



# 西洋参内生真菌分离鉴定及生防特性

姜午春<sup>1</sup>,解修超<sup>1,2</sup>,彭 浩<sup>1,2</sup>,邓百万<sup>1,2</sup>,罗 强<sup>1</sup>,王 娇<sup>1</sup>

(1. 陕西理工大学 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省食药菌工程技术研究中心, 陕西 汉中 723000)

**摘要:**为促进西洋参病害的生物防治研究,通过采用纯培养方法分离纯化西洋参内生真菌,获得 58 株内生真菌,通过形态学鉴定和显微观察初步确立了 16 株菌,提取纯化出其中 13 株真菌 DNA,选用真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 对 DNA 进行 ITS 特异性扩增,提交测序分析,构建系统发育树。确定其分属于:镰孢属(*Fusarium*)、毛束霉属(*Trichurus*)、葡萄孢属(*Cinerea*)、亚黑团孢属(*Periconiella*)、棘壳孢属(*Pyrenochaeta*)、链格孢属(*Ilternarsa*)。同时对菌株的生防作用进行研究,其中 14 株针对立枯病、根腐、茎腐、液斑水浸木 4 种病原菌表现出不同程度的拮抗性,占分离菌株的 87.5%。试验表明西洋参内生真菌多样性丰富。

**关键词:**西洋参;内生真菌;分离;鉴定;生防作用

内生真菌(Endophyte)指在植物生活史中,某段组织没有明显引起病害症状的一类真菌<sup>[1]</sup>。从 1833 年内生菌的提出至今有关植物内生真菌方面的报道很多。内生菌是生态学概念,且内生真菌产生的活性物质存在如抗虫、抗细菌、抗病毒、抗肿瘤等极大的多样性<sup>[2-3]</sup>。在植物病害防治中,植物内生菌通过产生包括 PHL、PCA、PLT 等在内的多种抗生素类物质,以及大量水解酶类,增强植物抵抗力、降解植物病原真菌的细胞壁或其它致病因子,达到防病效果。同时内生菌具有较强的营养竞争力,使病原菌因营养供给不足而自动消亡。

西洋参(*Panax quiquefolium* L.)属五加科人参属,多年生草本植物,其根部作为重要的补益类中药广为应用。现广泛种植于世界多个地区,但其在栽培过程中均表现出多种病害,且随种植年份的增加,病害种类、发病面积及严重程度亦逐年加增,其中根部病害最为严重,是影响西洋参产量及质量的主要障碍<sup>[4]</sup>。本试验从西洋参中分离得内生真菌,并通过筛选具有较强抗菌活性的菌株,为西洋参病害的生物防治奠定基础,同时为其它类似中药材病害的生物防治开辟新的途径,以期能减少化学农药的用量,从而达到杜绝或降低农残的目的,这对维护中药及中成药声誉、保证药效、开拓国际市场和维护用者健康都具有重要

意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试材料 陕西省留坝县枣木栏海拔 1 000~1 500 m 处采集四年生西洋参根部、密封袋密封并置于 4 ℃ 冰箱保存,用于内生真菌的分离。

1.1.2 培养基 cPDA 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 18 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 自然<sup>[5]</sup>。

1.1.3 主要仪器 立式压力蒸汽灭菌锅(LDZX-50KBS,上海申安)、干燥箱(101A-1 型)、双人双面精华工作台(SW-CJ-2F,苏州净化)、生化培养箱(XPX-250BSH-Ⅱ,上海新苗)、电子天平(BSA8201 MAX=8 200 g, d=0.1 g,北京赛多利斯)、电子天平(TB-214 MAX=210 g, d=0.1 mg,北京赛多利斯)、光学显微镜(SA3000,北京泰克)、恒温培养振荡器(ZHWY-B2112B,上海智城)、电热恒温水槽(XMTD-8222,上海精宏)、小型台式高速冷冻离心机(Centrifuge 5424R,上海艾研)、PCR 仪(TC-4000,英国 TECHNE 公司)、电泳仪(DYCP-34A,北京六一)、电泳仪电源(DYY-11 型,北京六一)、凝胶成像系统拍照仪(UVItect, Cambridge, United Kingdom)、佳能数码相机(A710IS)。

1.1.4 主要试剂 十六烷基-三甲基-溴化铵(CTAB)、Tris-平衡酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇、75%乙醇、PCR 扩增试剂盒、研钵、棉兰染液、移液枪、移液枪头及枪盒、酒精灯、试管、培养皿、

收稿日期:2018-01-09

第一作者简介:姜午春(1991-),女,在读硕士,从事微生物代谢产物活性研究。E-mail:252498002@qq.com。

通讯作者:解修超(1978-),男,博士,副教授,硕士生导师,从事微生物代谢产物活性研究。E-mail:44557987@qq.com。

涂布棒、接种环、载玻片、盖玻片、滤纸、HgCl<sub>2</sub>、青霉素(Penicillin)、氯霉素(Chloromycetin)、50%甘油等。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌的分离、纯化及形态观察 采用组织分离法和组织液匀浆涂布法进行内生真菌的分离<sup>[6]</sup>。具体操作如下:取无病斑的新鲜西洋参,冲洗干净,晾至表面无水珠,主根切成约 3 cm 的片段,通过自来水冲洗、75%乙醇漂洗、氯化汞漂洗、无菌水涮洗的顺序进行表面消毒。将处理后的组织块切成 1 cm×1 cm 小块,将 4 个小块均匀插入 cPDA 平板培养基中,28 ℃ 的恒温培养箱中培养。约 5 个组织块体积的样品与 50 mL 无菌水同时放入研钵中充分研磨,吸取组织液到平板上进行涂布,28 ℃ 恒温培养箱中培养 5~7 d<sup>[7-8]</sup>。

每隔 24 h 记录出菌情况及组织片变化,待组织边缘长出菌后,切 1 cm×1 cm 菌块,转接于新培养基中央,进行纯化培养。将纯化所得菌株转移到斜面培养基中培养 3 d,4 ℃ 冰箱保藏,待用。

将内生真菌接种于 cPDA 培养基培养 5 d,用胶带轻轻粘取边缘菌落的菌丝,以棉兰作浮载剂制成玻片,在显微镜下观察其显微形态特征,并初步进行分类鉴定。

1.2.2 DNA 提取及 ITS 扩增 ①基因组 DNA 提取:待测菌分别接种于 250 mL 的 cPDA 液体培养基中,静置 24 h,后摇瓶培养 3~5 d;过滤弃培养液取菌丝体,以灭菌后的滤纸尽可能吸干菌体表面水分,干菌丝球置于 1.5 mL 离心管中。采用 CTAB 法对真菌基因组 DNA 进行提取<sup>[9]</sup>。

②ITS 扩增:使用引物 ITS1:5'-TCCGTAG-GTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4: 5'-TCCTC-CGCTTATTGATATGC-3'; 25.0 μL PCR 扩增反应体系:10×缓冲液 5.0 μL,DNTP 4.0 μL,引物 1、引物 2 各 1.0 μL,DNA 模板 1.0 μL,Taq 酶 0.5 μL,ddH<sub>2</sub>O 12.5 μL;PCR 扩增程序:95 ℃ 5 min;95 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。以上条件进行 ITS 扩增,PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测,后送至上海生工进行序列检测<sup>[10]</sup>。

③分离菌株的系统发育分析:将测得核苷酸序列提交 GenBank 并进行 BLAST 检索,并下载同源性较高的序列,与分离内生真菌的 ITS 序列组成一套数据集,用 Clustal-X 软件进行多序列比对分析,运用系统发育分析软件 Mega5.0.2 构建系统发育树。

1.2.3 拮抗试验 将分离菌种与病原菌接种到同一平板培养基中,接种块相距 30 mm,于 28 ℃ 下培养 7~15 d 后,观察有无拮抗线。

1.2.4 数据分析 使用 BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)、Clustal-X 1.8 和 MEGA Version 5.0.2 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离鉴定结果

本试验通过采用组织块插片法和组织液匀浆涂布法从西洋参中分离了 58 株内生真菌,通过菌落形态和显微观察初步确立了 16 株菌,所分离纯化的部分真菌菌落形态描述如表 1 所示,主要分为镰刀形、卵圆形,单个着生或呈链状<sup>[11-12]</sup>。

表 1 分离纯化的真菌菌落形态及鉴定结果  
Table 1 Colony and microscopy characteristics of fungi

代表菌编号 Representative strain No.	菌属特征 Characteristics
1	镰刀形,小型分生孢子,单孢,卵圆形或者长圆形,单个着生或成链。
2	
3	
7	
4	联丝体暗色,柄细长,孢子生长部分膨大,长在分生孢子梗中,存在有黑色,简单或分枝的毛或刺,分生孢子暗色,单孢,卵圆形。链生,腐生。
6	分生孢子无色或灰白色,单孢,卵圆形,寄生。
8	分生孢子梗暗色,向上部分分枝,分生孢子单孢,暗色,卵圆形或长圆形。
13	

2.2 序列分析

提取分离所得西洋参内生真菌 DNA,通过 1%琼脂糖凝胶检测得到大于2 000 bp的目标片段,应用真菌 ITS 特异性扩增,通过 1%琼脂糖凝胶检测得到约 620 bp 的目标片段。通过 ITS 扩增,检测出其中 13 株内生真菌 ITS 序列,送至上海生工测序并进行序列比对,确认其分别属于镰孢属(*Fusarium* LK. ex FR)、毛束霉属(*Trichurus*)、葡萄孢属(*Cinerea*)、亚黑团孢属(*Periconiella*),对所测序列构建序列进化树见图 1,亲

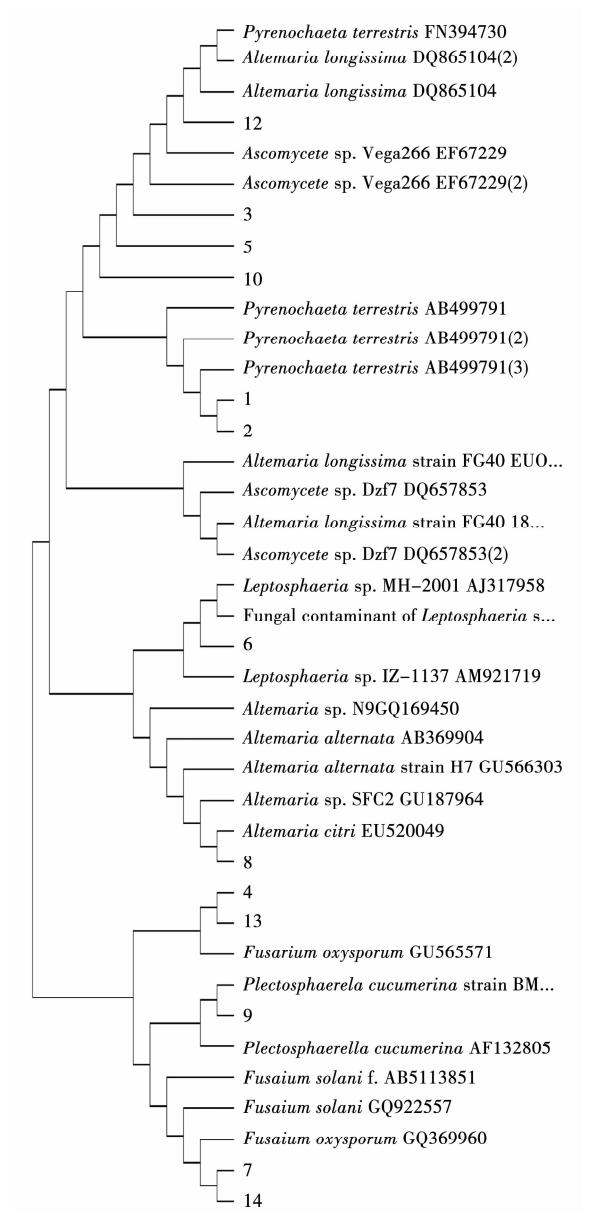


图 1 13 株西洋参内生真菌的 ITS 序列进化树  
Fig. 1 Phylogenetic tree based on endophytic fungi gene of *Panax quinquefolium*

缘关系相近的菌株在发育树距离较近。

2.3 内生真菌的拮抗试验研究结果

2.3.1 拮抗效果图 完成内生真菌拮抗试验后,其中 6 号菌株对 4 种病原菌的拮抗图见图 2,平板中两株对峙菌间产生明显拮抗线。

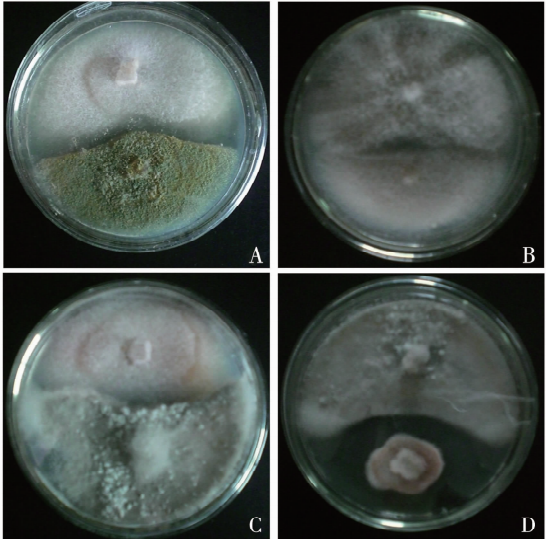


图 2 6 号菌与立枯病、根腐、茎腐、液斑水浸木 4 种病原菌对峙实验

Fig. 2 Antagonistic inhibition of No. 6 endophytic fungi to 4 kinds of pathogens

2.3.2 对峙结果统计及分析 进行内生真菌对峙实验后,观察测量详细统计结果显示 6 号菌对

表 2 病原菌与部分内生菌的对峙作用统计表  
Table 2 Statistical of the antagonistic between pathogenic bacteria and endophytes fungi

内生菌 Endophytes fungi	病原菌 Pathogenic bacteria			
	立枯病	茎腐	叶斑水浸木	根腐
3	+++	+++	—	++
5	—	—	—	—
6	+++	++	++	++
7	+++	++	—	—
8	+++	—	—	—
9	++	++	—	++
10	—	+	—	—
12	+++	++	—	++
13	—	—	—	—
14	+	—	—	+

+++表示拮抗作用明显;++表示拮抗作用较明显;+表示拮抗作用有效果但不明显;—表示没有拮抗作用。  
+++indicate obvious antagonism; ++ indicate less obvious antagonism; + indicate no obvious antagonism; — indicate no antagonism.

立枯病、茎腐、根腐、液斑水浸木 4 个种类病原菌均体现出拮抗作用且较明显;3、7、9、12 号菌菌对立枯病、茎腐、根腐这 3 个种类病原菌有拮抗作用且较明显;14 号菌对立枯病、根腐 2 个种类病原菌有一定拮抗作用;8 号菌仅对立枯病 1 个种类病原菌有明显拮抗作用;10 号菌仅对茎腐 1 个种类病原菌表现出一定拮抗作用;5、13 号菌对 4 个种类病原菌均未表现出拮抗作用;只有 6 号菌对叶斑水浸木产生拮抗,由试验结果可知,3、6、9、12 号菌株对至少 3 种致病菌表现出抑菌性,具有一定的生物防治潜力。

### 3 结论与讨论

全世界现已在至少 80 个属 290 多种禾本科植物中发现内生真菌,其范围几乎涵盖当前已研究过的所有植物,在这些植物中,各种农作物及经济作物中发现的内生细菌已超过 120 种。而在研究内生菌的同时还发现,感染内生菌的植物较未感染的植株往往表现出更强的生存竞争力,在生长速度、抗病害、抗逆境、抗动物危害等方面均具有显著优势。对植物内生菌的防病机理进行进一步研究发现,内生菌是通过产生抗生素类、水解酶类、植物生长调节剂和生物碱类物质,与病原菌竞争营养物质、增强宿主植物的抵抗力、诱导植物产生系统抗性途径抑制病原菌生长<sup>[13-14]</sup>。

本研究试验过程中,选择没有腐烂发霉及病斑、病害的健康西洋参根,在最短时间内进行新鲜活体植株分离样品处理,共分离纯化出 16 株菌株,分别属于:镰孢属(*Fusarium*)、毛束霉属(*Trichurus*)、葡萄孢属(*Cinerea*)、亚黑团孢属(*Periconiella*)、棘壳孢属(*Pyrenochaeta*)、链格孢属(*Ilternarsa*)。通过对峙试验,在分离得到的 16 株真菌中有 14 株真菌表现出至少对 1 种致病菌具有不同程度的拮抗作用,占总检测菌株的 87.5%。特别是其中 3、6、9、12 号菌株对至少 3 种致病菌均表现出较强抑菌性,可能具有很好的

生物防治潜力。

结果表明,西洋参内生真菌具有不同程度的拮抗作用,其中有部分菌种具有较强的活性,可进行进一步的研究,探索其在其它领域的作用。

本试验是对西洋参内生真菌的基础性研究,为下一步筛选西洋参内生真菌的抗菌活性菌株、为西洋参病害的生物防治研究打下了基础。

### 参考文献:

- [1] Ann M, Hirsch A, Maria Valdés. Micromonospora: An important microbe for biomedicine and potentially for biocontrol and biofuels[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2010, 42: 536-542.
- [2] Khaled A, El-Tarabily, Krishnapillai Sivasithamparam. Potential of yeasts as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters[J]. Mycology, 2006, 47: 25-35.
- [3] 陈雪英. 西洋参内生菌与人参皂苷类成分相关性的初步研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2007.
- [4] 杨家学, 焦晓林, 高微微. 西洋参根部病害研究进展[J]. 植物保护, 2009, 35(6): 30-35.
- [5] 范秀容, 李广武, 沈萍. 微生物学实验[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2006.
- [6] 孙桂丽, 陈有, 张琦, 等. 一株有抗菌活性的云南重楼植物内生真菌的鉴定[J]. 云南大学学报, 2006, 28(S1): 347-351.
- [7] 尹建军, 陈有为, 杨丽源, 等. 芦荟植物内生真菌的研究 I. 内生真菌的分离及鉴定[J]. 微生物学, 2004, 24(1): 25-41.
- [8] 叶静, 冉雪琴, 孙端方, 等. 三尖杉内生真菌的遗传多样性研究[J]. 山地农业生物学报, 2009, 28(2): 130-135.
- [9] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [10] 邓静, 刘吉华, 余伯阳. 具有生物碱转化活力的 4 株喜树内生真菌的鉴定[J]. 药物生物技术, 2006, 13(6): 436-441.
- [11] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [12] Barnett H L, Hunter B B. 半知菌属图解[M]. 北京: 科学出版社, 1997.
- [13] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展[J]. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401.
- [14] 徐菁菁, 孟竹, 王琦. 西洋参内生真菌抑菌活性的初步研究[J]. 菌物研究, 2015, 13(1): 15-19.

## Isolation, Identification and Bio-control Characteristics of Endophytic Fungi in *Panax quinquefolium*

JIANG Wu-chun<sup>1</sup>, XIE Xiu-chao<sup>1,2</sup>, PENG Hao<sup>1,2</sup>, DENG Bai-wan<sup>1,2</sup>, LUO Qiang<sup>1</sup>, WANG Jiao<sup>1</sup>

(1. School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000, China; 2. Research Center of Food and Medicinal Fungi Engineering Technology of Shaanxi Province, Hanzhong 723000, China)

(下转第 138 页)

能区情况调查[J]. 农产品市场周刊, 2016(32): 52-54.

[8] 西奥多·W·舒尔茨. 改造传统农业[M]. 北京: 商务印书馆, 2009.

[9] 汪晖, 陶然. 论土地发展权转移与交易的“浙江模式”——制度起源、操作模式及其重要含义[J]. 管理世界, 2009(8):

39-52.

[10] 张蔚文, 李学文, 吴宇哲. 基于可转让发展权模式的折抵指标有偿调剂政策分析——一个浙江省的例子[J]. 中国农村经济, 2008(12): 50-61.

## Grain Production Incentive Mechanism of Farmers in the Grain Production Function Area of Zhejiang

XU Wei-xing, JIANG He-zhong

(Business School of Ningbo University, Ningbo 315211, China)

**Abstract:** In order to encourage farmers to engage in grain production, we analyzed the problems of the grain production in the grain production area of Zhejiang and the reasons for the “non grain” phenomenon in this paper. The results showed that the lack of legal support for Zhejiang's grain production ‘hard constraints’ had led to the welfare imbalance of different interest groups, and farmers lack of food production incentives. The policy suggestions on the construction of Zhejiang grain functional area with incentive compatibility were put forward.

**Keywords:** land development rights; welfare balance; farmer compensation; agricultural modernization; Zhejiang grain producing functional area

(上接第 129 页)

**Abstract:** In order to promote the biological control research on the disease of *Panax quinquefolium*, 58 strains were isolated from *Panax quinquefolium* by using the methods of inserting tissue and spreading milling liquid. According to their colony characters and microscopic morphological characters, 16 strains are identified. We extract the DNA of 13 strains and amplify the ITS sequence by using the PCR apparatus. We contrast the ITS sequence and establish phylogenetic tree. There are belong to 6 genus: *Fusarium*, *Trichurus*, *Cinerea*, *Pyrenochaeta*, *Ilternaria*, *Periconiella*. 14 strains showed different degrees of resistance for *Rhizoctonia solani* Kuhn, *ceitocybe bescens*, stem rot, leaf spot, accounting for 87.5% of the isolates. *Panax quinquefolium* endophytic fungi have a rich diversity.

**Keywords:** *Panax quinquefolium*; endophytic fungi; isolation; identification; bio-control

(上接第 133 页)

## Study On *Dendrobium porphyrochilum*

LI Gui-lin, LI Ze-sheng, ZHOU Hou-guang, BAI Yan-bing, GAO Yan, LUO Kai, YAO Zhi-jun

(Dehong Tropical Agricultural Research Institute of Yunnan, Ruili 678600, China)

**Abstract:** In order to study the biological characteristics of *Dendrobium porphyrochilum*, understand its growth regularity and evaluate the value of its development and utilization. The author observed its botany characteristics, biological habits and yield traits and evaluated the commercial value of its stem. The results showed that floss-shaped and thinned roots, short stem weights was 0.14-0.72 g, yield averaged in the range of 42-216 g·m<sup>-2</sup> to 252-1 296 kg·hm<sup>-2</sup>; The rate of broken stem was 17.06%, and it contains 4.22% Crude Ash, 33.87% Polysaccharide, 0.851% Calcium, 0.016% Magnesium, 0.879% Total Nitrogen and 0.264% Phosphorus. Furthermore, both fresh and dried products of *Dendrobium porphyrochilum* (Fengdou) were evaluated as taste good, and its dried flowers could be used as tea. *Dendrobium porphyrochilum* is mainly put in the market as edible fresh products and for dry products as Fengdou processing. At present, the commercial cultivation of *Dendrobium porphyrochilum* is not successful yet, and resulting in its endangered. From the consideration of resource protection and commercial value, *Dendrobium porphyrochilum* should be cultivated on large scale. And its short stem and thin root are the main reasons for failing artificial production.

**Keywords:** *Dendrobium porphyrochilum*; characteristics; stem evaluation