

麻花秦艽不同组织部位可培养内生菌群结构及其与龙胆苦苷含量的相关性

陈 昕¹, 李 琪^{1,2}, 曹倩倩¹, 黄春萍^{*1,2}

(1. 四川师范大学 生命科学学院, 四川 成都 610068; 2. 农田生态服务能力建设四川省高校工程中心, 四川 成都 610068)

摘要: 为了明确四川麻花秦艽(*Gentiana straminea* Maxim)内生菌的资源状况, 本实验采用稀释涂布法并结合形态学观察及 16S rDNA 和 ITS-rDNA 序列分析的方法, 对其根、茎、叶和花中的内生菌进行了分离、纯化和鉴定; 并采用高效液相色谱法(HPLC)检测了不同组织部位龙胆苦苷的含量, 分析了麻花秦艽可培养内生菌数量与龙胆苦苷含量的相关性。结果表明, 麻花秦艽不同组织部位可培养内生菌数量和菌群结构存在一定的差异。其中, 从根中得到的可培养内生细菌和真菌的数量均最高, 分别为 $(8.77 \pm 0.71) \times 10^5$ cfu/g 和 $(2.00 \pm 1.05) \times 10^4$ cfu/g。统计分析显示, 麻花秦艽内生细菌和内生真菌的数量分别与其龙胆苦苷的含量成极显著正相关($P < 0.01$)。从麻花秦艽中共分离得到 13 株内生菌, 归属为 3 门 6 纲 8 目 9 科 10 属, 其中细菌 10 株, 真菌 3 株。其中的优势菌株, 包括细菌 QJ2(*Duganella* sp.)、QJ6(*Rahnella* sp.)、QJ10(*Pseudomonas* sp.)及真菌 QJ11(*Aspergillus* sp.)和 QJ13(*Aspergillus* sp.), 其数量均分别与龙胆苦苷的含量成极显著正相关($P < 0.01$)。麻花秦艽内生菌具有较丰富的遗传多样性, 不同组织部位麻花秦艽内生菌、种类及分布存在差异, 并与其有效成分龙胆苦苷存在极显著正相关性。

关键词: 麻花秦艽; 内生菌; 龙胆苦苷; 遗传多样性; 相关性

中图分类号: Q 93 文章编号: 1673-1689(2019)04-0021-09 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.04.004

Community Structure of Cultivable Endophytes in Different Organs of *Gentiana straminea* Maxim and Its Correlation with the Content of Gentiopicroin

CHEN Xin¹, LI Qi^{1,2}, CAO Qianqian¹, HUANG Chunping^{*1,2}

(1. College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610068, China; 2. Sichuan Engineering Center for Farmland Ecosystem Service Capacity Construction, Institute of Agro-products Processing, Chengdu 610068, China)

Abstract: In order to study the resource of the endophyte from *Gentiana straminea* Maxim in Sichuan, the cultivable endophyte in different organs of *Gentiana straminea* Maxim (roots, stems,

收稿日期: 2016-08-10

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31500358); 四川师范大学校级项目(14qn05); 四川省中药资源普查科技专项项目(2018PC005)。

* 通信作者: 黄春萍(1980—), 女, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事微生态学研究。E-mail: 13402856345@139.com

引用本文: 陈昕, 李琪, 曹倩倩, 等. 麻花秦艽不同组织部位可培养内生菌群结构及其与龙胆苦苷含量的相关性[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(04): 21-29.

leaves and flowers) were isolated and identified by the dilution separation methods and the sequence analysis of 16 S rDNA and ITS-rDNA. Then the content of gentiopicrodin in each organ was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the abundance of cultivable endophytes was analyzed. The results showed that 13 strains of cultivable endophytes were separated from *Gentiana straminea* Maxim as a whole, which belong to 3 phyla, 6 classes, 8 orders, 9 families and 10 genera, and among them, ten strains were bacteria and three were fungi. Meanwhile, there were differences of the quantity and microbial population of the cultivable endophytic bacteria and fungi in different organ or position of *Gentiana straminea* Maxim. The maximum quantity of endophytic bacteria and fungi were $(8.77 \pm 0.71) \times 10^5$ cfu/g and $(2.00 \pm 1.05) \times 10^4$ cfu/g respectively and both in the roots of *Gentiana straminea* Maxim.. Statistical analysis showed that correlations between the content of gentiopicrodin and the quantity of cultivable endophytic bacteria and fungi, respectively, were extremely significantly positive ($P < 0.01$). More over, the quantity of each predominant strain, bacteria QJ2 (*Duganella* sp.), bacteria QJ6 (*Rahnella* sp.), bacteria QJ10 (*Pseudomonas* sp.) fungi QJ11 (*Aspergillus* sp.) and fungi QJ13 (*Aspergillus* sp.), was extremely, significantly and positively related with the content of gentiopicrodin, respectively ($P < 0.01$). The cultivable endophytes in *Gentiana straminea* Maxim were characterized by abundant genetic diversity and there were differences of the endophytes community structure in different organ of *Gentiana straminea* Maxim. All the results will serve as the foundation of development and utilization of endophytes in *Gentiana straminea* Maxim.

Keywords: *Gentiana straminea* Maxim, endophytes, Gentiopicrodin, genetic diversity, correlation

植物内生菌包括真菌、细菌和放线菌,主要存活于健康植物组织内部,但不引发宿主植物表现出明显感染症状的微生物类群^[1-2]。植物内生菌可产生与宿主植物相同或者相似的具有生物活性的代谢产物,包括萜类、芳香类、多肽类等化合物^[2-4]。同时,这些活性成分通常具有抗肿瘤、抑菌和杀虫等作用,且代谢产物丰富,是新型药物的潜在资源^[5-6]。药用植物内生菌多样性的研究对进一步探索内生菌与宿主植物间的生态关系、反应宿主植物的生存环境和生长状态、生物学资源的开发等具有重要意义。

麻花秦艽(*Gentiana straminea* Maxim)为龙胆科龙胆属多年生草本植物,在我国有2000多年的种植历史,广泛分布于四川西北地区、青海大部分地区和甘肃、西藏、宁夏部分地区^[7],是我国三级重点保护野生药材之一^[8-9],具有退虚热、止痹痛、清湿热、祛风湿的功效,可用于治疗中风半身不遂、风湿痹痛、骨节酸痛、筋脉拘挛、骨蒸潮热、湿热黄疸、小儿疳积发热等症状^[7]。秦艽具有环烯醚萜类、黄酮类、生物碱和其他化学成分,以环烯醚萜为其特征成分^[10-11],这些活性成分含量在其不同组织中存在明显的差异^[12]。内生菌复杂的群落结构是秦艽植物

环境的一个重要组成,对其生长具有明显的影响,如:次级代谢产物的积累、药材质量、药材道地性等^[13-14]。同时,内生菌和植物之间密切的共生关系使内生菌能影响植物有效成分的合成,或者内生菌自身便合成某些有效成分^[15]。

然而,目前对麻花秦艽植物资源的研究主要集中在其化学成分、资源开发和药理药效等方面^[16-18],对该植物内生菌群结构的研究报道非常有限。另一方面,随着对秦艽植物需求量猛增,长期采挖和环境恶化,使野生秦艽资源遭到严重的破坏,最终制约了秦艽植物资源的健康发展。秦艽内生菌多样性及其相关研究对于探索秦艽与其内生菌之间的互动机制、反映秦艽的生长状态和生存环境、开发具有超常生态和医学功能的生物资源等均具有重要意义。本研究中将通过对麻花秦艽根、茎、叶和花等不同组织部位中的可培养内生菌的数量和组成等结构进行分析,探讨麻花秦艽可培养内生菌结构与其主要药效成分龙胆苦苷含量之间的关系,以期秦艽内生菌的资源情况及内生菌生物活性成分研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 样品来源 麻花秦艽于 2015 年夏季采自四川理县米亚罗 (31°14'—31°19'N, 102°53'—102°57'E, 海拔 2 458~4 619 m)。

1.1.2 培养基 牛肉膏蛋白胨培养基^[19](g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, 氯化钠 5, 琼脂 20, pH 7.0~7.2; 马丁(Martin)培养基^[19](g/L): 葡萄糖 10, 蛋白胨 5, 磷酸二氢钾 1, 琼脂 20, 1/3 000 孟加拉红 100 mL/L, 临用前加 0.03% 链霉素稀液 100 mL/L, 自然 pH。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 取麻花秦艽植株用自来水冲洗, 去除表面的泥土, 室温晾干。将清洗的秦艽根、茎、叶、花用灭菌手术刀切成 1 cm 见方的小块(段、片), 切掉表层。然后转到无菌操作台上进行消毒: 无菌水漂洗 2 次, 75% 乙醇浸泡 2 min, 0.01% 汞浸泡 4 s, 无菌水冲洗 3 次^[20], 以备内生菌分离纯化用。

1.2.2 菌株的分离纯化 将处理后的各组织置于灭菌研钵中, 加入 9 mL 无菌水, 研磨成匀浆菌悬液, 将制备的菌悬液 10 倍梯度依次稀释至 1×10^{-1} ~ 1×10^{-5} , 分别取 100 μ L 涂布于牛肉膏蛋白胨培养基和马丁氏培养基, 每个处理重复 3 次。细菌置于 37 $^{\circ}$ C 培养, 真菌置于 25 $^{\circ}$ C 培养。在同样培养条件下放置相应空白培养基, 同时吸取 1.2.1 中样品处理时最后一次无菌水冲洗液各 100 μ L 涂布牛肉膏蛋白胨和马丁平板做相应的对照培养, 若培养后无细菌或真菌长出, 证明表面消毒彻底^[21-22]。培养 2~3 d 后, 培养基中可见有菌落形成, 计算菌落数。根据菌落形态、颜色等的大小、形状、边缘、光泽、质地、颜色和透明程度等挑取单菌落转接(划线)入对应的培养基中纯化培养^[23]。

1.2.3 内生菌的鉴定 按照文献^[20]方法对细菌进行常规形态鉴定。根据《真菌鉴定手册》^[24], 对真菌进行常规形态鉴定。细菌和真菌总 DNA 的提取分别采用康为世纪(北京)生物科技有限公司细菌和真菌基因组 DNA 提取试剂盒按标准操作流程进行。按照文献^[1, 17]方法, 采用 27F/1429R 引物扩增细菌 16S rRNA 基因片段。按照文献^[25]方法, 采用 ITS1/ITS4 扩增真菌 18S rRNA 基因片段。得到的 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带回收后由擎科生物有

限公司进行序列测定。测序得到的核苷酸序列在 NCBI 上 GenBank 中进行 BLAST 分析, 采用 MEGA 4 软件对序列进行相似性分析, 并以 Neighbor-joining 方法构建系统发育树, 用 Bootstrap(1 000 次重复)进行检验。

1.2.4 龙胆苦苷相对含量检测 麻花秦艽主要药用成分龙胆苦苷的检测按照文献^[26]的方法采用 HPLC 检测。麻花秦艽各组织部位龙胆苦苷的含量见表 1。

表 1 麻花秦艽根、茎、叶、花中龙胆苦苷相对含量(n=3)
Table 1 Gentiopicrosin contents in roots, stems, leaves and flowers of *Gentiana straminea* Maxim(n=3)

组织部位	龙胆苦苷含量/%
根	7.11 $\pm$ 1.44 ^a
茎	0.89 $\pm$ 0.54 ^b
叶	0.54 $\pm$ 0.21 ^b
花	0.96 $\pm$ 0.69 ^b

注: 不同小写字母表示不同组织部位龙胆苦苷相对含量差异性显著(P<0.05)

1.3 数据处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行单因素方差分析, 多重比较采用最小显著差异法(LSD)。微生物数量与龙胆苦苷含量的相关关系采用 Pearson 法。数据整理、计算与作图均采用 Microsoft Excel 2013 软件。

2 结果与讨论

2.1 麻花秦艽不同组织部位可培养内生菌数量

通过稀释涂布法, 对麻花秦艽各组织部位可培养内生细菌和内生真菌进行检测, 结果见表 2。根中的可培养内生细菌和真菌的数量最高, 分别为 $(8.77 \pm 0.71) \times 10^5$ cfu/g 和 $(2.00 \pm 1.05) \times 10^4$ cfu/g; 茎中的可培养内生细菌显著性低于其他组织, 并且从茎和花中没有分离到可培养内生真菌。内生菌的种类和数量会受到不同分离部位的影响^[26], 同时大量的研究发现药用植物内生菌与其活性成分存在一定的相关性^[27-29]。麻花秦艽不同分离部位龙胆苦苷含量存在显著性差异(表 1), 这可能是导致其各部位内生菌数量存在显著性差异的主要原因(表 3)。

2.2 麻花秦艽可培养内生细菌的鉴定

从麻花秦艽的不同组织中共分离到内生细菌 10 株(QJ1~QJ10), 其形态特征见表 4。

表 2 麻花秦艽不同组织部位内生细菌与内生真菌数量
($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Quantity of the endophytic bacteria and fungi in the different parts of *Gentiana straminea* Maxim
($\bar{x} \pm s$) cfu/g

组织部位	细菌数量	真菌数量
根	$(8.77 \pm 0.71) \times 10^5$ ^a	$(2.00 \pm 1.05) \times 10^4$ ^a
茎	$(2.13 \pm 1.55) \times 10^3$ ^b	0 ^b
叶	$(1.00 \pm 0.30) \times 10^5$ ^c	$(1.00 \pm 0.90) \times 10^0$ ^c
花	$(3.43 \pm 1.12) \times 10^5$ ^c	0 ^b

注:不同小写字母表示内生细菌或内生真菌的数量在不同组织部位中差异性显著($P < 0.05$)。

表 3 可培养内生菌数量与龙胆苦苷相对含量的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of quantity of the cultivable endophytes and content of gentiopicrotin of *Gentiana straminea* Maxim

内生菌	龙胆苦苷相对含量	内生菌	龙胆苦苷相对含量
细菌	0.892**	QJ7	-0.297
真菌	0.811**	QJ8	-0.217
QJ1	0.144	QJ9	-0.304
QJ2	0.849**	QJ10	0.981**
QJ3	-0.126	QJ11	0.822**
QJ4	0.472	QJ12	-0.271
QJ5	0.285	QJ13	0.779**
QJ6	0.982**		

注:**表示相关极显著($P < 0.01$)

表 4 麻花秦艽可培养内生细菌形态与培养特征

Table 4 Morphological and cultured characteristics of culturable endophytic bacteria in *Gentiana straminea* Maxim

菌株	形态与培养特征
QJ1	规则圆形,凸起,湿润,菌落光滑,中间红边缘白,直径 1.5 cm; 菌体椭圆形或棒状,革兰反应阴性
QJ2	规则圆形,不透明,菌落光滑,边缘整齐,凸起,湿润,乳白色,粘稠,直径 0.5 cm,革兰染色阴性短杆状,单个或成对
QJ3	规则圆形,菌落光滑,边缘整齐,黄色,不透明,凸起,湿润,粘稠,直径 0.5 cm;革兰阴性
QJ4	规则圆形,菌落光滑,乳白色,不透明,凸起,湿润,粘稠,直径 0.5 cm
QJ5	规则圆形,边缘整齐,菌落光滑,乳白色,不透明,微凸起,湿润,粘稠,直径 0.2 cm,革兰阴性
QJ6	规则圆形,菌落光滑,边缘整齐,不透明,凸起,湿润,粘稠直径 0.5 cm
QJ7	椭圆形,边缘不光滑,干燥,薄,不透明,3 d 后变粘稠,凸起
QJ8	规则圆形,菌落光滑,边缘整齐,凸起,菌落金黄色,粘稠,湿润,不透明,直径 0.2 cm,革兰阴性
QJ9	椭圆形,边缘不光滑,煎蛋状,有 4 层,中间黄色,外层白色,薄,干燥,边缘透明
QJ10	规则圆形,菌落光滑,边缘整齐,乳白色,不透明,微凸起,湿润,粘稠,直径 0.2 cm,革兰阴性

氏菌、新鞘氨醇单胞菌,而菌株 QJ5、QJ7 和 QJ10 均属于假单胞菌属。此外,在本研究中菌株 QJ2、QJ3 和 QJ9 的 16s rDNA 序列与 GenBank 中已报道序列一致性低于 97%,这显示出麻花秦艽内生细菌微生

对菌株 QJ1~QJ10 进行 16S rDNA 基因测序,测序结果在 GenBank 进行同源性比对,结果见表 5。菌株 QJ1 与伯克霍尔德菌 (*Burkholderia* sp., 登录号 KJ004488.1) 的同源性为 99%;QJ4 与短小杆菌 (*Curtobacterium oceanosedimentum*, 登录号 JF460771.1) 的同源性为 100%;QJ5 与假单胞菌 (*Pseudomonas* sp., 登录号 KM253123.1) 的同源性为 99%;QJ6 与拉恩菌 (*Rahnella* sp., 登录号 KT580643.1) 的同源性为 99%;QJ7 与假单胞菌 (*Pseudomonas* sp., 登录号 JQ511859.1) 的序列同源性为 97%以上,构建系统发育树(图 1)后,分别位于同一系统发育分支上;QJ8 与新鞘氨醇单胞菌 (*Novosphingobium* sp., 登录号 KM252978.1) 的序列同源性为 100%;QJ10 与假单胞菌 (*Uncultured pseudomonas* sp., 登录号 GU201572.1) 的序列同源性为 99%。另外,QJ2 和杜榭菌 (*Duganella* sp., 登录号 KF424273.1) 的序列同源性最大,但只有 90%;QJ3 与不可培养细菌 (*Uncultured bacterium*, 登录号 DQ984599.1) 和黄单胞菌 (*Xanthomonadaceae bacterium*, 登录号 JN872548.1) 的序列同源性为最大,但均只达 93%;QJ9 与泛菌 (*Pantoea* sp., 登录号 JN853256.1) 的序列同源性最大,但只达 88%。综合同源性比对结果并结合其培养特征,菌 QJ1、QJ4、QJ6 和 QJ8 分别属于伯克霍尔德菌、短小杆菌、拉恩

物种群可能存在新的物种资源^[22]。

2.3 麻花秦艽可培养内生真菌分离鉴定

从麻花秦艽的不同组织中共分离到内生真菌 3 株(QJ11~QJ13),其形态特征见表6。

表 5 麻花秦艽可培养内生菌测序比对结果

Table 5 Result of blast by Genbank of culturable endophytes in *Gentiana straminea* Maxim

菌株	同源性最高的菌株	同源性/%	登录号
QJ1	伯克霍尔德菌 (<i>Burkholderia</i> sp.)	99	KJ004488.1
QJ2	杜辮菌 (<i>Duganella</i> sp.)	90	KF424273.1
QJ3	黄单胞菌 (<i>Xanthomonadaceae bacterium</i> SAP40_3)	93	JN872548.1
QJ4	短小杆菌 (<i>Curtobacterium oceanosedimentum</i>)	100	JF460771.1
QJ5	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i> sp. NR 5-06)	99	KM253123.1
QJ6	拉恩菌 (<i>Rahnella</i> sp.CanR-4)	99	KT580643.1
QJ7	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i> sp. HJ-34-4)	99	JQ511859.1
QJ8	新鞘氨醇单胞菌 (<i>Novosphingobium</i> sp. CR 7-04)	100	KM252978.1
QJ9	泛菌 (<i>Pantoea</i> sp. F6-PCAi-T3P21)	88	JN853256.1
QJ10	假单胞菌属 (<i>uncultured Pseudomonas</i> sp.)	99	GU201572.1
QJ11	花斑曲霉 (<i>Aspergillus versicolor</i>)	99	LC105686.1
QJ12	梅花状青霉 (<i>Penicillium herquei</i>)	97	JN246042.1
QJ13	花斑曲霉 (<i>Aspergillus versicolor</i>)	98	LC105684.1

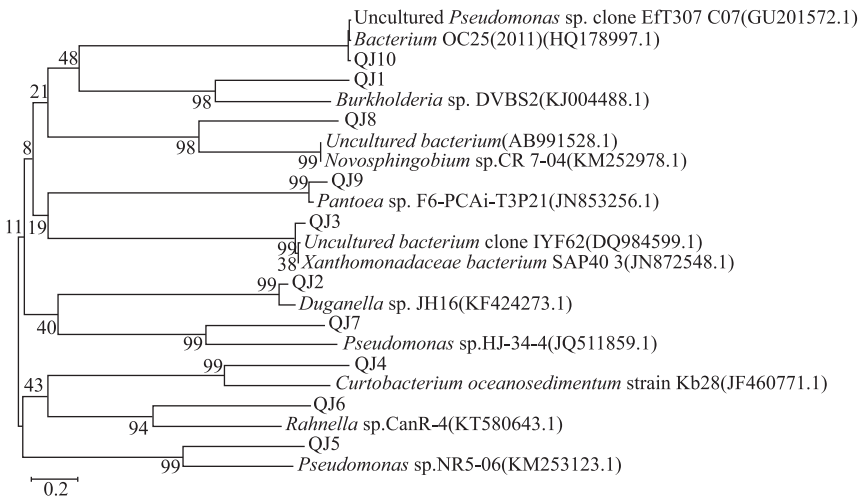


图 1 麻花秦艽内生细菌的系统发育分析

Fig. 1 Phylogenetic tree of the endophytic bacterium of *Gentiana straminea* Maxim

表 6 麻花秦艽可培养内生真菌形态与培养特征

Table 6 Morphological and cultured characteristics of Culturable endophytic fungus in *Gentiana straminea* Maxim

菌株	主要特征
QJ11	菌落圆形,灰绿色,周边乳白色,短绒毛状,有少量环形沟纹,反面肉色;营养菌丝树根状,有隔;分生孢子梗呈扫帚状;孢子椭圆或近圆形;产红棕色色素
QJ12	菌落圆形,绿色,反面褐色;分生孢子头为球形或辐射形,孢梗茎直径 4~8 μm,壁较厚且光滑
QJ13	菌落圆形,乳白色,干燥,中间绿色;分生孢子梗呈扫帚状;孢子椭圆或近圆形

对菌株 QJ11~QJ13 进行 ITS 基因测序,并在 GenBank 中进行同源性比对,结果见表 5,菌株 QJ11 与花斑曲霉 (*Aspergillus versicolor*, 登录号 LC105686.1)的同源性达 99%,构建系统发育树(图 2),二者位于同一系统发育分支上。综合同源性比

对结果和 QJ11 与花斑曲霉在发育树系统中的位置,并结合形态特征,菌株 QJ11 应属于花斑曲霉。菌株 QJ12 与梅花状青霉(*Penicillium herquei*,登录号 JN246042.1)的序列同源性达 97%,构建系统发育树(图 2)后,二者位于同一系统发育分支上。菌株

QJ13 与不可培养真菌 (*uncultured fungus*, 登录号 KM233157.1) 的同源性最大,达 98%,同时与花斑曲霉 (*Aspergillus versicolor*, 登录号 LC105684.1) 的序列同源性也达 97%,构建系统发育树(图 2)后,三者位于同一系统发育分支上。

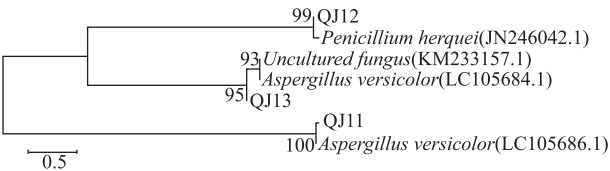


图 2 麻花秦艽内生真菌系统发育分析
Fig. 2 Phylogenetic tree of the endophytic fungus of *Gentiana straminea* Maxim

2.4 麻花秦艽可培养内生菌在各组织部位中的分布
从麻花秦艽中共分离纯化得到 10 株细菌和 3 株真菌。初步鉴定,内生真菌有 2 个属、细菌有 8 个属,它们在各组织部位的分布见表 7。麻花秦艽根、茎、叶和花中含有不同种类和数量的内生菌。麻花

秦艽茎中内生菌分离得到 7 属,叶部分离得到 7 属,根部分离得到 8 属,花部分离得到 3 属。其中,根中的内生菌种类最多,而花中的内生菌种类最少。菌株 QJ2 在不同组织部位中均有发现且数量最多,为麻花秦艽内生菌中的优势属,其包括的数量所占比例为 59.9%。菌株 QJ11 是真菌中占内生菌总数量比例最高的属,其包括的数量所占比例为 86.7%。其余菌株 QJ7 和 QJ9 仅在茎中分离得到,菌株 QJ10 仅在根中分离得到,菌株 QJ12 仅在叶中分离得到,菌株 QJ11 和 QJ13 仅在根中分离得到。

对不同组织部位分离出的内生菌数量进行分析可知,在麻花秦艽根中以菌株 QJ2 和 QJ5 为优势属,其所包括数量分别占该组织部位内生细菌总数的 81.3%和 6.2%,在麻花秦艽茎中以 QJ2 和 QJ3 为优势属,占该组织部位内生细菌总数的 46.0%和 36.3%,在麻花秦艽叶中以 QJ2 和 QJ3 为优势属,占该组织部位内生细菌总数的 42.9%和 22.0%,在麻花秦艽花中以 QJ2 和 QJ3 为优势属,占该组织部位内生细菌总数的 41.9%和 36.3%。

表 7 麻花秦艽可培养内生菌在各组织部位中的分布($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Distribution of endophytes in *Gentiana straminea* Maxim at the different parts($\bar{x} \pm s$) cfu/g

菌株	根	茎	叶	花
QJ1	$(6.33 \pm 4.16) \times 10^3$	0	$(1.33 \pm 0.58) \times 10^4$	0
QJ2	$(3.41 \pm 2.01) \times 10^5$	$(1.18 \pm 0.75) \times 10^3$	$(8.90 \pm 0.85) \times 10^4$	$(1.77 \pm 0.35) \times 10^4$
QJ3	$(1.67 \pm 0.58) \times 10^4$	$(9.30 \pm 1.13) \times 10^2$	$(4.57 \pm 2.21) \times 10^4$	$(1.53 \pm 0.28) \times 10^4$
QJ4	$(1.30 \pm 0.61) \times 10^4$	$(2.83 \pm 1.46) \times 10^2$	$(1.40 \pm 0.61) \times 10^4$	0
QJ5	$(2.60 \pm 0.62) \times 10^4$	0	$(3.67 \pm 1.15) \times 10^4$	0
QJ6	$(9.67 \pm 1.17) \times 10^3$	$(0.71 \pm 0.23) \times 10^2$	$(8.67 \pm 1.53) \times 10^3$	0
QJ7	0	$(0.20 \pm 0.10) \times 10^2$	0	0
QJ8	$(4.43 \pm 2.50) \times 10^3$	$(0.19 \pm 0.04) \times 10^2$	0	$(0.92 \pm 0.45) \times 10^4$
QJ9	0	$(0.62 \pm 0.15) \times 10^2$	0	0
QJ10	$(1.90 \pm 0.66) \times 10^3$	0	0	0
QJ11	$(8.00 \pm 3.46) \times 10^3$	0	0	0
QJ12	0	0	$(0.10 \pm 0.09) \times 10^2$	0
QJ13	$(1.20 \pm 0.79) \times 10^3$	0	0	0

3 结 语

近年来关于秦艽内生菌的报道较少,并且主要集中在从秦艽组织中分离纯化一些代谢产龙胆苦苷的微生物菌株。比如:赵强^[13]从秦艽的根中分离得到 1 株产龙胆苦苷的内生真菌根霉 QJ18,对 QJ18 的发酵条件进行优化,筛选出较优的碳源、氮源、温

度和 pH 条件。徐婉如^[30]对产龙胆苦苷的秦艽内生真菌进行诱变育种,筛选得到的突变株 QJ18-UV-23 和 QJ18-H-25 的龙胆苦苷产量分别是未突变菌株的 1.362 倍和 1.148 倍。此外,曾宪军等^[15]从麻花秦艽中分离得到了 1 株产龙胆苦苷的内生真菌腐皮镰刀菌 Gj-01,通过发酵培养后积累龙胆苦苷的量为 4.13 mg/L。另一方面,内生菌的分布规律可能

与宿主本身的特性及内生菌的种类相关,因此在宿主的不同器官中具有不同的分布和结构^[31]。在其他药用植物中的研究表明不同组织部位中内生菌多样性存在差异^[32-33],比如:对西洋参内生菌多样性研究结果显示西洋参根部的内生菌种类最多,为13属26种,而叶中内生菌最少,仅为9属16种。南药植株高良姜不同组织中内生细菌多样性指数存在显著差异,以根茎最低,叶最高^[34]。但是,目前尚没有从不同组织部位去研究秦艽内生菌结构的相关报道。本研究从根、茎、叶、花中共得到细菌10株,经鉴定归属于2门8属;真菌3株,归属于2属。其中茎部分离得到7属,叶部分离得到7属,根部分离得到9属,花部分离得到3属。实验结果探明了麻花秦艽可培养内生菌在其不同组织部位的分布规律。

同时,药用植物活性成分生物合成与植物内生菌的分布有紧密联系,而内生菌群也同样受植物体内活性成分的影响,两者之间存在显著相关性^[34-35]。通过研究麻花秦艽可培养内生菌及其优势菌株的数量与龙胆苦苷含量之间的相关性,弄清了可培养内生菌结构与麻花秦艽有效成分龙胆苦苷之间的相关关系。不仅内生细菌和内生真菌数量分别与麻花秦艽植株中龙胆苦苷的含量成极显著正相关($P<0.01$),而且优势内生菌 QJ2、QJ6、QJ10、QJ11 和 QJ13 的数量也分别与麻花秦艽植株中龙胆苦苷的含量成极显著正相关($P<0.01$,表7)。根据已有研究

报道,内生菌对植物活性成分的产生和积累途径的影响主要有两种方式:一是内生菌能产生外源性诱导子,能快速、专一和选择性地诱导药用植物代谢过程中特定基因的表达,调控药用植物活性成分的生物合成^[36];二是由于具有相同活性产物合成途径的相关基因或者在共同生活环境中直接接触而传递遗传物质^[37-38]。易培养、生长速度快、生长周期短的自身合成药用植物活性成分的微生物的研究和开发有望成为解决秦艽资源紧缺和合理开发利用秦艽资源的有效途径之一^[15]。本课题组在后续研究中发现细菌 QJ3 和 QJ9 的发酵液对大肠杆菌、志贺菌和沙门菌均具有较强的抑制作用,化合物的分离纯化及鉴定工作在进一步研究中,以期获得较高活性或者新的化合物。

目前,关于内生菌对药用植物活性成分的影响仍处在初步探索阶段,相关的研究将为内生菌对药用植物活性成分积累的调控作用提供实践基础。因此,本研究通过对麻花秦艽不同组织部位中进行可培养内生菌的分离与鉴定,为麻花秦艽内生菌资源进行进一步的开发奠定了良好的基础。通过研究麻花秦艽内生菌与其活性成分之间的相关性,有助于深入认识药材活性成分的形成。同时也为药用植物活性成分的生产管理奠定理论和实践基础,如在秦艽的栽培管理中,接种合适的菌肥和提高其内生菌总数量对秦艽活性物质含量的提高将有积极的促进作用。

参考文献:

- [1] WEI Juan, HEI Dongxv, LI Guohong, et al. Isolation and identification of endophytic bacteria in *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch) and phylogenetic analysis [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2015, 34 (2): 165-169. (in Chinese).
- [2] AFKHAM M E, STRAUSS S Y. Native fungal endophytes suppress an exotic dominant and increase plant diversity over small and large spatial scales[J]. **Ecology**, 2016, 97(15): 1159-1169.
- [3] LOWMAN S, KIM-DURA S, MEI C S, et al. Strategies for enhancement of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) performance under limited nitrogen supply based on utilization of N-fixing bacterial endophytes[J]. **Plant and Soil**, 2015, 405(1-2): 47-63.
- [4] MA Y, RAJKUMAR M, ZHANG C, et al. Beneficial role of bacterial endophytes in heavy metal phytoremediation[J]. **Journal of Environmental Management**, 2016, 174(1): 14-25.
- [5] LI H Y, WEI D Q, SHEN M, et al. Endophytes and their role in phytoremediation[J]. **Fungal Diversity**, 2012, 54: 11-18.
- [6] CHADHA N, MISHRA M, RAJPAL K, et al. An ecological role of fungal endophytes to ameliorate plants under biotic stress[J]. **Archives of Microbiology**, 2015, 197(7): 869-881.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 270-271.
- [8] HUANG Lulin, YANG Xiao, BAN Xianhong, et al. The progress of *Gentiana macrophylla* pall research [J]. **Modern Chinese Medicine**, 2015, 13(5): 40-43. (in Chinese)

- [9] WANG Jing, LIANG Jian, AN Yi, et al. Relationship between biomass in ground and underground parts of *Gentiana macrophylla* and its rhizosphere microbial community structure [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2011, 42 (12): 2535-2540. (in Chinese)
- [10] TIWAR R K, TRIVEDI M, GUANG Z C, et al. Genetic transformation of *Gentiana macrophylla* with *Agrobacterium rhizogenes*: growth and production of secoiridoid glucoside gentiopicroside in transformed hairy root cultures [J]. **Plant Cell Rep**, 2007, 26: 199-210.
- [11] WU Qixun, AN Yan, ZHANG Mingjin, et al. HPLC fingerprinting of *Gentiana straminea*, a traditional Chinese medicine from Qinghai province [J]. **Acta Bot Boreal-Occident Sin**, 2006, 26(1): 174-178. (in Chinese)
- [12] CAO X Y, WANG Z J, WANG Z Z. Comparative analysis of contents of four iridoid glucosides in different organs of four species of *Gentiana* L [J]. **Journal of Plant Resources and Environment**, 2012, 21(1): 58-63.
- [13] 赵强. 渐危药用植物秦艽产活性成分内生真菌的初步研究[D]. 西北大学, 2007.
- [14] RYAN R P, GERMAINE K, FRANKS A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications [J]. **FEMS Microbiology Letters**, 2008, 278(1): 1-9.
- [15] ZENG Xianjun, YANG Xin, DING Rengfeng, et al. Isolation and identification of an endophytic gentiopicrocin-producing fungus obtained from *Gentiana straminea* Maxim [J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**, 2015, 26(8): 2024-2027. (in Chinese)
- [16] CHEN Yuan, QIU Daiyu, GUO Fengxia, et al. Investigation on exploitation of *Gentiana straminea* [J]. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, 2008, 30(10): 1214-1216. (in Chinese)
- [17] MENG Jie, CHEN Xingfu, SONG Jiahua, et al. Research progress in classification and identification of Sect. *Cruciata* Gaudin in *Gentiana* (Tourn.) L. [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2013, 44(16): 2330-2335. (in Chinese)
- [18] YANG Yanmei, MA Xiaohui, LU Youyuan, et al. Contents of seven indicative constituents in seven kinds of *Gentiana macrophylla* by UPLC [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2016, 47(11): 1968-1973. (in Chinese)
- [19] 蔡妙英, 东秀珠. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [20] YANG Mingjun, LI Juan, WANG Yonggang, et al. Isolation and cluster analysis of endophytic fungi in *Narcissus tazetta* var. *Chinensis* [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2014, 11: 1625-1630. (in Chinese)
- [21] WANG Jing, ZHENG Xiqing, DI Na, et al. Isolation and identification of antagonistic endophytic bacteria from *Orobancha cumana* [J]. **Chinese Journal of Oil Crop Sciences**, 2015, 4: 539-547. (in Chinese)
- [22] LIU Jinhua, WU Lingfang, ZHANG Huawei. Isolation and preliminary identification of endophytes from *Artemisia annua* Linn. [J]. **Amino Acids and Biotic Resources**, 2011, 33(4): 27-30. (in Chinese)
- [23] LI Qiang, LI Shuhong, LI Xiaolin, et al. Diversity of endophytic microorganisms in fresh fruiting bodies of *Sarcodon imbricatus* [J]. **Chin J Appl Environ Biol**, 2015, 21(4): 629-634. (in Chinese)
- [24] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [25] ZHAO Zhiling, LIU Xuezhou, WEI Xiaoyu, et al. Screening and identification of available endophytes in roots of *Panax ginseng* [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2015, 6(14): 2143-2148. (in Chinese)
- [26] WU Jinrong, WU Lihong, ZHAO Zhili, et al. Simultaneous determination of five iridoids in *Gentiana macrophylla* Radix and their local variety by HPLC [J]. **China Journal of Chinese Malsrta Medica**, 2014, 39(4): 715-720. (in Chinese)
- [27] WANG Mengliang, JIAO Jin, XING Jie, et al. Effects of endophytic fungi ZPRa-R-1 on the key signal molecules and the main secondary metabolites in *Rhodiola crenulata* [J]. **Bulletin of Botanical Research**, 2016, 36(3): 416-420. (in Chinese)
- [28] TAO Ru, FENG Lei, ZHAO Faxing, et al. Hairy root induction of *Salvia miltiorrhiza* Bge. f. *alba* and fungal endophytes enhanced salvianolic acid contents in hairy root cultures [J]. **Lishizhen Medicine and Materia Medica Research**, 2015, 26(6): 1469-1473. (in Chinese)
- [29] TAO Jinhua, WANG Donggeng, PU Xuelian, et al. Promotion of HMGR activation and β -eudesmol biosynthesis in *Atractylodes lancea* suspension cell culture by hydrogen peroxide-mediated endophytic fungal elicitor [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2013, 44(19): 2740-2744. (in Chinese)
- [30] 徐婉如. 秦艽内生真菌的诱变育种及其发酵条件优化[D]. 西北大学, 2008.
- [31] ZHENG Youkun, LIU Kai, XIONG Zijun, et al. Research progress on biodiversity of endophytic actinobacteria in medicinal

- plants and their bioactive substances[J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2014, 14(45):2089-2099. (in Chinese)
- [32] LIU Xuezhou, ZHAO Zhiling, LI Shaobin, et al. The community structure and diversity of the endophytes in *American ginseng*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2015, 55(3):330-340. (in Chinese)
- [33] LI Shubin, HUANG Juan, ZHOU Renchao, et al. Diversity and plant growth-promoting potential of bacterial endophytes of *Alpinia officinarum* Hance, a famous south-China medicinal plant[J]. **Acta Ecologica Sinica**, 2015, 10:3204-3213. (in Chinese)
- [34] CHEN Long, LIANG Zining, ZHU Hua. Research advances in the studies of plant entophytic [J]. **Biotechnology Bulletin**, 2015 (8):30-34. (in Chinese)
- [35] WANG Zhiwei, JI Yanling, CHEN Yonggan. Studies and biological significances of plant endophytes [J]. **Microbiology China**, 2015, 42(2):349-363. (in Chinese)
- [36] LI P, MOU Y, SHAN T, et al. Effects of polysaccharide elicitors from endophytic *Fusarium oxysporium* Dzf17 on growth and diosgenin production in cell suspension culture of *Dioscorea zingiberensis*[J]. **Molecules**, 2011, 16(11):9003-9016.
- [37] ZENG Songrong, XU Chengdong, WANG Haikun, et al. Preliminary study on the mechanism of the same active components of the endophytic fungi of medicinal plants and their hosts [J]. **Chinese Traditional and Herbal Drugs**, 2013, 44(14):2004-2008. (in Chinese)
- [38] LI Juanhua, CHEN Wenqiang, DENG Baiwan, et al. Effect of plant growth regulators on taxol biosynthesis by an endophytic fungus[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(6):879-883. (in Chinese)

会 议 消 息

会议名称: 中国化学会第八届天然产物全合成青年学术研讨会

会议时间: 2019 年 11 月 21-24 日

会议地点: 福建省厦门市

主 办 方: 中国化学会

承 办 方: 1、中国化学会有机化学学科委员会; 2、厦门大学化学化工学院; 3、福建省化学生物学重点实验室;

会议主题: 天然产物合成前沿与发展趋势

大会主席: 黄培强

预计规模: 150

联 系 人: 郑啸

电子邮箱: zxiao@xmu.edu.cn

电 话: 15859270353

地 址: 福建省厦门市思明区思明南路 422 号

会议内容: 1、天然产物全合成与合成方法学; 2、天然产物的发现; 3、天然产物的化学生物学; 4、天然产物相关新药创制。