

醇化烟叶表面可培养微生物的鉴定和系统发育分析

杨金奎¹, 段焰青², 陈春梅¹, 李庆华², 黄静文¹, 张克勤^{1*}

1. 云南大学生物资源保护与利用重点实验室, 昆明市翠湖北路 2号 650091

2. 红云烟草(集团)有限责任公司技术中心, 昆明市北市区 650202

关键词: 烤烟; 醇化; 微生物; 系统发育

摘要: 以 K326烤烟品种为材料, 对不同醇化时间烟叶表面的可培养微生物进行了分离, 并通过分子生物学方法对这些微生物的种、属分类地位和系统发育关系进行了分析。结果表明: 醇化烟叶表面可培养微生物的数量和种类随着醇化时间的延长呈明显的下降趋势; 醇化烟叶表面的细菌主要包括芽孢杆菌和肠杆菌两个类群, 其中, 芽孢杆菌属的细菌为优势微生物类群。此外, 醇化烟叶表面细菌的数量和烟叶部位等级也存在一定的相关性, 即中部烟叶样品中细菌的数量高于下部烟叶样品, 而上部烟叶样品中的细菌数量最少。而真菌的数量和种类与醇化时间和烟叶样品部位等级之间没有明显的相关性。

中图分类号: TS444; TS14 文献标识码: A 文章编号: 1002-0861(2008)11-0051-05

Identification and Phylogenesis Analysis of Cultivable Microorganisms on Tobacco Leaf Surface During Aging

YANG JIN-KUI(1), DUAN YAN-QING(2), CHEN CHUN-MEI(1), LI QING-HUA(2), HUANG JING-WEN(1), and ZHANG KE-QIN(1)

1. Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-resources, Yunnan University, Kunming 650091, China

2. Technology Centre of Hongyun Tobacco (Group) Co., Ltd., Kunming 650202, China

Keywords: Flue-cured tobacco; Aging; Microorganism; Phylogenesis

Abstract: The cultivable microorganisms were isolated from the leaf surface of flue-cured tobacco cv. K326 sampled at different aging stages, and the systematic status of these microorganisms and their phylogenetic relationship were analyzed with molecular biological method. The results showed that the amount and races of cultivable microorganisms on leaf surface obviously decreased with the prolongation of aging time. The major bacteria are *Bacillus* sp. and *Enterobacter* sp.; and *Bacillus* sp. is the dominant. Moreover, there is certain relativity between the amount of bacteria and the stalk position of tobacco leaf, namely, the amount of bacteria on middle leaf is larger than that on lower leaf, and that on upper leaf is the smallest. However, there is no obvious relativity between the amount and race of fungi and the length of aging time or stalk position of tobacco leaf.

烤烟品质除受栽培因素的影响外, 烟叶调制、复烤和醇化等也有显著影响, 特别是在烟叶的发酵醇化过

程中, 微生物、酶及相关化学物质的协同作用, 能诱发一系列改善烟叶化学成分协调性和评吸质量的生化反应, 从而改善烟叶品质^[1-2]。尽管烟叶发酵的机制目前尚未完全清楚, 但一般认为烟叶发酵机理主要包括酶作用、微生物作用、化学作用等三方面^[3-6]。微生物及生物酶的作用贯穿于烟叶发酵始终, 对烟叶品质的影响较大。微生物不仅可以通过自身的生命活动作用于烟叶的醇化过程, 而且还通过其代谢产生的生物酶参与烟叶的生理生化反应, 促进烟叶中生物大分子化

基金项目: 云南省科技攻关及高新技术发展计划“生化技术在构建中式卷烟中的应用”(2006GG22)。

作者简介: 杨金奎(1972-), 博士, 研究方向: 烟草微生物学, 线虫的分子生防机制。*通讯作者: 张克勤 E-mail: kqzhang111@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-06-05

责任编辑: 董志坚 E-mail: yckj2256@yahoo.com.cn

电话: 0371-67672650

合物的转化。目前,分子生物学方法已被广泛用于微生物的分类和系统发育分析,其中 16S rRNA 和转录间隔区 (ITS)序列分别是细菌和真菌分类鉴定和系统发育分析中最常用的分子生物学指标^[7-8]。醇化烟叶表面存在大量的微生物,其中能在常规培养基上正常生长繁殖的微生物称为可培养微生物,目前文献报道的烤烟烟叶中存在的微生物均属于可培养微生物^[4,9-12]。以 K326烤烟样品为材料,利用分子生物学方法对烟叶表面的可培养微生物进行了分类鉴定和系统发育分析,试图从分子水平上揭示烤烟醇化过程中微生物类群的动态变化,为人工调控烟叶醇化过程提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 烟叶样品

烟叶样品于 2007年 3月采自红云烟草(集团)有限责任公司原料部烟叶醇化车间,烟叶的具体信息见表 1。

1.1.2 试剂和仪器

Pfu DNA polymerase 和 Taq DNA polymerase(日本 Takara公司);多功能 DNA 纯化回收试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);质粒小量快速提取试剂盒(北京三博远志生物技术有限责任公司);核苷酸测序仪 3730(美国 ABI公司);BP-211D 型天平(感量 0.01g,德国赛多利斯公司);电热恒温培养箱(上海一恒科学仪器公司)。

1.1.3 宿主和载体

宿主菌: E. coli DH 5 菌株(日本 Takara公司);载体: pMD18-T(日本 Takara公司)。

1.2 试验方法

1.2.1 微生物的分离与鉴定

烟叶表面微生物采用常规方法进行分离^[13]。烟叶样品中分离的微生物首先在显微镜下进行形态学观察,根据形态学差异将微生物划分为不同类群,在每个类群的微生物中挑取 3个单菌落进行培养,并提取基因组 DNA。以细菌和真菌的基因组 DNA作为 PCR扩

增的模板,分别对细菌的 16S rRNA 序列和真菌的转录间隔区 (ITS)序列进行 PCR 扩增,用于细菌和真菌的分类鉴定^[7-8]。细菌 16S rRNA 序列的扩增采用通用引物 20F(5' - AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG - 3')和 1500R(5' - GGTACCTTGTTACGACT - 3')进行^[14];真菌的转录间隔区 (ITS)序列的扩增采用通用引物 ITS4(5' / TCCTCCGCTTA TTGA TA TGC / 3')和 ITS5(5' / GGAA GTAAA GTCGTAACAAGG / 3')进行^[15]。PCR 扩增产物回收后连接到载体 pMD18 - T,并转化感受态 E. coli DH 5 菌株。以氨苄青霉素作为筛选标记,挑取白色菌落进行 PCR 验证,阳性菌落由北京三博远志生物技术有限责任公司进行测序。

1.2.2 微生物的系统发育分析

细菌的 16S rRNA 序列和真菌的 ITS 序列经过校正后,在 GenBank 中分别进行同源序列搜索 (BLAST search),并下载相关类群微生物模式菌株的 ITS 序列和 16S rRNA 序列。利用 ClustaX 软件^[16]分别对 ITS 序列或 16S rRNA 序列与模式菌株的 ITS 序列或 16S rRNA 序列进行比对,然后用 MEGA4.0 软件^[17]分别构建 Neighbor - Joining 分子系统进化树^[18],并进行 1000 次 Bootstrap 统计学检验^[19]。

2 结果与分析

2.1 醇化烟叶表面可培养微生物的分离和鉴定

通过平板分离,分别对 9个 K326烤烟样品中的细菌、放线菌、霉菌和酵母菌的数量进行检测。提取细菌和真菌的基因组 DNA,利用引物 20F和 1500R 扩增细菌的 16S rRNA 序列,PCR 扩增产物大小约为 1500bp(图 1A)。利用引物 ITS4和 ITS5 扩增真菌的 ITS 序列,PCR 扩增产物大小约为 500bp(图 1B)。把细菌的 16S rRNA 和真菌的 ITS 序列分别连接载体 pMD18 - T 进行测序和序列校对,利用 DNAMAN 生物学软件分别对细菌的 16S rRNA 和真菌的 ITS 序列进行比对,并去除重复的核苷酸序列。

把测序得到的细菌 16S rRNA 和真菌 ITS 序列在国际核苷酸序列数据库 GenBank 中进行同源性比对,对烟叶表面的可培养微生物进行种属分类地位的鉴定。核苷酸序列比对结果表明,从 9个烟叶样品中分离得到的细菌包括芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)、类芽孢杆菌属 (*Paenibacillus* sp.)、肠杆菌属 (*Enterobacter* sp.)、柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter* sp.)、欧文氏菌属 (*Ewingia* sp.)和泛菌属 (*Pantoea* sp.)等 6个种属,而分离得到的真菌包括曲霉属 (*Aspergillus* sp.)、木霉属 (*Trichoderma* sp.)、根霉属 (*Rhizopus* sp.)和镰刀菌属

表 1 供试烟叶样品

烟叶样品	等级	醇化时间(月)	烟叶样品	等级	醇化时间(月)
S1	B3F	6	S6	X3F	18
S2	C3F	6	S7	B3F	30
S3	X3F	6	S8	C3F	30
S4	B3F	18	S9	X3F	30
S5	C3F	18			

注:产地为云南宜良;品种为 K326。

(*Fusarium* sp.)等4个属,见表2。此外,9个烟叶样品中均没有分离到酵母菌和放线菌,说明烤烟 K326的叶面营养成分可能不适合这两类微生物的生长和繁殖。细菌占叶面微生物总数的97.5%以上,在醇化时间较短(6个月)的3个烟叶样品中分离到3种不同的真菌,在醇化时间为18个月的上部烟叶样品中只分离得到1种真菌。由此可见,自然发酵的烤烟 K326叶面微生物中细菌占绝对优势,这与邱立友等^[9]的报道一致。

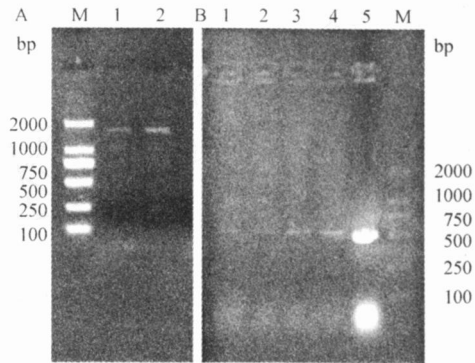
从微生物的数量来看,醇化时间较短(6个月)的烟叶样品中的微生物数量最多,随着醇化时间的延长,烤烟叶面微生物的数量明显下降(表2)。在醇化的初期细菌的数量和种类比较多,醇化6个月的烟叶细菌数量和种类最多。在醇化时间较短的烟叶样品中分离得到的细菌包括芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、肠杆菌属、柠檬酸杆菌属、欧文氏菌属和泛菌属6个属。而醇化18个月的烟叶样品中分离到的细菌数量明显下降,并且细菌的种类也减少,分离得到的细菌包括芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、肠杆菌属和泛菌属4个种属。而醇化30个月的烟叶样品中,细菌的数量与醇化18个月的样品接近,分离得到的细菌种类包括芽孢杆菌属、类芽孢杆菌属、肠杆菌属和柠檬酸杆菌属4个属。这些非优势细菌在不同烟叶样品中的存在和分布可能与烟叶的品质和醇化的环境条件有关。

可见,细菌的数量随着醇化时间的延长逐渐下降,尤其是在醇化时间为6个月到18个月之间的烟叶中细菌数量下降最快;细菌的种类随着醇化时间的延长也呈下降趋势。9个烟叶样品中均能分离到大量的芽孢杆菌类群的细菌,尤其是芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属细菌,芽孢杆菌属的细菌数量最多,是K326醇化烟

叶中的优势微生物类群。

细菌数量与烟叶部位等级间也存在明显的相关性,即相同醇化时间的烟叶样品中,中部烟叶样品的细菌数量高于下部烟叶,而上部烟叶样品中的细菌数量最少(表2)。细菌的种类和烟叶样品的部位等级之间没有明显的相关关系。

醇化6个月的烟叶样品中均能分离到真菌,但真菌的数量比细菌的数量少得多(2.5%),分离得到的真菌包括曲霉属、木霉属和根霉属3个属,在上部和中部烟叶样品中分离得到的真菌为根霉,而下部烟叶样品中分离得到了曲霉和木霉。然而,随着醇化时间的延长,真菌的种类和数量出现明显的变化。醇化18个月的烟叶样品中,只有上部烟叶样品中检测到镰刀菌属的真菌,而中部烟叶和下部烟叶中没有分离得到真菌。醇化30个月的样品中也没有检测到真菌。由此可见,云南K326烤烟烟叶醇化期间的叶面环境可能



注:A为细菌的16S rRNA的PCR扩增结果,M为DNA分子大小标记,1和2为不同菌株的PCR扩增结果;B为真菌ITS序列的PCR扩增结果,1,2,3,4和5分别为不同菌株的PCR扩增结果。

图1 细菌(16S rRNA)和真菌(ITS序列)的PCR扩增结果

表2 醇化K326烟叶表面可培养微生物的分离和鉴定

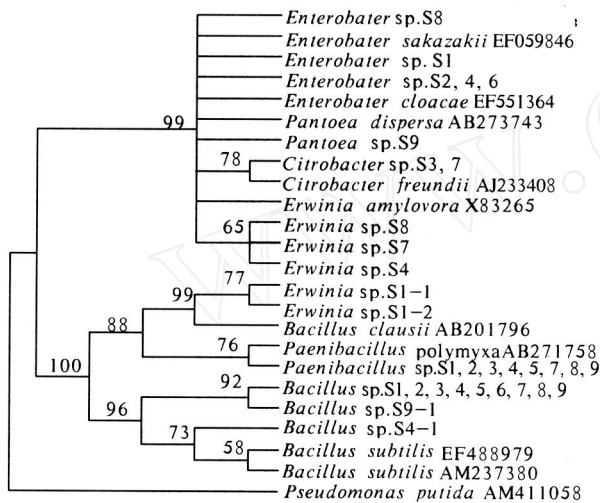
样品	微生物数量 (个/g烟叶)	细菌(个/g烟叶)	真菌 (个/g烟叶)
S1	1.12×10^5	B (5.5×10^4); P (2.8×10^4); C (1.8×10^4); Er (9.4×10^3)	R (0.9×10^3)
S2	3.31×10^5	B (1.2×10^5); P (9.3×10^4); E (5.9×10^4); C (3.9×10^4); Er (2×10^4)	R (1.0×10^3)
S3	1.95×10^5	B (8.5×10^4); P (4.4×10^4); Er (1.5×10^4); Pa (5.1×10^4)	A (0.9×10^3); T (0.1×10^3)
S4	1.79×10^4	B (9×10^3); P (3×10^3); E (3×10^3); Er (2.4×10^3)	F (4.5×10^2)
S5	2.42×10^4	B (1.8×10^4); P (6.2×10^3)	
S6	2.15×10^4	B (1.5×10^4); E (6.7×10^3)	
S7	1.58×10^4	B (9×10^3); P (4.9×10^3); E (1.8×10^3)	
S8	2.31×10^4	B (1.5×10^4); P (4.5×10^3); E (3.2×10^3)	
S9	2.23×10^4	B (1.2×10^4); P (6×10^3); E (2.7×10^3); C (1.6×10^3)	

注: B. 芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.); P. 类芽孢杆菌属(*Paenibacillus* sp.); E. 肠杆菌属(*Enterobacter* sp.); C. 柠檬酸杆菌属(*Citrobacter* sp.); Er. 欧文氏菌属(*Ewinia* sp.); Pa. 泛菌属(*Pantoea* sp.); F. 镰刀菌属(*Fusarium* sp.); R. 根霉属(*Rhizopus* sp.); A. 曲霉属(*Aspergillus* sp.); T. 木霉属(*Trichoderma* sp.)。

不利于真菌的生长。同时真菌的数量和种类明显少于细菌,真菌的数量和醇化时间以及烟叶样品的部位等级之间没有明显的相关性。

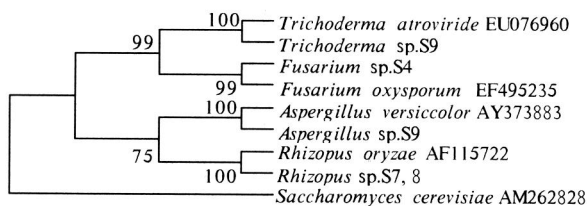
2.2 醇化烟叶表面可培养微生物的系统发育分析

在 GenBank 上进行同源性搜索,得到上述细菌和真菌的相近种或模式种的 16S rRNA 或 ITS 序列,并利用 Clustal 软件^[14]对这些序列进行比对,分别构建烤烟 K326 叶面细菌和真菌的系统发育树,见图 2 和图 3。醇化烟叶表面细菌聚类形成两个大的进化分枝(图 2),其中肠杆菌属、泛菌属、柠檬酸杆菌属和欧文氏菌属形成一个进化分枝(肠杆菌类群);芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属形成另一个进化分枝(芽孢杆菌类群)。芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属进化分枝内部又形成不同的进化亚枝,由不同的芽孢杆菌和类芽孢杆菌聚类形成。烟叶表面分离得到的 4 种真菌聚类形成两个进化分枝(图 3),其中,木霉和镰刀菌聚类形成一个进化分枝,而曲霉和根霉菌聚类形成另一个进化分枝。



注:系统树中的 S1~S9 分别表示 9 种烟叶样品中检测到的微生物,其中 *Bacillus* sp. S1-1 和 *Bacillus* sp. S1-2 表示在 S1 样品中检测到两种不同的芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)细菌;*Pseudomonas putida* 作为外群。

图 2 烤烟 K326 叶面细菌的系统发育分析



注:系统树中的 S4, S7~S9 分别表示烟叶样品中检测到的微生物;*Saccharomyces cerevisiae* 作为外群。

图 3 烤烟 K326 叶面真菌的系统发育分析

3 结论与讨论

云南 K326 烤烟表面可培养微生物的数量和种类随着醇化时间的延长而明显下降,芽孢杆菌属的细菌是优势微生物类群。烟叶部位等级和细菌数量也呈现明显的相关性,中部烟叶样品中细菌的数量高于下部烟叶样品,而上部烟叶样品中的细菌数量最少。云南 K326 烤烟表面的细菌主要聚类形成芽孢杆菌类群和肠杆菌类群两个大的进化分枝。

醇化烟叶的优势微生物芽孢杆菌属和类芽孢杆菌属具有较近的亲源关系,这些微生物在烟叶自然发酵过程中发挥着重要的作用^[10-11]。因此,在烟叶人工发酵中可以优先选择并人为加入这些微生物以促进烟叶的醇化。而肠杆菌属细菌有可能会对烟叶的醇化产生不利的影响,在烟叶的醇化过程中应尽量减少和控制这些细菌的数量,以消除对烟叶产生的不利影响。

目前通过添加优势微生物或生物酶的方法以加快烟叶醇化,提高烟叶品质和改善烟气特性^[4-6, 10-12, 20]。本研究结果为更有效地筛选用于烟叶人工发酵或加速自然醇化过程的微生物菌株提供了依据。对于一个未知的烟叶样品,可以通过分子生物学的方法对样品中的可培养微生物进行快速鉴定并构建系统发育树,确定烟叶样品中的微生物种群之间的系统发育关系,并根据优势微生物种群组成和数量的配比研制微生物添加剂,达到加速烟叶醇化的目的。同时,分类地位相近的微生物通常具有相似的生理生化代谢特性,因此,还可以根据系统发育树选择与烟叶表面优势微生物发育关系较近,更具有生长或产酶等竞争优势的微生物菌种添加到醇化烟叶中,以控制烟叶的内在品质向人们期望的方向转化,加快自然醇化进程,改善烟叶品质。

另外,本试验的取样方法为一次性取不同生产年份的烟叶,与以往的研究^[9-10]取样方法有所不同,但试验结果与前人的报道是一致的^[9-10],说明取样方法造成的误差在许可的系统误差范围之内。同时试验的主要目的是研究烟叶表面微生物的系统发育关系,微生物数量的差异并不影响试验结果的分析。

参考文献

- [1] 左天觉. 烟草的生产、生理和生物化学 [M]. 朱尊权, 等译. 上海: 上海远东出版社, 1993.
- [2] 杨虹琦, 周冀衡, 罗泽民, 等. 微生物和酶在烟叶发酵中的应用 [J]. 湖南农业科学, 2003 (6): 63-66.
- [3] Frankenburg W C. Study on the fermentation of cigar leaf

- tobacco[J]. Arch Biochem, 1947 (14): 157-181.
- [4] 罗家基,朱子高,罗毅,等.微生物在烟叶发酵过程中的作用[J].烟草科技,1998(1):6
- [5] 赵铭钦,李芳芳.微生物和酶学技术在烟草发酵中的应用及展望[J].中国农学通报,2007,23(1):314-318
- [6] 张立昌.烟叶酶处理的作用效果[J].烟草科技,2001(4):7-9.
- [7] 陈剑山,郑服丛. ITS序列分析在真菌分类鉴定中的应用[J].安徽农业科学,2007,35(13):3785-3786
- [8] 刘文强,贾玉萍,赵宏坤. 16S rRNA在细菌分类鉴定研究中的应用[J].动物医学进展,2006,27(11):15-18
- [9] 邱立友,赵铭钦,岳雪梅,等.自然发酵烤烟叶面微生物区系的分离鉴定[J].烟草科技,2000(3):14-17.
- [10] 朱大恒,陈锐,陈再根,等.烤烟自然醇化与人工发酵过程中微生物变化及其与酶活性关系的研究[J].中国烟草学报,2001(2):26-30
- [11] 韩锦峰,朱大恒,刘卫群,等.陈化发酵期间烤烟叶面微生物活性及其应用研究[J].中国烟草科学,1997(4):13-14.
- [12] 曹玉,李云,袁嘉丽,等.烟草烤制的微生物真菌细菌区系调查及其酶催化作用研究[J].云南大学学报,1998,20:509-512
- [13] 周德庆.微生物学实验教程[M].北京:高等教育出版社,2006
- [14] Weisburg W G, Bams M S, Pelletier A D, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. J Bacteriol, 1991, 173: 697-703.
- [15] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. Academic Press, San Diego, 1990: 315-322
- [16] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 24: 4876-4882
- [17] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24: 1596-1599.
- [18] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Mol Biol Evol, 1987(4): 406-425.
- [19] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.
- [20] 李伟,李少鹏,张圣炜,等.外加酶在烟草行业中的应用[J].中国农学通报,2006,22:66-70

《烟草科技》2009年广告开始征订

《烟草科技》杂志(月刊)创刊于1957年,由国家烟草专卖局主管、中国烟草总公司郑州烟草研究院主办、中国烟草科技信息中心编辑出版。

办刊优势:《烟草科技》系中国烟草行业唯一一家中文核心期刊、中国科技核心期刊、全国优秀科技期刊、美国《化学文摘》(CA)和《烟草文摘》(TA)收录期刊、执行《CAJ-CD规范》优秀期刊和《中国学术期刊(光盘版)》全文收录期刊,还加入了《中国期刊网》及《万方数据资源系统数字化期刊群》,通过网络向全球发布所载信息。《烟草科技》不仅在中国烟草行业内众所周知,而且在行业外乃至国外也有较大影响。据中国学术期刊(光盘版)电子杂志社报道,2007年度《烟草科技》在“中国知网”上的机构用户已达2564个,分布在10个国家和地区,个人读者分布在23个国家和地区,尤其是“医院”机构用户高达1240个。

主要栏目:专题报道、重要研究报告、烟草工艺、烟草化学、设备与仪器、烟草农学、病虫害防治等。

发行对象:全国各省市区县烟草专卖局和烟草公司,卷烟工业企业,卷烟销售公司,烟叶产区,卷烟辅料企业,烟机设备企业,科研院所的管理和技术人员,以及各大中专院校师生等。

杂志规格:国际标准大16开,彩色铜版纸胶印,每月20日出版,国内外公开发行,国际标准刊号:ISSN 1002-0861,国内统一刊号:CN 41-1137/TS,邮发代号:36-33。广告经营许可证:4100004000060。

《烟草科技》2009年彩色及黑白广告现已开始征订,欢迎行业内外新老客户踊跃征订。《烟草科技》为您创造无限商机,您若想订到理想的广告版面,请尽早尽快与本刊联系、索取并签订广告合同。

本刊配有彩色、黑白广告创意制作系统及专业设计人员,可为客户免费设计制作刊登在《烟草科技》上的广告。

地址:郑州高新技术产业开发区枫杨街2号 邮编:450001

联系人:曹娟 电话:0371-67672669 传真:0371-67672668 E-mail: yckj@tobaccoinfo.com.cn