

doi:10.3969/j.issn.2095-6002.2015.01.006

文章编号:2095-6002(2015)01-0032-06

引用格式:白飞荣,刘洋,曹艳花,等.西沙野生诺尼叶片内生菌的分离与初步鉴定[J].食品科学技术学报,2015,33(1):32-37.



BAI Feirong, LIU Yang, CAO Yanhua, et al. Isolation and identification of endophytes in wild Noni leaves from Paracel islands[J]. Journal of Food Science and Technology, 2015,33(1):32-37.

西沙野生诺尼叶片内生菌的分离与初步鉴定

白飞荣¹, 刘洋^{1,*}, 曹艳花¹, 姚粟¹, 李金霞¹, 谭望桥², 程池^{1,*}

(1. 中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心, 北京 100015;

2. 海南诺尼生物工程开发有限公司, 海南海口 570125)

摘要: 主要研究西沙群岛野生诺尼叶片中可培养内生菌的多样性。利用常规平板分离方法进行菌株分离。通过测定真菌核糖体基因翻译间隔序列(ITS序列)和细菌16S rDNA基因序列,结合系统发育研究对所分离菌株进行鉴定分析。共分离到32株内生菌,分为19种。其中2种霉菌,共2株,分别属于炭层菌属(*Nemania* sp.)和毛壳菌属(*Chaetomium* sp.);细菌17种,共30株,分别属于芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus* sp.)、微球菌属(*Micrococcus* sp.)、土地芽孢杆菌属(*Terribacillus* sp.)、肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)、黄单胞菌属(*Xanthomonas* sp.)、黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)等7个已知属,其中芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)为绝对优势属,共20株,11种。

关键词: 西沙野生诺尼叶片;内生细菌;群落多样性**中图分类号:** TS201.3**文献标志码:** A

诺尼(*Morinda citrifolia* Linn.)又称为海巴戟天、海滨木巴戟、诺尼、水冬瓜,被子植物门(Angiospermae)木兰纲(Magnoliopsida)茜草目(Rubiales)茜草科(Rubiaceae)巴戟天属(*Morinda*)植物,是一种热带常绿多年生阔叶灌木或小乔木^[1],主要分布在南太平洋热带诸岛,菲律宾,澳大利亚,柬埔寨以及我国海南岛,我国西沙群岛和我国台湾岛^[2]。早在2000多年前,波利尼亚人就利用诺尼叶片来治疗各种疾病,以及为服装染色^[3]。近年来,国内外科学研究主要针对诺尼的生理生化方面,已证明诺尼中含有茛菪亭、钾、维生素C、萜类化合物、生物碱、蒽醌、甲基醚、谷甾醇、胡萝卜素、维生素A、黄酮、亚油酸、茜素、氨基酸等多种化学成分^[4-5]。通过免疫机理的研究,证实了诺尼具有各种医疗保健作用,包括抗肿瘤、抗氧化、抗菌消炎、抗焦虑、抗皱、护肝、改

善糖尿病、改善痛风等功效^[6-11]。2002年欧洲食品科学委员会(Scientific Committee on Food, SCF)对诺尼进行了食品安全性鉴定,认为其是安全的。诺尼作为一种国际上比较流行的多功能保健产品,其产品具有广阔的市场前景,值得深入研究。

诺尼叶片呈深绿色,有光泽,膜质,对生,椭圆形或广椭圆形,长10~25 cm,宽5~10 cm,顶端急尖或短渐尖,基部阔楔形;侧脉每边6~7条,在叶片腹面微凸起,背面凸起明显,脉腋内常有短束毛;叶柄长5~12 mm;托叶大,膜质,长5~12 mm,顶端钝^[12]。诺尼新鲜叶子可直接咀嚼或包裹,或者加水熬汁饮用或浸泡,也可晒干磨成粉末。在巴西称诺尼叶为“止痛草”,其对牙龈炎、牙周病、喉痛、喉炎、感冒、头痛、发烧、风湿性关节炎、痛风、骨折、扭伤、皮肤病等均有一定的功效^[13]。

收稿日期:2014-02-28

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31300008);国家微生物资源平台专项(NIMR2014-4);中国食品发酵工业研究院科技发展基金(博士基金)项目(2012KJFZ-BS-01);北京市科技新星计划项目(Z141105001814095)。

作者简介:白飞荣,男,助理工程师,硕士,主要从事微生物分类学研究;

*程池,男,教授级高级工程师,主要从事微生物学方面的研究。通信作者。

*刘洋,男,工程师,博士,主要从事微生物生态学方面的研究。通信作者。

内生菌(*endophytes*)是一类可以和植物互利共生的微生物,经研究证明它们可以增加植物的生长发育和抗逆能力,也可通过产生一些代谢产物,而提高植物的药用性能^[14]。本文主要研究诺尼叶片中可培养内生菌的多样性,将为诺尼叶片中功能性微生物的开发利用奠定良好的基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

实验样品为野生诺尼的新鲜叶片(见图1),采集自中国海南省三沙市永兴岛(北纬16.83°,东经112.34°),共计645 g。样品存放无菌自封袋中,4℃保存。



图1 野生诺尼叶片样品

Fig. 1 Wild Noni leaves samples

1.2 培养基

玫瑰红钠和PDA培养基用于真菌的分离纯化,R2A和LB培养基用于细菌的分离纯化,均购于北京陆桥公司。

1.3 内生菌的分离培养和保存

采用稀释平板涂布法分离培养诺尼叶片中的内生菌。取不同枝条上的健康叶片,称取10 g进行表面灭菌,先用无菌水冲洗2次,滤纸吸干水分后,用体积分数为75%的酒精浸泡30 s,再用质量分数为0.1%的氯化汞溶液浸泡3 min,最后用无菌水冲洗3次。用无菌剪刀剪碎叶片,于无菌研钵中加入少量灭菌的石英砂和碳酸钙及少量无菌水充分研磨,然后依次用无菌水稀释成质量分数为 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 的组织悬液。

分别取100 μ L悬液涂布于玫瑰红钠平板(平板含有25 mg/mL氯霉素和25 mg/mL四环素)和R2A平板上,每个处理3个平行。玫瑰红钠平板置于25℃培养箱培养,从第2 d开始对平板上的单菌落进行分离计数,共7 d,根据菌落形态(包括大小、形状、颜色、质地、有无渗透液,有无可溶性色素等),对可培养真菌进行初步筛选,并利用PDA培养基平板纯化菌株;R2A平

板置于28℃培养箱培养,从第一天开始对平板上的细菌单菌落进行分离计数,共4 d,根据菌落形态(包括大小、形状、颜色、表面光泽度、边缘整齐度、透明度和质地等)进行初步筛选,利用LB培养基平板划线纯化菌株。纯化好的菌株,利用试管保藏备份,并提交给中国工业微生物菌种保藏中心(CICC)保藏。

1.4 内生菌的DNA提取与鉴定

1.4.1 内生真菌的DNA提取与扩增

采用传统CTAB抽提方法,提取内生真菌基因组DNA,采用通用引物:ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')和ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')扩增ITS基因序列^[15]。PCR反应体系为:模板10 $\times$ PCR buffer 5 μ L、dNTP(2.5 mmol/L)4 μ L、模板2 μ L、Taq DNA聚合酶1 μ L、引物各1 μ L,补充去离子水至50 μ L。反应条件:94℃ 5 min;94℃ 50 s,55℃ 50 s,72℃ 50 s,33个循环;72℃ 7 min。PCR产物用1%凝胶电泳进行检测,约为600 bp。

1.4.2 内生细菌的DNA提取与扩增

利用天根公司细菌基因组提取试剂盒,提取内生细菌基因组DNA,采用通用引物:27f(5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3')和1492r(5'-GGT-TACCT TGTACGACTT-3')扩增16S rDNA基因序列。PCR反应体系同真菌体系。反应条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 1.3 min,35个循环;72℃ 10 min。PCR产物用1%凝胶电泳进行检测,约为1 500 bp。

所有PCR产物都送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序,真菌序列与GenBank数据库中已知序列进行BLAST比对分析,细菌序列与EzBio-Cloud数据库比对,寻找具有较高同源性的目标序列。确定各菌株的有效序列后用ClustalX 1.83进行多序列比对,再用MEGA 5.0进行邻接法(Neighbor-Joining)聚类系统发育分析^[16]。1 000次(Bootstrap value)重复自检分析。各个种的代表序列均已提交到GenBank核酸序列数据库,并得到登录号KC708557~KC708575。

2 结果和分析

2.1 诺尼叶片中可培养内生菌的分离结果

通过分离纯化共得到诺尼叶片内生菌32株,利用测序分析和形态学观察方法,将其分为19种。其

中霉菌 2 株,分为 2 种;细菌 30 株,分为 17 种。菌 株形态描述见表 1。

表 1 诺尼叶片内生菌株的形态描述
Tab. 1 Morphological description of endophytes from Noni leaves samples

代表菌株	宏观形态描述
Y1	菌落黄褐色,圆形,表面光滑、湿润、凸起,不透明,边缘整齐
Y3	菌落黄色,圆形,表面光滑、湿润、凸起,不透明,边缘整齐
Y4	菌落黄色,圆形,表面光滑、湿润、凸起,不透明,边缘整齐
Y7	菌落浅粉色,圆形,表面光滑、湿润、凸起,半透明,边缘整齐
Y8	菌落土黄色,圆形,表面凸起,不透明
Y9	菌落乳白色,圆形,表面凸起,不透明
Y10	菌落白色,圆形,表面光滑、湿润、凸起,不透明,边缘整齐
Y11	菌落白色,圆形,中间凹陷,不透明,边缘锯齿状
Y12	菌落白色,圆形,表面凸起,不透明,边缘整齐
Y13	菌落灰白色,圆形,表面光滑、湿润、凸起,不透明,边缘整齐
Y16	菌落圆形,表面光滑、湿润、凸起,不透明
Y18	菌落圆形,表面光滑、湿润、半透明
Y19	菌落白色,圆形,表面光滑、湿润、凸起,不透明
Y21	菌落圆形,表面光滑、湿润、凸起,边缘整齐
Y20	菌落圆形,表面光滑、湿润、凸起,半透明,边缘整齐
Y25	菌落黄色,圆形,表面光滑、湿润、凸起,不透明,边缘整齐
Y27	菌落黄绿色,圆形,表面光滑、湿润、凸起,不透明,边缘整齐
NY1	菌落 PDA 平板培养 14 d,直径 40 mm;厚度适中;表面平坦;丝绒状;正面棕褐色,反面红棕色;无渗出液,有少量可溶性色素
NY2	菌落 PDA 平板培养 14 d,长满全皿;厚度适中;表面有放射性皱纹;丝绒状;正面中央棕色,外围淡黄色;反面中央黑褐色;无渗出液,无可溶性色素

2.2 诺尼叶片中可培养内生菌的多样性分析

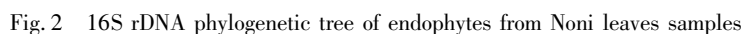
真菌分离结果中未得到酵母菌株,只分离到 2 种霉菌,各一株 (NY1, NY2), 分属于炭层菌属 (*Nemania* sp.) 和毛壳菌属 (*Chaetomium* sp.), 见

表 2。共分离到 30 株细菌,通过构建系统发育树分为 4 支 (见图 2), 隶属于 4 个门, 7 个属。其中厚壁菌门 (*Firmicutes*) 包括 3 个属, 分别为芽孢杆菌属

表 2 诺尼叶片中内生菌分离结果
Tab. 2 Isolation results of endophytes from Noni leaves samples

类群	属	代表菌株	GenBank 号	株数	最相近菌株 (登录号)	同源性 / %
细菌	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i> sp.	Y1	KC708557	6	<i>B. flexus</i> (AB021185)	99. 9
		Y8	KC708561	1	<i>B. aerophilus</i> (AJ831844)	100. 0
		Y9	KC708562	1	<i>B. aryabhatai</i> (EF114313)	99. 8
		Y10	KC708563	2	<i>B. methylophilus</i> (EU194897)	100. 0
		Y11	KC708564	1	<i>Bacillus manliponensis</i> (FJ416490)	98. 3
		Y12	KC708565	3	<i>B. cereus</i> (AE016877)	99. 9
		Y13	KC708566	1	<i>B. endophyticus</i> (AF295302)	99. 5
		Y16	KC708567	2	<i>B. licheniformis</i> (AE017333)	99. 0
		Y19	KC708569	1	<i>B. nealsonii</i> (EU656111)	99. 4
		Y21	KC708571	2	<i>B. vietnamensis</i> (AB099708)	98. 8

类群	属	代表菌株	GenBank 号	株数	最相近菌株 (登录号)	同源性/%
真菌	赖氨酸芽孢杆菌属 <i>Lysinibacillus</i> sp.	Y7	KC708560	3	<i>L. xylanilyticus</i> (FJ477040)	97.3
		Y20	KC708570	1	<i>L. macroides</i> (AJ628749)	99.4
	微球菌属 <i>Micrococcus</i> sp.	Y25	KC708572	2	<i>M. yunnanensis</i> (FJ214355)	99.8
	土地芽孢杆菌属 <i>Terribacillus</i> sp.	Y18	KC708568	1	<i>T. goriensis</i> (DQ519571)	100.0
	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i> sp.	Y3	KC708558	1	<i>E. cowanii</i> (AJ508303)	99.6
	黄单胞菌属 <i>Xanthomonas</i> sp.	Y4	KC708559	1	<i>X. campestris</i> (AE008922)	100.0
	黄杆菌属 <i>Flavobacterium</i> sp.	Y27	KC708573	1	<i>F. oceanosedimentum</i> (EF592577)	99.8
	毛壳菌属 <i>Chaetomium</i> sp.	NY1	KC708574	1	<i>C. globosum</i> (JN209909.1)	99.0
	炭层菌属 <i>Nemania</i> sp.	NY2	KC708575	1	<i>N. primolutea</i> (EF026121.1)	100.0



(*Bacillus* sp.), 赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus* sp.), 土地芽孢杆菌属 (*Terribacillus* sp.)。变形菌门 (Proteobacteria) 包括 2 个属, 为黄单胞菌属 (*Xanthomonas* sp.) 和肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.)。放线菌门 (Actinobacteria) 包括 1 个属, 为微球菌属 (*Micrococcus* sp.)。拟杆菌门 (Bacteroidetes) 包括 1 个属, 为黄杆菌属 (*Flavobacterium* sp.)。

由表 2 可知, 芽孢杆菌属为绝对优势属, 分离率达 66.7%, 丰富度为 55%; 赖氨酸芽孢杆菌属次之, 分离率为 13.3%。优势种^[17]有弯曲芽孢杆菌 (*Bacillus flexus*), 共 6 株, 分离率为 20%; 蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* 3 株, 分离率为 10%; 解木糖赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus xylanilyticus*) 3 株, 分离率为 10%。*Bacillus methylotrophicus* 和 *Lysinibacillus macroides* 均为近年来发表的新种, *Lysinibacillus macroides* 为中国新记录种^[18-19]。

3 讨 论

植物内生菌是指生活史中某一阶段生活在植物组织内, 对植物没有引起明显病害症状的一类微生物, 可从经过严格表面消毒的植物组织分离得到。其具有固氮、促植物生长、增强宿主植物抗逆境、抗病虫害等作用, 它们的代谢产物可能具有良好的药用价值, 并可能与植物的药用价值密切相关^[20]。

本文从野生诺尼叶片中共分离到可培养菌株 32 株, 分离数量较少, 原因可能如下 1) 本研究采用升汞表面灭菌的方法, 升汞较强的腐蚀性可能会杀死部分内生菌株; 2) 诺尼本身具有抑菌活性, 导致内生菌数量较少; 3) 在叶片和根等器官中内生菌含量原本就极少^[20]。本研究分离鉴定结果显示诺尼叶片中的优势微生物为杆状细菌, 其中芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.)、赖氨酸芽孢杆菌属 (*Lysinibacillus* spp.) 为优势属, 这与刘洋等诺尼种子内生细菌多样性研究结果相符^[21], 且许多其他植物内生细菌的研究结果也都表明芽孢杆菌或产芽孢细菌常为优势菌属^[22-24], 说明产芽孢细菌为一类非常重要的植物内生菌, 值得进一步开发研究。本文中的优势种弯曲芽孢杆菌 (*Bacillus flexus*) 为重要的工业产碱性淀粉酶菌株; 蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 可产生抗菌物质和细菌蛋白酶, 可能与植物抵御病害能力有关; 解木糖赖氨酸芽孢杆菌 (*Lysinibacillus xylanilyticus*) 为一种可降解木聚糖的菌株, 且在猪笼草、香樟、夏

枯草等药用植物内生细菌研究中均有分离。

内生菌作为一类重要的植物生存伴侣, 在植物生长发育中起着重要的作用, 往往容易被人们所忽视, 目前许多植物内生菌研究在持续进行, 得到了许多重要的发现。诺尼作为一种国际热销保健产品, 内生菌与其药理活性关系值得研究, 本文将为诺尼内生菌的研究开辟道路, 奠定基础。

致 谢

本研究得到了海南省三沙市政府的大力支持与帮助, 在此表示衷心地感谢!

参考文献:

- [1] 曹艳花, 刘洋, 姚粟, 等. 西沙野生诺尼内生细菌群落多样性初步研究 [J]. 食品科学技术学报, 2014, 32 (2): 39-45.
- [2] 广东省植物研究所. 海南植物志: 第 3 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1974: 330-331.
- [3] Palu A K, Kim A H, West B J, et al. The effects of *Morinda citrifolia* L. (Noni) on the immune system: its molecular mechanisms of action [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 12: 115(3): 502-506.
- [4] Wang M Y, West B, Jensen C J, et al. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research [J]. Acta Pharmacol Sin, 2002, 23(12): 1127-1141.
- [5] Yanine C, Fabrice V, Ana M P, et al. The Noni fruit: a review of agricultural research nutritional and therapeutic properties [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19: 645-654.
- [6] Akihisa T, Matsumoto K, Kimura Y, et al. Anti-inflammatory and potential cancer chemopreventive constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) [J]. J Nat Prod, 2007, 70(5): 754-758.
- [7] Mohd Z, Abdul-Hamid A, Osman A, et al. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf [J]. Food Chemistry, 2001, 78: 227-231.
- [8] Deng S, West B J, Palu A K, et al. Noni as an anxiolytic and sedative: a mechanism involving its gamma-aminobutyric acidergic effects [J]. Phytomedicine, 2007, 14(7-8): 517-522.
- [9] Kim S W, Jo B K, Jeong J H, et al. Induction of extracellular matrix synthesis in normal human fibroblasts by anthraquinone isolated from *Morinda citrifolia* (Noni) fruit [J]. J Med Food, 2005, 8(4): 552-555.
- [10] Wang M Y, Anderson G, Nowicki D, et al. Hepatic

- protection by Noni fruit juice against CCl_4 -induced chronic liver damage in female SD rats [J]. *Plant Foods Hum Nutr*, 2008, 63(3):141–145.
- [11] Owen P L, Martineau L C, Caves D, et al. Consumption of guava (*Psidium guajava* L) and Noni (*Morinda citrifolia* L) may protect betel quid-chewing papua new guineans against diabetes [J]. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2008; 17(4):635–643.
- [12] 李法营, 蓝增全, 李青红, 等. 诺丽研究进展(一) [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(32): 15819–15821.
- [13] 张伟敏, 魏静, 刘四新, 等. Noni 果的活性成分和生理功能的研究进展 [J]. *天然产物研究与开发*, 2007, 19: 1087–1091.
- [14] Van Wees S C, Pieterse C M J, Trijssenaar A, et al. Differential induction of systemic resistance in arabidopsis by biocontrol bacteria [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(6): 716–724.
- [15] Jin S L, Kwan S K, Hack S J. Phylogenetic analysis of *Xylaria* based on nuclear ribosomal ITS1-5.8S-ITS2 sequences [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 187: 89–93.
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor joining method, a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406–425.
- [17] 庞龙飞, 尤民生. 昆虫群落生态学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 77–103.
- [18] Madhaiyan M, Poonguzhali S, Kwon S W, et al. *Bacillus methylotrophicus* sp. nov., a methanolutilizing, plant-growth-promoting bacterium isolated from rice rhizosphere soil [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2010, 60(10): 2490–2495.
- [19] Coorevits A, Dinsdale A E, Heyrman J, et al. *Lysinibacillus macroides* sp. nov., nom. rev. [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2012, 62(5): 1121–1127.
- [20] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题 [J]. *生态学杂志*, 2004, 23 (2): 86–91.
- [21] 刘洋, 李辉, 程池, 等. 西沙野生诺尼种子内生细菌群落多样性的初步研究 [J]. *生物技术通报*, 2013 (10): 142–147.
- [22] 宋培勇, 兰琴英, 鲁卓越. 南方红豆杉内生细菌分离鉴定及系统发育分析 [J]. *生物技术*, 2012, 22(5): 61–65.
- [23] 宋培勇, 李凤华, 马莉莉. 南方红豆杉内生细菌分离鉴定及系统发育分析 [J]. *微生物学通报*, 2011, 38 (1): 8–13.
- [24] 游玲, 魏琴, 张云等. 山苍子 (*Litsea cubeba*) 可培养内生细菌的多样性 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2012, 40(4): 1–7.

Isolation and Identification of Endophytes in Wild Noni Leaves from Paracel Islands

BAI Feirong¹, LIU Yang^{1,*}, CAO Yanhua¹, YAO Su¹, LI Jinxia¹
TAN Wangqiao², CHENG Chi^{1,*}

(1. China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, China Center of Industrial Culture Collection, Beijing 100015, China;
2. Hainan Noni Biological Engineering Development Co. Ltd., Haikou 570125, China)

Abstract: The diversity of culturable endophytes in wild Noni leaves from Paracel Islands was discussed in this study. Strains were isolated by using conventional tablet separation methods. The isolates were identified by the fungal internal transcribed spacer 1 and 2 (ITS gene) amplification and the bacterial 16S rDNA amplification, combined with phylogenetic analysis. Total 32 endophytes were isolated and identified as 19 types. Two types of mold were *Chaetomium* sp. and *Nemania* sp. Seventeen types of bacteria (30 strains) belonged to 7 genera *Bacillus* sp., which were *Lysinibacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Terribacillus* sp., *Enterobacter* sp., *Xanthomonas* sp., *Flavobacterium* sp., and *Bacillus* sp.. *Bacillus* sp. was the dominant genus among the endophytic bacte, which had 20 strains divided into 11 types.

Key words: Noni leaves from Paracel islands; endophytic bacteria; community diversity

(责任编辑:李 宁)