样方法研究土壤理化因子对冬虫夏草分布的影响。结果表明:5~10 cm 土壤中,土壤含水量显著影响冬虫夏草的分布,pH 值、全钾含量极显著影响冬虫夏草的分布,且虫草数量最多,虫体形态表征也最好;第一主成分中全磷含量是影响冬虫夏草种群分布的主要土壤理化性质因子,第二主成分中 pH 值是影响冬虫夏草种群分布的主要因子。说明冬虫夏草对土壤层、土壤酸碱性、全钾含量和全磷含量有严格要求。

关键词:冬虫夏草;土壤环境;土壤层;理化因子;生境

中图分类号: S567.3⁺50.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0395-04

冬虫夏草[*Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc.] 为麦角菌科真菌,是真菌寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫后形成的子座和菌核的复合体^[1]。冬虫夏草性温而味甘,药用价值极高,具有补肺、益肾、补精髓及诸虚百损、止咳平喘、止血化痰、补肺益肾、抗白血病、抗抑郁症、抗辐射、抗癌、防癌、提高人体免疫功能、造血能力和调节免疫系统之功效,主治久咳虚喘、劳嗽咳血、病后虚弱、消瘦失眠、阳痿遗精、腰膝酸痛等症^[2-4]。冬虫夏草生活史极其复杂,必须经过相对独立的分生孢子阶段和子囊孢子阶段的转变。在自然条件下,其寄主绿蝙蝠蛾需要5~6 年才能完成 1 个世代,其中 85% 以上的时间在地下生活,且对生境要求极其特殊^[5]。随着市场对虫草需求日益增加,其野生环境被严重破坏,自然虫草日益减少、面临枯竭^[6],加强

对冬虫夏草野生环境的研究和保护已刻不容缓。

冬虫夏草生长条件要求严格,在我国主要分布于青藏高原及边缘地区,包括西藏、青海、四川、甘肃、云南等省份。一般生于海拔 3 600~4 500 m 的山地,高山灌丛、草甸和高山草甸中。分布呈明显地带性和垂直分布规律,且与寄主分布一致^[7]。冬虫夏草寄主对土壤生境依赖很强,近年来国内对其生境的研究主要集中在蝙蝠蛾幼虫的伴生植物、海拔界限及食性等方面^[8-9]。而关于甘南州合作地区冬虫夏草(含寄主昆虫,下同)分布区土壤微生境的研究还未见报道。本试验对该区冬虫夏草种群分布与土壤养分间的关系进行了研究,为保护冬虫夏草生态环境,实现其野生资源可持续利用及半人工培养提供科学依据。

1 研究区域概况

研究区域包括甘肃省合作市的 4 个街道、7 个乡(当周街道、伊合昂街道、坚木克尔街道、通钦街道、卡加曼乡、卡加道乡、佐盖多玛乡、佐盖曼玛乡、加茂贡乡、勒秀乡、那吾乡)。合作市(102°47'51"~103°22'00"E,35°18'50"~35°66'29"N)

收稿日期:2014-09-13

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360316);全国第 4 次中药资源普查项目(编号:2013GSZYZYPC-04)。

作者简介:何淑玲(1975—),女,甘肃陇西人,博士,副教授,主要从事药用植物研究。E-mail:heshuling2010@163.com。

[8]赵旭,常思静,景春娥,等. 我国植物内生菌研究进展[J]. 中国沙漠,2010,30(1):87-91.

[9]Fisher P J, Petrini O, Scott H M L. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.) [J]. New Phytologist, 1992, 122(2):299-305.

[10]Demain A L. Antibiotics: natural products essential to human health [J]. Medicinal Research Reviews, 2009, 29(6):821-842.

[11]Demain A L, Sanchez S. Microbial drug discovery: 80 years of progress[J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62(1):5-16.

[12]杜慧竟,苏静,余利岩,等. 药用植物内生放线菌的分离和生物学特性[J]. 微生物学报, 2013, 53(1):15-23.

[13]刘芸,殷红,仇农学. 一株产白藜芦醇虎杖内生真菌的分离和鉴定[J]. 菌物学报, 2010, 29(4):502-507.

[14]刘华金,易有金,杨建奎,等. 转化白藜芦醇苷虎杖内生真菌的分离和鉴定[J]. 食品科学, 2012, 33(11):172-176.

[15]彭浩,陈文强,邓百万,等. 1 株产白藜芦醇及白藜芦醇苷虎杖内生真菌的分离鉴定[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(8):342-345.

[16]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.

[17]张曼,解修超,陈文强,等. 红豆杉内生放线菌的分离及活性菌株的筛选与鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2012, 31(5):549-554.

[18]彭浩,陈文强,邓百万,等. 药用植物虎杖内生菌的研究现状与应用展望[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8):1-4.

[19]孔亚男,陈文强,邓百万,等. 虎杖内生放线菌的分离鉴定及抗菌活性[J]. 福建农林大学学报:自然科学版, 2012, 41(6):616-621.

[20]陈文强,彭浩,邓百万,等. 药用植物虎杖内生放线菌的分离及抑菌活性的研究[J]. 陕西理工学院学报:自然科学版, 2012, 28(6):61-67.