



丹参植株内生菌的分离纯化及其抗病性研究

颜 华,何 娇,李素俭,贾良辉,李军超*

(西北农林科技大学 生命科学学院,陕西杨陵 712100)

摘要:为探明丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge)内生菌的种类,筛选拮抗农作物病害菌的生防菌株,从健康丹参植株中进行内生菌分离,依照形态特征以及16S rDNA序列对菌株进行初步分类鉴定,采用琼脂块法进行拮抗菌株筛选,并选取拮抗活性较强的菌株液体发酵进行体外抑菌试验。结果表明:(1)从丹参植株中共分离得到69株内生菌(真菌62株、放线菌7株),其中23株内生真菌属于无孢类群或现有条件不适合产孢,其余真菌菌株中串珠镰孢菌属(*Fusarium moniliiforme* Sheld.)和交链孢菌属(*Alternaria* sp)为优势菌群;7株内生放线菌均为链霉菌属。(2)病原菌拮抗性实验表明,有44株内生菌对病原菌具有不同程度的拮抗活性,其中12株内生菌对2种及以上靶标病原菌具有拮抗活性,表明丹参内生菌具有一定的广谱抗菌性。(3)放线菌菌株A232的次级代谢产物对白色假丝酵母(*Candida albicans*)和苹果腐烂菌(*Valsa mali*)都表现出较强的拮抗活性,通过形态、培养特征以及16S rDNA序列分析,鉴定其为*Streptomyces luteoverticillatus*。

关键词:内生菌;丹参;分离;拮抗性

中图分类号:Q93-331; Q939.92 文献标志码:A

Isolation and Anti-microbial Activity of Endophytes from *Salvia miltiorrhiza*

YAN Hua, HE Jiao, LI Sujan, JIA Lianghui, LI Junchao*

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The objective of this research was to explore the population diversity, distribution features and the antibacterial activity of endophytes of *Salvia miltiorrhiza* Bge. 69 strains were isolated from the tissue of Radix *Salvia miltiorrhiza* Bge, which were composed of 62 endophytic fungi and 7 endophytic actinomycetes. They were identified according to morphology and 16s rDNA. The antagonistic activities of the endophytes and some of their secondary metabolites against pathogens were also carried out. The results showed that: (1) *Fusarium moniliiforme* Sheld. and *Alternaria* sp were the dominant genera among endophytes from *Salvia miltiorrhiza*; (2) 44 strains presented antagonistic to pathogenic bacterium or fungi, among of which, 50% show antifungal activity on *Escherichia coli*; Some endophytes had the strongest bacteriostatic activities on *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, the biggest diameter of antagonism could be 25 mm; (3) The secondary metabolites of strain A232 presented strong and broad-spectrum and antagonistic activity to *C. albicans* and *Valsa mali*. Based on morphology and 16S rDNA sequence, strain A232 was identified as *Streptomyces luteoverticillatus*.

收稿日期:2016-06-22;修改稿收到日期:2016-08-30

基金项目:国家自然科学基金(31101476);2012年度高等学校博士学科点专项科研基金(20120204120042);西北农林科技大学引进人才专项(Z111021104);杨凌示范区科技计划项目(2014NY-41)

作者简介:颜华(1976—),女,博士,副教授,主要从事微生物资源开发与利用研究。E-mail:yanh99@gmail.com

*通信作者:李军超,副教授,主要从事药用植物种质资源保存与优良品系选育,植物细胞工程等研究。E-mail:lijunchao57@sohu.com

Key words: endophytes; *Salvia miltiorrhiza*; isolation; antagonism

鼠尾草属植物丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge)为多年生草本植物,作为传统的活血化瘀中药,也是现代医学研究的主要中药之一^[1],主要被用于治疗心脑血管疾病,同时还用于治疗肝纤维化、消化性溃疡、白内障、癌症、记忆缺失、艾滋病等疾病^[2]。自20世纪30年代起,国内外学者先后分离得到了丹参药用有效成分,包括脂溶性的丹参酮I、II A、隐丹参酮等及水溶性的丹参素、原儿茶醛、丹酚酸等^[3]。近年来,由于市场上日益增大的丹参需求量,野生丹参转为人工家种的栽培面积也日益增大,对于病虫害的防治也愈发重要^[4]。研究表明多种病原菌可导致栽培丹参病害的发生,目前主要采用化学农药防治,但防效甚微^[5]。利用土壤有益微生物菌剂,快速恢复土壤微生态平衡是解决中药材土传病害的最佳选择^[6]。

近年来有关研究表明,从植物的根、茎、叶、果实等中分离到了很多以前未被人们认识的植物内生菌(endophyte)^[7],内生菌通过多种方式协助宿主抵御病虫害的入侵^[8],如促进其新陈代谢^[9],与病原菌资源竞争,以及合成一些对其有毒害作用的次级代谢产物^[10]。此外,对药用植物而言,由于其内生菌与其“协同进化”的关系,决定了某些内生菌具有产生与宿主植物相同或相似的生物活性物质的能力^[11]。我们对本校试验地内丹参植株进行了内生菌的分离、培养与鉴定,并对其进行抗病原菌活性进行研究,以期开发新的微生物资源,提高丹参的产量及质量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 丹参植株采集 用于进行内生菌分离的丹参植株均采自西北农林科技大学试验地的2年生丹参植株,分别取新鲜健康植株的根、茎和叶,采集的样品4 h内进行内生菌的分离。

1.1.2 供试病原菌 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、白假丝酵母(*Candida albicans*)和苹果腐烂菌(*Valsa mali*)由微生物实验室提供。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA);高氏一号培养基;牛肉膏蛋白胨琼脂培养基;淀粉水解培养基;Tresner培养基;酪氨酸培养

基;肉汁胨琼脂培养基;明胶液化培养基。

1.2 方法

1.2.1 内生菌的分离纯化 取新鲜、无虫害的丹参植株,经流水冲洗后,对材料表面进行消毒,先用75%乙醇浸泡1 min,无菌水冲洗3~4次,再在0.1%升汞中浸泡5 min,用无菌水冲洗3~4次。处理完毕在无菌条件下,用灭菌剪刀将叶片剪成5 mm×5 mm大小,根和茎切成长2 mm小段,接种到PDA和高氏一号固体培养基上,28℃避光培养2~3 d,待其边缘长出菌丝,用接种针挑取边缘生长良好的菌丝反复纯化,重复至得到纯种。

1.2.2 内生菌的初步鉴定 采用插片法^[12]进行形态特征观察,于第4、9天取片,光学显微镜下镜检拍照,记录形态特征;同时记录培养特征(基内菌丝、气生菌丝和孢子丝的特征及颜色)。内生真菌的鉴定依照《真菌鉴定手册》^[13]进行。

1.2.3 内生拮抗菌的初筛 通过平板涂抹法将供试菌接于改良高氏一号平板上培养10 d,用琼脂块法^[14]进行拮抗性试验。细菌培养2 d,真菌培养3 d,测定、记录拮抗圈的大小。从中选出拮抗性强的菌株在液体培养基中接种,28℃ 170 r/min摇瓶培养7 d,用无菌滤纸片蘸取发酵液后放入涂有病原菌的平板上。每皿3重复,28℃培养。

1.2.4 菌株232的分类鉴定 (1)形态、培养特征

取在高氏一号上培养7 d的232菌株的菌落边缘的菌块,大小为5 mm×5 mm×2 mm,置4%戊二醛中,4℃冰箱过夜进行固定;用pH 6.8的PBS缓冲液冲洗4~6次,每次30 min;然后用系列丙酮脱水,每次30 min;再用醋酸异戊酯置换2次;最后将样品置于CO₂干燥器中进行临界点干燥,粘台,喷金后观察菌丝形态并照相^[15-16]。

(2)16S rDNA序列测定及系统进化分析
CTAB法提取菌株DNA。16S rRNA序列PCR扩增引物为细菌通用引物27F(5'-AGTTGATCMTGGCT-CAG-3')和1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。PCR扩增产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序结果在GenBank中进行Blast,选取与目标菌株相似性较近的菌株序列,使用Clustal X(1.81)软件进行alignent;利用MEGA5.0软件对计算后的序列进行系统发育分析,构建进化树(N-J法,Bootstrap重复100次, Kimura-2-parameter)^[17]。

2 结果与分析

2.1 丹参植株内生菌的分离结果

从健康丹参植株中共分离得到 69 株内生菌,其中包括 62 株内生真菌和 7 株内生放线菌。62 株真菌中有 51 株分离自叶片,11 株分离自茎部,其中多达 23 株属于无孢类群(也可能是现有的条件不适合其产孢),占 37.10%。其余内生真菌菌株中串珠镰孢菌属和交链孢菌属各有 17 株,为优势菌,分别占 27.42%,青霉属有 5 株,只占 8.06%;7 株内生放线菌中有 5 株是由根部分离得到,茎部和叶片各分离到 1 株,根据 16S 相似性均归到链霉菌属(表 1)。

2.2 病原菌拮抗性内生菌的初筛

为了筛选到可能的生防菌株,我们对所分离到的内生菌进行了病原菌的拮抗实验,结果见表 2。由表 2 可以看出,69 株丹参内生菌中有 44 株针对不同靶标菌有一定的拮抗活性,占内生菌总数的 70.97%,

其中:拮抗大肠杆菌的菌株数量最多,有 22 株,拮抗苹果树腐烂病菌的次之,有 12 株;菌株 211-50Z、2BYLF11、3CYLF07、A232 对 3 种及以上靶标菌具拮抗活性,8 株内生菌对 2 种靶标病原菌具有抗性,表明丹参内生菌具有一定的广谱抗性。另外,菌株 231-50Z 和 2BYRF05 分别对假丝酵母和苹果树腐烂病菌的抑菌圈直径均达 25 mm,表明丹参内生菌

表 1 丹参内生菌类群组成

Table 1 The composition of endophytic strains from *Salvia miltiorrhiza*

内生菌 Endophyte	属 Genus	菌株数 No.
	交链孢菌属 <i>Alternaria</i> sp.	17
真菌 Fungi	串珠镰孢菌属 <i>F. moniliforme</i> Sheldon	17
	青霉菌属 <i>Penicillium</i> sp.	5
	无孢类群 <i>Mycelia Sterilia</i>	23
放线菌 Actinomycetes	链霉菌属 <i>Streptomyces</i>	7

表 2 供试菌的初筛试验结果(抑菌圈直径)

Table 2 The inhibiting effect of strains studied on pathogens (bacteriostatic diameter/mm)

内生菌 Endophyte	枯草 芽孢 杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄 葡萄 球菌 <i>S. aureus</i>	大肠 杆菌 <i>E. coli</i>	白假丝 酵母 <i>C. albicans</i>	苹果树 腐烂 病菌 <i>V. mali</i>	内生菌 Endophyte	枯草 芽孢 杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄 葡萄 球菌 <i>S. aureus</i>	大肠 杆菌 <i>E. coli</i>	白假丝 酵母 <i>C. albicans</i>	苹果树 腐烂 病菌 <i>V. mali</i>
3CYLF06	—	18	15	—	—	2BYLF02	—	—	—	9	—
2BYLF11	9	—	15	15	—	2BYLF03	—	—	8	—	—
3CYRF01	—	—	9	—	—	2BYLF08	—	—	13	—	—
222-1-Z	—	—	—	12	—	231-9Z	—	8	—	—	—
3DYLFO3	—	—	—	—	12	211-51Z	10	—	—	—	—
231-54Z	—	—	17	—	—	231-53Z	—	9	12	—	—
3DYCF04	16	—	—	—	—	231-11Z	—	9	—	—	13
2BYLF10	15	—	—	—	—	231-52Z	—	—	—	—	12
2BYRF05	—	—	—	—	25	211-53Z	—	—	13	—	—
2BYLF10	—	12	—	—	—	231-12Z	—	—	10	—	—
1XLF06	—	—	—	—	15	211-51Z	12	—	—	—	—
3DYLFO5	—	—	14	—	—	221-4Z	12	—	9	—	—
3CYLF03	—	—	13	—	—	232-1Z	—	—	—	19	—
231-50Z	—	—	—	25	—	221-5Z	—	12	—	—	—
3CYLF07	—	9	12	15	—	221-3Z	—	—	—	12	14
3DYRF04	15	—	—	—	—	211-2Z	—	—	8	—	—
2BYLF09	—	—	12	—	—	3CYLF02	15	—	—	—	—
232-1Z	—	—	13	—	13	3CYLF09	—	—	13	—	—
232-1Z	—	—	8	—	—	211-50Z	15	11	16	—	13
231-1Z	13	—	12	—	—	A232	—	—	12	14	14
231-3Z	—	—	—	—	12	231-8Z	—	—	14	—	—
2BYRF04	15	—	—	—	13	221-1Z	—	—	—	—	12

对病原菌具有较强的拮抗效果。

2.3 丹参内生菌发酵液对病原菌的拮抗性实验结果

根据初筛结果,选取抗性较强,抑菌谱较广的15株内生菌进行液体发酵培养,对发酵液的抑菌活性进行了测定。其中2BYLF11、211-50Z、3CYLF07、A232四株内生菌的抑菌效果较好(表3),它们多能对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌产生显著的拮抗作用。2BYLF11发酵液对大肠杆菌以及211-50Z对金黄葡萄球菌的抑制直径可达20 mm;此外,2BYLF11发酵液还可对枯草芽孢杆菌表现较强的拮抗作用;211-50Z和A232发酵液对白假丝酵母,以及A232发酵液对苹果树腐烂病病菌也有较为明显的拮抗作用。

相对于固体培养,液体发酵培养条件下表现出病原菌拮抗活性的丹参内生菌株数目较少,且某些菌株发酵液的抑菌谱与其固体培养时不一致,如3CYLF07固体培养基可以拮抗白色假丝酵母,而发酵液却对白色假丝酵母没有拮抗活性,2BYLF11固体培养条件下和液体发酵液均可以抑制枯草芽孢杆菌和大肠杆菌,但对白色假丝酵母和金黄色葡萄球菌的拮抗性则分别只在固体培养条件下和液体发酵条件下实现,这是由于微生物次级代谢受到细胞内外

信号严格的调控,培养基成分的不同或培养条件的差异会影响到其抑菌活性物质的产生或产量。

2.4 丹参内生菌菌株A232的鉴定

2.4.1 菌株A232的形态特征和培养特征 鉴于菌株A232具有较为光谱的抑菌活性且活性较强,我们对其进行进一步的鉴定。形态特征和培养特征见图1。由图1可见,菌株A232在高氏一号培养基上气生菌丝和孢子丝丰富,生长良好。显微镜下观察,孢子链较长,波曲;孢子圆或者椭圆。

2.4.2 菌株A232的16S rDNA序列分析 PCR扩增菌株A232的16S rDNA序列并进行测序,利用Blast软件从GenBank/EMBL/DDBJ数据库中搜索出的相关放线菌菌株的16S rDNA序列。随后用BioEdit进行多序列比对,并利用MEGA3.1的邻接法进行系统进化树的构建。将其与GenBank等数据库的该属的相关菌株16S rDNA序列进行比较后构建系统发育树(图2)。

由图2可见,在链霉菌属中,A232与黄化轮毛链霉菌(*Streptomyces luteoverticillatus*)在一个分支,它们关系最近(一致性为99.4%),根据《放线菌系统学》^[18]的统计,16S rDNA序列一致性在99%以上,有50%的可能性是同种,因此可以把A232暂定为*S. luteoverticillatus*。

表3 供试菌的发酵液拮抗结果(抑菌圈直径)

Table 3 The inhibiting effect of fermentation

(bacteriostatic diameter/mm)

内生菌 Endophyte	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	金黄葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	大肠杆菌 <i>E. coli</i>	白假丝酵母 <i>C. albicans</i>	苹果树腐烂病菌 <i>V. mali</i>
3CYLF07	—	13	11	—	—
2BYLF11	13	18	20	—	—
211-50Z	—	20	—	12	—
A232	—	—	—	10	9



图1 菌株A232的形态特征和培养特征

Fig. 1 Cultural and morphological characteristics of A232

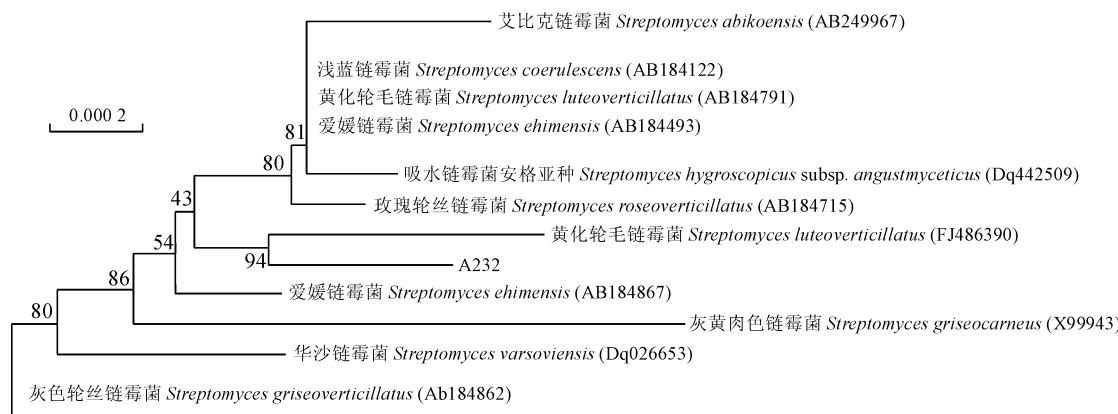


图 2 菌株 A232 基于 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain A232 based on 16S rDNA

3 讨 论

药用植物内生菌作为宝贵的微生物资源库,近年来越来越引起研究者们的关注,关于药用植物内生菌的多样性的研究日益增多。对丹参这一重要中药材内生菌的相关研究也陆续有报道。唐坤等从河南产区的丹参中分离到 277 株内生真菌,经鉴定,优势菌群主要有链格孢属(*Alternaria*)、木霉属(*Trichoderma*)和(*Cryptosporiopsis*)^[19];冀玉良等^[20]从商洛丹参根、茎、叶组织中分离获得 126 株内生真菌,经形态学鉴定归属于 5 目 7 科 19 属,曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)既是整个植株的优势菌群,也是根部和茎部的优势菌群。李艳玲等^[21]从泰山产的白花丹参和紫花丹参根、茎、叶和花组织中分离出 53 株内生真菌,分属于 9 属,分布最广的类群是链格孢属(*Alternaria*),占总菌株

的 43.4%;其次是 *Leptodontidium* sp(13.2%) 和镰刀菌属(*Fusarium*)(11.3%)。本实验从本校试验地丹参植株得到的 62 株内生真菌中,无孢类群菌株占 37.10%;其余菌株中串珠镰孢菌属和交链孢菌属为优势菌,各占 27.42%,青霉属的较少,只占 8.06%;这说明不同产地的丹参植株中的内生真菌具有一定的共性和多样性。我们还分离得到 7 株内生放线菌,而关于丹参内生放线菌这方面报道目前还很少。从抑菌活性来看,丹参内生菌中多数对病原菌具有程度不等的拮抗活性,部分菌株具有较广且较强的抑菌活性,有待进一步开发利用。丹参拮抗内生菌的分离,为丹参病害的生物防治奠定了菌种基础。内生菌资源库的扩充,生防菌活性成分的分离纯化等值得进一步研究,以期可以开发良好的生防产品。

参考文献:

- [1] 马丙祥,董凯. 丹参的药理作用研究新进展[J]. 中国药房, 2014, 7: 663-665.
- [2] 叶 勇. 丹参有效成分分离的研究进展[J]. 药品评价, 2005, 2: 146-148.
- [3] 张中堂,张群林,张云静,等. 中药丹参有效成分的提取分离方法研究进展[J]. 时珍国医国药, 2010, 3: 728-730.
- [4] 刘树林. 药用植物丹参病害及防治方法[J]. 吉林农业, 2013, 5: 36.
- [5] 王 雪,陈美兰,杨 光,等. 丛枝菌根真菌与哈茨木霉菌合用对连作丹参生长及质量的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 9: 1574-1578.
- YE Y. Research progress in active ingredient separation of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*. 2010, 3: 728-730.
- WANG X, CHEN M L, YANG G, et al. Effect of *Glomus versiforme* and *Trichodema harzianum* on growth and quality of *Salvia miltiorrhiza* [J]. *China Journal of Chinese Materia*

- Medica, 2014, 9: 1 574-1 578.
- [6] 叶鹏盛, 曾华兰, 江怀仲, 等. 丹参根腐病及其微生物防治研究[J]. 世界科学技术, 2003, 2: 63-65.
- YE P S, ZENG H L, JIANG H Z, et al. Study on Root Disease of *Radix Salviae Miltiorrhizae* and its control by micro-organisms[J]. *World Science and Technology*, 2003, 2: 63-65.
- [7] STROBEL G A. Rainforest endophytes and bioactive products [J]. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2002, 22(4): 315-333.
- [8] KATHRIN B, BENEDICTE RA, JUAN A, et al. Nutritional niche overlap potentiates the use of endophytes in biocontrol of a tree disease[J]. *BioControl*, 2015, 60: 655-667.
- [9] HAMILTON CE, GUNDE PE, HELANDER M, et al. Endophytic mediation of reactive oxygen species and antioxidant activity in plants: a review[J]. *Fungal Diversity*, 2012, 54: 1-10.
- [10] RODRIGUEZ R, REDMAN R. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis[J]. *J. Exp. Bot.*, 2008, 59(5): 1 109-1 114.
- [11] 魏宝阳, 曹亮, 李顺祥, 等. 内生菌与药用植物的关系及对次生代谢产物的影响[J]. 中国农学通报, 2011, 19: 83-88.
- WEI B Y, CAO L, LI S X, et al. The role of endophytes in medical plants and the effect of endophytes on secondary metabolites[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 19: 83-88.
- [12] 刘建玲, 陈宝宝, 刘永红, 等. 半夏内生菌的分离与初步鉴定[J]. 中国中药杂志, 2009, 18: 2 305-2 307.
- LIU J L, CHEN B B, LIU Y H, et al. Isolation and Identification of endophytes from *Pinellia* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2009, 18: 2 305-2 307.
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [14] 颜霞, 何晶晶, 赵彬, 等. 假橐吾内生菌分离及其拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 西北植物学报, 2010, 5: 1 029-1 034.
- YAN X, HE J J, ZHAO B, et al. Isolation, Screening and Identification of Endophytes in *Ligulariopsis shichuanica* [J].
- Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 5: 1 029-1 034.
- [15] 张清明, 王彩霞, 王海艳, 等. 苹果树腐烂病内生拮抗放线菌A-2的鉴定及其活性评价[J]. 农药学学报, 2013, 15(3): 286-292.
- ZHANG Q M, WANG C X, WANG H Y, et al. Identification of antagonistic endophytic actinomycetes A-2 and evaluation of its activity against *Valsa mali* [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2013, 15(3): 286-292.
- [16] GAO Z P. Control Efficacy of Apple Tree Valsa Canker by Endophytic Actinomycetes and Chemicals [D]. Northwest A&F University, 2009.
- [17] YIN Z Y, LIU H Q, LI Z P, et al. Genome sequence of *Valsa* canker pathogens uncovers a potential adaptation of colonization of woody bark[J]. *New Phytologist*, 2015: 1-15.
- [18] 徐丽华, 李文均, 刘志恒, 等. 放线菌系统学[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [19] 唐坤, 李标, 郭顺星. 河南产丹参内生真菌的多样性分析[J]. 中国药学杂志, 2015, 50: 7-12.
- TANG K, LI B, GUO S X. Analysis of Diversity of endophytic fungi in *Salvia miltiorrhiza* from Henan in China [J]. *Chin. Pharm. J.*, 2015, 50: 7-12.
- [20] 冀玉良, 李堆淑, 朱广启, 等. 商洛丹参内生真菌的种群多样性研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 8 913-8 915.
- JI Y L, LI D S, ZHU G Q, et al. Study on the population diversities of endophytic fungus in *Salvia miltiorrhiza* Bunge [J]. *Journal of Anhui Agri Sci.* 2011, 39 (15): 8 913-8 915.
- [21] 李艳玲, 史仁玖, 王健美, 等. 泰山产丹参内生真菌的分离鉴定和多样性分析[J]. 时珍国医国药, 2012, 23: 1-4.
- LI Y L, SHI R J, WANG J M, et al. Analysis of diversity of endophytic fungi in *Salvia miltiorrhiza* from Mountain Tai [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2012, 23: 1-4.

(编辑:潘新社)