

宁夏乌拉尔甘草内生菌鉴定及甜瓜 采后病害病原拮抗菌的筛选

刘建利, 曹君迈, 马文平

(北方民族大学生物科学与工程学院, 宁夏 银川 750021)

摘要: 采用组织分离法从宁夏地区乌拉尔甘草的根、茎、叶中分离内生菌, 依据形态进行初步鉴定; 以甜瓜采后病害病原菌为供试菌株, 测定甘草内生细菌抑菌活性。结果显示: 从宁夏地区乌拉尔甘草的根、茎、叶中共分离出内生菌 287 株, 根中分离出 142 株, 茎中分离出 78 株, 叶中分离出 67 株, 136 株属内生真菌, 151 株属内生细菌。对产孢的 53 株内生真菌进行初步鉴定, 分类为 2 纲 4 科 6 属, 链格孢属 (*Alternaria*)、曲霉属 (*Aspergillus*) 和青霉属 (*Penicillium*) 为优势种群。151 株内生细菌中, 革兰氏阳性菌、杆菌占优势。其中 8 株内生细菌对 4 种甜瓜采后病害病原菌的抑制能力均较强。

关键词: 乌拉尔甘草; 内生菌; 甜瓜采后病害病原菌; 筛选

中图分类号: S567.7⁺1; S652.08 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7601(2011)01-0252-05

乌拉尔甘草 (*Glycyrrhiza uralensis*) 是豆科 (*Leguminosae*) 甘草属 (*Glycyrrhiza*) 多年生草本植物, 是我国干旱、半干旱地区重要的药用植物资源, 有“十方九草”之称。从东北的黑龙江、辽宁、吉林, 华北的河北、山西、内蒙古, 西北的陕西、甘肃、宁夏、青海直到新疆的拜城均有分布, 主产区在宁夏、甘肃及内蒙古。甘草不仅具有很高的药用价值, 而且具有良好的生态效益, 生长在干旱荒漠区的甘草, 不仅耐旱、寒、热和盐碱, 而且具有很强的防风、固沙固土作用。因此, 甘草也被作为钙质土壤的指标性植物, 是干旱半干旱荒漠地区优良生态先锋植物^[1-3]。

关于新疆地区、内蒙古地区甘草内生菌的研究已有报道^[4-8], 而宁夏地区乌拉尔甘草内生菌的研究却未见报道。研究发现, 植物内生菌的分布不仅与寄主植物本身有关, 而且与寄主植物生活的生态环境关系更大^[9]。因此, 本研究旨在分离和鉴定宁夏地区乌拉尔甘草根、茎和叶中的内生菌, 并检测其抑菌活性。为探明宁夏甘草的道地性以及更好地开发利用甘草及其内生菌提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 乌拉尔甘草植株样品 2008 年 6~9 月采自宁夏盐池县野生草场和北方民族大学生态基地。

1.1.2 内生菌分离培养基 牛肉膏蛋白胨培养基

(NA)、高氏 1 号培养基 (Gause)、查氏培养基 (Czaeok)、马铃薯葡萄糖培养基 (PDA) 配制参见文献 [10]。

1.1.3 供试甜瓜采后病害病原菌菌株 粉霉病原菌菌株 (*Trichothecium roseum*)、白霉病原菌菌株 (*Fusarium sp.*)、黑腐病原菌菌株 (*Alternaria alternata*) 及软腐病原菌菌株 (*Rhizopus stolonifer*) 由本实验室马文平博士提供。

1.2 方 法

1.2.1 内生菌分离方法 组织分离法: 选择健康的乌拉尔甘草植株, 全株挖出, 迅速带回实验室, 塑料袋封装, 4℃ 冰箱保存, 3 d 内使用。从植株上剪取甘草根段、茎段和叶, 自来水冲洗干净。在超净工作台中, 将甘草根段、茎段和叶置于 70% 酒精浸泡 4 min, 倒掉酒精, 用无菌水冲洗 3 次。取出根段, 再置于 0.1% 升汞中浸泡 2 min, 倒掉升汞, 无菌水冲洗 5 次, 放在无菌滤纸上吸干。取出茎段和叶, 置于 5% 次氯酸钠溶液中浸泡 5 min, 倒掉次氯酸钠溶液, 无菌水冲洗 5 次, 放在无菌滤纸上吸干。将表面消毒过的根段、茎段, 用灭菌的解剖刀刮去表皮, 切成 0.5 cm 小段; 将消毒过的叶片直接切成 0.5 cm × 0.5 cm 小块。用灭过菌的镊子将上述切好的根段、茎段和叶片, 置于已铺好牛肉膏蛋白胨培养基、高氏 1 号培养基、查氏培养基、马铃薯培养基的培养皿表面, 使切口面与培养基接触, 每皿均匀放置 3~4 块, 28℃

收稿日期: 2010-01-28

基金项目: 宁夏回族自治区高等学校科学研究项目 (2009JY011)

作者简介: 刘建利 (1973—), 男, 陕西凤翔人, 讲师, 硕士, 主要从事植物和微生物分子生物学研究。E-mail: lj7523@126.com。

暗培养。表面消毒效果的检验采用组织印迹法:从每批已消毒过的甘草根段、茎段和叶中,取出 6~8 个外植体,不去表皮,也不切成小段,将这种完整的已消毒外植体,用灭过菌的镊子置于牛肉膏蛋白胨培养基、高氏 1 号培养基、查氏培养基、马铃薯培养基上,作为表面消毒效果的对照。24~48 h 后观察是否有细菌长出,72 h 后观察是否有真菌长出,如果对照培养基上在放置材料周围,无细菌、真菌生长,说明表面消毒彻底,有菌生长,说明表面消毒不够彻底,需重新确定条件最佳的表面消毒条件,保证表面消毒彻底。在保证表面消毒彻底前提下,待外植体与培养基接触部位长出菌,挑取接种到相同培养基上,培养成菌落。

1.2.2 内生菌的纯化 平板划线法^[10]分离纯化细菌;菌丝尖端切割法^[10]分离纯化真菌:将分离出的内生真菌,挑取菌丝接种在 PDA 培养基中央,在其上方加盖一无菌盖玻片,培养 3~4 d 后,放在体式显微镜下进行观察,会发现在其盖玻片边缘有菌丝长出,数量不多。在体式显微镜下,选择只有 1 根菌丝的区域,用记号笔标记,然后在超净工作台上用特制工具将其菌丝尖端连同培养基一块挖下,置于新培养基上培养,如此纯化多次,所得的菌株都是由单一的菌丝尖端分化生长而得到。

1.2.3 内生菌的保藏 斜面低温保藏法^[10]:将分离到的内生菌株接种在相应的固体斜面培养基上,待菌充分生长后,用油纸包扎好,移至 4℃ 冰箱中保藏。

1.2.4 内生菌的初步鉴定 革兰氏染色(三步法)^[10]镜检内生细菌,根据《常见细菌系统鉴定手册》^[11]初步鉴定;根据内生真菌菌落形态和菌丝、孢子形态,对照《真菌鉴定手册》^[12]初步鉴定到属。真菌载片培养^[10]观察内生真菌菌丝、孢子形态:把纯化后的内生真菌接种在无菌载玻片中央的小块培养基上,然后覆以盖玻片,轻压挤出空气,置于在底部倒入 3 mL 20% 的无菌甘油的培养皿中,28℃ 培养 3~5 d,随时取出载玻片,光学显微镜下观察内生真菌菌丝、孢子形态以及生长发育状况。

1.2.5 内生细菌和指示菌培养 将纯化后的内生细菌接入 NA 固体培养基平板,37℃ 培养 24 h,备用。供试甜瓜采后病害病原菌菌株在 PDA 固体培养基平板 28℃ 培养 5 d,备用。

1.2.6 拮抗菌株的筛选 琼脂块测抑菌圈法^[13]:取斜面保存的甜瓜采后病害病原菌,接种到 PDA 培养基平板上,28℃ 培养 3~5 d 产生孢子,用无菌 PDA 液体培养基冲洗培养物表面,收集冲洗液,经过无菌棉花过滤,稀释制成浓度为 10⁶ 个/mL 孢子混

合悬液,按 1:10 稀释比例加入到 50℃ PDA 培养基中,混匀后铺平板,然后将培养好的内生细菌制成菌饼(直径 6 mm),置于培养基上,以不接菌的 NA 培养基菌饼为空白对照,在 28℃ 下培养 3~5 d 后,用游标卡尺十字交叉法测定抑菌圈和菌落直径,每种内生菌做 3 个重复平板,取平均值。根据以下公式计算抑菌带宽度:抑菌带(mm)=(内生菌抑菌圈直径-内生菌菌落直径)-(空白对照抑菌圈直径-空白对照菌落直径)。

2 结果与分析

2.1 宁夏乌拉尔甘草内生菌分离

从宁夏乌拉尔甘草的根、茎、叶中共分离出内生菌 287 株,根中分离出 142 株,占 49.5%,茎中分离出 78 株,占 27.2%,叶中分离出 67 株,占 23.3%。136 株内生真菌中,根中分离出 55 株,占 40.4%;茎中分离出 44 株,占 32.4%;叶中分离出 37 株,占 27.2%(表 1)。151 株内生细菌中,从根中分离出 87 株,占 57.6%;茎中分离出 34 株,占 22.5%;叶中分离出 30 株,占 19.9%(表 2)。乌拉尔甘草不同组织部位的内生菌的数量也存在较大的差异,分布规律为根、茎、叶数量递减。

2.2 宁夏乌拉尔甘草内生菌初步鉴定

从宁夏乌拉尔甘草根、茎、叶中分离的 136 株内生真菌中,其中 83 株不产孢子,无法进行形态鉴定,对产孢的 53 株内生真菌进行初步鉴定,分类为 2 目 4 科 6 属(表 2),青霉属(*Penicillium*) 12 株,占 22.6%;黑葱花霉属(*Periconia*) 2 株,占 3.8%;链格孢属(*Alternaria*) 15 株,占 28.3%;根霉属(*Rhizopus*) 6 株,占 11.3%;镰孢霉属(*Fusarium*) 5 株,占 9.5%;曲霉属(*Aspergillus*) 13 株,占 24.5%。其中链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*) 为优势种群。而 151 株内生细菌中,革兰氏阳性菌 94 株,占 62.3%;革兰氏阴性菌 57 株,占 37.7%;杆菌 107 株,占 70.9%;球菌 44 株,占 29.1%,见表 2,革兰氏阳性菌、杆菌占优势。

2.3 宁夏乌拉尔甘草内生菌对甜瓜采后病害病原菌的抑制作用

如图 1,测定分离的 151 株内生细菌对甜瓜采后病害病原菌的抑制作用,可以看出,有 19 株内生细菌对至少 2 种病原菌有抑制作用,占总数的 12.6%;其中分离自根的 9 株,占 47.4%,分离自茎 6 株,占 31.6%,分离自叶的 4 株,占 21%。结果见表 3, R0805243、R0806131、R0806132、R0807111、S0806082、S0808213、S0807125、L0805056 共 8 株内生

细菌对 4 种病原菌的抑制能力均较强,具有开发成 防治甜瓜采后病害相应产品的潜力。

表 1 乌拉尔甘草内生真菌的种群、数量与种类分布

Table 1 Quantity, genera and composition of endophytic fungi isolated from *Glycyrrhiza uralensis*

纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	数量(株) Quantity (Strains)			合计(株) Total (Strains)
				根 Root	茎 Stem	叶 Leaf	
				半知菌类 Fungi Imperfecti	从梗孢目 Moniliales	从梗孢科 Moniliaceae 暗梗孢科 Dematiaceae 暗梗孢科 Dematiaceae 瘤座孢科 Tuberculariaceae 从梗孢科 Moniliaceae	
藻菌纲 Phycomycetes	毛霉目 Mucorales	毛霉科 Mucoraceae	根霉属 <i>Rhizopus</i>	2	1	3	6
未鉴定真菌 Unidentified				42	27	14	83
合计 Total				55	44	37	136

表 2 乌拉尔甘草内生细菌的形态多样性

Table 2 Morphological diversity of endophytic bacteria isolated from *Glycyrrhiza uralensis*

分离部位 Explant	菌株数量 Number of bacterial	革兰氏染色 Gram's stain		基本形态 Morphology	
		阳性 G ⁺	阴性 G ⁻	杆状 Bacillus	球状 Coccus
		根 Root	87	53	34
茎 Stem	34	20	14	28	6
叶 Leaf	30	21	9	19	11
合计 Total	151	94	57	107	44

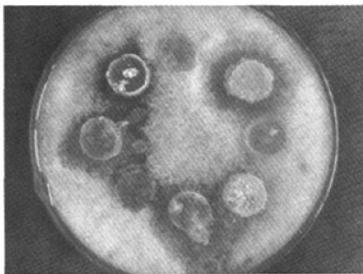


图 1 乌拉尔甘草内生细菌对甜瓜采后病害病原菌的抑制效果

Fig.1 Inhibition effects of endophytic bacteria against pathogens of post-harvest muskmelon

3 结论与讨论

从宁夏乌拉尔甘草根、茎、叶中共分离出内生菌 287 株,根中分离出 142 株,占 49.5%,茎中分离出 78 株,占 27.2%,叶中分离出 67 株,占 23.3%。136 株内生真菌,151 株内生细菌。乌拉尔甘草不同组织

表 3 乌拉尔甘草内生细菌对甜瓜采后病害病原菌的抑菌活性

Table 3 The inhibition activity of endophytic bacteria against pathogens of post-harvest muskmelon

Endophytic bacteria	菌株 <i>Trichothecium roseum</i>	<i>Fusarium sp.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	<i>Rhizopus stolonifer</i>
R	0805121 -	++	+++	-
	0805243 +++	+++	+++	+
	0806131 ++	+++	++	+
	0806132 ++	+++	+++	+
	0807111 ++	+++	+++	+
	0805203 +	++	+++	-
	0806153 -	++	+++	-
	0809121 ++	++	+	+
	0809053 +	++	+++	+
S	0808213 ++	+++	++	+
	0807125 ++	+++	+++	+
	0807051 +	++	++	-
	0806082 +++	+++	+++	+
	0806103 +	+++	+++	+
	0809212 +	++	+++	+
L	0807148 -	++	+++	-
	0805152 -	++	++	-
	0805056 ++	+++	+++	+
	0806135 +	+++	+++	+

注:1. - :抑菌带 < 5 mm; + :5 mm < 抑菌带 < 10 mm; ++ :10 mm < 抑菌带 < 15 mm; +++ :15 mm < 抑菌带。

2. R 表示菌株分离自根,S 表示菌株分离自茎,L 表示菌株分离自叶。

Note: 1. - :inhibition zone < 5 mm; + :5 mm < inhibition zone < 10 mm; ++ :10 mm < inhibition zone < 15 mm; +++ :15 mm < inhibition zone.

2. R, S and L refer to the bacteria strains isolated from root, stem and leaf of *Glycyrrhiza uralensis*.

部位的内生菌的数量也存在较大的差异,分布规律为根、茎、叶中数量递减。136株内生真菌中,83株不产孢,对产孢的53株进行初步鉴定,分类为2纲4科6属,青霉属(*Penicillium*)、黑葱花霉属(*Periconia*)、链格孢属(*Alternaria*)、根霉属(*Rhizopus*)、镰孢霉属(*Fusarium*)和曲霉属(*Aspergillus*)。链格孢属(*Alternaria*)、曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)为优势种群;151株内生细菌中,革兰氏阳性菌、杆菌占优势群。有19株内生细菌对甜瓜采后病害病原菌中至少2种病原菌有抑制作用,8株内生细菌对4种病原菌的抑制能力均较强,具有开发成相应产品防治甜瓜采后病害的潜力。

“植物内生菌(Endophyte)”是指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物的各种组织和器官的细胞间隙或细胞内部的微生物^[9]。如何界定分离到的微生物就是内生菌是一个比较麻烦的问题,从分离方法上,表面消毒是决定分离出的微生物是否为内生菌的关键步骤。表面消毒过轻,分离到的内生菌可能存在“假阳性”,即将组织表面附生菌或潜伏的病原菌误认为是内生菌。表面消毒过重,可能会透过组织杀死内部的内生菌,致使分离的内生菌数量减少。本研究采用“组织印迹法”检验表面消毒效果,将同一批表面消毒,但不切成小块的组织作为检验表面消毒效果的阴性对照,保证经过同样消毒程序,但被切成小块的试验材料切面长出的菌才被认定为内生菌。本研究还将消毒过的甘草根、茎的表皮在无菌条件下刮掉,进一步保证内生菌的“内生性”。也有研究者将最后一次清洗组织的无菌水为阴性对照,检验表面消毒效果^[14],其严谨性应不如本研究采用的“组织印迹法”,因为最后一次无菌水并不一定能将植物材料表面附生的未被杀死的微生物冲洗下来,所以容易出现“假阳性”。

本研究采用“组织分离法”分离内生细菌和内生真菌,该方法的优点是简单、直观,不仅可以减少无菌操作步骤、避免人为操作污染,而且可以清楚地观察到内生菌长出的组织部位。但也有研究者采用研磨法分离,将组织材料消毒后,在无菌研钵中研出汁液,再将汁液加到分离平板中^[14]。由于组织材料被充分研碎,保证了内生菌被最大限度释放出来,同时汁液中带有宿主植物成分,尽量模拟了内生细菌在宿主中的生活环境,便于一些专性或兼性寄生内生菌的生长。但该方法繁琐,在表面消毒后研磨如甘草根这类坚硬的组织材料时,容易带入人为操作污染,而且研磨可能会损坏内生真菌的菌丝,笔者认为该方法适合熟练操作后,分离叶、嫩茎等柔软组织中

的内生细菌。即使本研究采用的“组织分离法”加“组织印迹法”,在操作中,发现效果也不是很稳定,可能与不同季节植物材料本身生理状态差异有关。目前关于内生菌的分离程序,并无统一标准,多数研究者采用组织分离法,多批次分离到相同菌株,才认定为内生菌。另外,有研究者认为,病原菌的分离与确证可以采用“科赫假说”,内生菌的确证也可借用这一假说,采用“回接试验”^[13]来验证其“内生性”。但在实际操作中存在一定困难,一是植株无菌苗的获取,二是无菌苗由于生理周期的不同,内生菌不一定能回接上并定殖于植株内。

本研究所选用的材料为4~8年的甘草,所以不能确定生长期更长的材料中内生菌数量和种类是否更多,产出的活性物质是否更强,这有待进一步的探索和研究。内生菌在甘草不同组织器官中的出现频率也不相同,以根中的内生细菌出现频率最高,茎、叶次之,这可能是因为甘草是多年生草本,地上部分每年秋末冬初干枯,翌年春季由垂直根茎上端生出新的幼芽,致使叶生长时间较短,可能器官生长时间越长,其内生菌的种类和数量就越丰富。另外,在内生菌的分离过程中,所用培养基均为常规分离用的培养基,因而不能保证所有生活在组织内的微生物能够全被分离出来,可能有的稀有微生物不能在人工培养基上生长,有研究者结合非培养的方法对内生菌多样性进行研究,可能结果更科学^[15,16]。

本研究分离的内生真菌菌株中,有一部分在体外不产生孢子,致使依据形态初步鉴定无法进行,可能是由于内生真菌与宿主中长期以菌丝的形式生长,使得内生真菌不仅在宿主体内不产生子实体及孢子,而且在体外培养时也不适宜产生,需研究产孢子的条件,诱导产生孢子,或采用分子生物学技术相结合的手段,明确其分类地位。对于产孢子的内生真菌菌株,本研究也只是依据形态初步鉴定到属,同一属内有多株重复,究竟是同属同种,还是同属不同种的菌株,仍有待进一步研究。

本研究选用的测试菌种也是从实验室随机选取的,不能测出内生菌对所有病原菌的抑制作用,只是进行了初筛。目前在生产上利用植物内生真菌来防治农产品采后病害的例子非常少,主要是应用机理方面的研究还不成熟,还有待在这方面进行更加系统深入地研究。

参考文献:

- [1] 梁新华,史大刚.干旱胁迫对光果甘草幼苗根系MDA含量及保护酶POD、CAT活性的影响[J].干旱地区农业研究,2006,24

- (3):108—110.
- [2] 鲁守平,孙群,洪露,等.干旱胁迫下不同种源甘草幼苗的生理反应及其抗旱性分析[J].干旱地区农业研究,2007,25(5):140—144.
- [3] 郭江平,李文华,木巴里克,等.乌拉尔甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)大面积人工种植试验初报[J].干旱地区农业研究,2000,18(4):133—136.
- [4] 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.
- [5] 李文军,郑素慧,毛培宏,等.新疆甘草内生细菌的分离及其系统发育分析[J].新疆农业科学,2008,45(6):1057—1059.
- [6] 龚明福,林世利,张前峰,等.拮抗棉花枯、黄萎病菌的甘草内生细菌初步研究[J].塔里木大学学报,2007,19(2):49—52.
- [7] 张敏,沈德龙,饶小莉,等.甘草内生细菌多样性研究[J].微生物学通报,2008,35(4):524—528.
- [8] 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.
- [9] 孙剑秋,郭良栋,臧威,等.药用植物内生真菌及活性物质多样性研究进展[J].西北植物学报,2006,26(7):1505—1519.
- [10] 周德庆.微生物学实验教程(第二版)[M].北京:高等教育出版社,2006:32—372.
- [11] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M].北京:科学出版社,2001:353—358.
- [12] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1982:58—647.
- [13] 方中达.植病研究法(第三版)[M].北京:中国农业出版社,1998:246.
- [14] 王涛,游玲,魏琴,等.油樟内生细菌的多样性及抑制植物病原菌初步研究[J].西北林学院学报,2009,24(2):97—100.
- [15] 程晓燕,李文军,王芸,等.新疆野生胀果甘草内生细菌多样性的非培养初步分析[J].微生物学报,2009,49(6):718—725.
- [16] Wei G H, Yang X Y, Zhang J W, et al. Rhizobialide, a new stearylactone produced by rhizobial *Mesorhizobium* sp. CCNWCX022, an endophyte from *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Chemistry & Biodiversity, 2007,4(5):893—896.

Identification of endophytes from *Glycyrrhiza uralensis* in Ningxia and screening of antagonism against pathogens of post-harvest muskmelon

LIU Jian-li, CAO Jun-mai, MA Wen-ping

(College of Biological Sciences and Engineering, North University for Ethnicity, Yinchuan, Ningxia 750021, China)

Abstract: The study was aimed at isolating and identifying endophytes from *Glycyrrhiza uralensis* and detecting antimicrobial activity of these strains. The endophytes was isolated by using tissue isolation method from the root, stem and leaf of *Glycyrrhiza uralensis* in Ningxia and identified preliminarily based on morphological characteristics. With the pathogens of post-harvest muskmelon as test fungi, the antimicrobial activity of endophytic bacteria was investigated. The results showed that 287 endophytes were isolated from the roots, stems and leaves of *Glycyrrhiza uralensis* in Ningxia respectively, of which 142 were from roots, 78 from stems and 67 from leaves, and 151 belonged to bacteria and 131 to fungi. The 53 spore-producing fungi were classified into 6 genera under 4 families and 2 orders, *e. g.* *Penicillium*, *Alternaria* and *Aspergillus* were dominant. G^+ and *Bacillus* were dominant in endophytic bacteria. And 8 endophytic bacteria with higher activity against all pathogens of post-harvest muskmelon were selected out.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis*; endophyte; identification; pathogens of post-harvest muskmelon; selection