

甘草内生真菌分离及其抑菌活性初探

毕江涛¹, 王小霞², 陈卫民¹, 王 静¹, 贺达汉³

(1. 宁夏大学新技术应用研究开发中心, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021;
3. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

摘要:为了解药用植物甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)内生真菌资源多样性及其抑菌活性特征,通过组织块法对内生真菌进行分离,并选择小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)、枸杞黑果病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris*)、黄瓜立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)5种植物病原真菌和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)4种细菌作为供试指示菌,采用对峙法和改进的菌块法测定抑菌活性。试验结果显示,从甘草根、茎、叶中分离出20株内生真菌,其中根部最多,占分离菌株总数的65.0%,其次为茎部,叶部最少;经形态学初步分类鉴定归于2目2科5属,梭孢霉属为优势菌属,占分离菌株总数的70.0%;在分离的内生真菌中有15株菌对1种或1种以上供试植物病原真菌有不同程度的抑制作用,为分离内生真菌总数的75.0%,19株菌对1种或1种以上供试细菌有不同程度的抑制作用,为分离内生真菌总数的95.0%;有7株内生真菌对枯草芽孢杆菌拮抗性差异显著($P < 0.05$),有8株内生真菌对金黄色葡萄球菌拮抗性差异显著,有3株内生真菌对大肠杆菌拮抗性差异显著,有1株内生真菌对革兰氏阴性铜绿假单胞菌拮抗性差异显著,其中菌株RLEFR015对番茄灰霉病菌、金黄色葡萄球菌拮抗性差异显著,菌株RLEFR010对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌拮抗性差异显著,菌株RLEFR002对枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌供试细菌拮抗性差异显著;菌株RLEFR015、RLEFR002、RLEFR010均为梭孢霉属,为高活性菌株。甘草内生真菌具有多样性和抑菌活性,多数菌株对供试病原真菌和病原细菌具有拮抗性,对革兰氏阳性金黄色葡萄球菌和革兰氏阳性枯草芽孢杆菌拮抗性较强,预示着甘草内生真菌具有重要的资源价值。

关键词:药用植物;甘草;内生真菌;分离;抑菌活性

中图分类号:S567.7⁺1;S432.4⁺4

文献标识码:A

文章编号:1001-0629(2013)03-0357-08

* 1

内生真菌(*Endophytic fungi*)是指那些在其生活史中的某段时期生活在植物组织内,对植物组织没有引起病害症状的真菌^[1]。近年来,国内外学者已在多种植物,特别是药用植物中分离出内生真菌^[2-4],植物内生真菌不但对植物生长发育进行积极调控,而且能产生与宿主相同或相似的生理活性物质^[5-6],并具有抗菌、抗病毒、抗肿瘤、抗氧化、免疫抑制等生物活性,是植物天然代谢产物的重要来源^[7-9]。从植物中分离内生真菌,筛选具有活性的内生真菌及其天然产物作为药用植物替代资源的研究具有重要的意义^[10]。

甘草(*Glycyrrhiza uralensis*)属于豆科甘草属灌木状多年生草本植物,是我国干旱、半干旱地区重要的植物资源,在我国东北、华北、西北均有分布,主

产区主要在宁夏、甘肃、内蒙古。甘草耐旱、耐寒、耐盐碱、防风、固沙固土,是干旱半干旱荒漠地区优良的生态先锋植物,能够产生重要的生态效益。甘草作为一味古老的植物药,具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药、有抗癌抗病毒等药理作用^[11-12],在临床上用于治疗呼吸系统、消化系统、免疫系统等多种疾病。由于甘草对多种疾病表现了良好的预防和治疗作用且毒副作用较小,近年来对甘草潜在的多种药理活性的研究和挖掘一直是国内外药理界关注的重要议题。甘草作为我国乃至世界上重要的中药材,国内外需求量很大,随着甘草供需矛盾的日益增加,甘草野生资源日渐匮乏,市场供不应求,在这种供求矛盾紧张的情况下,对甘草资源的保护和利用势在必行^[13]。目前,人们已在甘草

的育种、栽培技术等方面开展了研究,但甘草人工种植周期长、组织培养技术尚不成熟,寻找新的可获取甘草有效成分的途径具有重要的现实意义。近年,国内外对于甘草内生真菌及其代谢产物的研究仍然处在起步阶段,王莉等^[14]对乌拉尔甘草内生真菌的分布和抑菌活性进行了研究,刘霞等^[15]采用组织块法对陕北野生甘草根中分离出的6株内生真菌发酵液进行了植物病原真菌的抑制活性测定,刘建利等^[16]对宁夏乌拉尔甘草中内生真菌多样性进行了初步研究。本试验在现有研究的基础上,根据植物-内生真菌共生理论及其甘草的生物学特性,对甘草内生真菌进行分离,并对其抑菌活性进行初步研究,以期为拓展甘草资源的综合利用途径提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 甘草于2010年10月初采自宁夏平罗,地理位置106°30'18" E, 38°23'57" N,海拔1 102 m。采样时挑选无病害健康植株,采集后48 h内利用75%乙醇和0.1%升汞进行表面消毒处理。

1.1.2 主要仪器 生化培养箱(STX-250)、超净工作台(HJ-CJ-2D)、生物显微镜(FL-107CCD)、湿热灭菌器(GMSX-280)、热空气消毒箱(GRX-9053A)。

1.1.3 培养基和试剂 营养琼脂培养基(蛋白胨10 g·L⁻¹、牛肉粉3.0 g·L⁻¹、氯化钠5.0 g·L⁻¹、琼脂15.0 g·L⁻¹)、马铃薯葡萄糖培养基(马铃薯浸粉5.0 g·L⁻¹、葡萄糖20.0 g·L⁻¹、琼脂15.0 g·L⁻¹、氯霉素0.1 g·L⁻¹)、乳酸石炭酸棉兰染色液(石炭酸20 g、甘油40 mL、乳酸20 mL、棉蓝0.05 g、蒸馏水40 mL)。

1.1.4 供试指示菌 供试植物病原真菌为小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)、枸杞黑果病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris*)和黄瓜立枯病菌(*Rhizoctonia solani*),由宁夏农林科学院植物保护研究所提供;供试细菌为革兰氏阳性菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),由西北农林科技大学无公害农药研究中心提供;革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)、革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和革兰氏阴性菌铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),由宁夏医科大学附属

医院检验科提供。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离和纯化 内生真菌的分离采用植物组织块法。首先将采集的植物材料用自来水冲洗进行预处理,去掉泥土和杂质,然后随机分别称取植物的根部、茎部、叶片置于3个直径为10 cm的无菌烧杯中,再依次用75%酒精漂洗1 min、无菌水漂洗3次,0.1%升汞漂洗3 min、无菌水漂洗3次,75%酒精漂洗30 s、无菌水漂洗5次进行表面消毒。消毒后的材料用无菌手术剪剪成叶(2~5) mm×(2~5) mm、根和茎5~10 mm的片段,分别置于PDA平板上,并用封口膜将培养皿密封,28℃进行避光培养3~5 d;同时,采用植物组织印记法^[17],将表面消毒的植物组织片段不经剪切直接在培养基表面轻抹,相同条件下培养作为对照,培养3 d后对照培养基中无真菌长出,证明表面消毒彻底,分离到的真菌是植物内生真菌。每皿接4~5个样品,重复3次,观察材料切口处长出的菌丝或菌落,取切口处菌丝,转接至新的PDA培养基上继续培养,采用尖端菌丝挑取法对所分离的内生真菌进行多次分离,最后将纯化后的菌株转接到PDA斜面上编号和保存^[18]。

1.2.2 内生真菌的形态观察与初步分类 用点植法在平板中接种纯化好的内生真菌菌株,然后观察菌落形态,并作常规镜检。首先从纯化培养3~5 d的菌落上挑取菌丝,用乳酸石炭酸棉兰染色液染色制成玻片,置于显微镜下观察菌丝形态、孢子梗形态、孢子形态以及孢子与营养体着生关系,对照《真菌鉴定手册》^[19]、《半知菌图解》^[20]等有关资料初步确定真菌的分类学地位至属。

1.2.3 病原菌拮抗内生真菌的初步筛选 供试植物病原真菌的拮抗作用分析采用平板对峙培养法^[21-23],将5种植物病原真菌分别接种于PDA平板中央,分离的内生真菌按3~4点接种于平板边缘,距病原真菌25 mm,距培养皿边缘距离不得小于10 mm,以只接病原真菌的平板作对照,处理和对照均设3次重复,置于28℃下恒温避光培养4 d后观察病原真菌菌落的变化,测定内生真菌对病原真菌的拮抗带宽度,以拮抗带宽度平均值作为内生真菌拮抗活性强弱的指标^[24-25],初步筛选出对植物病原真菌生长具有拮抗作用的内生真菌。

供试细菌的拮抗作用初步筛选采用改进的菌块

法^[26-27],按无菌操作法分别接入 2~3 环供试细菌于培养皿中,取融化并保温在 45 ℃ 左右的 NA 培养基倒入 90 mm 无菌培养皿中制成平板,以手搓法轻轻摇动使其混匀,待培养基稍微凝固后用灭菌接种环取内生真菌菌饼 3~4 块,直径约 5 mm,分 3~4 点等距离均匀放置,菌饼距培养皿边缘距离不得小于 10 mm,小心放入培养基中,使菌块带菌丝的一面贴在培养基表面,用封口膜密封后将培养皿置低温 10 ℃ 以下保持 12~14 h,然后将皿置于 28 ℃ 下恒温培养 3~5 d,观察内生真菌对病原细菌的拮抗作用,测定抑菌圈的直径,以抑菌圈直径大小的平均值作为内生真菌拮抗活性强弱的指标^[28-30]。

1.2.4 数据处理 病原菌拮抗带宽度大小和抑菌圈直径均为 3 次重复试验的平均值,以平均数±标准偏差表示,以对不同病原菌拮抗活性为效应变量,不同菌株病原菌拮抗活性比较采用单因素方差分析,以检验不同菌株拮抗活性之间的差别是否有统计意义,统计分析利用 SPSS 13.0 软件进行。

2 结果与分析

2.1 内生真菌菌株分布和种类构成 从甘草根、茎、叶中总共分离到内生真菌 20 株,其中根部 13 株、茎部 6 株、叶部 1 株,分别为分离菌株总数量的 65.0%、30.0%、5.0%(表 1)。

通过内生真菌菌落和菌株显微形态特征观察,将分离的内生真菌初步鉴定为 2 目 2 科 5 属(表 2),其中丝孢目有内生真菌 16 株,无孢目有 4 株,分别为所分离菌株总数的 80.0%和 20.0%。丝孢目中分离的菌株归于 3 个属,其中梭孢霉属 14 株,为分离菌株总数的 70.0%,为优势菌属;无孢目菌株归于 2 个属,为束丝菌属和组丝核菌属。

2.2 内生真菌抑活性 拮抗试验表明,15 株内生真菌对 1 种或 1 种以上供试植物病原真菌有不同程度的拮抗作用,为分离菌株数量的 75.0%(表 3)。

方差分析显示,内生真菌菌株对番茄灰霉病菌、黄瓜立枯病菌、小麦全蚀病菌拮抗活性差异显著($P<0.05$),内生真菌菌株对黄瓜枯萎病菌和枸杞黑果病菌拮抗活性差异不显著($P>0.05$),不同菌株多重比较结果表明,内生真菌对番茄灰霉病菌拮抗活性中,菌株 RLEFR015 与其他所有不同菌株比较拮抗活性差异显著($P<0.05$),菌株 RLEFR003 与其他无拮抗活性的菌株相比较,拮抗活性差异显

著($P<0.05$),但与菌株 RLEFR004、RLEFR006、RLEFS001、RLEFS002、RLEFS005 之间相比较,拮抗活性差异不显著($P>0.05$)。

同样,内生真菌对黄瓜立枯病菌拮抗活性中,菌株 RLEFR002、RLEFR003、RLEFR004、RLEFR007、RLEFS001 与其他菌株比较,拮抗活性差异显著($P<0.05$),但这 5 株菌之间差异不显著($P>0.05$)。

内生真菌对小麦全蚀病菌拮抗活性中,菌株 RLEFR003、RLEFR004、RLEFR007、RLEFS002、RLEFS003、RLEFS007 与其他菌株之间比较,拮抗活性差异显著($P<0.05$),但这 6 株菌之间差异不显著($P>0.05$)。

所有分离的内生真菌对 5 种病原真菌的拮抗活性中,菌株 RLEFR015 对番茄灰霉病菌拮抗活性差异显著,拮抗带宽度平均值为 5.67 mm,为高活性菌株。

表 1 甘草内生真菌菌株分布
Table 1 Distribution of isolates of endophytic fungi from *Glycyrrhiza uralensis*

分离部位 Isolation section	菌株编号 Strain number	属 Genus
根 Root	RLEFR001	束丝菌属 <i>Ozonium</i>
	RLEFR002	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR003	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR004	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR005	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR006	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR007	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR009	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR010	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR012	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR013	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR015	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFR019	组丝核菌属 <i>Phacodium</i>
茎 Stem	RLEFS001	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFS002	组丝核菌属 <i>Phacodium</i>
	RLEFS003	组丝核菌属 <i>Phacodium</i>
	RLEFS004	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>
	RLEFS005	曲霉属 <i>Aspergillus</i>
	RLEFS007	皮思霉属 <i>Pithomyces</i>
叶 Leaf	RLEFL002	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>

注:“RL”甘草;“EF”内生真菌;“R”根;“S”茎;“L”叶。
Note:Radix liquiritiae short for “RL”,Endophytic fungi for “EF”,Stem for “S”,Leaf for “L”.

表 2 甘草分离内生真菌菌属构成

Table 2 The genera of fungal endophytic isolates from *Glycyrrhiza uralensis*

目 Order	科 Family	属 Genus	菌株数量 Strain quantity			合计/株 Total strains
			根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	
孢目	无孢科	束丝菌属 <i>Ozonium</i>	1	0	0	1
Agnomycetales	Agonomycetaceae	组丝核菌属 <i>Phacodium</i>	1	2	0	3
丝孢目	丛梗孢科	梭孢霉属 <i>Fusidium</i>	11	2	1	14
		曲霉属 <i>Aspergillus</i>	0	1	0	1
		皮思霉属 <i>Pithomyces</i>	0	1	0	1
Hyphomycetales	Moniliaceae					

表 3 甘草内生真菌抑制植物病原真菌活性

Table 3 The antifungal activities of isolated endophytic fungi from *Glycyrrhiza uralensis* mm

菌株编号 Strain number	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporium</i> f. sp. cucumeris	枸杞黑果病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	黄瓜立枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	小麦全蚀病菌 <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>
RLEFR001	0.00±0.00c	0.00±0.00b	1.67±2.89a	0.00±0.00a	0.00±0.00b
RLEFR002	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	1.33±0.58a	0.00±0.00b
RLEFR003	2.00±2.65b	0.00±0.00b	1.33±1.16a	1.33±0.58a	1.33±1.16a
RLEFR004	0.67±1.16b	0.33±0.58a	2.33±2.08a	1.33±0.58a	2.67±1.16a
RLEFR005	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFR006	1.33±2.31b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFR007	0.00±0.00c	0.00±0.00b	2.33±2.08a	1.00±0.00a	3.67±3.06a
RLEFR009	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFR010	0.00±0.00c	0.00±0.00b	2.67±2.52a	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFR012	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFR013	0.00±0.00c	0.00±0.00b	2.67±1.16a	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFR015	5.67±0.58a	0.00±0.00b	2.67±4.62a	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFR019	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFS001	1.00±1.73b	0.00±0.00b	0.67±1.16a	1.33±2.31a	0.00±0.00b
RLEFS002	0.67±1.16b	0.00±0.00b	1.33±1.16a	0.00±0.00b	0.67±1.16a
RLEFS003	0.00±0.00c	0.67±1.16a	4.00±5.29a	0.00±0.00b	4.00±5.29a
RLEFS004	0.00±0.00c	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFS005	0.67±1.16b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b	0.00±0.00b
RLEFS007	0.00±0.00c	1.00±1.73a	0.33±0.58a	0.00±0.00b	3.67±3.51a
RLEFL002	0.00±0.00c	1.33±2.31a	2.33±4.04a	0.00±0.00b	0.00±0.00b

注:表中值为平均值±标准偏差。同列数字后面标有不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Data are means±SD. Different lower case letters within the same column mean significant difference at 0.05 level. The same below.

在分离的内生真菌中 19 株菌对 1 种或 1 种以上供试细菌有不同程度的拮抗作用,为分离内生真菌菌株数的 95.0%(表 4)。经方差分析,菌株对供试枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌拮抗活性差异显著($P<0.05$),不同菌株多重比较表明,在内生真菌对枯草芽孢杆菌拮抗活性中,菌株 RLEFS002 与其他菌株比较,拮抗活性差异显著($P<0.05$),其抑菌圈直径达 40.67 mm;菌株 RLEFR002、RLEFR004、RLEFR019、RLEFR006、RLEFR007、RLEFR013 与其他菌株比较,

拮抗活性差异显著($P<0.05$),但这 6 株菌之间比较差异不显著($P>0.05$)。

内生真菌对大肠杆菌拮抗活性中,菌株 RLEFR001、RLEFR009、RLEFR010 与其他菌株比较,拮抗活性差异显著($P<0.05$),但这 3 株菌之间比较差异不显著($P>0.05$)。

内生真菌对金黄色葡萄球菌拮抗活性中,菌株 RLEFR002、RLEFS004、RLEFR005、RLEFR006、RLEFR010、RLEFR015、RLEFS005、RLEFS007 与其他菌株比较,拮抗活性差异显著($P<0.05$),但这

8 菌株之间比较差异不显著($P>0.05$)。内生真菌对铜绿假单胞菌拮抗活性中,菌株 RLEFR012 与其他菌株比较,拮抗活性差异显著($P<0.05$)。

在分离的内生真菌中,7 株内生真菌对枯草芽孢杆菌拮抗活性差异显著($P<0.05$),占分离菌株

总数的 35.0%,3 菌株对大肠杆菌拮抗活性差异显著,占分离菌株总数的 15.0%;8 菌株对金黄色葡萄球菌拮抗活性差异显著,占分离菌株总数的 40.0%,1 菌株对铜绿假单胞菌拮抗活性差异显著,占分离菌株总数的 5.0%。

表 4 甘草内生真菌拮抗病原细菌活性

Table 4 The antibacterial activity of isolated endophytic fungi from *Glycyrrhiza uralensis*mm

菌株编号 Strain number	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>	铜绿假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RLEFR001	0.00±0.00d	24.33±13.43a	0.00±0.00c	0.00±0.00c
RLEFR002	22.33±3.79b	4.67±4.16b	29.67±6.03a	2.67±4.62b
RLEFR003	0.00±0.00d	0.00±0.00c	8.00±13.86b	0.00±0.00c
RLEFR004	26.00±6.25b	0.00±0.00c	0.00±0.00c	2.33±4.04b
RLEFR005	0.00±0.00d	6.67±5.77b	22.67±21.60a	0.00±0.00c
RLEFR006	19.67±4.62b	4.00±6.93b	23.67±4.16a	0.00±0.00c
RLEFR007	23.67±1.53b	0.00±0.00c	17.33±15.04b	0.00±0.00c
RLEFR009	0.00±0.00d	17.00±3.61a	0.00±0.00c	0.00±0.00c
RLEFR010	16.00±2.00c	19.33±1.53a	30.00±7.00a	0.00±0.00c
RLEFR012	0.00±0.00d	0.00±0.00c	0.00±0.00c	7.00±6.25a
RLEFR013	21.00±5.29b	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
RLEFR015	0.00±0.00d	0.00±0.00c	23.67±1.53a	0.00±0.00c
RLEFR019	19.67±2.08b	7.00±12.12b	19.67±4.73b	0.00±0.00c
RLEFS001	0.00±0.00d	0.00±0.00c	0.00±0.00c	0.00±0.00c
RLEFS002	40.67±5.86a	7.33±12.70b	14.33±24.83b	0.00±0.00c
RLEFS003	0.00±0.00d	0.00±0.00c	9.00±7.81b	0.00±0.00c
RLEFS004	0.00±0.00d	0.00±0.00c	21.33±2.08a	0.00±0.00c
RLEFS005	0.00±0.00d	0.00±0.00c	24.33±1.16a	0.00±0.00c
RLEFS007	15.00±1.73c	2.00±3.46b	24.67±4.04a	0.00±0.00c
RLEFL002	0.00±0.00d	5.00±4.36b	0.00±0.00c	0.00±0.00c

2.3 高活性菌株菌属分布 抑菌活性结果显示,内生真菌菌株 RLEFR015 对供试病原真菌番茄灰霉病菌和对金黄色葡萄球菌拮抗活性差异显著($P<0.05$),该菌株为梭孢霉属;内生真菌菌株 RLEFR010 对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌两种供试细菌拮抗活性差异显著($P<0.05$),为梭孢霉属;菌株 RLEFR002 对枯草芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌两种供试细菌拮抗活性差异显著($P<0.05$),属于梭孢霉属;这 3 菌株对供试病原菌拮抗活性差异显著,均为梭孢霉属。

3 讨论

内生真菌普遍存在于植物中,且具有多样性特征^[31]。不同植物体内分离到的内生真菌种类和数量有一定的差别,即使是同一种植物,可分离到的内生真菌通常为数十种,有的甚至多达数百种^[32],造成这种差异可能与植物不同品种、生境、体内微环

境、表面消毒程序、分离方法、培养基种类等因素有关。宋素琴等^[33]对采自新疆的健康野生胀果甘草(*G. inflata*)不同组织中内生真菌进行分离,纯化得到两株内生真菌,分属于青霉属和镰刀菌属;李文军等^[34]分离了新疆胀果甘草中的内生真菌,从甘草根、茎、叶中分离得到 108 株内生真菌,分属于 6 个属;刘建利等^[16]从宁夏乌拉尔甘草的根、茎、叶中分离出 136 株内生真菌,对产孢的 53 株内生真菌进行初步鉴定,分属于 6 个属,其中链格孢属、曲霉属和青霉属为优势种群。本研究从甘草根、茎、叶中共分离到内生真菌 20 株,不同组织部位的内生真菌数量存在较大差异,分布特点为根、茎、叶中数量递减,其与刘建利等^[16]所分离的内生真菌分布结果相同;同时该研究分离得到的内生真菌分别属于 5 个属,梭孢霉属为优势种群。可见,不同分离方法和程序以及宿主生境的不同会在一定程度上影响分离内生真

菌的数量和种类构成。另外,本研究仅仅采用常规培养法进行培养,且为了确保分离菌株的内生性,消毒时间严格,可能因此使得很多内生真菌被杀死,供试甘草中可能还有未分离到的内生真菌,在后续试验中要进一步摸索更为合适的分离方法,保证内生真菌分离种类的多样性和可靠性。

本研究中所用的培养基均为常规分离用的培养基,可能有的内生真菌不能在人工培养基上生长,并且对内生真菌的鉴定只是根据菌株形态学特征初步鉴定到属,在今后的研究中如结合非培养方法对内生真菌多样性进行研究,可能结果会更科学^[35]。

利用菌块对峙法初步筛选病原菌拮抗菌优点是直观、简便、成本低、不失为一种体外有效筛选活性内生真菌的方法,其拮抗带宽度或抑菌圈直径是评价抑菌活性的重要参考指标。王艳红等^[25]采用改进的对峙培养法研究了药用植物温郁金(*Curcuma wenyujin*)一株内生真菌(*Chaetomium globosum* L18)对几种常见植物病原菌的拮抗作用,其中对番茄灰霉病菌平均抑菌带宽度只有 0.2 mm,但对玉米弯孢叶斑病菌平均抑菌带宽度达到 10.2 mm。本研究中分离的内生真菌菌株 RLEFR015 对番茄灰霉病菌平均抑菌带宽度达 5.67 mm,对其他病原真菌抑菌带宽度较低。因此,即使是同一菌株对不同病原真菌抑菌活性也存在差异。

王玉君等^[30]通过抑菌圈扩散法测定了远志(*Polygala tenuifolia*)内生真菌对 14 种指示菌的抑菌活性,并将抑菌圈直径范围设为 ≤ 10 mm、 $10 \sim 15$ mm、 > 15 mm,发现远志内生真菌对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌等 5 种指示菌抑菌效果较好,抑菌圈直径均大于 15 mm,这与本研究中内生真菌对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色假单胞菌抑菌圈直径均大于 15 mm 的结果相吻合。

秦盛等^[36]从仙人掌(*Opuntia*)分离出内生真菌进行抑菌活性研究,发现 3 种仙人掌内生真菌抑菌活性的分布存在一定的差别,其中元江仙人掌(*O. microdasys*)内生真菌的中等活性菌株(抑菌圈直径 $10 \sim 15$ mm)所占比例最高,低活性菌株(抑菌圈直径 < 10 mm)与高活性菌株(抑菌圈直径 > 15 mm)所占比例较高,而墨西哥仙人掌(*O. ficusindica*)内生真菌中 3 种活性菌株数目相当,这与本研究所分离的内生真菌抑菌活性的分布存在一定的差异相符合,是甘草内生真菌多样性在抑菌活性方面的体现。

当然,利用菌块对峙法进行抑菌活性筛选,由于内生真菌可能与供试指示菌的生长速度不同,容易造成彼此之间的干扰,同时培养种类对微生物中活性物质的产生有重要影响,选择哪种或者哪几种培养基的发酵液进行活性检测,实现高效筛选,还需在今后的研究工作中对初步试验结果进一步进行验证和优化。

某些药用植物内生菌形成与宿主植物相同或相似的代谢途径,产生一些抗菌、抗病毒等活性物质^[37]。甘草对革兰氏阳性球菌、革兰氏阳性芽孢杆菌、一些真菌和原虫有较强大的抑制活性,其中对耐药性金黄色葡萄球菌抑菌作用在中医临床上具有重要意义^[38]。本研究分离的 20 株内生真菌中,有 15 株内生真菌对 1 种或多种供试植物病原真菌有不同程度的抑制作用,有 19 株内生真菌对 1 种或多种供试细菌有不同程度的抑制作用,甘草内生真菌对真菌和细菌具有抑制作用,与以上研究结果基本一致。另外,陈丽艳等^[39]研究了甘草根茎乙醇提取物对 5 种细菌和两种真菌的抗菌活性,结果表明,甘草根茎乙醇提取物对革兰氏阳性菌非常敏感,而对革兰氏阴性菌和真菌不敏感。王丽等^[40]从乌拉尔甘草的根、茎中共分离出 54 株内生真菌,抑菌试验得到 20 株活性菌株,其抗菌活性主要表现为对枯草芽孢杆菌和酒精酵母的抗性,高活性菌株对枯草芽孢杆菌的抑菌圈达 27.18 mm。本研究的抑菌试验中,有 7 株菌对枯草芽孢杆菌拮抗活性差异显著,占分离菌株总数的 35.0%,有 8 株菌对金黄色葡萄球菌拮抗活性差异显著,占分离菌株总数的 40.0%,有 3 株菌对大肠杆菌拮抗活性差异显著,占分离菌株总数的 15.0%,有 1 株菌对革兰氏阴性铜绿假单胞菌拮抗活性差异显著,占分离菌株总数的 5.0%,说明甘草内生真菌对革兰氏阳性球菌、革兰氏阳性芽孢杆菌拮抗活性较强,对革兰氏阴性菌敏感性较差,同时也表明甘草内生真菌能够产生抗菌活性物质,这可能与甘草有效成分的药理作用有密切关系,预示着其开发和利用的可行性。

4 结论

药用植物甘草内生真菌具有多样性,其不同组织部位内生真菌的分布存在差异。甘草内生真菌对植物病原真菌和人类病原细菌具有拮抗活性,对革兰氏阳性球菌、革兰氏阳性芽孢杆菌拮抗活性较强,甘草内生真菌具有重要的资源价值。

参考文献

- [1] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1):148-152.
- [2] 孙剑秋, 郭良栋, 臧威, 等. 药用植物内生真菌多样性及生态分布[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2008, 38(5): 475-484.
- [3] 陈苹, 戴好富, 解修超, 等. 海南粗榧内生真菌的分离与初步鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(9):1455-1460.
- [4] Huang W Y, Cai Y Z, Hyde K D, *et al.* Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants [J]. Fungal Diversity, 2008, 33:61-75.
- [5] 姚玉秀, 魏希颖. 药用植物内生真菌生物活性及其成分研究[J]. 药用生物技术, 2011, 18(2):185-188.
- [6] Aly A H, Debbab A, Kjer J, *et al.* Fungal endophytes from higher plants: A prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products [J]. Fungal Diversity, 2010, 41(1):1-16.
- [7] Jalgaonwala R E, Mohite B V, Mahajan R T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi[J]. Journal of Microbial Biotechnology Research, 2011, 1(2):2-32.
- [8] Tenguria R K, Khan F N, Quereshi S. Endophytes-mines of pharmacological therapeutics[J]. World Journal of Science and Technology, 2011, 1(5):127-149.
- [9] Gunatilaka A A. Natural products from plant-associated microorganisms: Distribution, structural diversity, bioactivity, and implication for their occurrence [J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(3):50-526.
- [10] 赫荣乔. 植物内生菌成为我国当前微生物研究领域的热点[J]. 微生物学通报, 2009, 36(1):1.
- [11] 陈海娇. 北药甘草的药理学研究进展[J]. 吉林农业科技学院学报, 2006, 15(2):15-18.
- [12] 王敏. 甘草研究综述[J]. 齐鲁药事, 2005, 24(10): 614-616.
- [13] 朱强, 王俊, 梁文裕. 宁夏珍稀濒危药用植物资源及其保护[J]. 中国野生植物资源, 2009, 28(1):12-16.
- [14] 王莉, 刘磊, 韩素贞. 乌拉尔甘草内生真菌拮抗菌株的筛选和鉴定[J]. 生物技术通报, 2009(6):155-158.
- [15] 刘霞, 党峰峰, 贺晓龙, 等. 陕北野生甘草内生菌的分离及抑菌活性筛选[J]. 西北植物学报, 2010, 30(10): 2110-2115.
- [16] 刘建利, 曹君迈, 马文平. 宁夏乌拉尔甘草内生菌鉴定及甜瓜菜后病害病原拮抗菌的筛选[J]. 干旱地区农业研究, 2011, 29(1):252-256.
- [17] 何佳, 刘笑洁, 赵启美, 等. 植物内生真菌分离方法的研究[J]. 食品科学, 2009, 30(15):180-183.
- [18] 王家明, 宋亚琼, 刘宏亮, 等. 雷公藤内生真菌的分离鉴定及抗肿瘤活性菌株筛选[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(5):145-148.
- [19] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1982:405-649.
- [20] Barnnnet H L, Hunter B B. 半知菌属图解[M]. 沈崇尧, 译. 北京: 科学出版社, 1977:64-211.
- [21] 袁保红, 杜青平, 邓祖军. 小连翘内生真菌种群分布及其抗菌性研究[J]. 广东药学院学报, 2007, 23(3): 307-311.
- [22] 张苗苗, 张蓉, 王生荣. 高寒草地植物内生真菌的分离及其抑菌活性初探[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(7): 3072-3075.
- [23] 蔡永欣, 花日茂, 柏钰, 等. 喜树内生真菌的分离及其对植物病原菌的抑制作用测定[J]. 安徽农业大学学报, 2010, 37(4):748-752.
- [24] 江曙, 陈代杰, 戈梅, 等. 药用植物内生真菌抗菌活性的筛选[J]. 药物生物技术, 2006, 13(5):351-354.
- [25] 王艳红, 吴晓民, 朱艳萍, 等. 温郁金内生真菌 *Chaetomium globosum* L18 对植物病原菌的抑菌谱及拮抗机理[J]. 生态学报, 2012, 3(7):2040-2046.
- [26] 程丽娟, 薛泉宏. 微生物学实验技术[M]. 西安: 世界图书出版公司, 2000:104-105.
- [27] 孙奎, 苏印泉. 无花果内生真菌的抑菌活性研究[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(23):12455-12459.
- [28] 苏印泉, 朱红薇, 马希汉, 等. 杜仲内生真菌的抑菌活性筛选[J]. 西北植物学报, 2005, 25(6):1153-1157.
- [29] 张秀环, 梅文莉, 陈苹, 等. 白木香内生真菌的分离鉴定及其抑菌活性[J]. 微生物学杂志, 2009, 2(3): 6-10.
- [30] 王玉君, 崔晋龙, 苏红, 等. 远志内生真菌抑菌活性筛选[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3):404-411.
- [31] Rodriguez R L, White Jr J F, Arnold A E, *et al.* Fungal endophytes: Diversity and functional roles [J]. New Phytologist, 2009, 182(2):1-17.
- [32] 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9):881-892.
- [33] 宋素琴, 欧提库尔·玛合木提, 张志东, 等. 新疆胀果甘草内生菌的分离和鉴定[J]. 微生物学通报, 2007, 34(5):867-870.
- [34] 李文军, 郑素慧, 毛培宏, 等. 新疆胀果甘草内生菌的分离及产甘草酸菌株的筛选[J]. 生物技术, 2008, 18(5):28-31.
- [35] Arnold A E, Henk D A, Eells R L, *et al.* Diversity and phylogenetic affinities of foliar fungal endophytes in lobby pine inferred by culturing and environmental

- PCR[J]. *Mycologia*, 2007, 99(2):185-206.
- [36] 秦盛, 邢珂, 吴少华, 等. 3 种仙人掌植物内生真菌抑菌活性研究[J]. *中草药*, 2006, 37(6):917-921.
- [37] 陈雪英, 都晓伟, 李滨. 内生菌与药用植物活性成分相关性研究进展[J]. *国外医药·植物药分册*, 2008, 23(2):47-51.
- [38] 张明发, 沈雅琴. 甘草抗菌和抗原虫药理研究进展[J]. *临床药物治疗杂志*, 2009, 7(2):49-53.
- [39] 陈丽艳, 施晓光, 付玉杰, 等. 甘草根茎乙醇提取物抗菌活性研究[J]. *植物研究*, 2006, 26(2):229-232.
- [40] 王丽, 刘磊, 韩素贞. 乌拉尔甘草内生真菌拮抗菌株的筛选和鉴定[J]. *生物技术通报*, 2009(6):155-158.

Isolation of endophytic fungi from medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis* and its microbial inhibition activity

BI Jiang-tao¹, WANG Xiao-xia², CHEN Wei-min¹, WANG Jing¹, HE Da-han³

(1. Research and Development Center for New Techniques, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

3. School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

Abstract: In order to explore the resource diversity and microbial inhibition activities of endophytic fungi from medicinal plant *Glycyrrhiza uralensis*, the endophytic fungi were isolated from root, stem and leaf of the host by tissue inoculation culture, the five kinds of pathogenic fungi, *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporium* f. sp. *cucumeris*, *Rhizoctonia solani*, and the four kinds of bacteria, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, were used as indicators to test microbial inhibition activities of the isolates by agar plate antagonistic action and modified agar gel diffusion methods. The results indicated that twenty endophytic fungi strains were isolated from the root, stem and leaf as a whole, and the most isolates came from the root, making up 65.0% of the total, then from stem, and leaf as the least; Based on morphological characters, the isolated strains attribute to two genera, two families and five orders, and *Fusidium* sp. was the dominant genera, amounting to 85.0% of the total isolates; For the isolated strains fifteen strains had antifungal activities against one or more pathogenic fungi, accounting for 75.0% of the total isolates, nineteen strains showed antibacterial activities to one or more bacterial indicators, taking up 95.0% of the total isolates; There were seven strains showed inhibition activities to *B. subtilis*, and eight strains had inhibition activities to *S. aureus* and three strains expressed inhibition activities to *E. coli* and one strain to *P. aeruginosa*; Of which the strain RLEFR015 had significant differences statistically for microbial inhibition activity against *B. cinerea*, *S. aureus* ($P < 0.05$), the strain RLEFR010 had significant differences statistically for microbial inhibition activity against *E. coli* and *S. aureus* ($P < 0.05$), the strain RLEFR002 had significant differences statistically for microbial inhibition activities against *B. subtilis* and *S. aureus* ($P < 0.05$), the strains, RLEFR015, RLEFR010, RLEFR002, belonging to *Fusidium* sp. were strong bioactive isolates. The endophytic fungi isolated from the host showed diversity and antimicrobial activities, and majorities of the strains isolated from the host had antimicrobial activities against pathogens, inclined towards being more antagonistic to *S. aureus* and *B. subtilis*, and all that indicated that endophytic fungi from *G. uralensis* have important resource value.

Key words: medicinal plant; *Glycyrrhiza uralensis*; endophytic fungi; isolation; microbial inhibition activity