

五味子中内生拮抗活性细菌的分离与筛选

金岩^{1,2}, 孙晶波³, 高洁^{1*}

1. 吉林农业大学农学院, 吉林 长春 130118

2. 北华大学林学院, 吉林 吉林 132013

3. 北华大学药学院, 吉林 吉林 132013

摘要: **目的** 从不同地区采集五味子植株, 分离内生细菌, 并进行菌群密度、拮抗菌筛选和抑菌活性研究。**方法** 采用平板分离法分离内生细菌并纯化典型菌株; 平板对峙法测定体外拮抗活性; 生长速率法测定抑菌活性。**结果** 不同种植地、五味子不同器官中内生细菌的菌群密度差异较大, 野生的较栽培的大; 五味子各器官中, 根中的内生细菌最多, 其次为茎, 叶片中最少。从分得的大量内生细菌中共纯化出 302 株内生细菌, 拮抗菌比率平均为 24.19%。从中选出了 12 株对五味子茎基腐病菌、人参根腐病菌、棉花枯萎病菌、番茄灰霉病菌、人参黑斑病菌具有较好拮抗作用的菌株。12 株菌株的发酵产物对供试病原菌菌丝生长均有一定的抑制作用, 其中 JYg-2 对人参根腐病的抑制率最高, 达 80.02%。**结论** 五味子植株体内存在大量内生细菌, 并且含有一定比率的拮抗菌, 拮抗活性稳定。因此五味子内生细菌可以成为开发拮抗菌资源的重要途径, 并具有较大潜能。

关键词: 五味子; 内生细菌; 筛选; 拮抗菌; 抑菌活性

中图分类号: R282.15 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)07-0996-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.07.019

Isolation and screening of endophytic bacteria with antagonistic activity from *Schisandra chinensis*

JIN Yan^{1,2}, SUN Jing-bo³, GAO Jie²

1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

2. College of Forestry, Beihua University, Jilin 132013, China

3. College of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132013, China

Abstract: Objective To isolate the endophytic bacteria from the plants in *Schisandra chinensis*, collected from different regions, and to study the flora density, antagonistic bacteria screening, and antibacterial activity. **Methods** The endophytic bacteria were isolated by plate isolation method, and to purify their typical strains. Their antagonistic activity *in vitro* and antibacterial activity were tested by plate confrontation method and growth rate method, respectively. **Results** The difference in the flora density of endophytic bacteria in the wild cultivars of *S. chinensis* was significantly higher than that in the cultured cultivars. Among the parts of *S. chinensis*, the density of endophytic bacteria was the highest in the roots, followed by the stems, and the lowest in the leaves. Endophytic bacteria (302 strains) were obtained from the isolated bacteria by purification, and the ratio of antagonistic bacteria was 24.19%. Twelve strains were selected with antagonistic action against the pathogens of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium Solani*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, and *Alternaria panax*, and the fermentation of them had inhibitory effect on inhibiting mycelial growth of the tested pathogens. The inhibitory rate of JYg-2 to *A. panax* was the highest with 80.02%. **Conclusion** Plenty of endophytic bacteria are found in healthy plant of *S. chinensis* and some of them have stable antagonistic activity. Endophytic bacteria of *S. chinensis* have the great potential on developing biocontrol bacteria.

Key words: *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill; endophytic bacteria; screening; antagonistic bacteria; antibacterial activity

收稿日期: 2013-11-10

基金项目: 吉林省世行办质量安全项目(2011-Z24)

作者简介: 金岩(1976—), 女, 讲师, 在读博士, 研究方向为植物病害综合治理。

Tel: 18604498257 Fax: (0432)64656157 E-mail: wuyanhua100@163.com

*通信作者 高洁(1964—), 女, 博士, 教授, 现主要从事农作物病害鉴定诊断, 综合治理技术及植物抗性基因工程研究工作。

Tel: 13844102189 E-mail: jiecao115@126.com

五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill 作为食药兼用的中药材, 由于其具有保肝、调脂、补肾和美容的功效^[1-3], 深受广大消费者的欢迎。近年来, 在国家中药现代化科技产业基地建设的指引下, 吉林省开展了五味子的大面积引种和建立了规范化栽培技术体系, 实现了五味子由野生采集到人工栽培的重大转变。但是, 随着五味子单一栽培面积的增加, 五味子各种病害, 如根腐病、茎基腐病、黑斑病、白粉病、叶枯病等, 也随之发生^[4], 并呈逐年加重的趋势, 使得五味子的产量和品质下降, 严重影响了种植户的经济效益。

目前, 五味子病害的防治主要还是依赖于化学药剂防治, 由此便产生了病菌抗药性、环境污染和农药残留等一系列问题, 影响了五味子产业的发展。因此, 寻找安全有效的生物防治措施以减少或抑制五味子病害的发生, 是亟待解决的实际问题。已有研究证明, 健康植物体内存在大量的内生细菌, 它们是植物病害生物防治的潜在资源菌^[5], 已在烟草^[6]、马铃薯^[7]、番茄^[8]等多种作物体内分离筛选到具有防病或诱导抗病作用的内生细菌。

本研究采用人工培养法首次对五味子内生细菌进行了分离, 并对其抑菌性进行了初步研究, 旨在筛选出能产生抑菌活性物质的内生细菌, 为五味子病害的防治提供一条新的、有效的、可靠的生物防治新途径。

1 材料与菌种

1.1 材料

人工栽培五味子分别采自吉林左家药植物园, 长白、集安五味子种植基地; 野生五味子采自长白、集安山区, 经吉林农业大学高洁教授鉴定为木兰花科植物五味子 *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill。

1.2 供试菌种

五味子茎基腐病菌 *Fusarium oxysporum*、人参根腐病菌 *Fusarium Solani*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、番茄灰霉菌 *Botrytis cinerea*、人参黑斑病菌 *Alternaria panax*。以上菌种由吉林农业科技学院范文忠教授提供。

2 方法

2.1 分离和培养用培养基

分离内生细菌培养基采用牛肉膏蛋白胨培养基 (NA), 病原菌培养采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA)^[7]; 液体发酵培养基为不加琼脂的 NA 培养基, 每摇瓶 (250 mL) 装入 120 mL。上述培养基

均需在 0.1 MPa、121 °C 条件下灭菌 30 min, 无菌检查后方可使用。

2.2 表面消毒剂的选择及灭菌效果检验

在无菌室内, 将五味子根、茎、叶样本用流水冲洗干净, 分别随机称取 5 g, 用无菌纱布包裹后先在 70% 乙醇中浸 3 min, 以去除组织表面的气泡, 然后分别浸入 3% 和 5% 的次氯酸钠水溶液中消毒 6、8、10、12、15 min, 无菌水冲洗 3~4 次。取最后一次无菌水冲洗液 0.2 mL 涂布于 NA 培养基上, 每个处理重复 3 次, 并以无菌水冲洗样本的洗液为对照 (CK)。在 28 °C 下培养 48 h, 观察有无菌落产生, 计算除菌率以检验表面灭菌效果。

2.3 内生细菌的分离及菌群密度测定

将经表面消毒的样本分别置于无菌研钵中, 加 5 mL 无菌水碾碎, 匀浆, 静止 15 min 后, 各取 50 μ L 于 NA 平板上涂布, 28 °C 培养, 待细菌菌落出现后, 计算菌群密度, 每个样本重复 3 次。根据菌落形态、颜色等挑取不同的单菌落, 按常规方法纯化后斜面保存, 以供测试。

2.4 内生细菌体外拮抗活性测定

利用平板对峙法测定内生细菌的体外拮抗活性。在培养好的致病菌的菌落边缘用无菌打孔器 (直径 5 mm) 取菌块, 置于 PDA 平板中央, 在与中央等距离的 3 个点上接种分离纯化的内生细菌, 每一个菌株做 3 次重复试验, 以不接种待测内生细菌为对照, 然后在 28 °C 下培养, 5~7 d 后观察抑菌性, 同时测定抑菌圈的大小 (取 3 次重复的平均值)。

2.5 菌株培养液拮抗活性测定

将筛选出的拮抗活性较高的菌种活化后接种于发酵培养液中, 并于 28 °C、180 r/min 条件下振荡培养 3 d。培养好后以 4 000 r/min 离心 30 min, 取上清液, 用双层滤纸滤过, 滤液即为发酵液。利用生长速率法测定各发酵液对供试病原菌菌丝生长的抑制率。

$$\text{抑制率} = (\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / \text{对照菌落直径}$$

3 结果与分析

3.1 表面灭菌效果测定

常用的植物组织表面消毒剂是酸性升汞液, 消毒能力强, 但升汞存在两方面缺点: 一方面是其穿透能力强, 可能杀死植物组织内的细菌^[7], 另一方面会有残药的影响。因此在消毒剂的选择上选择了安全有效的次氯酸钠进行表面消毒。

结果表明 (表 1), 不同质量分数次氯酸钠对五

表 1 不同组织表面消毒在不同时间下的除菌率

Table 1 Antibacterial rate by surface sterilization in different tissues at different time

样品	3%次氯酸钠消毒的除菌率 / %					5%次氯酸钠消毒的除菌率 / %				
	6 min	8 min	10 min	12 min	15 min	6 min	8 min	10 min	12 min	15 min
根	33	38	50	88	100	45	52	87	94	100
茎	37	48	67	90	100	51	63	89	100	100
叶	84	96	100	100	100	100	100	100	100	100
CK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

五味子不同组织的灭菌效果各异。其中,根部样品 3%和 5%的次氯酸钠消毒 15 min 后除菌率才能达到 100%。茎部样品经 3%次氯酸钠 12 min、5%次氯酸钠 10 min 除菌率达 100%。叶片样品经 3%次氯酸钠 10 min、5%次氯酸钠 6 min 除菌率达 100%。因此对于五味子的不同部位,所需灭菌时间不同,这可能是由于不同组织对消毒剂的敏感性不同所致。

3.2 不同产地五味子内生细菌的菌群密度

对不同来源五味子内生细菌菌群密度测定,结果见表 2。不同来源五味子体内均含有一定量的内

生细菌,其菌群密度有一定的差异。集安野生种为 4.70×10^4 CFU/g,长白野生种为 3.96×10^4 CFU/g,而左家、集安、长白栽培种分别为 2.46×10^4 、 2.66×10^4 、 3.47×10^4 CFU/g,可见野生五味子的内生细菌菌群密度均高于栽培五味子,且差异显著($P < 0.05$, 0.01)。

在五味子的不同器官中,内生细菌的菌群密度也各不相同。根部样品的菌群密度最大,在 $4.21 \times 10^4 \sim 8.34 \times 10^4$ CFU/g,平均在 5.76×10^4 CFU/g;其次为茎部样品,平均可达 3.13×10^4 CFU/g;叶部样品最少,平均为 1.46×10^4 CFU/g。

表 2 不同产地五味子内生细菌菌群密度

Table 2 Flora density of endophytic bacteria in *S. chinensis* from different regions

样品来源	菌群密度 / ($\times 10^3$ CFU·g ⁻¹)			
	根	茎	叶	平均值
左家(栽培)	42.1	22.3	9.3	24.6 dD
长白(栽培)	45.2	24.8	9.9	26.6 dD
集安(栽培)	54.7	37.9	11.5	34.7 cC
长白(野生)	62.6	35.4	20.8	39.6 bB
集安(野生)	83.4	36.3	21.4	47.0 aA
平均	57.6 aA	31.3 bB	14.6 cB	—

小写字母表示处理间在 0.05 水平上差异显著,大写字母表示在 0.01 水平上差异极显著

Lowercase letters mean significant difference at 0.05 level in treatment, uppercase letters mean highly significant difference at 0.01 level

3.3 内生细菌的纯化

从健康五味子的根、茎、叶中分离到了大量的内生细菌,由于数量较大,仅选择典型的菌落进行分离纯化,共纯化出 302 株内生细菌。其中左家栽培五味子的根、茎、叶样本中共分离出 43 株,编号为 Zg01~20、Zj01~15、Zy01~08。长白栽培五味子的根、茎、叶样本中共分离出 51 株,编号为 CZg01~25、CZj01~16、CZy01~10。长白野生五味子的根、茎、叶样本中共分离出 69 株,编号为 CYg01~32、CYj01~20、CYy01~17。集安栽培五味子的根、茎、叶样本中共分离出 62 株,编号为

JZg01~30、JZj01~21、JZy01~11。集安野生五味子的根、茎、叶样本中共分离出 77 株,编号为 JYg01~40、JYj01~22、JYy01~15。从这些数据中可以看出野生的五味子较栽培的五味子可纯化的内生细菌数量要多,就五味子植株而言,根中可纯化的内生细菌最多,其次是茎,叶片中的最少。可见,在五味子不同的采集地及五味子不同器官组织中所含有的内生细菌数量有明显差异。

3.4 拮抗菌的测定

采用对峙生长法测试了已分离到的内生细菌对供试病原菌的抑制作用,结果表明(表 3),不同来

表 3 不同采集地五味子拮抗内生细菌的量
Table 3 Contents of antagonist endophytic bacteria in *S. chinensis* from different regions

样品来源	内生菌株数	拮抗菌株数	百分比 / %
左家 (栽培)	43	8	18.60
长白 (栽培)	51	10	19.61
集安 (栽培)	62	9	14.51
长白 (野生)	69	22	31.88
集安 (野生)	77	28	36.36
平均	60.4	12.6	24.19

源的五味子中均含有对植物病原菌具有抑制作用的内生细菌, 拮抗菌所占的比率平均为 24.19%, 其中以集安野生五味子体内含有的拮抗菌比率最高 36.36%, 集安栽培五味子最低 14.51%, 不同采集地五味子体内拮抗细菌的量存在一定的差异。

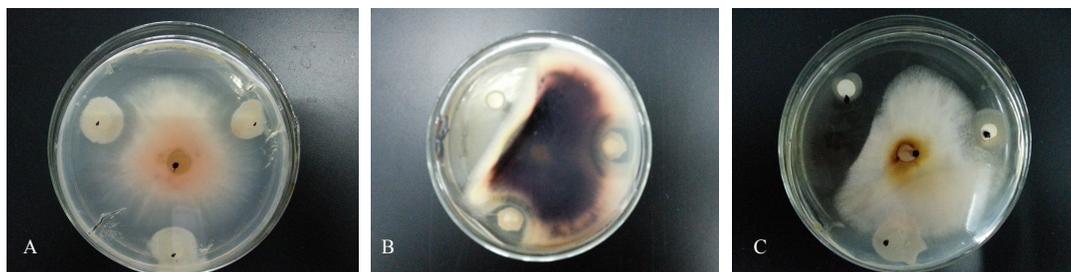
3.5 强拮抗力内生细菌的筛选

通过平板对峙试验, 选择抑菌圈直径在 2 mm 以上的菌株, 从 302 株菌株中共选出 12 株对供试病原真菌均有较强拮抗力的内生细菌继续研究拮抗活性, 结果见表 4、图 1。

表 4 内生细菌对致病菌抑菌活性的测定

Table 4 Antibiotic activities of endophytic bacteria against pathogens

菌株	抑菌圈半径 / mm				
	棉花枯萎病菌	人参根腐病菌	五味子茎基腐病菌	人参黑斑病菌	番茄灰霉病菌
Zg-2	2.1	6.9	2.7	4.6	3.8
Zj-8	2.6	7.2	4.6	3.5	5.3
CZg-12	4.3	5.8	6.2	5.4	4.3
CZj-13	5.2	5.6	4.3	7.3	6.2
CYg-11	6.4	7.8	6.4	7.4	5.3
CYg-8	3.4	8.2	4.2	6.4	5.8
JZg-6	2.3	7.2	5.3	6.6	3.6
JZg-14	3.1	5.2	4.5	3.6	3.5
JYg-2	2.2	7.0	6.4	6.9	4.3
JYg-7	5.3	9.0	6.7	6.9	5.9
JYg-12	4.4	8.7	5.5	5.8	4.9
JYj-3	3.4	7.1	5.3	6.2	3.7



A-五味子茎基腐病菌 B-人参黑斑病菌 C-人参根腐病菌
A-*F. oxysporum* B-*A. panax* C-*F. solani*

图 1 分离菌株对植物病原菌抑菌作用

Fig. 1 Antagonistic bacteria effect of isolated strains on pathogens

3.6 菌株培养液拮抗活性测定

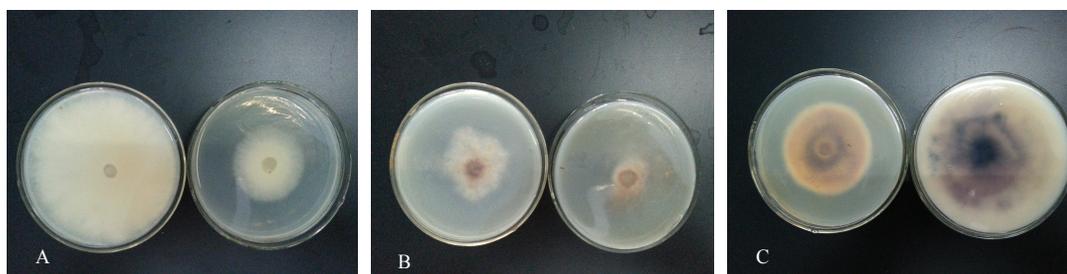
采用生长速率法测定了 12 株菌株其代谢产物的抑菌活性, 结果见表 5 及图 2。结果显示五味子内生细菌的代谢产物经高温高压后对供试病原菌仍有一定的抑制作用。人参黑斑病菌和人参根腐病菌对五味子内生细菌的代谢产物比较敏感, 其中 CYg-11、

JYg-2、JYg-7、JYg-12、JYj-3 对人参黑斑病菌的菌丝生长抑制率在 70% 以上, CYg-11、JZg-14、JYg-2、JYg-7、JYg-12、JYj-3 对人参根腐病菌的菌丝生长抑制率在 70% 以上。JYg-2 对人参根腐病菌的抑制率最高, 达 80.02%。而对五味子茎基腐病的菌丝生长虽有一定的抑制作用, 但是抑制率相对较低。

表5 12株内生细菌发酵液对病原菌菌丝生长的抑制率

Table 5 Inhibitory rate of fermentation broth of 12 endophytic bacteria strains on pathogens

菌株	菌丝生长抑制率 / %				
	棉花枯萎病菌	人参根腐病菌	五味子茎基腐病菌	人参黑斑病菌	番茄灰霉病菌
Zg-2	35.02	46.31	17.43	56.74	43.15
Zj-8	46.36	35.28	10.32	32.47	25.37
CZg-12	45.76	35.28	3.06	35.17	27.78
CZj-13	35.28	42.93	19.27	46.25	17.97
CYg-11	68.17	71.68	11.26	73.12	57.18
CYg-8	44.13	37.17	10.04	42.49	25.17
JZg-6	32.51	59.15	25.17	46.72	38.27
JZg-14	47.35	73.14	21.31	54.25	15.16
JYg-2	56.28	80.02	12.61	78.49	65.73
JYg-7	62.17	78.47	28.93	73.28	65.28
JYg-12	52.64	75.38	13.48	75.18	67.18
JYj-3	45.13	76.16	10.23	70.27	51.26



A-棉花枯萎病菌 B-番茄灰霉病菌 C-人参黑斑病菌
A-*F. oxysporum* B-*B. circerea* C-*A. panax*

图2 菌株培养液对植物病原菌菌丝生长的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of fermentation broth of strain against mycelial growth of pathogens

4 讨论

目前关于植物内生细菌的研究逐渐增多,但对于其分离部位、表面灭菌、分离方法及分离培养基的选择上均无统一的方法。

本研究首次选取吉林省不同产地的五味子主要器官—根、茎、叶进行了内生细菌的分离研究。就表面消毒剂的选择,大多数报道用升汞作消毒剂^[8],但升汞的穿透力较强,进入植物组织后可能会将内生细菌杀死,影响分离效果,因此选用了穿透力较弱,灭菌效果较好的次氯酸钠作为表面消毒剂,同时测定了其在不同浓度下对不同器官的灭菌效果。因此在实际的表面消毒时,根据不同器官的特点,选用合适浓度的次氯酸钠。

本研究在不同地点、不同器官的五味子样本中共分离到内生细菌 302 株,样品的来源较广、数量

较多,基本上保证了分离到的内生细菌具有多样性和代表性,为后续研究奠定了良好的基础。

已有研究表明,内生细菌的种类和数量会受到植物种类、生长阶段、生长环境的影响^[9]。本研究通过对不同地区、不同器官组织中的五味子内生细菌菌群密度进行测定,结果表明野生较栽培五味子所含有的菌群密度要大,五味子根中的菌群密度要大于茎和叶,这也与前人的研究结果相吻合。野生较栽培的样本中菌群密度高,是由于其所处的环境生物多样性更丰富一些,而植物根中内生细菌的数量也比植物地上组织多^[10]。

对筛选出的具有较强体外拮抗活性的 12 株内生细菌进行液体培养后,其培养液经过高温高压后仍具有良好的抑菌作用,说明其抑菌活性稳定,具有作为生防菌的潜能。

内生细菌是植物微生态系统的组成部分,相对于土壤中的腐生细菌、植物根围的生防细菌,内生细菌则更具有竞争力,更有利于发挥生防作用^[11]。本研究表明五味子体内含有大量的内生细菌,并有拮抗活性高而稳定的菌株存在,因此五味子内生细菌可以成为防治五味子病害的生物防治的新途径。对于筛选出的拮抗细菌,还需要进一步测定其在五味子体内的定植情况、持久性、对五味子生长的影响、田间的防病效果,为开发和应用防治五味子病害的生防菌资源提供科学依据。

参考文献

- [1] 明延波,赵华,周丽,等. 五味子的研究进展 [J]. 实用药物与临床, 2007, 10(6): 365-366.
- [2] Tang Y, Liu Y Z, Han L, et al. Optimization of smashing tissue extraction technology of *Schisandra chinensis* fruits by orthogonal Test. [J]. *Chin Herb Med*, 2012, 4(3): 259-262.
- [3] 史琳,王志成,冯叙桥. 五味子化学成分及药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2011, 34 (3): 208-212.
- [4] 韩继堂,黄瑞贤,陈立波,等. 北五味子主要病害发生概况及防治技术 [J]. 人参研究, 2009(3): 43-44.
- [5] 刘云霞. 植物内生细菌的研究与应用 [J]. 植物保护, 1994, 20(5): 30-32.
- [6] 雷丽萍,夏振远,郭荣君,等. 烟草内生细菌的分离和鉴定 [A] // 中国植物病理学会 2006 年学术年会论文集 [C]. 长沙: 中国农业科学技术出版社, 2006.
- [7] 崔林,孙振,孙福在,等. 马铃薯内生细菌的分离及环腐拮抗菌的筛选鉴定 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 353-358.
- [8] 王美琴,陈俊美,薛丽,等. 番茄内生细菌的分离及拮抗菌的筛选 [J]. 山西农业科学, 2007, 35(2): 55-58.
- [9] 方中达. 植病研究方法 [M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [10] 黎起秦,罗宽,林纬,等. 番茄青枯病内生细菌的筛选 [J]. 植物病理学报, 2003, 33(4): 364-367.
- [11] 罗明,芦云,张祥林. 棉花内生细菌的分离及生防益菌的筛选 [J]. 新疆农业科学, 2004, 41(5): 277-282.