

秦岭地区羊肚菌根系土样黏细菌的分离

王 军^{1,2}, 高 磊^{1,2}, 张 琨^{1,2}, 万 一^{1,2*}

(1. 陕西省微生物研究所 分子生物学研究中心, 陕西 西安 710043; 2. 陕西省科学院 秦岭天然产物工程中心, 陕西 西安 710043)

摘 要 通过分离陕西秦岭地区羊肚菌根系土样中的黏细菌, 建立黏细菌的分离方法, 分析羊肚菌根系土样中黏细菌的多样性。采集自陕西商洛地区种植羊肚菌根系土样, 采用不同诱导方法分离土样中的黏细菌, 比较不同方法的出菌率, 通过菌落形态、显微照片对黏细菌进行观察, 并结合 16S rRNA 序列, 分析得到的黏细菌种类。采用活的大肠埃希菌作为诱导底物分离出的黏细菌数量最多, 本次实验从羊肚菌根系土样中共分离纯化出 17 株黏细菌, 包括 5 个属, 其中黏球菌属 (*Myxococcus*) 12 株, 珊瑚球菌属 (*Coralloccoccus*) 2 株, 孢囊杆菌属 (*Cystobacter*) 1 株, 原囊菌属 (*Archangium*) 1 株, 标桩菌属 (*Stigmatella*) 1 株。结果显示羊肚菌根系土壤有黏细菌存在, 其中以黏球菌属居多, 为后续探讨黏细菌与羊肚菌之间是否存在互生关系提供参考。

关键词 羊肚菌; 黏细菌; 秦岭地区; 分离纯化

中图分类号 Q939.93

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2019)05-0081-06

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2019.05.012

Isolation of Myxobacteria in Rhizosphere Soil of *Morchella* in Mt. Qinling Area

WANG Jun^{1,2}, GAO Lei^{1,2}, ZHANG Kun^{1,2}, WAN Yi^{1,2}

(1. Mol. Biology Res. Ctr., Shaanxi Inst. of Microbiol., Xi'an, Shaanxi 710043;

2. Engin. Ctr. of Mt. Qinling Nat. Products, Shaanxi Acad. of Sci., Xi'an, Shaanxi 710043)

Abstract The diversity of myxobacteria in the rhizosphere soil of *Morchella* by isolating them from soil samples of *Morchella* in Mt. Qinling area in Shaanxi Province, and a method for isolating myxobacteria was established. Myxobacteria were isolated from the rhizosphere soil of *Morchella* planted in Shangluo, Shaanxi Province by different induction methods. The bactericidal rates of different methods were compared and the myxobacteria were observed and analyzed by colony morphology, microscopic photographs, and the 16S rRNA sequence. The number of myxobacteria induced by living *E. coli* was the highest. A total of 17 strains of myxobacteria were isolated and purified, and identified into 5 genera, *Myxococcus* (12), *Coralloccoccus* (2), *Cystobacter* (1), *Archangium* (1), and *Stigmatella* (1). The results showed that myxobacteria exist in the rhizosphere soil of *Morchella*, and the genera of *Myxococcus* were in the majority, that might relate to the particularity of the rhizosphere soil of *Morchella*. This study provided an important scientific base for further study of the relationship between myxobacteria and *Morchella*.

Keywords *Morchella*; Myxobacteria; Mt. Qinling area; isolation

黏细菌 (Myxobacteria) 是一类革兰阴性杆菌, 能够滑行运动, 生命周期内可以形成多细胞子实体。黏细菌具有许多明显的社会属性, 它们以社

会性的方式移动和捕食, 这些过程需要特定的细胞间信号, 展现出其复杂的生物间通讯水平。目前黏细菌有 23 个属, 约 60 个种^[1-2]。近三十年

基金项目: 陕西省科技厅重点研发计划项目 (2017NY-116); 陕西省科学院应用基础研究专项 (2015K-12)

作者简介: 王军 男, 硕士, 助理研究员。研究方向为微生物分离及代谢产物研究。Tel: 029-82357035, E-mail: wangjun198272@163.com

* 通讯作者。男, 博士, 研究员。研究方向为分子生物学及微生物学。Tel: 029-82357035, E-mail: wanyi6565@sina.com

收稿日期: 2019-02-06

来,黏细菌被认为是具有多种生物活性次生代谢产物的宝贵生产者,黏细菌代谢产物具有许多独特的结构特征,以及稀有或新颖的作用方式,使它们成为药物开发中具有吸引力的先导结构^[3-4]。近年来对于黏细菌的基因组测序和代谢谱分析表明,黏细菌次生代谢的多样性远远大于先前人们的预期^[5]。秦岭作为我国生物多样性的典型地区,真菌资源丰富。羊肚菌(*Morchella*)是一类大型食药两用真菌,具有很高的营养价值和药用价值,在陕西省秦岭地区广泛种植^[6]。羊肚菌生活史复杂,发生地环境多样。人工栽培时,播种后都需要覆盖往年发生过羊肚菌的土壤进行“覆土”操作,才能收获羊肚菌子实体^[7]。有研究表明,较为丰富的细菌群落结构有利于羊肚菌的发生,这提示了羊肚菌发生时需要某些微生物的刺激,或者需要土壤中某些特殊物质的作用,而这些特殊物质又与土壤中微生物活动有关。熊川等^[8]运用PCR-DGGE技术分析羊肚菌菌塘土壤细菌群落的结构与多样性,对采集于凉山州的野生羊肚菌的根系土样进行分析,结果显示羊肚菌根系土壤中存在 Myxococcaceae(黏球菌科),且占据一定的优势地位,但该类土样中黏细菌的分离纯化等工作尚未见报道。鉴于此,有必要分离羊肚菌根系土样中的可培养黏细菌并分析其种类,为分析黏细菌与羊肚菌的生长是否存在某种联系提供依据,本研究采用不同诱导方法对羊肚菌根系土壤中的黏细菌进行分离鉴定,以期发掘羊肚菌等大型真菌根系土壤中的黏细菌资源并建立适宜的分离方法,为特殊生境的黏细菌资源研究开发提供思路,为评价黏细菌在羊肚菌发生中的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土样 羊肚菌(*Morchella*)根系土样采自商洛市洛南县高耀镇前坪种植基地大棚,采集后立即风干,4℃保存备用。

1.1.2 菌种 大肠埃希菌(*E. coli*) CMCC 44102,由陕西省微生物研究所菌种资源中心提供。

1.1.3 培养基 WCX 培养基、ST21 Agar 培养基用于黏细菌的诱导,VY/2 培养基用于黏细菌的纯化,LB 培养基用于黏细菌的验纯,CAS 液体培养

基用于黏细菌的保存。

1.1.4 仪器和试剂 恒温培养箱(GH4500,天津泰斯特仪器有限公司);宽视场体视显微镜(PXS,上海光学仪器五厂);全温摇瓶柜(HYG-A,常州市国旺仪器制造有限公司);PCR 扩增仪(Gene-Amp)。DNA marker、2×Taq PCR Master Mix、PCR 胶回收试剂盒、T 载体试剂盒均购自天根生化科技公司。

1.2 方法

1.2.1 黏细菌的分离纯化 ①土样的预处理 称取风干的土样 10 g,研细,加入 0.1 mg/mL 的放线菌酮溶液浸泡过夜,以抑制真菌生长,离心后去除水层。②将培养至对数生长期的活和死的大肠埃希菌分别涂布于 WCX 培养基上,将滤纸片和纤维素粉分别平铺在 ST21 Agar 培养基上,取豌豆大小土样分别放在诱导底物中央。30℃恒温培养,每天观察子实体的形成情况,连续观察一个月,以上述不同诱导底物对土样中的黏细菌进行诱导,比较出菌率^[9-10](图 1)。③分离的黏细菌纯化与保藏:当平皿上土样周围有黏细菌子实体形成时,在体视镜下挑取子实体并转接至 VY/2 培养基上,30℃培养,待长出子实体或薄膜状细胞后,反复转接至无杂菌生长。将纯化好的黏细菌挑取至 LB 液体培养基中震荡培养过夜,若培养基仍然澄清则说明无杂菌。将在平皿上生长至纯净单一的黏细菌接入到 CAS 冻存液中,-80℃保存^[11]。

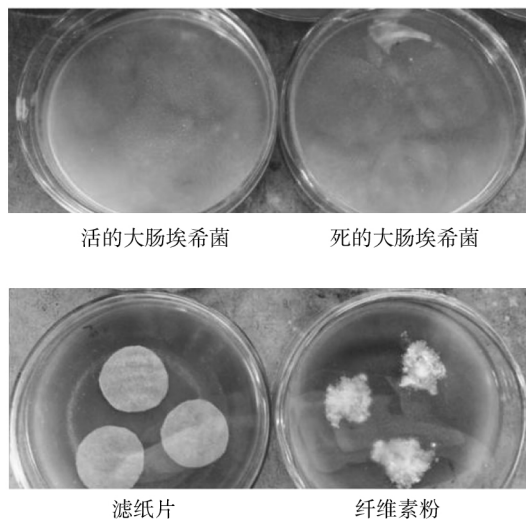


图 1 培养基诱导底物

Fig. 1 Induced substrate of the culture mediums

1.2.2 菌株的分类鉴定 ①形态学鉴定:依据《Bergey's Manual of Determinative Bacteriology》(9th edition)的黏细菌分类标准,对分离的黏细菌菌落形态、细胞颜色、黏孢子和子实体形态进行观察,将分离到的黏细菌归类到属^[12]。②分子生物学鉴定:采用 CTAB 法提取黏细菌总 DNA,用细菌通用引物 27F 和 1492R 对黏细菌菌株的总 DNA 进行 16S rRNA 扩增,PCR 产物进行测序,将所得序列结果在 NCBI 进行 BLAST 同源性比对,确定其归属^[13-14]。

2 结果与分析

2.1 羊肚菌根系土样黏细菌的分离纯化

对比不同诱导底物对黏细菌的诱导效果(见图 2),活的大肠埃希菌能够诱导出较多的黏细菌子实体,平均每个平皿可以诱导出 2~3 种黏细菌子实体,而死的大肠埃希菌诱导效果相对较差,这可能与黏细菌具有的主动捕食习性有关。滤纸片和纤维素粉对黏细菌子实体的诱导效果没有显著差异,但滤纸片上的子实体在滤纸片表层,易于挑取,而纤维素粉上的子实体则与纤维素粉混在一起,不易挑取。

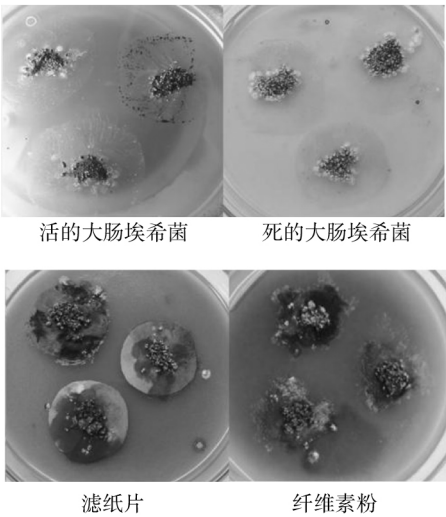


图 2 不同底物诱导黏细菌效果

Fig. 2 The photos of different substrate inducing effects

不同底物诱导的出菌率见表 1,以活的大肠埃希菌和滤纸片作为底物的培养基均能诱导出较多的黏细菌,其中活的大肠埃希菌的诱导效率最高。

表 1 不同诱导底物的出菌率

Table 1 The Bacteria rates of different inducible substrates

培养基底物	样品数	出菌板数	出菌率/%	诱导出菌株数
活的大肠埃希菌	6	6	100	13
死的大肠埃希菌	6	2	33	2
滤纸片	6	6	100	8
纤维素粉	6	5	83	5

本研究采用不同的大肠埃希菌诱导法和滤纸片诱导法,从 6 个羊肚菌根系土样中共诱导出 28 个黏细菌子实体,诱导出的部分子实体见图 3。

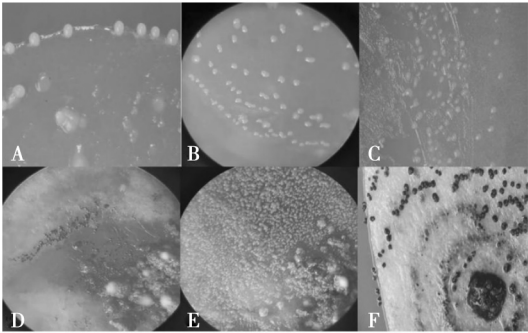


图 3 诱导的部分黏细菌子实体

Fig. 3 The photos of fruiting bodies of some myxobacteria

A: 黏球菌; B: 黏球菌; C: 珊瑚球菌; D: 标桩菌; E: 原囊菌; F: 孢囊杆菌
A: *Myxococcus*; B: *Myxococcus*; C: *Coralloccoccus*; D: *Stigmatella*; E: *Archangium*; F: *Cystobacter*

经过反复纯化,目前得到 17 株黏细菌,部分菌株在 VY/2 平皿上的照片见图 4。

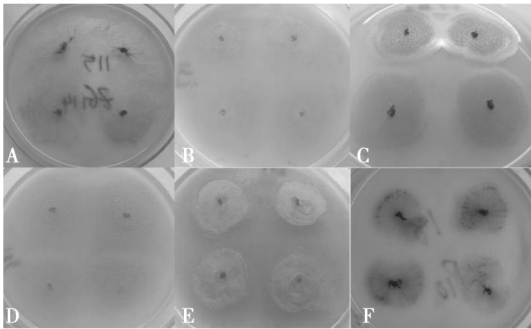


图 4 菌株

Fig. 4 The photos of the myxobacteria

A: 标桩菌; B: 黏球菌; C: 珊瑚球菌; D: 黏球菌; E: 原囊菌; F: 孢囊杆菌
A: *Stigmatella*; B: *Myxococcus*; C: *Coralloccoccus*; D: *Myxococcus*; E: *Archangium*; F: *Cystobacter*

成熟的黏细菌的黏孢子大多呈圆球形、椭圆形或不规则的团块状,直径在 1~2 μm 左右(图 5)。

2.2 羊肚菌根系土样中黏细菌的外观形态观察

根据子实体、菌落形态和颜色等特征,以及 16S rRNA 基因序列比对结果,将上述菌株初步分为 5 个属,包括黏球菌属 (*Myxococcus*) 12 株,珊瑚球菌属 (*Corallococcus*) 2 株,孢囊杆菌属 (*Cystobacter*) 1 株,原囊菌属 (*Archangium*) 1 株,标桩菌属 (*Stigmatella*) 1 株(表 2)。分离结果说明羊肚菌根系土样中黏细菌资源具有一定的多样性,但主要以黏球菌属 (*Myxococcus*) 为主,这可能与本次采集的羊肚菌根系土样类型相似有关,土样中黏细菌的种类与羊肚菌的生长是否有相关性有待进一步研究。

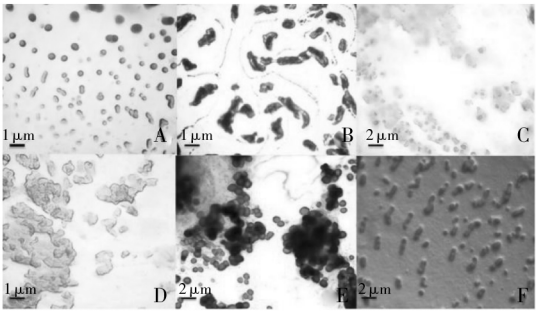


图 5 黏细菌黏孢子显微照片

Fig. 5 The spore microphotograph of the strains
A: 黏球菌; B: 孢囊杆菌; C: 标桩菌; D: 原囊菌; E: 黏球菌;
F: 珊瑚球菌
A: *Myxococcus*; B: *Cystobacter*; C: *Stigmatella*; D: *Archangium*;
E: *Myxococcus*; F: *Corallococcus*

表 2 分离得到的黏细菌各属的形态特征

Table 2 Morphological characteristics of the isolated myxobacteria strains

属名	子实体	营养细胞	黏孢子	菌落
黏球菌属 (<i>Myxococcus</i>)	软的小球形,黄色、橘色、粉红色等	细长杆状,尖部呈锥形, (0.5~0.7) μm × (2.0~10) μm	球形或卵形,直径 1.0~1.8 μm,有囊壳	软的片状,颜色各异
珊瑚球菌属 (<i>Corallococcus</i>)	屋脊状、小泡状或荚状,橘色,球形,有突起	尖端略尖的杆状物(0.5~0.8) μm × (4~6) μm 细长杆状	球形,有囊壳,直径 1.0~1.5 μm	软薄片,边缘有褶皱
孢囊杆菌属 (<i>Cystobacter</i>)	脉纹或脊,棕色或深褐色	尖状,(0.5~0.8) μm × (4~6) μm	杆状,坚硬,直径 0.5~1.7 μm	坚硬的薄膜,边缘有褶皱
原囊菌属 (<i>Archangium</i>)	透明枝状,较硬,红棕色或浅褐色	细长,末端尖,(0.7~0.8) μm × (4~8) μm	规则的球状,直径 1.0~1.5 μm	坚硬的膜状,有脊状突起
标桩菌属 (<i>Stigmatella</i>)	球状孢囊,浅棕色	杆状,两头略尖(0.7~0.8) μm × (4~8) μm	杆状,顶部圆形直径 1.0~3.0 μm	软的薄膜状,边缘粉色突起

2.3 羊肚菌根系土样中黏细菌的分子鉴定

将分离得到的 17 株黏细菌的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库中的已知序列进行比对,找出亲缘关系最近的种属。从 bacterio. cict. fr 网站数据库中找到所得菌株模式菌株的 16S rRNA 序列,用 Clustal X 软件进行序列相似性分析和序列比对,用 Mega 4.0 的 N-J 法构建系统进

化树。
如图 6 所示,可以将这 17 株菌分为 3 个大支,第 1 支是黏球菌属和珊瑚球菌属,第 2 支是孢囊杆菌属和原囊菌属,第 3 支是标桩菌属。分子鉴定的结果也表明 16S rRNA 不能完全将黏细菌的某些种类分开,因此对黏细菌的鉴定需要在分子鉴定的基础上结合形态学进行分类。

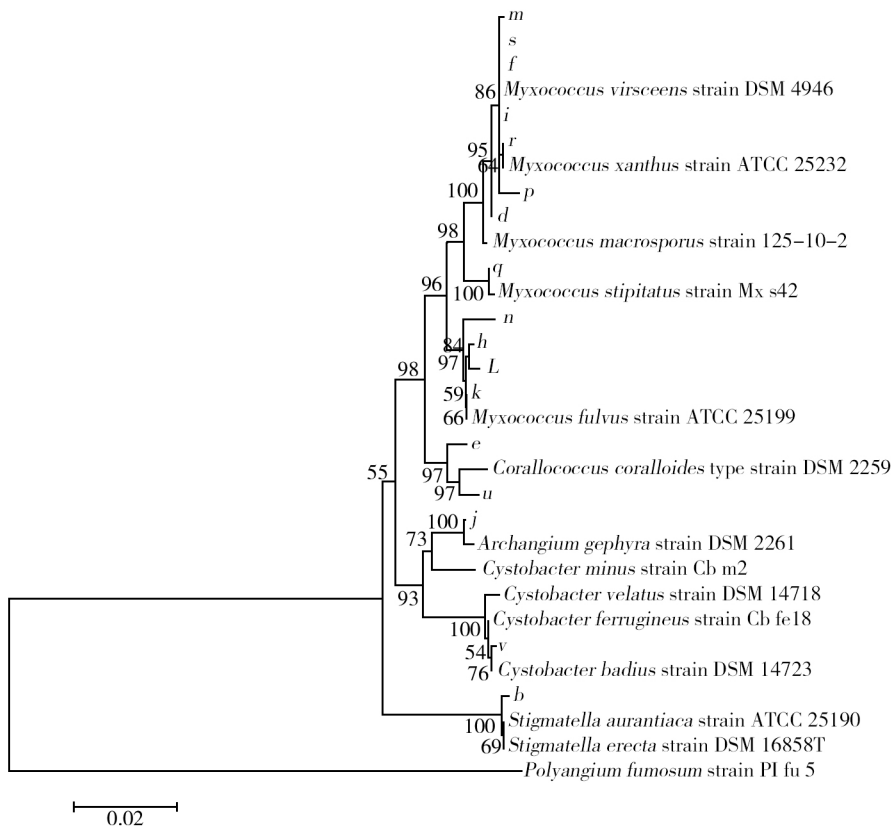


图6 分离菌株的系统发育树

Fig.6 Phylogenetic tree of the separated myxobacteria

3 讨 论

环境中绝大多数的微生物仍然是不可培养的,这表明微生物资源潜力巨大^[15],同时提醒我们仍有很多的工作需要完成。宏基因组测序技术的发展使研究人员能够了解环境中微生物种类及数量,但是对于可培养的微生物的性状以及生理生化特性的研究,仍然是微生物分类的依据,也是将丰富的微生物资源运用到生产实践中必不可少的方法^[16]。黏细菌具有分布范围广、生长代时长、显著的社会性(如生长的细胞密度依赖、群体运动、群体捕食)等特点^[17]。鉴于此,本研究对土样中的黏细菌进行定向分离。比较了不同诱导底物对土样中黏细菌子实体的诱导效果,结果显示以活的大肠埃希菌为诱导底物诱导土样中的黏细菌子实体效果最好,出菌率最高。

采用不同底物诱导法,对采集于秦岭商洛地区的羊肚菌根系土样中的可培养黏细菌进行分

离,得到5个属共17株黏细菌,初步鉴定为黏球菌属12株,珊瑚球菌属2株,孢囊杆菌属1株,原囊菌属1株,标桩菌属1株^[18]。分离结果说明羊肚菌根系土样所含的黏细菌资源以黏球菌属为主,这与采集的羊肚菌根系土样类型相似,以及黏球菌属黏细菌对环境的适应性强、易于培养等因素有关^[19]。已有的研究表明,较为丰富的细菌群落结构有利于羊肚菌的发生,这暗示了羊肚菌发生时需要某些微生物的刺激,或者需要土壤中某些特殊物质的作用,而这些特殊物质又与土壤中微生物活动有关,黏细菌作为羊肚菌生长的菌塘土中的优势种群,很有可能是利于羊肚菌发生的细菌之一,其与羊肚菌生长的相关性及其具体的作用机制还有待进一步研究^[20]。

通过分析特殊生境下的黏细菌,如与某些植物或大型真菌中共生的黏细菌,可以增加获得新菌株及其相关代谢产物的概率,从而为得到活性黏细菌及其活性成分,开发黏细菌资源提供新的

思路^[21]。本研究拓宽了对羊肚菌根系中存在的可培养微生物的认识,作为来自新生境的黏细菌菌株,不仅丰富了黏细菌资源库,也可为进行其他特殊生境微生物的分离提供参考^[22]。

参考文献:

- [1] Dawid W. Biology and global distribution of myxobacteria in soils[J]. Fems Microbiol Rev, 2000, 24(4): 403-427.
- [2] Harvey CW, Du H, Xu Z, et al. Interconnected cavernous structure of bacterial fruiting bodies[J]. PloS Computational Biology, 2012, 8(12): e1002850.
- [3] Wenzel SC, Müller R. Myxobacterial natural product assembly lines: fascinating examples of curious biochemistry[J]. Nat Prod Rep, 2007, 24(6): 1211-1224.
- [4] Wiebke L, Corinna W, Joachim W. Actinobacteria and myxobacteria: two of the most important bacterial resources for novel antibiotics[J]. Current topics in microbiology and immunology, 2016, (398): 273-302.
- [5] Daniel K, Gabriela Z, Ole R. Discovering the hidden secondary metabolome of *Myxococcus xanthus*: a study of intraspecific diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(10): 3058-3068.
- [6] 和晓娜, 李峻志, 李书兰, 等. 秦岭东段流岭山区羊肚菌的分子鉴定[J]. 陕西师范大学学报(自然科学版), 2012, 40(5): 68-71.
- [7] Liu Q, Ma H, Zhang Y, et al. Artificial cultivation of true morels: current state, issues and perspectives[J]. Crit Rev Biotechnol, 2018, 38(2): 259-271.
- [8] 熊川, 李小林, 李强, 等. 羊肚菌菌塘土壤细菌群落的结构及多样性[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2015, 41(4): 428-434.
- [9] LI YZ, Hu W, Zhang YQ, et al. A simple method to Isolate salt tolerant myxobacteria from marine sample[J]. Journal of Micorbiological Methods, 2002, 50(2): 205-209.
- [10] Zhang LP, Wang HY, Fang XM, et al. Improved methods of isolation and purification of myxobacteria and development of fruiting body formation of two strains[J]. J Microbiol Meth, 2003, 54(1): 21-27.
- [11] Wioletta WD, Anna JB, Hanna D, et al. Current trends in myxobacteria research[J]. Annals of Microbiology, 2016, 66(1): 17-33.
- [12] Miyashita M, Sakane T, Suzuki K, et al. 16S rRNA gene and 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences analysis of the genus *Myxococcus*[J]. FEMS Microbiol Lett, 2008, 282(2): 241-245.
- [13] Li B, Yao Q, Zhu H. Approach to analyze the diversity of myxobacteria in soil by semi-nested PCR-denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) based on taxon-specific gene[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e108877.
- [14] Lee C, An D, Lee H, et al. Correlation between *Sorangium cellulosum* subgroups and their potential for secondary metabolite production[J]. J Microbiol Biotechnol, 2013, 23(3): 297-303.
- [15] Zhou J, Kang S, Schadt CW, et al. Spatial scaling of functional gene diversity across various microbial taxa[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(22): 7768-7773.
- [16] Li JX, Liu CG. Progress on Methods for Increasing Microbial Culturability[J]. Advances in Microbiology, 2016, 5(1): 1-8.
- [17] Mohr KI, Stechling M, Wink J, et al. Comparison of myxobacterial diversity and evaluation of isolation success in two niches: Kiritimati Island and German compost[J]. Microbiologyopen, 2016, 5(2): 268-278.
- [18] Mohr KI. Diversity of Myxobacteria-We Only See the Tip of the Iceberg[J]. Microorganisms, 2018, 6(3): 84-106.
- [19] Kathrin IM, Tanja Z, Joachim W, et al. Myxobacteria in high moor and fen: an astonishing diversity in a neglected extreme habitat[J]. Microbiology Open, 2017, 6(4): e464.
- [20] He S, Zhao K, Ma L, et al. Effects of different cultivation material formulas on the growth and quality of *Morchella* spp. [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2018, 25(4): 719-723.
- [21] Nan B, Zusman DR. Uncovering the mystery of gliding motility in the myxobacteria[J]. Annu Rev Genet, 2011, 45(45): 21-39.
- [22] Herrmann J, Fayad AA, Müller R. Natural products from myxobacteria: novel metabolites and bioactivities[J]. Nat Prod Rep, 2017, 34(2): 135-160.