

不同生育期襄麦冬内生细菌的分布及产甾体皂苷菌株的初步筛选

余海忠^{1*}, 程旭³, 王海燕¹, 殷幼平², 王中康²

¹湖北文理学院食品科学技术学院, 襄阳 441053; ²重庆大学生命科学学院, 重庆 405200;

³襄阳市农业科学院, 襄阳 441057

摘要: 甾体皂苷是百合科山麦冬属多年生草本植物襄麦冬 *Liriope spicata* var. *prolifera* Y. T. Ma 的主要活性成分之一, 具有多重药理学活性。为了探究不同生育期襄麦冬内生细菌的分布情况, 挖掘其产甾体皂苷内生细菌菌株资源, 本研究对其内生细菌进行了分离、纯化、鉴定和功能研究。利用纯培技术从不同生育期的块根和须根中分离获得 50 株细菌, 分子生物学鉴定这些内生细菌分属 15 个属 22 个种。利用 16S rDNA-PCR-DGGE 技术分析襄麦冬块根始见期、迅速膨大期、成熟采收期的块根内生细菌的群落结构, 结果表明三个生育期的块根样品内生菌群结构基本相同, 细菌类群差异很小, 获得的 21 个序列中包含分属 14 属 21 种的细菌类群。利用颜色反应、TLC、HPLC 等方法, 从纯培细菌中初步筛选出墨西哥假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas mexicana*、山羊葡萄球菌 *Staphylococcus caprae*、砖红色微杆菌 *Microbacterium testaceum* 3 株细菌具有明显产甾体皂苷特征。上述结果表明襄麦冬内生细菌具有“工厂化”制备生产甾体皂苷的应用开发潜力。

关键词: 襄麦冬; 内生细菌; 甾体皂苷; 分布

中图分类号: Q936

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)6-1027-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.6.016

Distribution of endophytic bacteria and preliminary screening of steroidal saponin-producing strain from *Liriope spicata* var. *prolifera* Y. T. Ma in different growth stages

YU Hai-zhong^{1*}, CHENG Xu³, WANG Hai-yan¹, YIN You-ping², WANG Zhong-kang²

¹School of Food Science and Technology, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, China;

²College of Life Sciences, Chongqing University, Chongqing 405200, China;

³Xiangyang Academy of Agricultural Sciences, Xiangyang 441057, China

Abstract: *Liriope spicata* var. *prolifera* Y. T. Ma is a indigenous medicinal herb cultivated in Xiangyang of Hubei, China, which belongs to *Liriope* genus of Liliaceae family. Steroidal saponins, one of the main active components in the tuberous roots of *L. spicata* var. *prolifera*, have multiple pharmacological activities. In order to investigate the distribution of endophytic bacteria in *L. spicata* var. *prolifera* at different growth stages and to explore the resources of endophytic bacteria producing steroidal saponins, the endophytic bacteria were isolated, purified, identified and function studied. Using pure culture technology, 50 endophytic bacteria were isolated from *L. spicata* var. *prolifera* at different growth stages, and these endophytic bacteria were 22 species belonging to 15 genera by colony morphology and molecular biological identification. In addition, 16S rDNA PCR-DGGE method was used to analyze the endophytic bacteria distribution in the tuberous root of *L. spicata* var. *prolifera* during the different stages including initial growth stage, rapid growth stage and mature stage. DGGE showed that the structures of endophytic bacteria in tuberous root from three growing periods were all basically the same and slightly difference. By blasting the sequences of 16S rDNA V6-V8 hypervariable region in GenBank, it was found that the 21 sequences contained 21 bacteria

收稿日期: 2021-10-08 接受日期: 2022-05-25

基金项目: 国家星火计划面上项目(2015GA760011); 湖北省高价值知识产权培育工程(专利类)项目(D2020000875); 襄阳市医疗卫生领域科技计划重点项目(2020YL23)

* 通信作者 Tel: 86-710-3592609; E-mail: haizhongvip@hbuas.edu.cn

species belonging to 14 genera. Moreover, three strains of *Pseudoxanthomonas mexicana*, *Staphylococcus caprae* and *Microbacterium testaceum* were preliminarily identified as possessing the steroidal saponin-producing ability by Color reaction, TLC and HPLC. The above results showed that the endophytic bacteria of *L. spicata* var. *prolifera* have the application and development potential of "industrialized" preparation and production of steroidal saponins.

Key words: *Liriope spicata* var. *prolifera* Y. T. Ma; endophytic bacteria; steroidal saponins; distribution

囊麦冬,即湖北麦冬 *Liriope spicata* var. *prolifera* Y. T. Ma,为《中华人民共和国药典》(2010年版)山麦冬基源植物之一^[1],甾体皂苷是其主要活性成分,它的皂苷元基本骨架属于螺甾烷(spirostane,共有27个碳原子组成)的衍生物,依照螺甾烷结构中C25的构型和F环的环合状态,可将其分为以下四种主要类型:螺甾烷醇类(C25为S构型)、异螺甾烷醇类(C25为R构型)、呋甾烷醇类(F环为开链衍生物)、变形螺甾烷醇类(F环为五元四氢呋喃环)。现已从囊麦冬中分离出14种甾体皂苷^[2-4],其主要苷元是薯蓣苷元(diosgenin)和鲁斯可苷元(ruscogenin),均为C25(S)异构体,其中以山麦冬皂苷C(Ls-S3)含量较高^[5]。甾体皂苷具有多重药理学活性^[6,7],除了极少的能化学全合成,主要还是通过化学萃取中药材直接获得^[8],囊麦冬甾体皂苷也不例外。但是由于存在生产周期长、大田连作障碍、皂苷含量低、提取成本高、环境污染大等问题^[9],囊麦冬甾体皂苷的可持续生产和供应受到制约,因此,非常有必要寻找大量制备皂苷的新途径。

此前,有研究报道从滇重楼、华重楼中分离得到可产生甾体皂苷的内生细菌^[10-13],受此启发,本课题组尝试从囊麦冬中分离和发掘代谢产生甾体皂苷的内生细菌菌株:利用纯培方法和16S rDNA-PCR-DGGE技术^[14],分析和鉴定囊麦冬始见期、迅速膨大期、成熟采收期的样品(块根或须根)中内生细菌的分布。同时,采用颜色反应、TLC、HPLC方法,对获得的纯培菌株进行初步的产皂苷能力评价,以期获得目的菌株为实现甾体皂苷的“工厂化、规模化、快速化”生产提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 样品处理与表面消毒

囊麦冬样品分三次采集:2013年9月20日(块根始见期)、2013年11月28日(块根迅速膨大期)和2014年3月22日(块根成熟采收期),地点位于湖北襄阳欧庙囊麦冬GAP基地。选择茁壮植株的新鲜块根或须根,采集后立即带回实验室冲洗处理,在无菌条件下,将待处理样品(块根、须根)放入75%(V/V)乙醇浸泡2 min,用无菌水漂洗3次;有

效氯含量4%~6%的次氯酸钠溶液浸泡2 min,用大量无菌水连续漂洗4次,并分别设置环境、漂洗和印记对照试验以检测表面消毒是否彻底。处理后的样品用无菌滤纸吸干水分,取一部分在3天之内完成可纯培内生细菌的分离操作,另取一部分置-80℃保存用于后续16S rDNA PCR-DGGE分析。

1.2 试剂与设备

主要试剂:有效氯含量4%~6%的次氯酸钠、正丁醇、乙醚、氯仿、浓硫酸、乙酸酐、AlCl₃、75%乙醇、无水乙醇、二氨基乙基四乙胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、过硫酸铵、N,N,N',N'-四甲基二乙胺、色谱纯乙腈(上海国药集团公司);薄层层析用硅胶G(青岛海洋化工厂分厂);CTAB、SDS、EDTA、TRIS碱、PVP、β-巯基乙醇、葡萄糖、琼脂、(上海生工)。PCR扩增试剂盒、标准分子量、琼脂糖、氨卞青霉素、PCR产物纯化试剂盒、引物、pMD-19T克隆载体(大连宝生物公司);细菌基因组DNA小量制备试剂盒、凝胶纯化回收试剂盒(Axygen公司)。

主要设备:YSQ-LS-30SII立式压力蒸汽灭菌器(上海博讯);HZ-9211K恒温振荡器(华利达);ChemiDoc XPS自动凝胶成像仪(Bio-Rad);AL204电子分析天平(梅特勒-托利多);GXP-9160MBE隔水式培养箱(上海博讯);GZX-9030MBE鼓风干燥箱(上海博讯);Mastercycler pro梯度PCR仪(Eppendorf);SIGMA 3K15低温冷冻离心机(Sigma);Power Pac HC™电泳仪(Bio-Rad);FreeZone 12小型冷冻干燥机(Labconco);超低温冰箱(Thermo electron);MiliQ纯水机(Millipore);RE-52AA旋转蒸发器(上海亚荣);核酸蛋白检测仪(Beckman);Shimadzu LC-20AT高效液相色谱仪(岛津)。

1.3 可纯培内生细菌的鉴定

1.3.1 菌株的分离与纯化

在无菌条件下,称取表面消毒样品组织1.0 g左右,加5 mL无菌水于研钵中充分研磨,将匀浆液按1×10⁻³倍数稀释之后,分别吸取0.2 mL涂布于牛肉膏蛋白胨培养基、PDA培养基、LB培养基平板,每个处理设置3个重复,37℃避光培养。随时观察平板,挑取生长良好的菌落,在牛肉膏蛋白胨培养基

平板上作“Z”形划线,并根据菌落的颜色及形态,分别取呈现不同表形特征的菌落进行多次划线纯化,直至得到单菌落。菌株编号,转入 PDA 斜面 37 °C 培养,待菌落长满试管后于 4 °C 保藏、待用。

1.3.2 菌株 DNA 的提取

挑取上述单菌落接种于 LB 液体培养基中,根据不同菌落生长的特点,在 37 °C 下 180 r/min 分别震荡培养 7 ~ 12 h 后取菌液 2 mL,10 000 r/min 离心 5 min,去上清收集菌体。采用酶解法^[15]提取内生细菌的基因组总 DNA,DNA 样品-20 °C 保存、待用。

1.3.3 16S rRNA 基因的扩增与克隆

取上述提取的细菌总 DNA 为模板,以细菌 16S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增^[16]。PCR 扩增产物用 1% (W/V) 的琼脂糖凝胶进行电泳分析,用凝胶成像仪检测。采用 pMD™19-T Vector 作为克隆载体,按照 KIT 提供的操作步骤完成上述 PCR 扩增产物的连接、转化和阳性克隆的鉴定。阳性克隆转接于 LB 液体培养基,震荡培养 12 ~ 16 h 后将菌液送出测序。

1.4 内生细菌 16S rDNA-DGGE 分析

1.4.1 菌株基因组 DNA 提取

取上述-80 °C 保存的表面消毒样品,进行内生细菌基因组 DNA 的提取^[16],洗脱得到的 DNA 溶解于 TE,分装后-20 °C 保存待用。

1.4.2 菌株 16S rDNA V6 ~ V8 区的扩增

为了避免植物样本中线粒体 DNA 与叶绿体 DNA 的干扰,本实验在进行内生细菌 16S rDNA 序列扩增时分为两个流程:先按照“1.3.3”项下方法扩增出细菌 16S rDNA 中的 V5 ~ V9 高变区;再以 V5 ~ V9 高变区的扩增产物为模板,采用 Nested-PCR^[17]来扩增 16S rDNA 的 V6 ~ V8 区。扩增结束以后,取一定量的 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电

泳,检测是否为目的 DNA 片段,若有,用此 PCR 产物进行 DGGE 分析。

1.4.3 PCR-DGGE 分离及条带分析

对上述 PCR 产物进行浓缩,采用 DGGE 系统进行电泳分离及条带分析^[16],依次完成电泳分离、银染、拍照,使用 QuantityOne-1-D 软件标出图谱中较清晰的条带,并切下对应的条带,分别捣碎后加入 20 μ L ddH₂O 于-20 °C 过夜,最后以上清液为模板进行 PCR 扩增和电泳检测,切割并回收目的 DNA 条带,送出测序。

1.5 序列比对

将上述菌株 16S rDNA 的 V5 ~ V9 区、V6 ~ V8 区序列测序结果,在 NCBI 数据库上进行 BLAST 比对分析,寻找同源性最高的序列进行种属鉴定。

1.6 产甾体皂苷内生菌株的筛选

1.6.1 菌株发酵液总皂苷提取物的制备

按照“1.3.2”项下方法完成菌株的液体震荡培养,将发酵液-80 °C 急冻后进行低温冷冻干燥,再按以下步骤完成菌株发酵液总皂苷的提取:冷冻干燥的发酵产物研成粉末,加入 75% 乙醇在 60 °C 下抽提 3 h,重复抽提两次,合并提取液,旋转蒸发得浸膏。浸膏加水溶解后,加入乙醚进行萃取,保留水层部分,再加入水饱和正丁醇萃取 4 次(15、10、5、5 mL),保留并合并正丁醇层部分。减压浓缩去除正丁醇后获得浸膏,即菌株发酵液总皂苷提取物。浸膏根据后续不同的检测需要,选择不同的溶剂进行溶解,分装后于-20 °C 保存待用。

1.6.2 发酵液总皂苷提取物的颜色反应

分别取上述菌株发酵液总皂苷提取物进行颜色反应,初步检测所提取的菌株发酵产物中是否含有皂苷。如果有,再判断其是属于甾体皂苷还是三萜皂苷(见表 1)。

表 1 内生菌株发酵液总皂苷提取物的颜色反应

Table 1 Color reaction of total saponin from fermentation of endophytic bacteria

颜色反应 Color reaction	操作步骤 Operation procedure	阳性结果 Positive result
Liebermann 反应 Liebermann reaction	样品溶于 200 μ L 乙醚,加浓硫酸 50 μ L	呈黄-红-蓝-紫-绿等颜色变化,最后褪色,则样品含皂苷
Liebermann-Burchard 反应 Liebermann-Burchard reaction	样品溶于氯仿,加乙醚-硫酸(20:1)数滴	呈蓝绿色,则样品含甾体皂苷;呈红紫色,则样品含三萜皂苷
三氯乙酸反应 Trichloroacetic acid reaction	样品溶于氯仿,点在滤纸上,喷三氯乙酸,加热	加热至 60 °C 呈红色,含甾体皂苷;加热至 100 °C 呈红色,含三萜皂苷
氯仿-浓硫酸反应 Chloroform sulfuric acid reaction	样品溶于氯仿,加浓硫酸数滴	氯仿层现红色或蓝色,硫酸层有绿色荧光,则样品含甾体皂苷

1.6.3 发酵液总皂苷提取物的 TLC 检测

阳性对照的制备:称取囊麦冬块根粉末 10 g,加入 100 mL 甲醇,80 °C 索氏提取 3 h 至无色,对提取液进行减压浓缩,得浸膏,后续提取步骤与“1.6.1”项下方法相同,最终获得囊麦冬总皂苷提取物,用 2 mL 甲醇溶解,即获得阳性对照。

TLC 检测:将上述提取的菌株发酵液总皂苷提取物配成甲醇溶液,取 10 μ L 点样于 G 型硅胶板上,设置阳性对照。层析液为氯仿-甲醇(100:1),显色液为 15% 硫酸乙醇溶液,105 °C 烘 3 min,直至显出清晰红色斑点为止。

1.6.4 发酵液总皂苷提取物的 HPLC 检测

色谱条件:检测器:SPD-20A;柱温箱:CTU-10AS 并配有在线脱气机 DGU-20A;色谱柱:Inert Sustain C₁₈(250 mm \times 4.6 mm,5 μ m)。流动相:A 水,B 乙腈;梯度洗脱(0 ~ 25 min,5% B \rightarrow 30% B;25 ~ 35 min,30% B \rightarrow 55% B;35 ~ 45 min,55% B \rightarrow 65% B;45 ~ 55 min,65% B \rightarrow 85% B;55 ~ 70 min,85% B \rightarrow 100% B;70 ~ 75 min,100% B;75 ~ 75.5 min,100% B \rightarrow 5% B;75.5 ~ 80 min,5% B)。流速 1 mL/min,检测波长为 210 nm,进样量 10 μ L,记录 80 min 数据,信号强度单位为 μ V。

2 结果与分析

2.1 可纯培囊麦冬内生细菌的分离及鉴定

通过传统的细菌分离纯化方法,本实验完成对不同生育期囊麦冬块根和须根的初步分离,获得 50 株可纯培的内生细菌,其中 28 株来自须根,22 株来自块根。观察记录它们的菌落形态特征,并对其 16s rRNA 基因进行扩增、测序、BLASTn 比对,具体结果见表 2。根据菌落形态,并结合序列比对结果,初步表明:上述 50 株内生细菌分属 15 个属 22 个种。其中,芽孢杆菌属 *Bacillus*、葡萄球菌属 *Staphylococcus* 各分离出 4 种菌,假单胞菌属 *Pseudomonas* 分离出 2 种菌,其余的 12 个属,包括沙门氏菌属 *Salmonella*、肠杆菌属 *Enterobacter*、假黄单胞菌属 *Pseudoxanthomonas*、摩根菌属 *Morganella*、农杆菌属 *Agrobacterium*、微杆菌属 *Microbacterium*、产吡啶杆菌属 *Porphyrobacter*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、赖氨酸芽孢杆菌属 *Lysinibacillus*、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、鞘氨醇杆菌属 *Sphingobacterium*、短小杆菌属 *Curtobacterium*,每个属只有 1 种菌。

上述完成鉴定的 22 种内生细菌分别为:韦氏芽

孢杆菌 *Bacillus weihenstephanensis* (Accession 登记号:KC329820),嗜气杆菌 *Bacillus aerophilus* (Accession 登记号:KC329821),巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* (Accession 登记号:KC329822),尼尔森杆菌 *Bacillus nealsonii* (Accession 登记号:KC329823),琥珀葡萄球菌琥珀亚种 *Staphylococcus succinus subsp. Succinus* (Accession 登记号:KC329824),山羊葡萄球菌 *Staphylococcus caprae* (Accession 登记号:KC329825),溶血性葡萄球菌 *Staphylococcus haemolyticus* (Accession 登记号:KC329826),表皮葡萄球菌 *Staphylococcus epidermidis* (Accession 登记号:KC329827),罗氏假单胞菌 *Pseudomonas rhodesiae* (Accession 登记号:KC329817),极端东方化假单胞菌 *Pseudomonas extremorientalis* (Accession 登记号:KC329818),邦戈尔沙门氏菌 *Salmonella bongori* (Accession 登记号:KC329819),墨西哥假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas Mexicana* (Accession 登记号:KC329828),根癌土壤杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* (Accession 登记号:KC329829),柠檬色短小杆菌 *Curtobacterium citreum* (Accession 登记号:KC329830),纺锤形赖氨酸芽孢杆菌 *Lysinibacillus fusiformis* (Accession 登记号:KC329831),溶血不动杆菌 *Acinetobacter haemolyticus* (Accession 登记号:KC329832),浮游产吡啶杆菌 *Porphyrobacter neustonensis* (Accession 登记号:KC329833),砖红色微杆菌 *Microbacterium testaceum* (Accession 登记号:KC329834),阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* (Accession 登记号:KC329835),韩国鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas koreensis* (Accession 登记号:KC329836),泗阳鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium siyangense* (Accession 登记号:KC329837),摩氏摩根菌 *Morganella morganii* (Accession 登记号:KC329838)。

2.2 内生细菌 16S rDNA-DGGE 图谱分析

2.2.1 内生细菌 16S rDNA 的 V5 ~ V9、V6 ~ V8 片段的扩增

用通用引物扩增囊麦冬块根内生细菌 16S rDNA V5 ~ V9 的 4 个高变区,得到两条条带,分别为 730 bp 和 840 bp(见图 1A),其中 730 bp 的条带为目的片段,进行切胶回收。以上述回收 DNA 片段为 PCR 扩增模板,用带 GC 夹的 968F 和 1378R,扩增出大小为 450 bp 的 V6 ~ V8 的目的片段(见图 1B)。

表2 襄麦冬可纯培内生细菌的形态特征及其 16s RNA 基因序列比对结果

Table 2 Colony morphology and GenBank BLAST results of 16s RNA sequences of endophytic bacteria

菌株编号 Strain No.	菌落形态 Colony morphology	序列大小 Sequence length (bp)	最相似菌株 Closest related species strain	相似度 Similarity (%)
EBNDX011	浅黄色,表面光滑湿润,球形	1 501	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	99
EBNDK009	黄色,刺突状,菌落表面平整	1 516	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBPDAK005	红色,小液滴状	1 506	<i>Salmonella bongori</i>	98
EBPDAK003	白色,表面光滑湿润,球形	1 517	<i>Staphylococcus succinus</i> subsp. <i>Succinus</i>	99
EBNDX005	白色,不透明,菌落表面平整	1 504	<i>Enterobacter cloacae</i>	98
EBNDX028	红色,小液滴状	1 506	<i>Salmonella bongori</i>	98
EBNDK010	黄色,刺突状,菌落表面平整	1 516	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBNDK005	黄色,刺突状,菌落表面平整	1 516	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBNDX008	乳白色,圆团状,表面光滑	1 501	<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	99
EBPDAK008	红色,小液滴状	1 506	<i>Salmonella bongori</i>	98
EBNDX003	橙黄色,表面有褶皱	1 515	<i>Staphylococcus caprae</i>	98
EBNDX018	乳白色,周围有晕圈	1 509	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	99
EBNDX002	乳白色,周围有晕圈	1 509	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	99
EBLBX005	橙色,小液滴状	1 513	<i>Bacillus aerophilus</i>	99
EBNDK008	黄色,刺突状,菌落表面平整	1 516	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBNDK006	黄色,菌落表面平整	1 408	<i>Morganella morganii</i>	99
EBLBX006	橙色,表面光滑湿润,球形	1 449	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99
EBNDX007	乳白色,周围有晕圈	1 509	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	99
EBNDX015	橙色,小液滴状	1 515	<i>Bacillus aerophilus</i>	99
EBNDX023	橙色,小液滴状	1 513	<i>Bacillus aerophilus</i>	99
EBNDX016	乳白色,周围有晕圈	1 515	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	99
EBNDX017	浅黄色,花团状	1 493	<i>Sphingobacterium siyangense</i>	98
EBNDK007	黄色,刺突状,菌落表面平整	1 516	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBNDK013	黄色,刺突状,菌落表面平整	1 516	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBPDAK006	暗红色,点状	1 467	<i>Microbacterium testaceum</i>	99
EBNDX014	透明,菌体表面有凸起	1 449	<i>Porphyrobacter neustonensis</i>	99
EBNDX011-1	红色,小液滴状	1 506	<i>Salmonella bongori</i>	98
EBNDK016	黄色,刺突状,菌落表面平整	1 517	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBNDK004	透明,小球形	1 497	<i>Bacillus megaterium</i>	99
EBNDX009	白色,周围有晕圈	1 482	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	99
EBNDX019	乳白色,周围有晕圈	1 509	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	99
EBNDK014	黄色,刺突状,菌落表面平整	1 516	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBLBK001	浅黄色,菌体表面有凸起	1 515	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	99
EBNDX006	乳白色,周围有晕圈	1 509	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	99
EBNDX026	橙色,小液滴状	1 513	<i>Bacillus aerophilus</i>	99
EBLBX003	橙色,小液滴状	1 513	<i>Bacillus aerophilus</i>	99
EBPDAK001	橙色,小液滴状	1 513	<i>Bacillus aerophilus</i>	99
EBPDAK002	暗红色,点状	1 486	<i>Microbacterium testaceum</i>	99

续表 2 (Continued Tab. 2)

菌株编号 Strain No.	菌落形态 Colony morphology	序列大小 Sequence length (bp)	最相似菌株 Closest related species strain	相似度 Similarity (%)
EBNDX017	白色, 圆团状, 表面光滑,	1 430	<i>Sphingomonas koreensis</i>	99
EBNDX008-2	红色, 小液滴状	1 506	<i>Salmonella bongori</i>	98
EBLBX004	橙色, 表面光滑湿润, 球形	1 449	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99
EBNDK012	黄色, 刺突状, 菌落表面平整	1 516	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBNDX001	乳白色, 小液滴状	1 514	<i>Bacillus nealsonii</i>	99
EBNDK015	暗黄色, 点状, 表面湿润	1 517	<i>Lysinibacillus fusiformis</i>	98
EBNDX013	橙色, 表面光滑湿润, 球形	1 449	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	99
EBLBX005-1	白色, 小白点状	1 515	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99
EBNDX010	乳白色, 小液滴状	1 514	<i>Bacillus nealsonii</i>	99
EBNDK003	黄色, 刺突状, 菌落表面平整	1 516	<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	99
EBNDK011	乳白色, 小液滴状	1 513	<i>Bacillus nealsonii</i>	99
EBPDAK007	污白色, 菌落表面粗糙不透明	1 486	<i>Curtobacterium citreum</i>	99

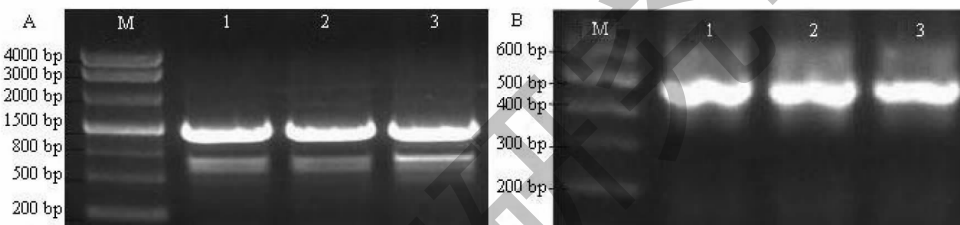


图 1 囊麦冬内生细菌 16S rDNA 高变区电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of 16S rDNA hypervariable region of *L. spicata* var. *prolifera* endophytic bacteria

注: A 为 V5 ~ V9 高变区扩增片段; B 为 V6 ~ V8 高变区扩增片段。M 为标准分子量; 1 为块根始见期; 2 为块根迅速膨大期; 3 为采收期。

Note: A is the amplified fragment of V5 ~ V9 hypervariable region; B is the amplified fragment of V6 ~ V8 hypervariable region. M is the standard molecular; 1, 2 and 3 refer to the initial growth stage, rapid growth stage and mature stage of root tuber, respectively.

2.2.2 内生细菌 16S rDNA-DGGE 图谱分析

对不同生育期的囊麦冬块根内生细菌进行 DGGE 图谱分析(见图 2), 结果表明: 囊麦冬块根始见期、块根迅速膨大期和块根采收期这 3 个生育期采集的块根样品中, 内生菌群结构基本相同, 细菌类群差异很小。分别将分离的 21 个区分明显的条带割胶回收、测序比对, 发现这 21 个序列分属 15 个属, 共计 21 种不同细菌(见表 3)。其中, 芽孢杆菌属 *Bacillus*、葡萄球菌属 *Staphylococcus* 各有 3 种细菌, 沙雷氏菌属 *Serratia*、假单胞菌属 *Pseudomonas* 各有 2 种, 其余的 11 个属, 包括假单胞属 *Pseudomonas*、果胶杆菌属 *Pectobacterium*、鲍特氏菌属 *Bordetella*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、产吡啶杆菌属 *Porphyrobacter*、短小杆菌属 *Curtobacterium*、肠杆菌属 *Enterobacter*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、固氮菌属 *Azotobacter*、微杆菌属 *Microbacterium*、假棍状杆

菌属 *Pseudoclavibacter*, 均只有 1 种菌。DGGE 所测结果与上述分离得到的 22 种可纯培内生细菌菌株相比, 又增加了 7 个属: 沙雷氏菌属 *Serratia*、果胶杆菌属 *Pectobacterium*、鲍特氏菌属 *Bordetella*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、固氮菌属 *Azotobacter*、假棍状杆菌属 *Pseudoclavibacter*。

2.3 产甾体皂苷内生菌株的筛选

2.3.1 颜色反应筛选结果

根据 Liebermann 反应、Liebermann-Burchard 反应、三氯乙酸反应以及氯仿-浓硫酸反应的需要, 分别将上述制备的 22 株可纯培内生细菌发酵液总皂苷提取物, 配制成不同溶剂的样品溶液。颜色反应结果表明: 有 3 株细菌初步具有产甾体皂苷的特征, 分别是砖红色微杆菌 *Microbacterium testaceum* (EBPDAK002)、墨西哥假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas*

mexicana (EBNDX002)、山羊葡萄球菌 *Staphylococcus caprae* (EBNDX003), 具体反应结果见表 4。

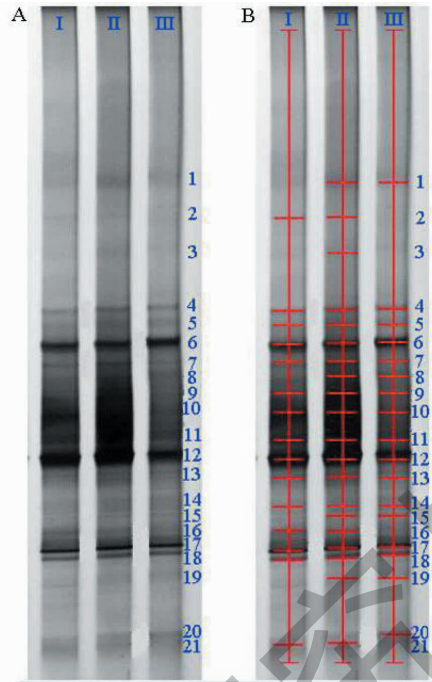


图 2 襄麦冬内生细菌 16S rRNA V6~V8 高变区 DGGE 图谱

Fig. 2 DGGE map of the 16S rRNA V6~V8 high variable region of endophytic bacteria from *L. spicata* var. *prolifera*

注: A 为原始图; B 为 QuantityOne-1-D 软件处理图 (红色线条代表切胶测序条带)。I 为块根始见期; II 为块根迅速膨大期; III 为采收期。
Note: A is the original diagram; B is the processing diagram of QuantityOne-1-D software (the red line represents the sequencing bands). I, II and III refer to the initial growth stage, rapid growth stage and mature stage of root tuber, respectively.

表 3 DGGE 条带序列比对结果

Table 3 Sequence alignment results of DGGE bands

菌株编号 Strain No.	菌株名称 Strain	最匹配的参考菌株 Closest related species (Accession No.)	一致性 Identity (%)	登记号 Accession No.
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain Fussel (NR_036904. 1)	99	MG016528
2	<i>Pectobacterium betavasculorum</i>	<i>Pectobacterium betavasculorum</i> strain CFBP 2122 (NR_118292. 1)	99	MG016529
3	<i>Bacillus massiliogorillae</i>	<i>Bacillus massiliogorillae</i> strain G2 (NR_133029. 1)	99	MG016530
4	<i>Bordetella sputigena</i>	<i>Bordetella sputigena</i> strain R-39474 (NR_137343. 1)	99	MG016531
5	<i>Pseudomonas mendocina</i>	<i>Pseudomonas mendocina</i> strain ATCC 25411 (NR_114477. 1)	99	MG016532
6	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i>	<i>Stenotrophomonas tumulicola</i> strain T5916-2-1b (NR_148818. 1)	99	MG016533
7	<i>Porphyrobacter colymbi</i>	<i>Porphyrobacter colymbi</i> strain TPW-24 (NR114328. 1)	99	MG016534
8	<i>Bacillus pumilus</i>	<i>Bacillus pumilus</i> strain NBRC 12092 (NR_112637. 1)	99	MG016535
9	<i>Serratia nematodiphila</i>	<i>Serratia nematodiphila</i> strain DZ0503SBS1 (NR_044385. 1)	99	MG016536
10	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> strain NBRC 100910 (NR_113956. 1)	99	MG016537
11	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> strain LMG 3645 (NR_025467. 1)	99	MG016538
12	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i> strain NBRC 102204 (NR_114043. 1)	100	MG016539
13	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i>	<i>Pseudoxanthomonas japonensis</i> strain NBRC 101033 (NR113972. 1)	99	MG016540
14	<i>Enterobacter tabaci</i>	<i>Enterobacter tabaci</i> strain YIM Hb-3 (NR_146667. 1)	99	MG016541

续表 3 (Continued Tab. 3)

菌株编号 Strain No.	菌株名称 Strain	最匹配的参考菌株 Closest related species (Accession No.)	一致性 Identity (%)	登记号 Accession No.
15	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i>	<i>Pseudoxanthomonas mexicana</i> strain NBRC 101034 (NR_113973.1)	99	MG016542
16	<i>Methylobacterium trifolii</i>	<i>Methylobacterium trifolii</i> strain TA73 (NR_108524.1)	99	MG016543
17	<i>Bacillus toyonensis</i>	<i>Bacillus toyonensis</i> strain BCT-7112 (NR_121761.1)	99	MG016544
18	<i>Azotobacter chroococcum</i>	<i>Azotobacter chroococcum</i> strain LMG 8756 (NR_116305.1)	99	MG016545
19	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i>	<i>Staphylococcus saccharolyticus</i> strain JCM 1768 (NR_113405.1)	99	MG016546
20	<i>Microbacterium testaceum</i>	<i>Microbacterium testaceum</i> strain DSM 20166 (NR_026163.1)	99	MG016547
21	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i> strain DSM 20419 (NR_029264.1)	99	MG016548

注:菌株编号与图 2 编号一致。

Note: The number of strain is consistent with that of Fig. 2.

表 4 菌株发酵液提取物甾体皂苷颜色反应结果

Table 4 Results of color reaction of total saponin in fermentation from endophytic bacteria

菌株编号 Strain No.	Liebermann 反应结果 Liebermann reaction result	Liebermann-Burchard 反应结果 Liebermann-Burchard reaction result	三氯乙酸 反应结果 Trichloroacetic acid reaction result	氯仿-浓硫酸 反应结果 Chloroform sulfuric acid reaction result
EBPDAK002	+	+	+	+
EBNDX002	+	+	+	+
EBNDX003	+	+	+	+

注: + 表示反应为阳性结果,显示含有甾体皂苷。

Note: + indicates that the reaction is positive and contains steroidal saponins.

2.3.2 TLC 筛选结果

分别取上述 3 株内生细菌发酵液总皂苷提取物和囊麦冬总皂苷提取物的甲醇溶液,进行薄层层析分析。在展开剂的作用下,囊麦冬总皂苷最终跑出 7 个条带(目前,已从囊麦冬中分离出 14 种甾体皂苷分子^[3],这表明本实验中囊麦冬甾体皂苷的提取条件以及 TLC 展开条件均有待继续优化),菌株 EBPDAK002、EBNDX002、EBNDX003 分别跑出 3、2、6 个条带,TLC 图谱表明(见图 3),3 个样品与囊麦冬总皂苷提取物均有相对应的条带,对应的迁移率 R_f 值也大致相同(见表 5):与囊麦冬总皂苷提取物 TLC 条带相比,EBPDAK002 有 4 个条带的迁移距离与其相近,EBNDX002、EBNDX003 则各有 1 个条带相近。以上结果进一步证明了 3 株内生细菌具有产甾体皂苷特征。

2.3.3 HPLC 筛选结果

以提取的囊麦冬块根总甾体皂苷为阳性对照,对上述 3 株内生菌发酵液总皂苷提取物进行 HPLC 梯度检测,结果进一步证明上述 3 种内生细菌具有自主代谢产生甾体皂苷的能力。由图 4A 可知,墨西哥假黄单胞菌的发酵液总皂苷,其样品过柱子以后,分别在 3.15、15.98、54.85、57.64、75.19 min 等

时间点出现了与阳性对照对应的特征峰,表明该菌株能产生的甾体皂苷至少有 5 种与寄主植物的一样。由图 4B 可知,来自山羊葡萄球菌的样品,在 4.42、15.98、20.73、57.64、75.19 min 时间点也出现了 5 个特征峰与阳性对照一致;图 4C 则显示了砖红色微杆菌提取物样品在三个时间点即 15.98、57.64、75.19 min 出现了三个与阳性对照对应的特征峰。有趣的是,2 种内生菌株均在 15.98、57.64、75.19 min 时间点出现了特征峰,这表明在它们代谢产生的甾体皂苷中,至少有 3 种是相同的种类。

3 讨论与结论

利用传统微生物纯培方法,本研究从不同生育期囊麦冬块根和须根中分离获得 15 属 22 种的内生细菌,其中芽孢杆菌属、葡萄球菌属各有 4 种菌,假单胞菌属有 2 种菌,其余的 12 个属,包括沙门氏菌属 *Salmonella*、肠杆菌属 *Enterobacter*、假黄单胞菌属 *Pseudoxanthomonas*、摩根菌属 *Morganella*、农杆菌属 *Agrobacterium*、微杆菌属 *Microbacterium*、产吡啶杆菌属 *Porphyrobacter*、不动杆菌属 *Acinetobacter*、赖氨酸芽孢杆菌属 *Lysinibacillus*、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、鞘氨醇杆菌属 *Sphingobacterium*、短小杆菌属 *Curtobacterium*,均只有 1 种菌。

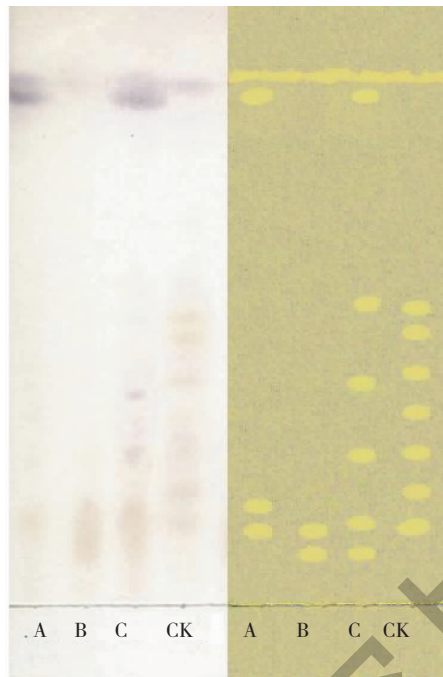


图3 内生细菌发酵液总皂苷提取物 TLC 图谱

Fig. 3 TLC result of total saponins extracts of endophytic bacteria fermentation

注:A 是 EBPDAK002 菌株;B 是 EBNDX002 菌株;C 是 EBNDX003 菌株;CK 是囊麦冬。Note:A is EBPDAK002 strain;B is EBNDX002 strain;C is EBNDX003 strain;CK is *L. spicata* var. *prolifera*.

表5 内生细菌发酵液总皂苷提取物 TLC 结果

Table 5 TLC result of total saponins extracts of endophytic bacteria fermentation

样品编号 Sample No.	R_f1	R_f2	R_f3	R_f4	R_f5	R_f6	R_f7
囊麦冬总皂苷提取物 Total saponins extracts of <i>L. spicata</i> var. <i>prolifera</i>	0.118	0.182	0.243	0.305	0.376	0.437	0.473
EBPDAK002	0.080	0.125	0.236	0.355	0.485	0.991	-
EBNDX002	0.080	0.118	-	-	-	-	-
EBNDX003	0.118	0.161	-	-	-	-	-

注:“-”表示菌株发酵提取物与囊麦冬总皂苷提取物比较无对应条带的的数据。

Note:The“-” indicates that there is no corresponding band data for the strain fermentation extract compared with total saponins extracts of *L. spicata* var. *prolifera*.

通过 16S rDNA-PCR-DGGE 鉴定,本研究发现在囊麦冬的块根始见期、迅速膨大期、成熟采收期,其内生细菌群落结构基本相同,菌株类群差异很小。通过序列比对,从分离序列中鉴定出 15 属 21 种的细菌类群,其中芽孢杆菌属 *Bacillus*、葡萄球菌属 *Staphylococcus* 各有 3 种细菌,沙雷氏菌属 *Serratia*、假单胞菌属 *Pseudomonas* 各有 2 种,其余的 11 个属,包括假单胞属 *Pseudomonas*、果胶杆菌属 *Pectobacterium*、鲍特氏菌属 *Bordetella*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、产吡啶杆菌属 *Porphyrobacter*、短小

杆菌属 *Curtobacterium*、肠杆菌属 *Enterobacter*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、固氮菌属 *Azotobacter*、微杆菌属 *Microbacterium*、假棍状杆菌属 *Pseudoclavibacter*,均只有 1 种菌株。相比上述 22 株可纯培内生细菌,DGGE 又新鉴定出 7 个属:沙雷氏菌属 *Serratia*、果胶杆菌属 *Pectobacterium*、鲍特氏菌属 *Bordetella*、寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、固氮菌属 *Azotobacter*、假棍状杆菌属 *Pseudoclavibacter*。

本研究对可纯培内生菌株的产皂苷能力进行了

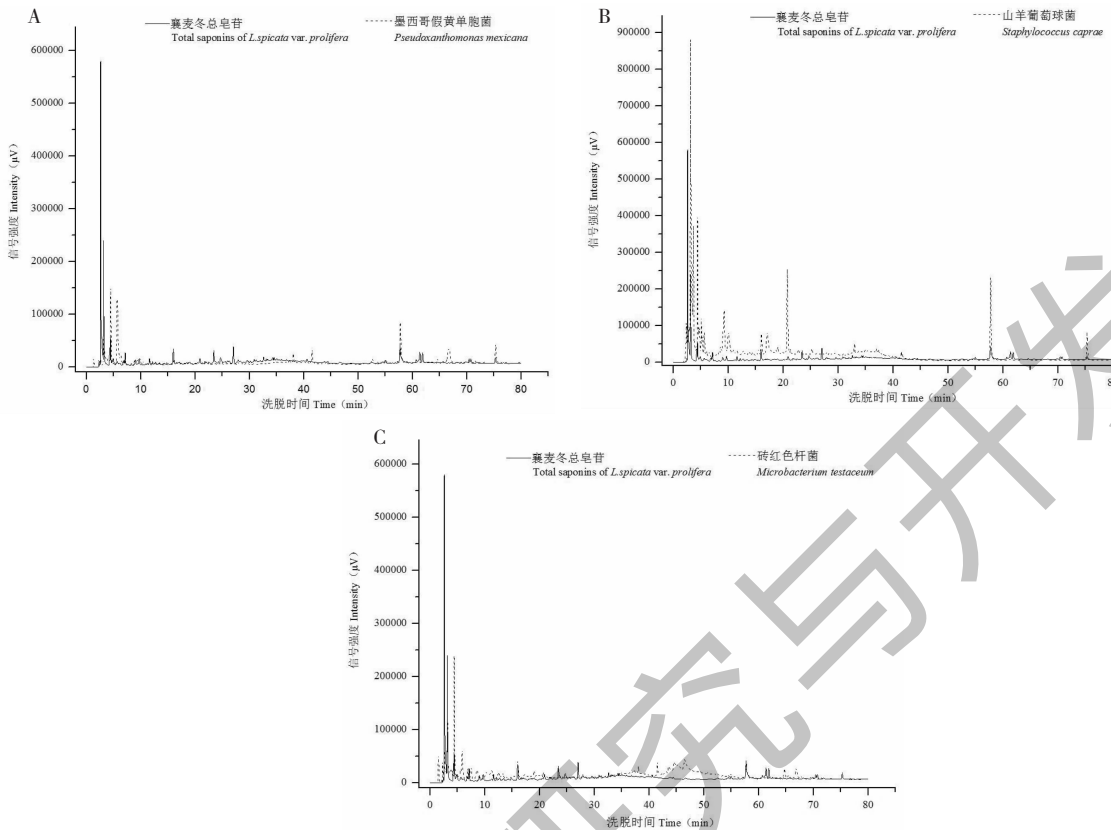


图4 内生细菌发酵产物总皂苷提取物的 HPLC 色谱图

Fig. 4 HPLC chromatograms of total saponins extracts of endophytic bacteria fermentation

评估,初步鉴定墨西哥假黄单胞菌 *Pseudoxanthomonas mexicana*、山羊葡萄球菌 *Staphylococcus caprae*、砖红色微杆菌 *Microbacterium testaceum* 3 株细菌具有明显产甾体皂苷特征。根据 HPLC 检测结果,这三株内生细菌均在 15.98、57.64、75.19min 时间点出现了特征峰,表明它们的发酵物中至少可能有 3 种皂苷是相同结构,这有待后续实验进一步证明。目前,对甾体皂苷类化合物的检测有两种主要策略:一种是直接检测,另一种是通过裂解的皂苷元进行定性、定量分析来间接检测。有学者采用 HPLC 法先后对穿山龙^[18]、箭根薯^[19]、剑麻^[20]、百合珠芽^[21]中的薯蓣皂苷元进行了测定。本实验由于未获得囊麦冬甾体皂苷标准品和分离的纯品,暂用制备的囊麦冬块根甾体皂苷(混合物)作为阳性对照,通过比对相同检测条件下能否出现相同时间点特征峰的方式,初步鉴定了内生细菌的产苷特性,后续本实验室将进一步对发酵产物皂苷提取物进行分离纯化,采用质谱、核磁共振等手段进行更精确地表征。

根据 16S rDNA V6 ~ V8 高变区 DGGE 分析结

果,并结合可产甾体皂苷的可纯培内生细菌的筛选结果,本实验发现一个现象:在囊麦冬块根迅速膨大期和成熟采收期,均能从其块根中检测到墨西哥假黄单胞菌 *P. mexicana* 的存在,而始见期块根中却未能检测出。已经证实囊麦冬块根的生物量以及甾体皂苷的含量是从始见期开始逐步升高,会在迅速膨大期和成熟期采收达到顶点^[22,23]。这种现象是不是意味着,墨西哥假黄单胞菌在囊麦冬块根甾体皂苷的累积中发挥着正相关的作用? 这同样有待后续实验进一步证明。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol I (中华人民共和国药典: 第一部) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2010: 349-356.
- 2 Yu BY, Hirai Y, Shoji J, et al. Comparative studies on the constituents of Ophiopogonis Tuber and its congeners. VI. Studies on the constituents of the subterranean part of *Liriope spicata* var. *prolifera* and *L. muscari* [J]. Chem Pharm Bull, 1990, 38: 931-935.

- 3 Yu BY, Qiu SX, Zaw K, et al. Steroidal glycosides from the subterranean parts of *Liriope spicata* var. *prolifera* [J]. Phytochemistry, 1996, 43:201-206.
- 4 Liu W, Wang ZL, Liang HQ. Studies on the chemical constituents of *Liriope spicata* (Thunb.) Lour var. *prolifera* Y. T. MA. [J]. Acta Pharm Sin, 1989, 24:749-754.
- 5 Yu BY, Xu GJ Studies on resource utilization of Chinese drug Dwarf Lilyturf [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 1995, 26:205-210.
- 6 Liu X, Yu JL, Liu M, et al. Research progress of bioactivity of steroidal saponins in recent ten years [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2015, 40:2518-2523.
- 7 Hao LZ. Study on chemical constituents of steroidal saponins from *Ophiopogon japonicus* [D]. Yanbian: Yanbian University (延边大学), 2007.
- 8 Haralampidis K, Trojanowska M, Osbourn AE. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants [J]. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2002, 75:31-49.
- 9 Yu HZ, Ye GD, Pan WL, et al. An endophytic *Aspergillus fungus* of *Liriope spicata* var. *prolifera* and its application in the preparation of steroidal saponins (一种囊麦冬内生曲霉属真菌及在制备甾体皂苷中的应用): CN201710970731. 2 [P]. 2019-12-27.
- 10 Zhao M, He SR, Chen XJ, et al. Screening and identification of steroidal saponins-producing endophytes from *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2005, 45:776-779.
- 11 Zhang XJ, Zha LS, Chen XJ, et al. Isolation and identification of an endophyte of *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2006, 33(5):84-88.
- 12 Ren Z. The research of steroidal saponins-producing endophytes from *Paris polyphylla* var. *chinensis* Franch [D]. Chengdu: Sichuan Normal University (四川师范大学), 2007.
- 13 Yang LL. The bacterial diversity of *Paris polyphylla* var. *yunnanensis* from rhizome and phylogenomics of *Rhizobium* [D]. Kunming: Yunnan University (云南大学), 2016.
- 14 Ercolini D. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food [J]. J Microbiol Methods, 2004, 56:297-314.
- 15 Li Yanfang. Isolation of facultative anaerobic entophytic bacterial with Ca Las infected *Citrus* tissues and determination of dominant bacterial populations [D]. Chongqing: Chongqing University (重庆大学), 2011.
- 16 Li YF, Yin YP, Wang YX, et al. Isolation of facultative anaerobic entophytic bacterial companioned Ca Las infected citrus tissues and evaluation of dominant bacterial populations [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2011, 38:1362-1370.
- 17 Araújo WL, Marcon J, Maccheroni W, et al. Diversity of endophytic bacterial populations and their interaction with *Xylorella fastidiosa* in citrus plants [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68:4906-4914.
- 18 Du QP, Tian JG, Wei XR. RP-HPLC determination of diosgenin in *Dioscorea nipponica* Makino [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志), 2006, 26(1):14-16.
- 19 Wang ZJ, Zhang W, Peng X, et al. HPLC determination of diosgenin in *Tacca chantrieri* [J]. Chin J Ethnomed Ethnopharm (中国民族民间医药), 2019, 28(5):27-30.
- 20 Li HF, Ling WM, Lu R, et al. Determination of diosgenin in sisal by high performance liquid chromatography [J]. Appl Chem Ind (应用化工), 2018, 47:1541-1544.
- 21 Yuan ZY, Luo LM, Chen NH, et al. Rapid analysis of chemical constituents of Lily bulbil by UPLC-Q-TOF-MS and the antitumor activity of diosgenin [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2019, 31:808-813.
- 22 Wu T, Yu BY, Cheng ZH, et al. Quantitative determination of the main saponin content in Hubei liriopae (*Liriope spicata* var. *prolifera*) by HPLC-ELSD [J]. Chin Tradit Herb drugs (中草药), 2000, 31:175-177.
- 23 Qu HJ. Study on standardized planting technology of *Liriope spicata* var. *prolifera* [D]. Yaan: Sichuan Agricultural University (四川农业大学), 2006.