

人参内生菌的分离及拮抗菌株的筛选*

姜 云¹, 尹 望¹, 陈长卿^{2**}, 陈 光¹, 高 洁²

1.吉林农业大学生命科学学院, 长春 130118; 2.吉林农业大学农学院, 长春 130118

摘 要: 利用研磨法和组织块法对我国吉林省 5 个不同地区来源的健康人参植株分别进行了内生细菌和内生真菌的分离, 并采用菌体初筛和发酵液复筛相结合的方法, 筛选了对 6 种人参主要病害病原菌具有抑菌活性的内生菌株。结果显示: 在人参根、茎、叶不同器官中共分离获得了 152 株内生细菌和 46 株内生真菌, 初筛后得到对 2 种以上病原菌有抑菌活性的内生细菌 16 株, 内生真菌 3 株, 复筛后对 4 种以上病原菌具有抑菌活性的细菌 2 株, 真菌 1 株, 还发现了对灰霉病菌具有明显抑制作用的菌株 3 株。

关键词: 人参; 内生菌; 分离; 筛选; 拮抗菌株

中文分类号: S432.44; S567.51

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2012)

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20120903.1007.001.html>

Isolation and Screening of Antagonistic Endophyte from *Panax ginseng*

JIANG Yun, YIN Wang, CHEN Chang-qing, CHEN Guang, GAO Jie

1.College of Life Sciences, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2.College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: The endophytes of healthy *Panax ginseng* plants from five different areas in Jinlin province, China were isolated using grinding and tissue culture methods. Subsequently, the strains which could inhibit pathogens of six main diseases of ginseng were screened with themselves and fermentation products. The results showed that 152 strains of endophytic bacteria and 46 strains of endophytic fungi were obtained. Sixteen bacteria strains and three fungal strains had an inhibitory effect on more than two pathogens after primary screening strains, and two bacteria strains and one fungal strain which could inhibit more than four pathogens were selected after fermentation products. Three strains were also found for the significant inhibition against *Botrytis cinerea* pathogen in the test.

Key words: *Panax ginseng*; endophyte; isolation; screening; antagonistic strain

植物内生菌(Plant endophyte)是指能够定殖在植物各种组织和器官的细胞间或细胞内、并与植物建立和谐联合关系的一类微生物, 包括真菌、细菌、放线菌等, 其与宿主植物经过长期的协同进化, 对宿主植物产生了许多生理作用, 例如抗病虫、促进生长、生物固氮以及作为外源基因载体等^[1-3]。目前, 病害的普遍发生是制约人参产业健康发展的重要因素, 化学药剂防治因其具有对有害生物高效、操作方便、适应性广、经济效益显著等特点而被长期广泛应用, 然而在使用过程中暴露出的人参农药残留超标、品质下降、出口率降低、病原菌抗药性产生以及污染生态环境等问题已经到了亟待解决的程度。因此, 国家《中

药材生产质量管理规范》明确指出, 提倡使用生防制剂, 其中植物内生菌作为一类具有生防功能的微生物资源, 已引起越来越多的研究学者的重视, 内生菌的来源、分离部位以及种类也越来越多样化。目前国内关于人参内生菌分离并用于防治植物病害的研究报道很少, 只见邱服斌等^[4]对人参根部分离获得的内生细菌ge21菌株进行了鉴定并发现菌株对尖孢镰刀菌等8种不同病原菌具有抑菌活性的报道。本研究从吉林省5个不同地区来源的健康人参植株中分离获得了内生细菌和内生真菌, 并对其中具有抑菌活性的内生菌株进行了筛选, 旨在丰富人参内生菌资源, 并为人参拮抗内生菌的进一步研究和在人参病害防治中

* 基金项目: 吉林农业大学科研启动基金项目(201007), 吉林农业大学博士科研启动基金项目(201005)

作者简介: 姜云, 女, 博士, 讲师, 研究方向: 农业微生物及其发酵工程。

收稿日期: 2012-04-12

网络出版时间: 2012-09-03 10:07

** 通讯作者

应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2010 年 6~9 月, 在吉林省通化县、集安市、临江市、抚松县和吉林农业大学人参种植基地 (ND) 5 个地区分别采集新鲜人参样品, 采集部位为整个植株, 生长期为 4 年。

供试 6 种靶标菌由吉林农业大学农学院植物病理实验室提供, 分别为人参锈腐病菌 (*Cylindrocarpon destructans*)、人参灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、人参菌核病菌 (*Sclerotinia schinseng*)、人参疫霉菌 (*Phytophthora cactorum*)、人参黑斑病菌 (*Alternaria panax*)、人参根腐菌 (*Fusarium solani*)。

内生真菌和靶标菌繁殖均采用普通马铃薯葡萄糖培养基 (PDA), 内生细菌的分离和培养采用牛肉膏蛋白胨培养基 (NA), NB 培养液; 细菌发酵培养基: 葡萄糖 20 g, 胰蛋白胨 5 g, 酵母粉 5 g, 牛肉膏 3.8 g, NaCl 5 g, CaCO₃ 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

1.2 方法

人参内生细菌的分离采用传统的平板培养法^[5], 将从不同地点采集的新鲜人参植株样品带回实验室, 先用自来水冲洗 3 min, 分别将健康人参样品的根、茎、叶各 3 g 用无菌水洗净后, 置于 99% 乙醇溶液中浸泡 1 min, 然后置于 3.125% 的次氯酸钠溶液中浸泡 6 min, 再置于 99% 乙醇溶液中浸泡 30 s, 最后用无菌水冲洗 5 次。样品用无菌吸水纸吸干后备用。吸取 50 μ L 最后一次洗涤水涂布在 NA 平板上, 置于 28 $^{\circ}$ C 培养箱培养 2 d, 作为空白对照组。将处理过的样品剪碎, 置于无菌研钵中, 加入 10 mL 无菌水后研磨, 吸取 50 μ L 上清液均匀涂布在 NA 平板上, 每个器官 3 个不同处理, 28 $^{\circ}$ C 条件培养 2~3 d, 根据菌落形态挑取不同类细菌, 纯化后的内生细菌接种于 NA 斜面培养基上, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

人参内生真菌的分离采用传统的组织块培养法^[6], 样品无菌处理同内生细菌, 处理好的样品用无菌吸水纸吸干后备用。将待分离的组织用无菌手术刀切成 0.5 mm \times 0.5 mm 大小的薄片, 置 PDA 平板上, 25 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 15~20 d, 根据菌落形态挑取不同真菌, 统计菌落数并进行纯化, 然后接种于 PDA 斜面培养基上, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。吸取 50 μ L 最后一次洗涤水涂布在 PDA 平板上, 置于 25 $^{\circ}$ C 培养箱培养 15~20 d, 作为空白对照组。

人参拮抗内生菌初筛采用混菌法^[7]对分离得到的 152 株内生细菌和 46 株内生真菌进行菌体抑菌活性的初筛, 将 1 mL 无菌水分别加入 6 种人参病害靶标菌

的 PDA 培养试管中, 用接种针将菌丝和孢子刮下, 分别制成菌悬液与 PDA 培养基 10 mL 混合后倒入 9 cm 的培养皿中制成含菌平板, 将 1 cm 直径内生细菌和内生真菌菌碟放入混好靶标菌的平板内, 25 $^{\circ}$ C 培养 2~4 d 后根据抑菌圈直径的大小筛选出抑菌活性好的菌株。

人参拮抗内生细菌的复筛采用打孔法^[7], 对初筛得到的菌株进行无菌发酵液拮抗性筛选。①将初筛得到的菌株分别接种于装有 50 mL NB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 12 h (80 r/min) 制成种子液; ②按 3% 的接种量, 将种子液接入 50 mL 细菌发酵培养基中, 于 28 $^{\circ}$ C 振荡培养 (150 r/min) 3 d; ③收集培养液离心 (10,000 r/min, 4 $^{\circ}$ C) 15 min 后得清液, 取上清液用 0.22 μ m 的无菌滤膜在超净工作台上过滤后备用, 得无菌发酵液。④用打孔器在混好靶标菌的 PDA 平板 (平板制备方法同上) 上打孔, 打孔器直径为 1 cm, 在孔中加入 200 μ L 无菌发酵滤液, 置 25 $^{\circ}$ C 培养 2~4 d 后测定抑菌圈直径。

人参拮抗内生真菌的复筛方法: ①将初筛得到的菌株分别接种于装有 100 mL 马铃薯葡萄糖培养液的 250 mL 三角瓶中, 25 $^{\circ}$ C 振荡培养 5 d (100 r/min); ②收集培养液离心 (10,000 r/min, 4 $^{\circ}$ C) 15 min 后得无菌发酵液。③打孔法同上。

2 结果与分析

2.1 人参内生菌的分离

本研究从吉林省 5 个地区采集的新鲜人参样品, 经分离、纯化、空白对照验证, 确认获得 152 株内生细菌。试验结果表明, 不同地区来源的人参样品中获得的菌株数量分布存在一定的差异, 临江菌株最多 (35 株), 通化最少 (26 株)。将分离得到的 152 株内生细菌在相同的条件下培养, 利用培养特征进行初步归类^[8], 培养特征主要包括单菌落含水状态, 菌落大小, 是否突起, 菌落透明度, 菌落与培养基结合程度, 菌落颜色及正反面颜色是否一致, 菌落边缘情况, 表面光滑与否等特征把分离得到的 152 株内生细菌初步分为 87 类 (图 1)。试验还对内生真菌进行了分离, 获得的数量相对较少, 在相同的培养条件下, 根据菌落的颜色及正反面颜色、气生菌丝的状态、菌落边缘情况^[9], 分离得到 46 株内生真菌。

2.2 人参拮抗内生菌的初筛

采用混菌法对分离得到的内生细菌和真菌进行菌体抑菌活性的筛选, 结果显示 (表 1, 图 2), 对 2 种以上病原菌具有抑菌活性的细菌为 16 株, 真菌 3 株。其中, 对人参灰霉病菌有抑菌作用的内生细菌最多, 为 11 株, 其次是对人参锈腐病菌为 10 株, 对人参根腐病菌和人参疫霉菌最少, 分别为 5 株和 4 株。

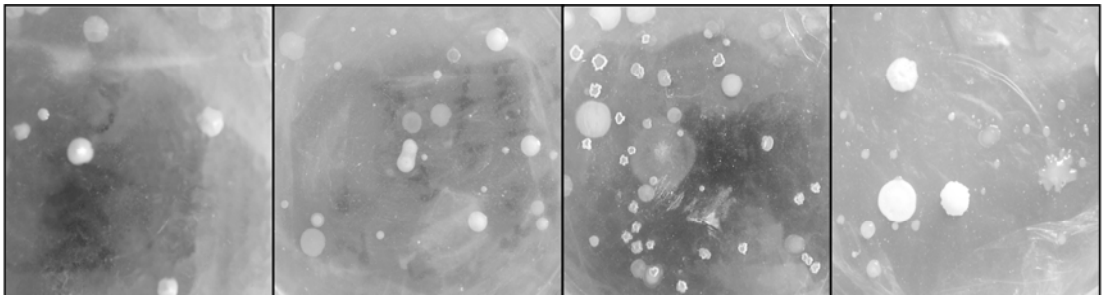


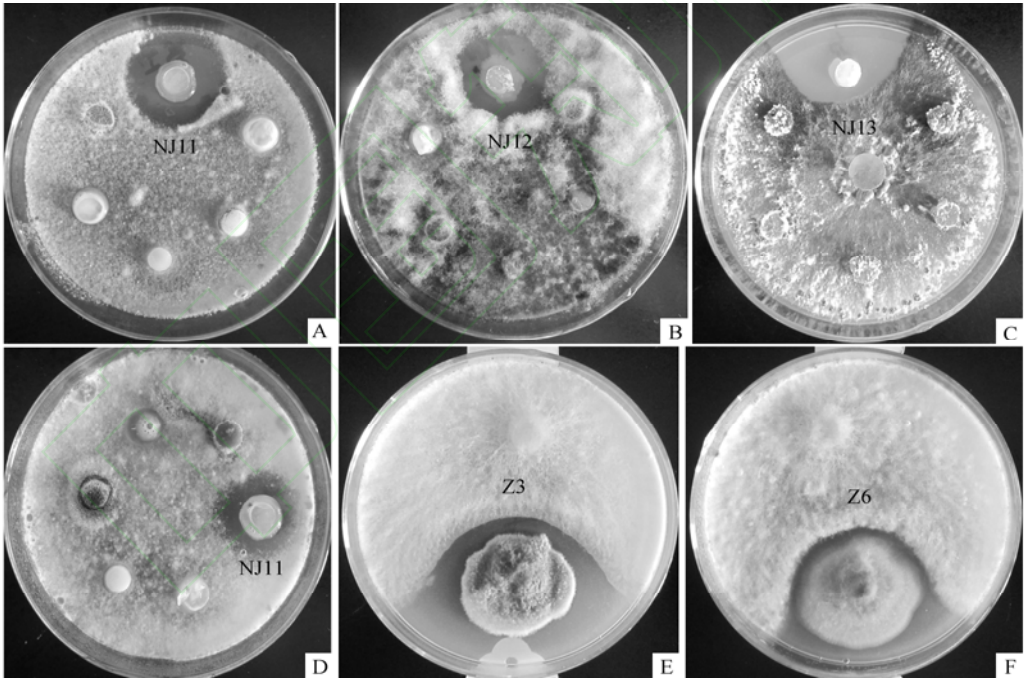
图 1 人参内生细菌分离结果
Fig 1. Isolation of different endophytic bacteria from *panax ginseng*

2.3 人参拮抗内生菌复筛

通过对初筛得到的内生细菌和真菌进行发酵液抑菌活性的复筛，得到对 2 种以上病原菌有抑菌活性的菌株 8 株，这 8 株内生菌对人参锈腐病菌均有作用，而对人参根腐病菌和人参疫霉病菌有抑菌作用的菌株较少（表 2）。结果显示（表 2 和图 3），对 4 种以上病原菌具有抑菌活性的细菌有 2 株，分别为 LY7 和 NJ13，其中 NJ13 对供试的 6 种病原菌均有抑菌作用，且效果较好；而内生真菌 Z3 对供试的 6 种病原

菌均有抑菌作用。此外，菌株 LY7、LY8 和 NY2 对于灰霉病菌的抑菌圈直径均>50 mm，说明此菌株的抑制效果明显好于其他处理。

TY1 发酵液相对于菌体减少了对灰霉病菌（*B. cinerea*）的抑制作用，LY8 发酵液相对于菌体增加了对黑斑病菌（*A. panax*）的抑制作用，LJ10、LY7、NJ4 和 NY2 对病原菌的抑菌情况变化较大，结果表明发酵后的抑菌效果与菌体的抑菌效果有着明显的区别。



A、B、C. *B. Cinerea*； D. *C. Destructans*； E. *S. schinseng*, F. *A. panax*.

图 2 人参拮抗内生菌株的初筛效果

Fig.2. The inhibitory effect of antagonistic endophyte from ginseng based on primary screening

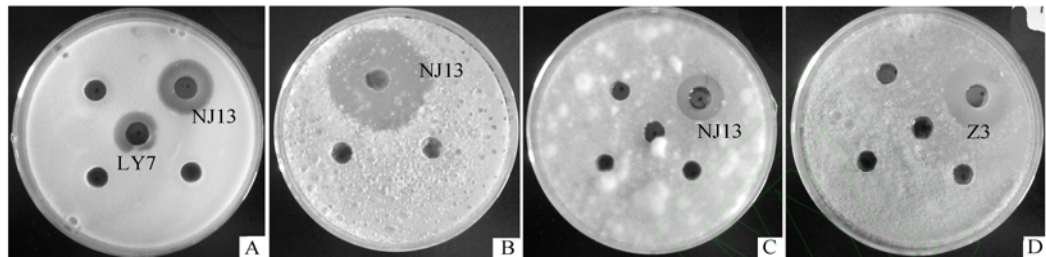
表 1 人参拮抗内生细菌初筛情况

Table 1. The results of antagonistic endophytic bacteria from ginseng based on primary screening

拮抗细菌 Antagonistic bacteria	抑菌效果 Inhibitory effect					
	锈腐病菌	灰霉病菌	菌核病菌	疫病病菌	黑斑病菌	根腐病菌
	<i>C. destructans</i>	<i>B. cinerea</i>	<i>S. schinseng</i>	<i>P. cactorum</i>	<i>A. panax</i>	<i>F. solani</i>
TY1	+	+			+	
JG6		+	+			
JG22	+	+				+
JG9			+	+		

LJ10	+			+		
LY6	+	+			+	+
LY7	+	+			+	+
LY8	+	+				
LY9	+	+			+	
FY7			+	+		
NG8		+	+			
NJ4	+		+			
NJ11	+	+			+	+
NJ12		+			+	
NJ13	+		+	+		+
NY2		+	+			

注：“+”代表拮抗内生细菌菌株对病原菌具有抑菌效果
Note: “+” indicates that antagonistic endophytic bacteria strains had an inhibitory effect on plant pathogens



A. *C. destructans*; B. *B. cinerea*; C. *F. solani*, D. *S. schinseng*

图 3 人参拮抗内生菌复筛效果

Fig. 3. The inhibitory effect of antagonistic endophyte from ginseng after secondary screening

表 2 人参拮抗内生菌的复筛情况

Table 2. The results of antagonistic endophyte from ginseng based on secondary screening

拮抗菌株 Antagonistic strains	抑菌圈直径/mm Inhibition circle diameter					
	锈腐病菌 <i>C. destructans</i>	灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	菌核病菌 <i>S. schinseng</i>	疫病菌 <i>P. cactorum</i>	黑斑病菌 <i>A. panax</i>	根腐病菌 <i>F. solani</i>
TY1	16				22	
LJ10	16				22	
LY7	16	50	18		24	
LY8	14	56			24	
NJ13	22	35	14	28	34	20
NJ4	16	14				
NY2	14	56			30	
Z3	18	34	20	30	26	16

3 讨 论

植物内生菌的分离一般采用组织研磨法和组织块法^[10]。本研究主要采用组织研磨法进行内生细菌的分离，共获得内生细菌 152 株，分离效果较好，空白对照均未发现有任何菌株生长，可以初步确定所分离得到的细菌为内生细菌，如需进一步确认，还需要进行定植检测^[11]；而真菌由于生长周期较长，采用研磨法分离的效果并不理想，因此试验采用了组织块法，最终分离获得了 46 株内生真菌。

拮抗菌株的筛选采用菌体初筛和发酵液复筛相结合的方法，其中菌体抑菌活性的初步筛选是先放弃一部分菌体本身就没有拮抗活性的菌株，缩小筛选范围，本试验初筛后发现不同菌株对于供试的 6 种人参主要病害病原菌均有不同的抑制作用，其中对人参锈腐病菌、菌核病菌、灰霉病菌和黑斑病菌具有抑菌活

性的菌株较多，而对人参根腐病菌和人参疫霉病菌有抑菌作用的菌株较少，说明在拮抗菌株间存在着靶标菌选择性，对于不同种类的病原菌抗菌谱存在差异。此外，本研究还发现，虽然诸如 LY8 和 NY2 等菌株的抑菌谱相对不广，但其对于灰霉病菌的抑菌活性却明显高于其他菌株，这也为研究和开发高效专化性活性产物奠定了基础。

将初筛得到的菌株进行发酵培养后，进一步开展了发酵液抑菌活性的筛选，得到对 4 种以上植物病原菌有抑菌活性的细菌 2 株，真菌 1 株，其中细菌 NJ13 和真菌 Z3 对供试的 6 种病原菌都有效果，抗菌谱广，说明菌株经过发酵培养后，发酵液中的抑菌成分抗菌性能要好于菌体本身，适合开展活性产物分离等后续试验，但室内试验还需要进行 1~2 年的田间试验进行验证^[12]，此结果为该菌株的应用和后续研究奠定了基础。

参考文献：

- [1] 胡桂萍,郑雪芳,尤民生,等. 植物内生菌的研究进展[J]. 福建农业学报, 2010, 25(2): 226-234.
- [2] 易婷,缪煜轩,冯永君. 内生菌与植物的相互作用: 促生与生物薄膜的形成[J]. 微生物学通报, 2008, 35(11): 1774-1780.
- [3] Di Fiore S. Endophytic bacteria and their possible role in the host plant. Istven F. *Azospirillum* VI and related microorganisms: genetics, physiology, ecology[M]. Heidelberg: Springer, 1995: 72-78.
- [4] 邱服斌,李雁津,张晓霞,等. 人参内生细菌ge21菌株的鉴定及抑菌活性测定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 43-47.
- [5] 饶小莉,沈德龙,李俊,等. 甘草内生细菌的分离及拮抗菌株鉴定[J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 700-704.
- [6] 徐丽莉,韩婷,李琳,等. 人参内生真菌的分离及其体外抗真菌、抗肿瘤活性[J]. 第二军医大学学报, 2009, 30(6): 699-702.
- [7] 周德庆. 微生物学实验手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1986:121-123.
- [8] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统分类和鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] Vargas C, Lopes A, Hemerly A. Variability and interactions between endophytic bacteria and fungi isolated from leaf tissues of citrus root stocks[J]. Can J Microbiol, 2001, 47 (3): 229-236.
- [10] Huang W Y, Cai Y Z, Xing J, et al. A potential antioxidant resource: endophytic fungi from medicinal plants[J]. Economic Botany, 2007, 61: 14-30.
- [11] 何红,邱思鑫,蔡学清,等. 辣椒内生细菌 BS-1 和 BS-2 在植物体内的定殖及鉴定[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 13-18.
- [12] 辜运富,张云飞,张小平. 一株抗玉米纹枯病内生细菌的分离鉴定及其抗病促生作用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1240-1245.