

唐美琼, 闵丹丹, 李 刚, 等. 山豆根根瘤菌的生物学特性及其不同菌株对山豆根幼苗药用有效成分的影响[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 131–134. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.037

山豆根根瘤菌的生物学特性及其不同菌株对山豆根幼苗药用有效成分的影响

唐美琼, 闵丹丹, 李 刚, 李林轩

(广西药用植物园/广西药用资源保护与遗传改良重点实验室, 广西南宁 530023)

摘要:对采自广西不同地点的山豆根根瘤菌进行生物学特性研究, 并将其分别接种在盆栽山豆根幼苗上, 室内培养 180 d 后, 测定植株药用有效成分苦参碱、氧化苦参碱含量。结果表明, 山豆根根瘤菌为快生型根瘤菌, 在 YMA 培养基上代谢产酸, 大部分菌株的生长温度范围为 25 ~ 35 ℃, 酸碱耐受范围为 pH 值 6.0 ~ 10.0, 对抗生素卡那霉素 (Km)、庆大霉素 (Gm) 敏感; 不同来源的根瘤菌对山豆根药用有效成分积累的影响不同, 与其他菌株相比, 来自靖西县的 2 株菌 JX2、JX3 对苦参碱、氧化苦参碱的影响达到了显著水平。

关键词:山豆根; 根瘤菌; 生物学特性; 有效成分

中图分类号: S567.21⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0131-04

山豆根为豆科植物越南槐 (*Sophora tonkinensis* Gagnep.) 的干燥根和根茎, 主产于广西, 别称广豆根。山豆根具有清热解毒、消肿止痛等功效^[1], 其有效成分以苦参碱、氧化苦参碱为主^[2], 具有抗炎、抗心律失常、抗肿瘤等生物活性^[3]。野生山豆根分布地域狭窄, 零星生长于石山区石缝中, 野生资源已濒临枯竭^[4]。近年来, 科技人员已经对山豆根的人工繁殖栽培进行研究, 并取得了一定的成果^[5-6]。在山豆根的栽培生产中, 如果能利用豆科植物与根瘤菌的共生固氮效应满足植物对氮素的需求, 对提高药材的质量及发展可持续农业、保护生态环境都有重要意义。但是目前关于豆科药材的生物固氮及其结瘤固氮对药材质量影响等相关研究甚少, 对山豆根的

研究更是罕见。本试验从研究山豆根根瘤菌生物学特性入手, 进一步研究根瘤菌对山豆根幼苗有效成分积累的影响, 以期开发利用山豆根根瘤菌资源、提高山豆根原料药材的质量提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 根瘤菌的采集及分离纯化

分别在广西药用植物园、隆安县、靖西县栽培的山豆根系上采集新鲜、饱满、个大的根瘤, 放入装有无水氯化钙的具塞试管内, 带回实验室进行分离纯化。用自来水将采集的根瘤冲洗干净, 在无菌条件下, 用 95% 乙醇浸泡 1 min 后用无菌水冲洗 3 次, 用 0.1% 氯化汞浸泡 3 min 后再用无菌水冲洗 4 次, 然后置于灭菌的研钵中, 用无菌玻棒挤压、破碎根瘤, 取汁液在加有 0.025 g/L 刚果红的 YMA 平板上划线, 28 ℃ 恒温培养至菌落出现, 挑选典型单菌落进行连续培养, 获得根瘤菌菌株 YY、LA1、LA2、JX2、JX3 (表 1)。

收稿日期: 2015-11-24

基金项目: 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项 (编号: GZPT13-38、GZBZ14-14)。

作者简介: 唐美琼 (1984—), 女, 广西全州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事药用植物育种研究。Tel: (0771) 5602850; E-mail: tangmeiqiong2006@163.com。

社, 2003。

[2] 杨成华, 李贵远, 邓伦秀, 等. 贵州百里杜鹃保护区的杜鹃属植物种类及其观赏特性研究[J]. 西部林业科学, 2006, 35(4): 14–18, 39.

[3] 周 艳, 陈 训, 韦小丽, 等. 凋落物对迷人杜鹃幼苗更新和种子萌发的影响[J]. 林业科学, 2015, 51(3): 65–74.

[4] 高俊凤. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2006.

[5] 郝再彬, 苍 晶, 徐 仲. 植物生理实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004: 46–49.

[6] 武卫华, 刘忠荣, 黄先敏, 等. 叶绿体色素的提取方法改进及其应用[J]. 北方园艺, 2010(24): 67–69.

[7] 吴 林. 不同有机物料对花卉植物生育及土壤性状的影响[D]. 长春: 吉林农业大学, 2007.

[8] 程存刚, 赵德英, 吕德国, 等. 植物源有机物料对果园土壤微生物

群落多样性的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(4): 913–922.

[9] 王建华, 刘鸿先, 徐 同. 超氧化物歧化酶(SOD)在植物逆境和衰老生理中的作用[J]. 植物生理学通讯, 1989, 25(1): 1–5.

[10] 赵丽英, 邓西平, 山 仑. 活性氧清除系统对干旱胁迫的响应机制[J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 413–418.

[11] 曲春香, 沈颂东, 王雪峰, 等. 用考马斯亮蓝测定植物粗提液中可溶性蛋白质含量方法的研究[J]. 苏州大学学报(自然科学版), 2006, 22(2): 82–85.

[12] 黄承玲, 陈 训, 高贵龙. 3 种高山杜鹃对持续干旱的生理响应及抗旱性评价[J]. 林业科学, 2011, 47(6): 48–55.

[13] 崔 妍. 两种景天科植物抗逆性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2014.

[14] 师晨娟. 植物生长调节剂对苗木生长及其抗性生理的影响[D]. 北京: 北京林业大学, 2006.

表 1 山豆根根瘤采集地点及所得菌株

采集地点	菌株
广西药用植物园,平地	YY
广西隆安县,试验平棚内	LA1
广西隆安县,试验平棚内	LA2
广西靖西县,山地	JX2
广西靖西县,山地	JX3

1.2 生长特性测定

革兰氏染色参照《常见细菌系统鉴定手册》,按常规方法进行^[7]。生长曲线测定:将根瘤菌接种到 YMA 液体培养基中,接种后每隔 4 h 用紫外-可见分光光度计在 600 nm 波长处测定各参试菌株培养液的吸光度,以培养时间为横坐标、吸光度为纵坐标绘制生长曲线。溴麝香草酚蓝(BTB)反应:将菌种接种于含 0.1% 溴麝香草酚蓝的 YMA 培养基上,于 28 ℃ 培养 6~10 d,观察颜色变化。

1.3 生理生化特性测定

以 YMA 液体培养基为基本培养基。温度试验设置共设 8 个单一温度和 1 个耐高温处理,单一温度分别设为 4、10、15、20、25、30、35、40 ℃,耐高温处理先于 60 ℃ 处理 10 min,再置于 28 ℃ 摇床中培养 5 d。酸碱度影响试验:分别设置 pH 值为 4、5、6、7、8、9、10、11、12,共 9 个梯度。耐盐性试验:分别设置 NaCl 终浓度为 0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、3.0%,共 5 个梯度。抗生素抗性试验:添加不同浓度氨苄青霉素(Amp)、氯霉素(Cm)、卡那霉素(Km)、庆大霉素(Gm)、大观霉素(Spec)、链霉素(Sm)、羧苄青霉素(Cb)、萘定酮酸(Nm)、四环素(Tc)至 YMA 液体培养基中。碳源、氮源利用试验:以去掉碳源的 White 培养基为基础培养基,分别加入各种碳源或氮源,使终浓度为 1% (质量体积分数),调节 pH 值至 7.0。灭菌后接入供试菌株,以 YMA 液体培养基为阳性对照,以不加任何碳源的培养基为阴性对照,于 28 ℃、200 r/min 摇床培养 5 d 后,显微镜下检测根瘤菌的生长状况。以上试验均设置 3 次重复。

1.4 回接试验

培养基质为按 1:1 体积混合的水洗河沙、蛭石,121 ℃ 高压灭菌 1 h。山豆根种子来自广西药用植物园科研基地。先将山豆根种子在 60 ℃ 左右热水中浸泡,并让其自然冷却,吸胀后分别用 75% 乙醇、0.1% 氯化汞进行表面消毒,在无菌的水洗河沙中,于 28 ℃ 培养至发芽,选取长势一致的植株移栽至花盆中,花盆用 5% 高锰酸钾浸泡 5~6 h 后清洗干净。

将供试菌株分别接种到山豆根幼苗根系上作为接种处

理,以不接种根瘤菌为对照处理(CK),共 6 个处理,每个处理种植 3 盆,每盆 15 株。接种方法:移栽山豆根幼苗后,用移液枪吸取相应的根瘤菌菌液 2 mL,注于幼苗根系周围,CK 处理用等量的无菌水代替。将植株置于日-夜温度周期 28 ℃—22 ℃、光照度 3 000 lx 的无菌光照培养室内培养。用 Fahraeus 无氮营养液补充营养元素、水分。培养 180 d 后取出植株清洗,统计山豆根幼苗根瘤数量。

1.5 苦参碱与氧化苦参碱的含量测定

测定方法参照 2010 年《中华人民共和国药典》(简称《药典》)^[8]。以苦参碱、氧化苦参碱对照品作为试验对照,按照《药典》中山豆根测定的方法制备供试液。称取山豆根药材 0.5 g,精确加入 20 mL 混合溶液(三氯甲烷:甲醇:浓氨水体积比为 40:10:1)密塞,称质量,放置 30 min,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 min;再次称质量后用混合溶液补足质量,摇匀,过滤,精确量取续滤液 10 mL,40 ℃ 减压回收(使用旋转蒸发器)至溶剂全部挥尽,在残渣中加入适量甲醇(色谱纯)溶解,转移至容量瓶中,用甲醇定容至 10 mL,摇匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤。另取适量苦参碱、氧化苦参碱对照品,加入液相流动相(乙腈:异丙醇:3% 磷酸溶液体积比为 80:5:15),使苦参碱含量为 20 μg/mL,氧化苦参碱含量为 150 μg/mL。仪器:高效液相色谱仪 Varian JC2X058;色谱柱:Phenomenex Luna 5 μ NH₂ 100 A,150 mm×4.6 mm;柱温:25 ℃;流动相:乙腈:异丙醇:3% 磷酸溶液体积比为 80:5:15;检测波长 210 nm;液相时间 16 min。

1.6 数据处理方法

采用 SPSS 16.0 进行数据统计与分析。

2 结果与分析

2.1 山豆根根瘤菌的生长特性

山豆根根瘤菌在 YMA 平板上于 28 ℃ 培养 3~5 d 能形成良好的典型菌落,其菌落呈圆形,透明黏稠,表面光滑,有光泽,边缘整齐,中心稍有突起。按菌落大小可分为 2 种类型,其中 YY、LA2、JX3 菌落直径为 0.6~0.8 cm,LA1、JX2 菌落直径为 0.2~0.4 cm。BTB 反应表明,参试的山豆根菌株代谢产酸;革兰氏染色均为阴性。生长曲线测定结果表明:各菌株在培养 0~4 h 为迟缓期,4~24 h 为对数生长期,24 h 后进入稳定生长期(图 1)。由此可见,本研究分离到的根瘤菌具有快生型根瘤菌的一般特征^[9],初步判定它为快生型根瘤菌。

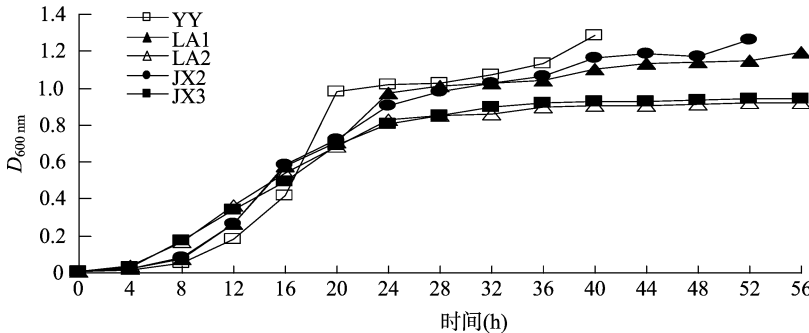


图1 山豆根根瘤菌的生长曲线

2.2 山豆根根瘤菌的生理生化特性

2.2.1 温度对山豆根根瘤菌生长的影响 山豆根根瘤菌对不同温度的反应较为一致,对低温的忍耐能力较差,在 30 ℃ 左右生长良好。各菌株对异常温度的耐受性有一定的差异,来自同一产地的不同根瘤菌株对高温的耐受性也存在着差异,其中 YY、LA1、JX2 能耐受短时 60 ℃ 的高温(表 2)。

表 2 不同温度对山豆根根瘤菌生长的影响								
菌株	不同温度条件下根瘤菌生长情况							
	0 ℃	10 ℃	20 ℃	25 ℃	30 ℃	35 ℃	40 ℃	60 ℃ + 28 ℃
YY	-	-	+	+	+	+	+	+
LA1	-	-	-	+	+	+	-	+
LA2	-	-	-	+	+	+	-	-
JX2	-	-	-	+	+	+	-	+
JX3	-	-	-	+	+	+	-	-

注:“+”表示生长,“-”表示不生长。表 3 至表 6 同。

2.2.2 pH 值对山豆根根瘤菌生长的影响 一般过酸、过碱的环境条件不利于根瘤菌的生长,山豆根根瘤菌对酸碱的反应较为一致,在 pH 值为 6.0 ~ 10.0 时均能生长,其中 LA1、JX2、JX3 在 pH 值为 11 的条件下仍能生长(表 3)。由试验结果可知,山豆根根瘤菌对酸性环境较为敏感,pH 值低于 6.0 时菌株不能再生长,但具有较丰富的耐碱种质资源。

2.2.3 NaCl 含量对山豆根根瘤菌生长的影响 表 4 表明,山豆根根瘤菌在无盐条件下能生长,随着 NaCl 含量的增加,菌株生长受到抑制,当 NaCl 含量达到 1% 及以上时,菌株不能生长。

表 5 山豆根根瘤菌对抗生素的抗性												
菌株	不同 Amp 含量对根瘤菌的影响				不同 Cm 含量对根瘤菌的影响				不同 Km 含量对根瘤菌的影响			
	100 μg/mL	300 μg/mL	500 μg/mL	600 μg/mL	100 μg/mL	300 μg/mL	500 μg/mL	600 μg/mL	5 μg/mL	10 μg/mL	30 μg/mL	40 μg/mL
YY	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
LA1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
LA2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
JX2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JX3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

菌株	不同 Gm 含量对根瘤菌的影响				不同 Spc 含量对根瘤菌的影响				不同 Sm 含量对根瘤菌的影响			
	5 μg/mL	10 μg/mL	30 μg/mL	40 μg/mL	5 μg/mL	10 μg/mL	30 μg/mL	40 μg/mL	5 μg/mL	10 μg/mL	30 μg/mL	40 μg/mL
YY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LA2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
JX2	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+
JX3	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-

菌株	不同 Cb 含量对根瘤菌的影响			不同 Nm 含量对根瘤菌的影响			不同 Tc 含量对根瘤菌的影响		
	10 μg/mL	50 μg/mL	300 μg/mL	10 μg/mL	50 μg/mL	300 μg/mL	30 μg/mL	100 μg/mL	300 μg/mL
YY	+	+	+	+	+	-	-	-	-
LA1	+	+	+	+	+	-	+	-	-
LA2	+	+	+	+	-	-	+	+	-
JX2	+	+	+	+	+	-	+	+	-
JX3	+	+	+	+	+	-	+	+	-

2.2.5 碳源和氮源利用 根瘤菌一般能较好地利用单糖和双糖,而快生型根瘤菌能利用麦芽糖、乳糖、蔗糖等双糖^[10]。由表 6 可知,山豆根根瘤菌均能利用葡萄糖、蔗糖、甘露醇、麦芽糖、果糖、乳糖,但不能利用乙酸钠、甘氨酸和肌醇。

本试验检测了供试菌株对 5 种氮源的利用情况,由表 6

表 3 pH 值对山豆根根瘤菌生长的影响								
菌株	不同 pH 值条件下根瘤菌的生长情况							
	4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0	10.0	11.0 12.0
YY	-	-	+	+	+	+	+	- -
LA1	-	-	+	+	+	+	+	+
LA2	-	-	+	+	+	+	+	- -
JX2	-	-	+	+	+	+	+	+
JX3	-	-	+	+	+	+	+	+

表 4 不同含量的 NaCl 对山豆根根瘤菌生长的影响						
菌株	不同 NaCl 含量下的根瘤菌生长情况					
	0%	0.1%	0.5%	1.0%	2.0%	3.0%
YY	+	+	+	-	-	-
LA1	+	+	+	-	-	-
LA2	+	+	+	-	-	-
JX2	+	+	+	-	-	-
JX3	+	+	+	-	-	-

2.2.4 山豆根根瘤菌对几种抗生素的耐受性 对抗生素的敏感性是根瘤菌的重要生理生化特性,可以作为分类的指标之一。表 5 表明,山豆根根瘤菌株对 Km、Gm 的耐受性最差,在低含量(5 μg/mL)下均不能生长;对 Cb 表现出抗性,在较高含量(300 μg/mL)下仍能够生长;在 100 μg/mL Cm、10 μg/mL Nm 中都能够生长。此外,菌株间对不同抗生素或同一抗生素不同浓度的抗性差异较大,即使是来自同一地域的菌株之间也有部分差异。如来自靖西县的菌 JX2、JX3 对 Amp 敏感,相反另外 2 株来自隆安县的 LA1、LA2 对 Amp(600 μg/mL)表现出抗性,而分离自广西药用植物园的 YY 菌株能忍耐 100 μg/mL Amp。

可见,所有的菌株都能利用蛋白胨和硫酸铵;所有菌株均不能利用半胱氨酸;除 YY 外,其余菌株均能利用硝酸钾,而且 YY、LA1 不能利用甘氨酸,说明大部分供试根瘤菌可以利用无机氮源作为其生长所需氮源。试验结果表明,来源不同的山豆根根瘤菌对供试碳源、氮源的利用能力比较一致。

表 6 山豆根根瘤菌的碳源、氮源利用情况

菌株	碳源利用情况									氮源利用情况				
	葡萄糖	乙酸钠	甘氨酸	肌醇	蔗糖	甘露醇	麦芽糖	果糖	乳糖	蛋白胨	硝酸钾	硫酸铵	甘氨酸	半胱氨酸
YY	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
LA1	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
LA2	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
JX2	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
JX3	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

2.3 根瘤菌对山豆根幼苗有效成分的影响

接种根瘤菌能使山豆根幼苗结瘤,不同根瘤菌处理的植株苦参碱和氧化苦参碱含量是不同的。接种根瘤菌的处理,其苦参碱、氧化苦参碱含量均比对照有所增加,其中接种来自靖西县菌株的植株含量显著高于对照及其他大部分处理(表 7)。由结果可见,接种根瘤菌有利于根瘤形成,再通过根瘤进行生物固氮来积累氮素,从而促进植株有效成分的积累。

表 7 根瘤菌对山豆根幼苗有效成分含量的影响

菌株	苦参碱含量(mg/g)	氧化苦参碱含量(mg/g)
YY	0.123 ± 0.003b	1.877 ± 0.282ab
LA1	0.113 ± 0.015b	1.600 ± 0.173bc
LA2	0.120 ± 0.000b	1.493 ± 0.191bc
JX2	0.190 ± 0.017a	2.167 ± 0.120a
JX3	0.210 ± 0.006a	2.487 ± 0.019a
CK	0.105 ± 0.003b	1.247 ± 0.023c

注:同列数据后标有不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

3 讨论

药材原料质量是药材生产中亟待解决的问题,许多学者也在探索解决、评价药材质量的方法^[11-12]。山豆根人工驯化获得成功之后,人们总结了山豆根人工栽培的一些技术措施^[5-6],但是在栽培生产中,药农为了追求产量而多施重施氮肥,造成病虫害加重、农药残留量升高、硝酸盐含量超标等问题,严重影响药材质量,这是目前山豆根可持续生产中不可忽视的问题。生物固氮是豆科植物的一个重要特性,通过生物固氮可以利用自然界的 N₂ 改善植株的氮素营养状况,从而避免盲目施氮肥造成对山豆根等豆科药材质量的不良影响。因此,筛选出具有优良特性的土著根瘤菌菌株对进一步在生产上进行接种应用是十分有利的。本试验从山豆根根瘤中获得 5 株根瘤菌,它们均具有快生型根瘤菌生长特征和生理生化特征。

杨亚珍等发现,不同地理来源、同一地理来源、甚至同一植株不同甘草根瘤菌菌株在个别指标方面存在差异^[13];黄荣韶等发现,不同生态环境下采集的鸡骨草根瘤菌在生物学特性方面具有较大的差异^[14]。本试验结果与这些研究有相似之处,即来源相同或来源不同的山豆根根瘤菌在对高温忍耐能力、酸碱环境的适应性、抗生素的敏感性等方面存在差异,

但对酸碱环境的适应性及碳源的利用能力比较一致,推测这可能与不同的菌株含有的一些特殊基因有关。通过回接试验发现,人工接种根瘤菌明显促进山豆根根瘤的形成,植株的有效成分含量大幅度提高,其原因可能是生物碱是含氮化合物,氮素的供给利用在山豆根生物碱的生物合成和积累中起重要作用。但是不同来源的山豆根菌株之间对有效成分积累的影响不同,这是否与采集地的生态环境有关,尚待进一步研究。

参考文献:

[1] 全国中草药汇编组. 中草药汇编[M]. 北京:人民卫生出版社, 1978:105.

[2] 林启寿. 中草药成分化学[M]. 北京:科学出版社,1977:709.

[3] 张鸣杰,黄建. 苦参碱类抗肿瘤作用机制研究的新进展[J]. 中国中药杂志,2004,29(2):115-118.

[4] 黄宝优,农东新,黄雪彦,等. 中药材山豆根资源调查报告[J]. 中国现代中药,2014,16(9):740-744.

[5] 覃文流,凌征柱,吴庆华,等. 山豆根野生变家种研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(9):1668-1669.

[6] Wei K H, Li L X, Huang Y C, et al. Tissue culture of *Sophora tonkinensis* Gagnep. and its quality evaluation[J]. Pharmacognosy Magazine,2013,9(36):323-330.

[7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:353.

[8] 国家药典委员会. 中国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:26.

[9] 曹燕珍,胡正嘉,黄诚金,等. 快生型根瘤菌的研究——I. 快生型大豆根瘤菌的分离及其生理生化形状[J]. 华中农业大学学报,1986,5(2):149-156.

[10] Broghton W J. Nitrogen fixation[M]. Oxford: Clarendon Press, 1982:76.

[11] 郭玫,余晓晖,李阳. 中药材质量现状及解决途径[J]. 甘肃中医学院学报,2003,20(2):63,封三.

[12] 刘广南. 中药的生产必须从源头抓起[J]. 世界科学技术:中药现代化,2001,3(4):76-77.

[13] 杨亚珍,韦草宏,万晓红,等. 西北地区甘草根瘤菌的表型多样性研究[J]. 微生物学通报,2004,31(2):20-25.

[14] 黄荣韶,盛孝邦,王永雄. 鸡骨草根瘤菌的分离及其生物学特性研究[J]. 中国中药杂志,2005,30(13):971-977.