

赵媛,云梅,杨国柱,等. 对叶红景天内生菌抗病菌株筛选及培养条件优化[J]. 江苏农业科学,2018,46(17):102-105.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.17.025

# 对叶红景天内生菌抗病菌株筛选及培养条件优化

赵媛<sup>1</sup>,云梅<sup>1</sup>,杨国柱<sup>1</sup>,段晓明<sup>2</sup>

(1. 青海大学生态环境工程学院,青海西宁 810016; 2. 青海大学农牧学院,青海西宁 810016)

**摘要:**以对叶红景天(*Rhodiola subopposita*)为研究对象,对对叶红景天植株材料进行处理,从对叶红景天的根、茎、叶中分离得到 24 株对叶红景天内生菌,其中真菌 5 株、细菌 12 株、放线菌 7 株。以蚕豆荚枯萎病病原菌、菜豆黑斑病病原菌、茄镰刀菌 I、茄镰刀菌 II 这 4 种植物病原菌为靶标菌,通过平板对峙法测定其抑菌活性。结果表明,对叶红景天中有比较丰富的具有抗菌活性的内生菌,24 株菌中有 12 株菌对蚕豆荚枯萎病病原菌、菜豆黑斑病病原菌、茄镰刀菌 I、茄镰刀菌 II 有不同程度的抑菌作用;并选取其中抑菌活性最高的放线菌 G5 菌株进行培养条件优化,得出最佳碳源为乳糖、最佳氮源为大豆蛋白胨、最适磷酸盐为 0.30% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、最适金属离子为 0.30% NaCl,与基础培养基相比优化培养基的抑菌活性提高了 30.06%。

**关键词:**对叶红景天;植物内生菌;抑菌活性;抗病菌株筛选;培养基优化

**中图分类号:** Q949.751.1;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)17-0102-04

对叶红景天(*Rhodiola subopposita*)为景天科(Crassulaceae)红景天属(*Rhodiola* L.)植物,是多年生草本植物,也是我国特有的植物,主要分布在青海省、东北地区、甘肃省、新疆维吾尔自治区、四川省、西藏自治区、云南省、贵州省等地<sup>[1]</sup>,野生资源有限。研究发现,红景天不仅有抗缺氧、抗寒冷、抗疲劳、抗微波辐射、抗菌等显著功能,还有延缓机体衰老、防止老年疾病等功能<sup>[2]</sup>。内生菌为能定植在植物组织间隙或细胞内部,并且能与宿主植物建立起共栖、互惠共生、共养等一系列关系的微生物<sup>[3]</sup>。作为植物微生态系统的重要组成部分,植物内生菌构筑了宿主植物的健康屏障。内生菌生物防治植物病害的主要机制包括分泌抗菌物质、竞争生态位及诱导植物抗性等<sup>[4]</sup>,还可以通过促进植物生长达到抗病效果。因此,研究植物内生菌,寻找具有农药活性的次生代谢产物,是研发新型无公害农药的重要途径,前景广阔。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

对叶红景天的根、茎、叶及根际土壤采自青海省西宁市大通县大阪山,经青海大学生态环境工程学院张得钧教授鉴定为景天科红景天属对叶红景天。

### 1.2 培养基

真菌培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15~20 g、蒸馏水 1 L,pH 值自然。

细菌培养基:胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)培养基:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、琼脂 15~20 g、蒸馏水 1 L,pH 值

自然。

放线菌培养基:高氏 I 号培养基:可溶性淀粉 20.00 g、KNO<sub>3</sub> 1.00 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.00 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.50 g、KCl 0.50 g、FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.01 g、琼脂 18.00 g、蒸馏水 1.00 L,pH 值自然。

马铃薯葡萄糖液体(PDB)培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 L,pH 值自然。

基础培养基:蛋白胨 20.0 g、甘油 10.0 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g、蒸馏水 1.0 L,pH 值自然。

碳源发酵培养基:蛋白胨 20.0 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g、蒸馏水 1.0 L,pH 值自然。

氮源发酵培养基:甘油 10.0 g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1.5 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g、蒸馏水 1.0 L,pH 值为 7.3。

### 1.3 内生菌分离

将采集的对叶红景天新鲜根、茎、叶用自来水冲洗多次,然后在无菌条件下将根、茎切割成 0.5 cm × 0.5 cm 的小块,叶剪成 1 cm × 1 cm 的小块,在 75% 乙醇中润洗 1 min 后用无菌水漂洗 3 次,再用 0.1% 次氯酸钠进行消毒。根、叶消毒 5 min,茎消毒 8 min,再用无菌水冲洗 3 次,然后放在已灭菌的滤纸片上,待水吸干后分别接种在加有链霉素的 PDA 培养基、TSA 培养基及高氏 I 号培养基上,28 ℃ 培养 3~4 d,待切口边缘长出菌丝后,取单菌落转到新的 PDA 培养基上,纯化培养 3 次后编号并接种到试管斜面培养 4~7 d,放入冰箱中 4 ℃ 保存<sup>[5-6]</sup>。试验中设立对照:吸取消毒后最后 1 次冲洗材料的无菌水,涂布于各分离平板上培养。若无杂菌长出,表明表面消毒彻底,分离到的是内生菌<sup>[7]</sup>。可以根据培养基平板上长出菌落的形态、颜色、大小等挑取不同的单菌落纯化后保存<sup>[8]</sup>。

### 1.4 抗病菌株筛选

采用平板对峙法:用平板划线法将内生菌和病原菌接种于 PDA 培养基平板上,在恒温培养箱中培养 3~4 d,用灭过菌的直径为 6 mm 的打孔器在病原菌菌落边缘切取同样大小

收稿日期:2017-04-10

基金项目:青海大学 2014 年度中青年科研基金(编号:2014-QNY-2);青海大学教育部“春晖计划”科研基金(编号:Z2015071);青海省科学技术项目(编号:2016-NK-140);青海省科技计划项目(编号:2014-NS-N01)。

作者简介:赵媛(1984—),女,内蒙古乌兰察布人,硕士,讲师,主要从事微生物学研究。E-mail:116733168@qq.com。

的菌饼置于 PDA 培养基平板中央,在 PDA 培养基平板距中心 25 mm 处用打孔器切去同样大小的菌饼,并将内生菌用无菌水稀释后用移液枪接在孔内,每个处理重复 3 次。27 ℃ 培养 3 d 后测量抑菌带的宽度,抑菌带直径大于等于 10 mm 用“+++”表示,抑菌带直径大于等于 5 mm,小于 10 mm 用“++”表示,抑菌带直径小于 5 mm 用“+”表示,没有抑菌活性用“-”表示<sup>[9]</sup>。

1.5 培养条件优化

1.5.1 种子液制备 选取抑菌活性最好的菌株 G5 接种于 PDA 固体培养基上,在恒温培养箱内培养 48 h;用接种环挑取单菌落,接入装有 50 mL PDB 培养基的 150 mL 三角瓶中,于 25 ℃、150 r/min 条件下振荡培养 24 h。

1.5.2 摇瓶培养 取 2 mL 种子液接入 100 mL 基础培养基的 250 mL 三角瓶中,在 30 ℃、150 r/min 条件下振荡培养 3 d,将发酵液在 10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液。采用抑菌圈法进行抑菌效果检测,培养 3 d 后,观察抑菌效果<sup>[10]</sup>。

1.5.3 最佳碳源的筛选 碳源发酵培养基其他成分不变,碳源分别设为 1.0% 葡萄糖、1.0% 乳糖、1.0% 果糖、1.0% 甘油、1.0% 可溶性淀粉、1.0% 蔗糖<sup>[10]</sup>,以碳源发酵培养基为对照,接入 10% G5 菌株种子液,25 ℃、150 r/min 振荡培养 3 d;将发酵液 10 000 r/min 离心 15 min,收集上清液,在 PDA 培养基平板上涂布上清液,并用灭过菌的直径为 6 mm 的打孔器在病原菌菌落边缘切取同样大小的菌饼于 PDA 培养基平板中央,测定发酵上清液的抑菌效果。

1.5.4 最佳氮源的筛选 氮源发酵培养基其他成分不变,氮源分别设为 2.0% 蛋白胨、2.0% 尿素、2.0% 豆粕、2.0% 硫酸铵、2.0% 大豆蛋白胨、2.0% 牛肉膏、2.0% 酵母膏<sup>[10]</sup>;以氮源发酵培养基为对照,其他条件相同,抑菌效果测定方法同“1.5.3”节。

1.5.5 磷酸盐对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响 采用筛选出的最佳碳源和氮源,在基础培养基(无 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)中分别加入 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O 等磷酸盐,设置 0.1%、0.2%、0.3% 等 3 个浓度梯度,以不加 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 的基础培养基为对照<sup>[10]</sup>,基础发酵条件培养后,测定发酵上清液的抑菌效果。

1.5.6 金属离子对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响 采用筛选出的碳源、氮源、磷酸盐,在基础培养基(无 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O)中分别加入 FeCl<sub>3</sub>、CuSO<sub>4</sub>、NaCl、ZnSO<sub>4</sub>、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O、MnSO<sub>4</sub>、CaCO<sub>3</sub>、KNO<sub>3</sub> 等溶液,设置 0.1%、0.2%、0.3% 等 3 个浓度梯度,以不加 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 的基础培养基为对照<sup>[10]</sup>,基础发酵条件培养后,测定发酵上清液的抑菌效果。

1.5.7 优化验证 以筛选得到的最佳碳源、最佳氮源、最适磷酸盐、最适金属离子作为优化培养基。以 5% 接种量分别接种到优化培养基与基础培养基中,在 25 ℃、150 r/min 条件下振荡培养 4 d,将发酵液在 10 000 r/min 条件下离心 15 min,收集上清液,测定发酵上清液的抑菌效果。试验中以基础培养基为对照,测定其抑菌性。

1.6 G5 菌株的形态学鉴定

1.6.1 G5 菌株菌落形态观察 菌落形态观察采用点接

法<sup>[11]</sup>。蘸取少量孢子,在 PDA 培养基平板中央接种 1 点,置于恒温培养箱中培养 3 ~ 4 d,观察 G5 菌落颜色、大小、质地、边缘、生长速度等特性。

1.6.2 G5 菌株显微镜观察 对 G5 菌株进行显微镜观察,首先对 G5 菌株进行革兰氏染色,然后分别在低倍显微镜及高倍显微镜下进行观察拍照。

2 结果与分析

2.1 内生菌株的分离

通过对对叶红景天新鲜根、茎、叶的菌种分离纯化,依据菌落生长形态特征,从对叶红景天中初步筛选出 24 株内生菌,其中真菌 5 株,占 20.8% (P1 ~ P5),细菌 12 株,占 50.0% (T1 ~ T12),放线菌 7 株,占 29.2% (G1 ~ G7)。

2.2 对叶红景天抗病内生菌的筛选

如表 1 所示,通过平板对峙法得出,24 株菌株中有 12 株菌株对蚕豆荚枯萎病病原菌、菜豆黑斑病病原菌、茄镰刀菌 I、茄镰刀菌 II 均有不同程度的抑菌活性,其中放线菌 G5、真菌 P1 对茄镰刀菌 I 有强抑菌活性;放线菌 G1、真菌 P2、细菌 T11 对菜豆黑斑病病原菌有强抑菌活性;细菌 T3 对茄镰刀菌 II 有强抑菌性,具体见图 1。选用抑菌活性最好的放线菌 G5 菌株进行后续优化试验。

表 1 对叶红景天内生菌抗病菌株筛选

| 菌株  | 蚕豆荚枯萎<br>病病原菌 | 菜豆黑斑<br>病病原菌 | 茄镰刀菌 I | 茄镰刀菌 II |
|-----|---------------|--------------|--------|---------|
| G1  | —             | ++           | —      | —       |
| G2  | —             | —            | —      | —       |
| G3  | —             | —            | +      | —       |
| G4  | —             | —            | +      | —       |
| G5  | —             | —            | +++    | —       |
| G6  | —             | —            | +      | —       |
| G7  | —             | —            | —      | —       |
| P1  | —             | —            | ++     | —       |
| P2  | —             | ++           | —      | —       |
| P3  | —             | —            | —      | —       |
| P4  | —             | —            | —      | —       |
| P5  | —             | —            | —      | —       |
| T1  | —             | —            | —      | —       |
| T2  | —             | —            | —      | —       |
| T3  | —             | —            | —      | ++      |
| T4  | —             | —            | —      | —       |
| T5  | —             | —            | —      | —       |
| T6  | —             | —            | —      | —       |
| T7  | —             | —            | —      | —       |
| T8  | —             | —            | —      | —       |
| T9  | +             | —            | —      | —       |
| T10 | +             | —            | —      | +       |
| T11 | —             | ++           | —      | —       |
| T12 | ++            | —            | —      | —       |

2.3 内生菌培养条件优化单因素试验

2.3.1 不同碳源对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响 试验检测了葡萄糖、甘油、可溶性淀粉、乳糖、果糖、蔗糖等 6 种不同碳源对内生菌抑菌活性的影响。由图 2 可知,以乳糖为碳源的发酵培养基抑菌效果最好,病原菌菌落直径为 12.25 mm,

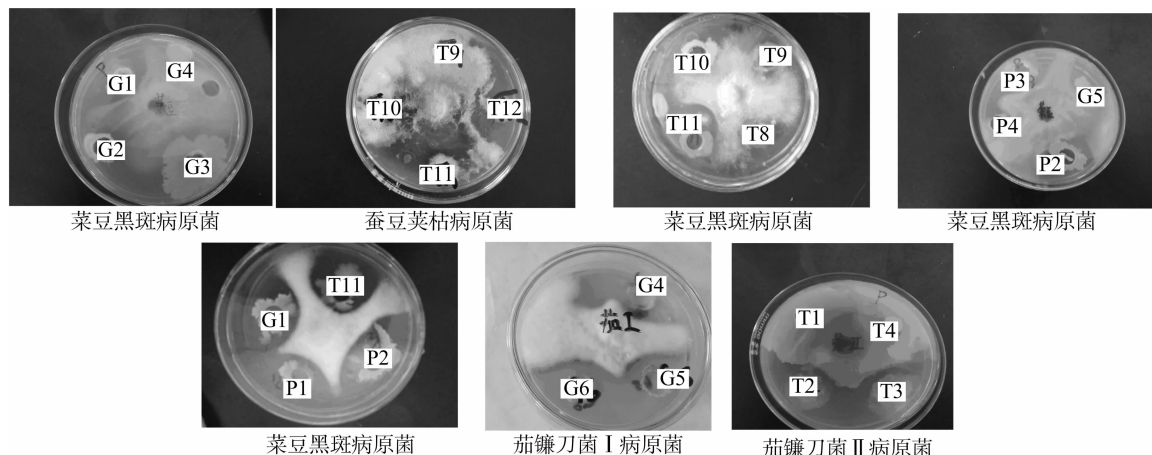


图1 部分内生菌对病原菌的抑菌效果

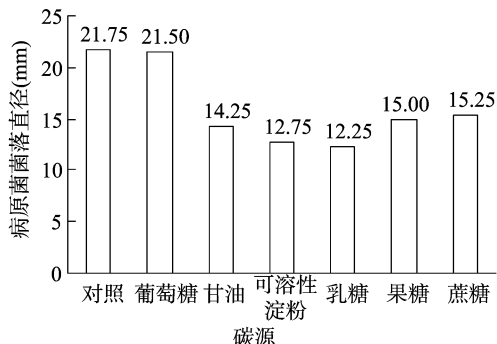


图2 不同碳源对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响

小于对照基础发酵培养基的病原菌直径(21.75 mm),其次是可溶性淀粉,而葡萄糖、蔗糖、果糖、甘油等作为碳源时内生菌的抑菌活性较差。因此,选用乳糖为发酵培养基的最佳碳源。

**2.3.2 不同氮源对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响** 试验检测了牛肉膏、酵母膏、硫酸铵、豆粕、蛋白胨、大豆蛋白胨、尿素等作为氮源时内生菌的抑菌活性。由图 3 可知,以蛋白胨为氮源的发酵培养基抑菌效果最好,病原菌菌落直径为 11.40 mm,小于对照基础发酵培养基的病原菌菌落直径(40.00 mm),其次是大豆蛋白胨、豆粕,而牛肉膏、硫酸铵等作为氮源时内生菌的抑菌活性较差。因此,选用蛋白胨为发酵培养基的最佳氮源。

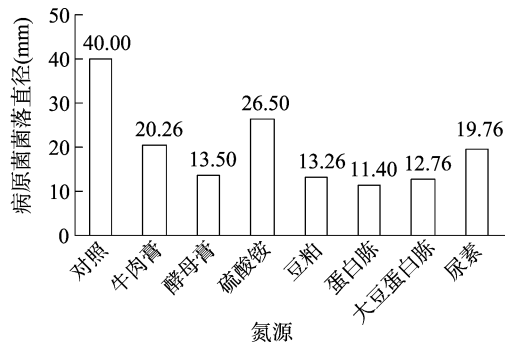


图3 不同氮源对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响

### 2.3.3 不同磷酸盐对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响

不同磷酸盐的不同浓度对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响如图 4 所示,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  等对抑菌活性物质的产生均有不同程度的

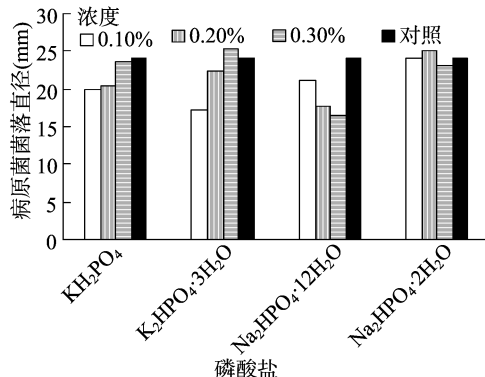


图4 不同磷酸盐对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响

促进或抑制作用,而  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  的 3 个不同浓度对抑菌活性物质的产生均有较高的促进作用,且以浓度为 0.30% 时最为明显。因此,选择 0.30%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  为发酵培养基的最佳磷酸盐。

### 2.3.4 不同金属离子对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响

不同金属离子的不同浓度对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响如图 5 所示,  $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{CuSO}_4$ 、 $\text{NaCl}$ 、 $\text{ZnSO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnSO}_4$ 、 $\text{CaCO}_3$ 、 $\text{KNO}_3$  等对抑菌活性物质的产生均有不同程度的促进或抑制作用,而  $\text{NaCl}$  的 3 个不同浓度对抑菌活性物质的产生均有较高的促进作用,且以浓度为 0.30% 时最为明显。因此,选择 0.30%  $\text{NaCl}$  为发酵培养基的金属离子溶液。

### 2.4 内生菌培养条件优化验证

试验测定了优化培养基与基础培养基培养下 G5 菌株的抑菌效果。由图 6 可知,优化培养条件下 G5 菌株的抑菌效果较好,培养至第 7 天时其抑菌活性提高了 30.06%。

### 2.5 G5 菌株形态学鉴定

在显微镜下的观察结果显示, G5 菌株为短杆状,大小为  $2.81 \mu\text{m}$ ,呈革兰氏阴性(图 7)。G5 菌株菌落形态观察结果见表 3。

## 3 结论与讨论

植物内生菌的分离及其天然产物的研究已成为世界范围内研究的热点领域。与不计其数的植物附生菌相比,内生菌似乎吸引了更多的注意力。主要原因为植物内生菌能够产生丰富多样的具有农药活性的次生代谢产物,其中不少物质都

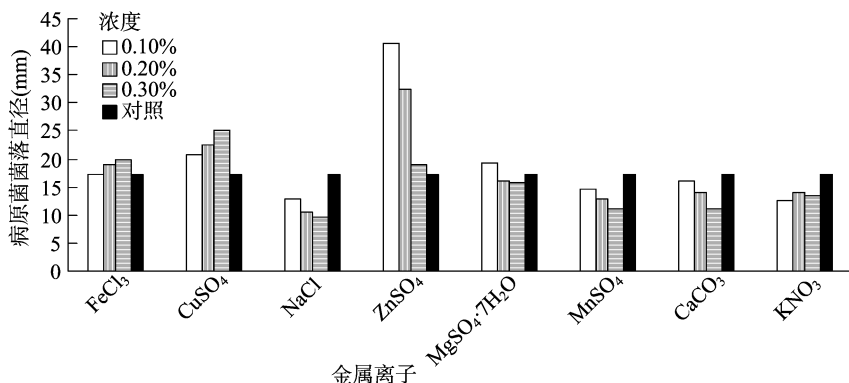


图5 不同金属离子对 G5 菌株产生抑菌活性物质的影响

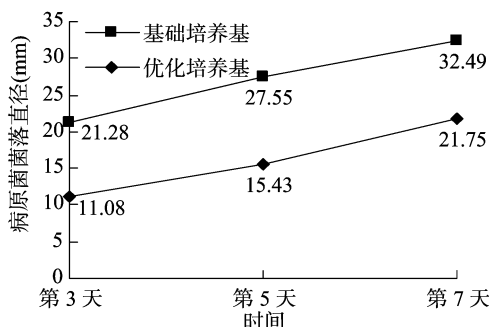


图6 基础培养基与优化培养基条下 G5 菌株的抑菌活性

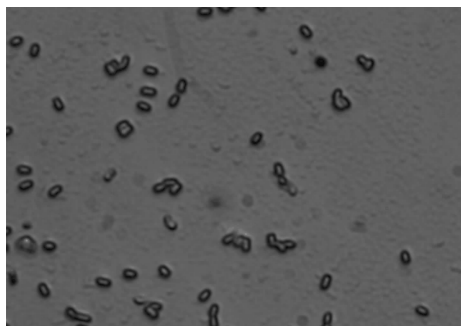


图7 内生菌 G5 菌株显微观察结果

表 3 G5 菌落形态观察结果

| 测定内容       | 菌落形态            |
|------------|-----------------|
| 大小(培养 3 d) | $d < 1$ mm      |
| 形状         | 片形              |
| 隆起度        | 扁平状             |
| 边缘         | 边缘光滑            |
| 颜色         | 乳白色             |
| 质地         | 光滑、油脂状、半透明、具有黏性 |

具有抑菌活性,在自然界中具有重要的生态学作用,因而引起了人们的广泛关注并取得了较大进展<sup>[12-14]</sup>。因此,利用我国的植物内生菌资源来筛选抗菌和杀菌活性物质,促进新型生物农药的开发和创新具有十分重要的意义<sup>[15]</sup>。

对叶红景天是青海地区高海拔珍贵药用植物,具有抗菌消炎的药理活性。本研究从青海高山地区对叶红景天中分离出 24 株内生菌,其中有 12 株具有抑菌活性,进一步证明了内生菌具有与宿主相似的药理活性。下一步可对抗病内生菌的有效成分进行分离提取,试图找出使其具有抗病性的某种

物质。

目前,对对叶红景天具有抗病抑菌作用的报道较少,因此对于对叶红景天的更多有效抑制成分有待进一步研究,为对叶红景天应用于临床抗菌治疗提供充足的科学依据。

#### 参考文献:

- [1]明海泉,夏光成,张瑞钧. 红景天研究进展[J]. 中草药,1988,19(5):37-42.
- [2]孙世国. 高山红景天的开发利用[J]. 特产研究,1993(1):24-25.
- [3]肖 潇. 基于镉超累积植物内生菌的重金属污染修复研究[D]. 长沙:湖南大学,2011.
- [4]Martinuz A,Schouten A,Sikora R A. Systemically induced resistance and microbial competitive exclusion;implications on biological control [J]. Phytopathology,2012,102(3):260.
- [5]Liu X G,Gao K X,Gu J C,et al. Testing on the antagonism of the dominant of endophytic fungi from *Populus tomentosa*, *Chateo mium* ND35 in the laboratory[J]. SciSilvae Sin,1999,35(5):57-61.
- [6]冯永君,宋 未. 植物内生细菌[J]. 自然杂志,2001,23(5):249-252.
- [7]Horn W S,Msj S,Schwartz R E,et al. Variation in production of phomodiol and phomopsolide B by *Phomopsis* spp. [J]. Mycologia,1996,88(4):588-595.
- [8]Li J Y,Strobel G,Sidhu R,et al. Endophytic taxol - producing fungi from bald cypress, *Taxodium distichum* [J]. Microbiology,1996,142(8):2223-2226.
- [9]黄新奇,雍晓雨,沈其荣,等. 土传黄瓜立枯病高效拮抗菌的筛选鉴定及其生物效应[J]. 植物保护学报,2012,39(1):45-50.
- [10]张飞官. 桑疫病病原拮抗性桑树内生菌的筛选鉴定及其抑菌活性物质研究[D]. 重庆:西南大学,2014.
- [11]杜连祥,路福平. 微生物学实验技术[M]. 北京:中国轻工业出版社,2010.
- [12]柳志强,李乔曼,徐 爽,等. 催吐萝芙木内生菌 *Bacillus subtilis* LYM3 的抑菌活性产物[J]. 江苏农业学报,2017,33(1):67-72.
- [13]姜华年,丁 婷. 厚朴内生真菌 HPFJ3 对小麦全蚀病的生防作用[J]. 江苏农业学报,2016,32(2):285-292.
- [14]初 龙,李 伟,李欣亚,等. 重金属超富集植物种子内生真菌多样性及其重金属抗性[J]. 江苏农业学报,2017,33(1):43-49.
- [15]徐 毅. 植物内生菌在病害防治中的作用[J]. 科技信息(学术版),2007(24):73,76.