



杨帆,刘春来,刘亮,等.大兴安岭野生药用植物内生真菌的分离及拮抗菌株初筛[J].黑龙江农业科学,2021(7):87-91.

大兴安岭野生药用植物内生真菌的分离及拮抗菌株初筛

杨帆^{1,2,3},刘春来^{2,3},刘亮^{2,3},王爽^{2,3},蒋希峰^{2,3},李敏^{2,3},曹大为^{2,3},李新民^{1,2,3}

(1.黑龙江省农业科学院 博士后科研工作站,黑龙江 哈尔滨 150086;2.黑龙江省农业科学院 植物保护研究所,黑龙江 哈尔滨 150086;3.农业部哈尔滨作物有害生物科学观测实验站,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为挖掘野生植物内生真菌资源,本研究采集了大兴安岭东麓野生药用植物,通过传统组织分离法,从21种供试材料不同组织部位分离纯化内生真菌,以常见作物病原菌为靶标菌,采用平皿对峙法筛选拮抗菌株。根据拮抗菌株菌落形态及分子生物学特征进行菌株鉴定。结果表明:共分离纯化478株内生真菌,筛选出61株具有拮抗作用的菌株,其中11株抑菌带宽 ≥ 5 mm,为高活性拮抗菌株。61株菌株经鉴定后有10株无法鉴定到属,其余51株分属于16个属,其中青霉属占24.59%,刺盘孢属占11.48%,离蠕孢属、瓶霉属、链格孢属和镰刀菌属占6.56%,其余均低于5%。

关键词:药用植物;内生真菌;拮抗作用

植物内生菌是普遍存在于植物体内,与寄主植物协同进化,或存在拮抗作用或存在轻微致病的互惠共生关系的一类微生物^[1-2]。研究表明大多数的植物物种至少具有一种内生菌^[3],而生长在独特环境中的植物通常具有新的内生菌^[4]。这使植物内生菌的挖掘研究发展成为寻找具有潜在农业、医药和工业应用价值的天然产物的新领域^[5]。

药用植物的内生真菌可以产生与寄主相同或相似的次生代谢产物,是具有生物活性的天然化合物的丰富来源^[6-7],由植物及其内生真菌共同产生的生物活性化合物包括抗癌药物 Camptothecin,抗癌先导化合物 Podophyllotoxin 和天然杀虫剂印楝素^[8-10],尽管如此,药用植物仍在很大程度上未被开发^[11]。因此从药用植物中分离得到内生真菌在寻找新的生物活性天然化合物方面具有重要的应用价值。研究报道传统药用植物是新型内生真菌的重要来源^[12-14],在杀菌剂的研制中内生真菌代谢产物具有很大潜力。这极大地推动了药用植物内生真菌及其筛选功能性生物活性产物的研究进展。

本试验材料野生药用植物采自大兴安岭东麓内蒙古自治区呼伦贝尔市阿荣旗三岔镇新胜村,通过组织分离法,对内生真菌进行分离、鉴定及拮抗菌株的初步筛选,为挖掘野生植物内生真菌资源及功能型拮抗菌株提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物 供试植物采自大兴安岭东麓内蒙古自治区呼伦贝尔市阿荣旗三岔河镇新胜村,共21份野生植物样本。包括:黄芩(*Scutellaria baicalensis*)、地丁草(*Corydalis bungeana*)、兴安石竹(*Dianthus chinensis*)、玉竹(*Polygonatum odoratum*)、小叶玉竹(*Polygonatum humile*)、地榆(*Sanguisorba officinalis*)、威灵仙(*Clematis chinensis*)、关防风(*Saposhnikovia divaricate*)、藜芦(*Veratrum nigrum*)、兴安乌头(*Aconitum ambiguum*)、毛筒玉竹(*Polygonatum inflatum*)、黄芪(*Astragalus membranaceus*)、毛百合(*Lilium dauricum*)、白藓(*Dictamnus dasycarpus*)、北苍术(*Atractylis chinensis*)、走马芹(*Anchangelica decurrens*)、兴安柴胡(*Bupleurum sibiricum*)、苦参(*Sophora flavescens*)、漏芦(*Stemmacantha uniflora*)、桔梗(*Platycodon grandiflorum*)和狼毒(*Euphorbia fischeriana*)。

1.1.2 病原菌 供试病原菌有大豆根腐病

收稿日期:2021-04-28

基金项目:黑龙江省农业科学院科研项目计划(2019YYF037);黑龙江省农业科学院农业科技创新跨越工程-经济作物科技创新专项(HNK2019CX06-01-03)。

第一作者:杨帆(1982—),女,博士,副研究员,从事作物病虫害生物防治。E-mail:yf_echo2011@163.com。

通信作者:李新民(1963—),男,硕士,研究员,从事微生物源农药研究。E-mail:xinmin63@163.com。

菌(*Fusarium oxysporum*)、玉米大斑病菌(*Seto-sphaeria turcica*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、马铃薯早疫病菌(*Alternaria solani*)、水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、玉米茎基腐病菌(*Fusarium graminearum*),以上病原菌菌株均由黑龙江省农业科学院植物保护研究所生物防治研究室保存。

1.2 方法

1.2.1 内生真菌分离及纯化 采用组织分离法:用自来水反复冲洗供试样品根、茎、叶、花、果后放置在滤纸上晾干。无菌操作台中取野生植物健康组织根、茎、果 5~7 mm,叶、花 3 mm²,经 70%酒精浸 5 s,根、茎、果经 0.1%升汞浸 1.5~2.0 min,叶、花经 0.1%升汞浸 30~45 s,无菌水漂洗 3 次,灭菌滤纸吸干表面水分,放置于 PDA(含链霉素 400 μg·mL⁻¹)平皿上,每皿 4 块组织,4 次重复。于 25 ℃培养箱中培养,每天观察至有菌丝长出。

消毒效果验证:将 400 μL 各组织最后 1 次无菌水冲洗液涂布于 PDA 平皿,25 ℃培养箱黑暗培养 3~5 d,观察有无菌落产生,若平皿无真菌生长,表明组织表面灭菌彻底,所分离获得的是内生真菌,否则不能继续用于试验。

各组织平皿培养 2~3 d 后,待培养组织边缘有菌丝长出时,采用尖端菌丝挑取法,挑取形态不同的菌落纯化菌株转移至新的 PDA 平皿继续培养,反复纯化培养,对已纯化的菌株编号,转至 PDA 斜面,于 25 ℃培养箱中培养 5~7 d,4 ℃冰箱内保藏备用。

1.2.2 拮抗内生真菌初筛 参考平皿对峙法^[15],略改进。将靶标菌 7 mm 菌碟分别接于 PDA 平皿中央,“+”方向距培养皿边缘 1 cm 处接种待测内生真菌菌碟,以单独接靶标菌为对照,每处理重复 3 次。25 ℃培养箱培养至靶标菌长满平皿,检测待测内生真菌是否有拮抗作用。

1.2.3 拮抗内生真菌分类鉴定 形态学鉴定:活化具有拮抗作用的菌株至 PDA 平皿,打取培养皿边缘直径 7 mm 菌碟,将菌碟转接于 PDA 平皿中央,25 ℃培养箱黑暗培养,每隔 2 d 观察菌落形态,待菌丝长满平皿时,显微镜下观察菌丝、产孢结构以及分生孢子梗着生情况,对菌株进行鉴定。

分子生物学鉴定:利用通用引物 ITS1 和 ITS4 扩增序列,扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离,目的片段经 DNA 胶回收试剂盒回收纯化后,PCR 回收产物直接送样测序。将测序后获得的序列提交到 NCBI,用 Blast 完成序列分析,结合形态学,进行菌株鉴定。

2 结果与分析

2.1 野生植物不同组织内生真菌分离

从 21 种野生药用植物不同健康组织中共分离得到 478 株内生真菌,其中平均分离数量及分离率以根部最高,分别为 7 株和 34.14%,其次为茎部,叶部次之。不同植物间,从药用植物地丁分离的内生菌共 31 株,分离率最高为 6.48%(表 1,图 1)。

表 1 野生植物各部位内生真菌分离数量及分离率

野生植物	根		茎		叶		花		果实	
	分离数量	分离率/%	分离数量	分离率/%	分离数量	分离率/%	分离数量	分离率/%	分离数量	分离率/%
黄芩	9	30.00	7	23.33	9	30.00	5	16.67	-	-
地丁	9	29.03	5	16.13	5	16.13	-	-	12	38.71
石竹	9	32.14	13	46.43	6	21.43	-	-	-	-
玉竹	8	50.00	2	12.50	6	37.50	-	-	-	-
小叶玉竹	6	33.33	4	22.22	8	44.44	-	-	-	-
地榆	7	29.17	8	33.33	9	37.50	-	-	-	-
威灵仙	7	38.89	8	44.44	3	16.67	-	-	-	-
关防风	6	28.57	7	33.33	8	38.10	-	-	-	-
藜芦	4	19.05	10	47.62	7	33.33	-	-	-	-
草乌	10	37.04	8	29.63	9	33.33	-	-	-	-
毛筒玉竹	12	57.14	6	28.57	3	14.29	-	-	-	-

表 1(续)

野生植物	根		茎		叶		花		果实	
	分离数量	分离率/%	分离数量	分离率/%	分离数量	分离率/%	分离数量	分离率/%	分离数量	分离率/%
黄芪	12	42.86	8	28.57	8	28.57	-	-	-	-
百合	5	23.81	8	38.10	8	38.10	-	-	-	-
白藓皮	7	31.82	6	27.27	9	40.91	-	-	-	-
苍术	10	40.00	7	28.00	8	32.00	-	-	-	-
走马芹	3	15.79	4	21.05	5	26.32	7	36.84	-	-
柴胡	10	37.04	5	18.52	6	22.22	6	22.22	-	-
苦参	7	38.89	6	33.33	5	27.78	-	-	-	-
漏芦	6	35.29	8	47.06	3	17.65	-	-	-	-
桔梗	8	42.11	5	26.32	4	21.05	2	10.53	0	
狼毒	7	25.00	9	32.14	12	42.86	-	-	-	-
均值	7	34.14	6	30.38	6	29.53	5	21.56	6	19.35



A.分离自地丁根部; B.分离自走马芹茎部; C.分离自走马芹花。

图 1 野生植物部分内生真菌菌落

2.2 拮抗菌株初筛

以 6 种本地区主要植物病原菌为靶标菌,对分离的 478 株内生真菌进行平皿对峙初筛试验,结果得到具有拮抗作用的菌株 61 株,其中活性较

高的拮抗菌株 11 株,抑菌带宽≥5 mm。其中分离自地丁果实的菌株 2-Fr-8 对多种病原菌菌丝生长均起到了较强的抑制作用,拮抗作用广谱且高效,是一株有研究潜力的菌株(图 2)。



A.靶标菌Fusarium oxysporum; B.Botrytis cinerea; C.Setosphaeria turcica。

图 2 部分内生真菌对不同靶标菌的拮抗效果

2.3 拮抗内生真菌鉴定

将 61 株拮抗菌株的 ITS 序列测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 比对,有 10 株菌株同源性比对无法鉴定到属,其余 51 株菌株分属于 16 个属,青霉属(Penicillium)、刺盘孢属(Colletotrichum)、离蠕孢属(Bipolaris)、土赤壳属(Ilyonectria)、异茎点霉属(Paraphoma)、瓶霉属(Phia-

lophora)、拟茎点霉(Phomopsis)、蓝状菌属(Talaromyces)、球毛壳属(Chaetomium)、链格孢属(Alternaria)、曲霉属(Aspergillus)、镰刀菌属(Fusarium)、毛盘菌属(Lachnum)、垫壳孢属(Coniella)、长孢菌属(Ramicandelaber)和棘壳孢属(Pyrenochaeta)。其中青霉属占拮抗菌株的 24.59%,刺盘孢属占 11.48%,离蠕孢属、瓶霉

属、链格孢属和镰刀菌属占 6.56%，未知菌株占 16.39%，其余均低于 5%（图 3，图 4）。



A. *Penicillium canescens*; B. *Bipolaris victoriarum*; C. *Coniella* sp.

图 3 部分拮抗内生真菌显微形态特征

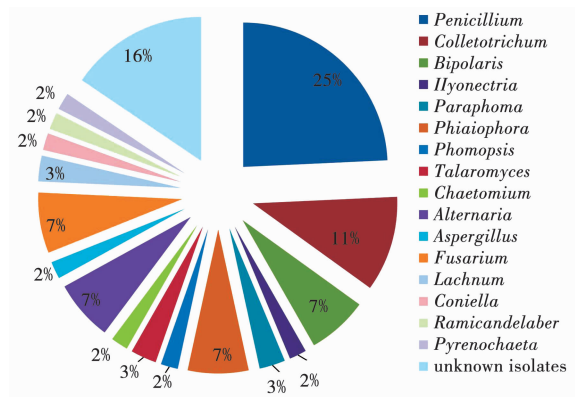


图 4 野生药用植物拮抗内生真菌的组成分布

3 讨论与结论

在挖掘及筛选高效拮抗内生真菌的研究中，区域性、植物体种类以及分离方法直接影响内生真菌的种类及数量。内生真菌的种类还与植株的生长年龄、所处季节以及组织和器官的相对位置等因素有关^[16]。此外，多数内生真菌并不能在人工培养基上培养，且 PDA 培养基不一定是最佳培养基^[17]，这在一定程度上限制了内生真菌的丰度。本研究在野生植物营养生长阶段采集样品，从 21 种野生药用植物中分离得到的 478 株内生真菌也只是这些药用植物内生真菌的一部分，在后续研究中可尝试采用不同分离方法、不同培养基来分离得到尽可能多的内生真菌。

在多数情况下，植物内生真菌的作用是植物对外来病原菌的生物防御，其抑菌机理主要体现在具有较强的空间和营养竞争能力，能够产生抗菌物质抑制植物病原菌的生长，在植物遇到病原菌侵袭时，能够通过释放代谢物来抵御或裂解受影响的细胞来发挥作用，也可以通过诱导寄主防御机制或促进生长来间接发挥作用^[18]。以 6 种本地区主要植物病原菌为靶标菌，对分离的

478 株内生真菌进行平皿对峙初筛试验，虽然只有 61 株菌株具有拮抗作用，但结果印证了并非所有的内生真菌菌株都具有抗菌活性^[19]。初筛结果显示，分离自地丁果实的菌株 2-Fr-8 对多种病原菌菌丝生长均起到了较强的抑制作用，拮抗作用广谱且高效；分离自黄芪根部的菌株 12-R-5 只对番茄灰霉病原菌菌丝生长有强抑制作用，具有专一性，这两株菌株可以作为新型抗菌剂的潜在来源，值得深入研究。

由于内生真菌特殊的生活环境，很多菌株在人工条件下无法培养或者很难产生孢子，这对菌种鉴定工作带来很大的困难。此外，分离到的内生菌株很大一部分不能被准确地鉴定，这也是内生真菌的常见问题^[20]。目前真菌鉴定主要基于形态学特征和特定的分子序列差异，其中 ITS 序列分析法鉴定种间关系准确性相对较高，简单易行。本研究对拮抗内生真菌进行 ITS 序列分子，辅助形态学鉴定，确定内生真菌分类地位。除 10 株同源性比对无法鉴定到属，其余 51 株分属于 16 个属，其中优势菌青霉属占 24.59%，刺盘孢属占 11.48%，其余均小于 10%。

野生药用植物内生真菌作为潜在的农业和药物新资源，其研究越来越受到重视。对本研究筛选到的具有广谱高效拮抗菌株离蠕孢 2-Fr-8 及专一高效拮抗菌株棘壳孢 12-R-5，还需进一步进行抑菌活性物研究，为开发功能型生物菌剂提供依据。

参考文献：

- [1] XING X K, GUO S X, FU J G. Biodiversity and distribution of endophytic fungi associated with *Panax quinquefolium* L. cultivated in a forest reserve[J]. Symbiosis, 2010, 51: 161-166.
- [2] ALVIN A, MILLER K I, NEILAN B A. Exploring the po-

- tential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds [J]. *Microbiol Research*, 2014, 169:483-495.
- [3] RYAN R P, GERMAINE K, FRANKSA, et al. Bacterial endophytes: Recent developments and applications [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 278:1-9.
- [4] STROBEL G A. Endophytes as sources of bioactive products[J]. *Microbes and Infection*, 2003, 5:535-544.
- [5] KHIRALLA A, MOHAMED I, THOMAS J, et al. A pilot study of antioxidant potential of endophytic fungi from some Sudanese medicinal plants[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2015, 8:701-704.
- [6] TIAN Y, AMAND S, BUISSON D, et al. The fungal leaf endophyte *Paraconiothyrium variabile* specifically metabolizes the host-plant metabolome for its own benefit [J]. *Phytochemistry*, 2014, 108(9):95-101.
- [7] SUNIL D, MANISH G, VED P, et al. Endophytic fungi: A source of potential antifungal compounds [J]. *Journal of Fungi*, 2018, 4(3): 77-119.
- [8] PURI S C, VERMA V, AMNA T, et al. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin [J]. *Journal of Natural Products*, 2005, 68:1717-1719.
- [9] PURI S C, NAZIR A, CHAWLA R, et al. The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans[J]. *Journal of Biotechnology*, 2006, 122:494-510.
- [10] KUSARI S, VERMA V C, LAMSHOEFT M, et al. An endophytic fungus from *Azadirachta indica* A. Juss. that produces azadirachtin[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28:1287-1294.
- [11] KUMAR S, KAUSHIK N. Metabolites of endophytic fungi as novel source of biofungicide: A review[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2012, 11:507-522.
- [12] HUANG W Y, CAI Y Z, HYDE K D, et al. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants[J]. *Fungal Divers*, 2008, 33:61-75.
- [13] 孔德崑, 牛若超, 毛彦芝, 等. 植物内生菌活性代谢物研究进展[J]. *黑龙江农业科学*, 2019 (12):151-154.
- [14] 王景仪, 李梦秋, 李艳茹, 等. 药用植物内生真菌的多样性及生物功能研究进展 [J]. *生物资源*, 2020, 42 (2): 164-172.
- [15] 杨帆, 刘春来, 王爽, 等. 一株平沙绿僵菌的鉴定及生防应用潜力评价[J]. *植物保护*, 2018, 44(5):199-205.
- [16] MIGUEL P S B, DELVAUX J C, OLIVEIRA M N V, et al. Diversity and distribution of endophytic fungal community in eucalyptus leaves[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2017, 11(3):92-105.
- [17] 单体江, 冯皓, 谢银燕, 等. 柠檬桉内生真菌的分离及其提取物的抗菌活性[J]. *植物保护*, 2019, 45(6):149-155.
- [18] ALVIN A, MILLER K I, NEILAN B A. Exploring the potential of endophytes from medicinal plants as sources of antimycobacterial compounds [J]. *Microbiological Research*, 2014, 169:483-495.
- [19] YU H S, ZHANG L, LI L, et al. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes [J]. *Microbiological Research*, 2010, 165: 437-449.
- [20] XIANG L B, GONG S J, YANG L J. Biocontrol potential of endophytic fungi in medicinal plants from Wuhan Botanical Garden in China [J]. *Biological Control*, 2016, 94: 47-55.

Isolation of Endophytic Fungi from Medicinal Plants and Screening for Antagonistic Strains

YANG Fan^{1,2,3}, LIU Chun-lai^{2,3}, LIU Liang^{2,3}, WANG Shuang^{2,3}, JIANG Xi-feng^{2,3}, LI Min^{2,3}, CAO Da-wei^{2,3}, LI Xin-min^{1,2,3}

(1. Postdoctoral Programme, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Plant Protection Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 3. Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pest in Harbin, Ministry of Agriculture, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to explore the endophytic fungi resources of wild plants, endophytic fungi were isolated and purified from different tissues of 21 wild medicinal plants grown at the southern foot of the Daxing'an Mountains by tissue isolation method. Antagonistic strains were screened by plate confrontation method with common plant pathogens as target strains. The strains were identified according to colony morphology and molecular biology. The results showed that 61 antagonistic strains were screened out from 478 strains of endophytic fungi, among which 11 strains which inhibitory zone width greater than or equal to 5 mm were highly active. Among 61 strains, 10 strains could not be identified by homology comparison, and the remaining 51 strains belonged to 16 genera. Among them, *Penicillium* accounted for 24. 59%, *Colletotrichum* accounted for 11. 48%, *Bipolaris*, *Phialophora*, *Alternaria* and *Fusarium* accounted for 6. 56%, the rest were less than 5%.

Keywords: medicinal plant; endophytic fungi; antagonist determination