

灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’内生菌对其悬浮细胞生物量及绿原酸含量的影响

李群, 汪超, 唐明, 程世君, 马丹炜, 王亚男, 卢红*

四川师范大学生命科学院, 成都610101

摘要: 从灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’中分离出17株内生菌, 并采用16S rDNA和18S rDNA分子鉴定结合形态特征鉴定出其中6株。将获得的6株内生菌作为诱导子添加至‘渝蕾1号’悬浮培养体系中, 探讨其对‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量及绿原酸含量的影响。结果表明, 分离得到的6株菌分别为根瘤菌(cc2)、荧光假单胞菌(cc4)、盾壳霉菌(cc5)、高地芽孢杆菌(cc13)、同温层芽孢杆菌(cc14)及短小芽孢杆菌(cc15)。同时, 6株内生菌均不同程度地影响‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量及次生代谢产物绿原酸含量。对生物量来说, 6种内生菌均在浓度为25 mg·L⁻¹时, 生物量达到最大值。对绿原酸来说, 根瘤菌、荧光假单胞菌、盾壳霉菌及同温层芽孢杆菌均在浓度为25 mg·L⁻¹时, 绿原酸含量达到最大, 而高地芽孢杆菌和短小芽孢杆菌在浓度为12.5 mg·L⁻¹时, 绿原酸含量达到最大。总结以上结果, 与对照相比, 细胞生物量和绿原酸含量会在菌株的某个浓度下大大提高, 该结果为绿原酸的工业化生产打下了基础。

关键词: 灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’; 内生菌; 生物量; 绿原酸

Effects of Endophytes of *Lonicera macranthoides* Cultivar ‘Yulei1’ on the Biomass Accumulation and Chlorogenic Acid Production

LI Qun, WANG Chao, TANG Ming, CHENG Shi-Jun, MA Dan-Wei, WANG Ya-Nan, LU Hong*

College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

Abstract: We isolated 17 kinds of endophytes from *Lonicera macranthoides* cultivar ‘Yulei1’. Besides, the 6 kinds of endophytes were identified through the 16S rDNA or 18S rDNA sequences homologous analysis, and morphological observation. This study weighed the biomass of the ‘Yulei1’ cells and analyzed the content of chlorogenic acid by the addition of different kinds of endophytes in cell suspension cultures of ‘Yulei1’. The 6 kinds of endophytes included *Rhizobium* sp. (cc2), *Pseudomonas* sp. (cc4), *Coniothyrium minitans* (cc5), *Bacillus altitudinis* (cc13), *Bacillus stratosphericus* (cc14), and *Bacillus pumilus* (cc15). In addition, the biomass accumulation and chlorogenic acid production of ‘Yulei1’ were influenced by 6 kinds of endophytes. As for biomass accumulation, the maximum accumulation of biomass was observed while 6 kinds of endophytes concentration was 25 mg·L⁻¹. In terms of chlorogenic acid production, the highest chlorogenic acid production of ‘Yulei1’ was tested while 4 kinds of endophytes (*Rhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., *C. minitans*, and *B. stratosphericus*) concentration was 25 mg·L⁻¹. However, the highest chlorogenic acid production of ‘Yulei1’ was tested while 2 kinds of endophytes (*B. altitudinis* and *B. pumilus*) concentration was 12.5 mg·L⁻¹. Compared with the control, the biomass accumulation and chlorogenic acid production were greatly increased with a certain concentration. These results laid a foundation on the industrial production of chlorogenic acid.

Key words: *Lonicera macranthoides* cultivar ‘Yulei1’; endophytes; biomass; chlorogenic acid

植物内生菌是植物内环境的重要组成部分之一, 在长期的进化历程中, 与植物形成一种互利共生的关系。植物内生菌种类较多, 主要包括内生细菌、内生真菌、内生放线菌这3种类群(陈龙等2015)。植物内生菌不仅可以自身合成代谢产物, 如Chen等(2010)从杜仲的叶片和皮质中分离到B5菌株, 该菌株可以产绿原酸; 冷慕婵等(2007)从金银花中分离了80株菌, 其中3株能产绿原酸。还能作为诱导子诱导植物特定基因快速、高度专一的

选择性表达, 进而活化特定次生代谢途径, 调控代谢产物的合成(刘颖和魏希颖2014; 谭燕等2013; 魏宝阳等2011; 隆丽林等2015; 王红等2014)。因此, 为了提高次生代谢产物的含量, 近年来关于植物内生菌与植物代谢产物相互关系的研究越来越多。

收稿 2015-08-14 修定 2015-10-26

资助 四川师范大学实验技术与管理项目(SYJS2014-12和SYJS2015-05)。

* 通讯作者(E-mail: 154194719@qq.com; Tel: 028-84480656)。

绿原酸(chlorogenic acid, CA), 又名咖啡鞣酸, 是植物细胞在有氧呼吸过程中经莽草酸途径的中间产物合成的一种苯丙素类物质(Wang等2013), 在忍冬科和杜仲科植物中含量较多。研究表明, 绿原酸具有众多生物学功能, 如抗菌(Kabir等2014)、抗氧化(Kim和Baik 2015)、抗炎(Zatorski等2015)、抗焦虑(Shao等2014)、降低血糖(Jaiswal 2014)、抗癌(Belkaid等2006)和抗HIV (Ilaiyaraja等2015)等。除此之外, 绿原酸在化工和食品领域也有众多应用(朱燕等2010; 罗磊和郭晓园2008)。众多的功能导致绿原酸供不应求, 绿原酸价格也一路飙升。一直在寻求化学和生物合成方法解决这一难题, 但因绿原酸有个易水解基团, 导致化学合成较难, 半个世纪前, 产率仅能达到5%, 目前虽然已解决易水解基团保护问题, 但因合成步骤较多, 产率仍然较低(陈绍华等2008), 规模化生产还有一定距离。因此生物合成方法一直是大家关注的焦点。目前生物合成研究主要集中在细胞培养条件优化等方面, 但这些研究均未从根源上探讨次生代谢产物的合成和代谢问题, 即使代谢产物含量有所提高, 其量也是有限的。因此寻求从代谢途径来研究代谢产物的生物合成方法才能解决根本问题。要研究代谢途径, 就涉及底物、添加物(诱导子)、培养条件及它们间相互作用等问题。本研究试图从代谢途径研究绿原酸的生物合成问题, 即从忍冬科植物灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’中分离出内生菌, 并将内生菌作为诱导子加入‘渝蕾1号’悬浮培养体系中, 研究诱导子对次生代谢产物绿原酸含量的影响。该研究旨在为绿原酸的产业化生产奠定一定的基础。

材料与方法

1 材料及培养基

植物材料来自四川师范大学生命科学学院生物园, 由魏琴教授鉴定为灰毡毛忍冬品种‘渝蕾1号’(*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz. cv. ‘Yulei1’)

PDA培养基(秦新苗等2015)、高氏一号培养基(裴冬丽等2015)、NA培养基(陈倩等2014)、B₅培养基(王蒂2004)均参照相应的参考文献。

真菌18S rDNA、细菌16S rDNA通用引物及序列测序由北京华大基因公司完成。

2 实验方法

2.1 内生菌的分离

从‘渝蕾1号’植株老根上截取老根并剪成约1 cm长的外植体, 将材料放置在水龙头下流水冲洗3~4 h, 然后用洗洁剂清洗2~3 min, 流水冲洗干净并移至超净工作台; 把预处理好的材料用75%酒精浸泡30 s, 无菌水冲洗10次以上, 0.1%的升汞处理6 min后, 再用无菌水清洗多次(≥10次), 分别接种到PDA、高氏一号、NA培养基中, 并分别在28、28和37 °C的培养箱培养7 d, 每个锥形瓶中接种1个外植体。需要注意的是, 消毒过程中冲洗外植体的最后一次无菌水应涂布于PDA、高氏一号和NA平板培养基中, 如果无菌水在PDA、高氏一号培养基中培养5 d后未长菌, 说明上述表面杀菌完全; 无菌水在NA培养基中培养3 d后未长菌, 说明上述表面杀菌完全。

选取培养7 d后在其表面长菌的外植体, 在超净工作台中准确挑取表面菌体划线于PDA、高氏一号和NA培养基中, 分别在28、28和37 °C培养箱中培养1~5 d, 挑取单菌落再次划线于上述培养基, 并重复上述过程5~6次纯化菌种。最后对纯化后的菌种挑取单菌落进行液体培养, 备用。

2.2 内生菌的鉴定

2.2.1 DNA提取

对于培养所获得的菌悬液采用Tiangen细菌、真菌试剂盒, 进行DNA的提取, 并进行电泳检测。

2.2.2 基因组鉴定

将提取获得的细菌DNA和真菌DNA作为模板, 细菌采用16S rDNA基因引物27F (5'-AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG-3')和1492R (5'-TACGACTTAACCCCAATCGC-3')进行扩增; 真菌采用18S rDNA基因引物NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTG-TCTC-3')和NS8 (5'-TCCGCAGGTTACCTACG-GA-3')进行扩增。PCR扩增采用20 μL体系: 包括DNA模板2 μL, 上游引物和下游引物各2.5 μL, DMSO 2 μL, 2×PCR Mix 50 μL, ddH₂O 40 μL, 混匀后取20 μL分装于5个100 μL的灭过菌的EP管中进行PCR扩增。PCR扩增程序包括: 94 °C 5 min; 94 °C 50 s, 63 °C(真菌)/61 °C(细菌) 0.5 min, 72 °C 1 min, 重复36次; 72 °C 10 min; 4 °C保存。PCR产物测序由北京华大基因公司完成。所获得的16S

rDNA和18S rDNA序列在NCBI数据库BLAST对比获得相似度较高的序列(匹配度 $\geq 97\%$ 以上), 并获知相应的菌体种属。

2.2.3 内生菌的形态学观察

对已获知的内生菌采用三点法在平板中培养并观察其正面和背面形态特征, 同时进行显微结构观测。无菌丝体的内生菌显微结构观测采用革兰氏染色法在倒置显微镜(10 \times 20倍)下观察; 有菌丝体的内生菌用透明胶带轻轻粘取菌丝体少许, 在倒置显微镜(10 \times 20倍)下观察。

2.3 内生菌诱导子的制备

将生长到对数生长期的菌悬液进行离心, 并在超净工作台中用灭过菌的滤纸把发酵液水分吸干, 无菌水清洗多次, 最后一次离心10 min以上。诱导子浓度设置采用2倍稀释法, 准确称取40 mg离心得到的菌体, 溶解于10 mL无菌水中, 超声打碎, 吸取1 mL, 备用; 在上述10 mL的重悬菌液中吸取500 μ L, 重溶于500 μ L无菌水, 备用; 10 mL的重悬菌液中吸取250 μ L, 重溶于750 μ L无菌水, 备用; 10 mL的重悬菌液中吸取125 μ L, 重溶于875 μ L无菌水, 备用。

将上述配制好的不同浓度的内生菌诱导子药液各取1 mL, 分别加入100 mL干净的三角瓶中, 然后再加入到39 mL B₅培养液中, 使内生菌诱导子浓度在12.5~100 mg \cdot L⁻¹之间。最后内生菌诱导子在121 $^{\circ}$ C高压蒸汽灭菌20 min, 冷却后备用。

将上述配制好的药液培养基转移至紫外灯下杀菌30 min, 并在无菌状态下称取2.00 g对数生长期的‘渝蕾1号’悬浮细胞, 分别接种于所配制的药液培养基中, 每个实验组5个平行, 2次重复, 在25 $^{\circ}$ C、16 h光周期、110 r \cdot min⁻¹摇床培养25 d后检测‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量和次生代谢产物绿原酸的含量。

2.4 内生菌诱导子对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量和绿原酸含量的影响

悬浮细胞培养至25 d后, 用真空抽滤抽去发酵液, 然后将鲜重细胞移至直径为8 cm的培养皿中, 60 $^{\circ}$ C烘干至恒重, 并称重。将烘干至恒重的愈伤细胞粉碎过60目筛, 准确称取其中0.10 g于10 mL 60%的甲醇溶液中, 超声萃取30 min, 取上清用0.22 μ m的有机过滤膜注射过滤, 转移至HPLC进样瓶,

采用HPLC法(李群等2015; 唐明等2015)检测‘渝蕾1号’次级代谢产物绿原酸的含量。

3 数据处理

实验所有数据采用SPSS 17.0统计软件, 单因素方差Duncan分析($P < 0.05$)。数据以平均值 \pm 标准误差来表示。

实验结果

1 内生菌的分离

将获得的内生菌划线培养后, 形成不同的单菌落形态, 见图1-A。从图中可以看出, 各菌落颜色、形态大小差异较大。最终通过纯化分离, 共得到17株内生菌。将17株菌培养在相应的液体培养基中, 分别命名为cc1~cc17, 结果见图1-B。从图1-B可以看出, 菌的颜色差异较大, 其中cc1、cc5~cc7、cc10、cc14与cc15呈深黄色, 且cc1与cc5有抱团的菌丝体产生; cc2~cc4、cc9、cc11和cc13呈浅黄色, 且cc2有菌丝状结构但不抱团; cc8呈乳白色; cc16呈浅红黄色; cc17为黄色并有抱团的菌丝体产生。另外, cc12菌株在相应的液体培养基中无法生长。可见, 不同的菌在培养过程中会出现不同的状态。

2 菌种鉴定

2.1 分子生物学鉴定

将获得的17种内生菌分别采用Tiangen细菌和真菌试剂盒进行总DNA的提取, 结果发现, 17种内生菌中仅获取6种内生菌总DNA(图2-A), 它们分别是cc2、cc4、cc5、cc13、cc14及cc15。将6种菌以总DNA为模板, 以16S rDNA与18S rDNA的通用引物进行PCR扩增, 结果见图2-B, 可以看出扩增的效果较好。最后将PCR产物测序并与NCBI库比对, 结果表明: cc2为 α -变形菌门中的根瘤菌(*Rhizobium* sp.)、cc4为荧光假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、cc5为盾壳霉菌(*Coniothyrium minitans*)、cc13为高地芽孢杆菌(*Bacillus altitudinis*)、cc14为同温层芽孢杆菌(*Bacillus stratosphericus*)及cc15为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。

2.2 形态学鉴定

六种内生菌的形态学结果见表1和图3。其中, 从菌落正面形态可以看出, cc2和cc5具有菌丝状结构, cc4、cc13、cc14及cc15具有粘液层或乳状层;

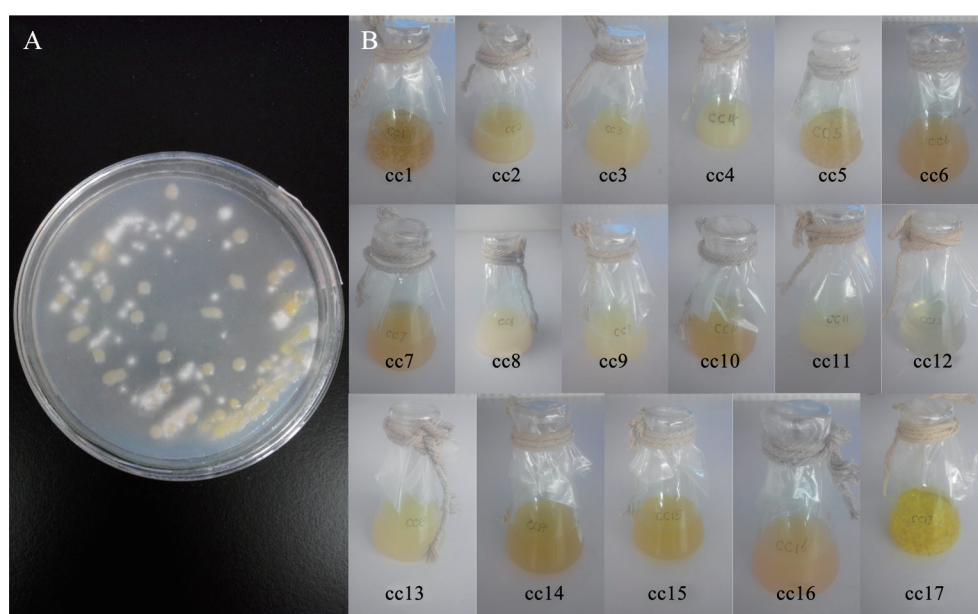


图1 不同菌种的单菌落形态(A)及菌悬液(B)

Fig.1 Single colony morphology (A) and bacterium suspension of the different strains (B)

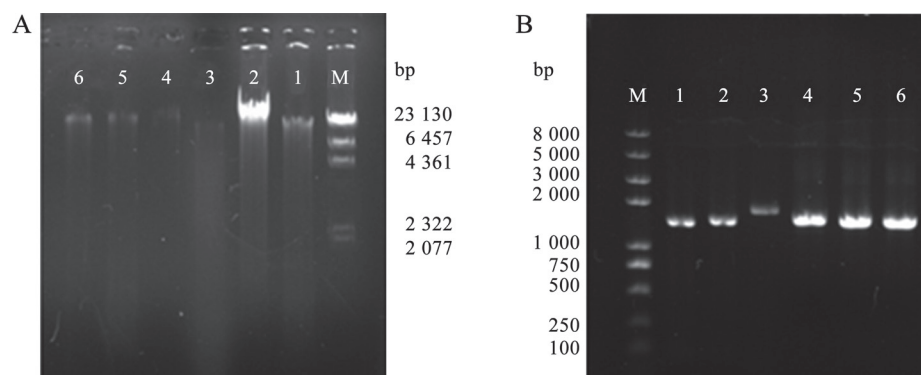


图2 内生菌总DNA电泳图(A)及PCR扩增图(B)

Fig.2 DNA (A) and PCR (B) electrophoretogram of endophytes

A: 内生菌总DNA电泳图; B: PCR扩增图。M为分子量标准; 1~6分别表示内生菌cc2、cc4、cc5、cc13、cc14以及cc15的总DNA和PCR扩增条带的电泳泳道。

另外, 从菌落背面形态发现6种内生菌中cc2、cc4、cc5及cc14呈圆形, 而cc13和cc15呈不规则圆形; 同样, 在显微观测中也可以看出cc2和cc5有菌丝存在, 与菌落正面形态观测结果相符, 而其余4种内生菌呈棒状或杆状。

3 六种内生菌诱导子对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量及绿原酸含量的影响

六种内生菌诱导子对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量形态上的影响见图4。从图4可以看出, 6株不同浓度内生菌处理悬浮细胞后, 细胞的生

长变化较为明显, 特别是在浓度为 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右时, 细胞呈淡黄色, 生长旺盛, 生物量较大。但cc2和cc5处理后, 细胞在不同浓度阶段均有一定程度的褐变, 特别是浓度达到 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 所有内生菌处理的细胞均发生褐变。

六种内生菌诱导子对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量及绿原酸含量的影响见图5。从图5可以看出: 对cc2而言(图5-A), 在 12.5 和 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时生物量差异不大, 均达到最大值, 分别为 13.93 和 $13.82 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。而绿原酸在各浓度之间差异显著, 在

表1 六种内生菌的形态学结果

Table 1 The result of morphology of 6 endophytes

菌种	正面形态	背面形态	显微观测结果	形态结合分子鉴定结果
cc2	表面凸起颗粒状结构, 有粘液层, 半透明, 呈圆形; 菌体生长至稳定期, 表面乳状物消失, 有细小的类菌丝体产生	呈土黄色、圆形	有簇居的菌丝状结构, 末端呈香蕉状	α -变形菌门中的根瘤菌
cc4	呈深蓝色, 半透明, 圆形状, 且有粘液层	呈深蓝色, 菌落边缘有菌圈结构	呈短小棒状	荧光假单胞菌
cc5	呈白色, 圆形, 有白色菌丝体	呈淡黄色, 圆形, 菌落边缘有菌圈结构	菌丝体呈树枝状	盾壳霉菌
cc13	表面灰白色, 边缘呈不规则圆形, 有乳状层	呈黄白色, 不规则圆形, 无菌圈	呈短杆状, 分散排列	高地芽孢杆菌
cc14	菌落较小, 且呈黄白色, 有乳状层, 圆形	呈淡黄色, 圆形	菌体多连接在一起, 且呈杆状	同温层芽孢杆菌
cc15	菌落较大, 呈蜡黄色, 有褶皱, 不规则圆形, 有粘液层	呈深土黄色, 不规则圆形	呈细杆状, 分散排列	短小芽孢杆菌

正面形态、背面形态和显微观测照片分别见图3中每种菌的第1、2和3个图。

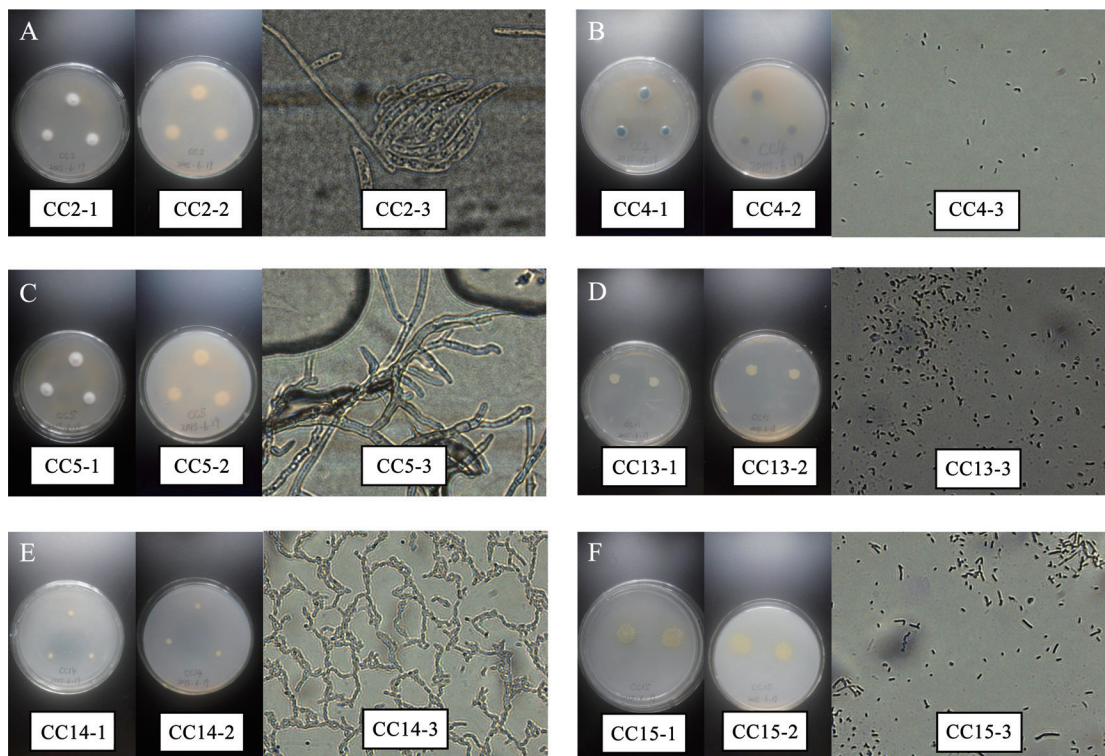


图3 六种内生真菌和细菌菌落形态及显微观测

Fig.3 The morphologic characters and microscopic observation

A~F分别表示cc2、cc4、cc5、cc13、cc14以及cc15的形态学鉴定图示; 其中, 每个菌落的第1个图是菌落正面, 第2个图是菌落背面, 第3个图是显微图(10×20倍)。

25 mg·L⁻¹时, 绿原酸含量达到最大值, 为26.46 mg·g⁻¹ (DW)。对cc4来说(图5-B), 当诱导子浓度为25 mg·L⁻¹时, 生物量取得最大值15.64 g·L⁻¹, 与对照(13.33 g·L⁻¹)差异显著。而绿原酸含量在各个浓度

均与对照[11.93 mg·g⁻¹ (DW)]差异不显著。对cc5而言(图5-C), 随着浓度的增加(12.5~100 mg·L⁻¹), 其细胞生物量和绿原酸的含量均呈现先增加后降低的趋势, 且浓度在25 mg·L⁻¹时, 生物量和绿原酸

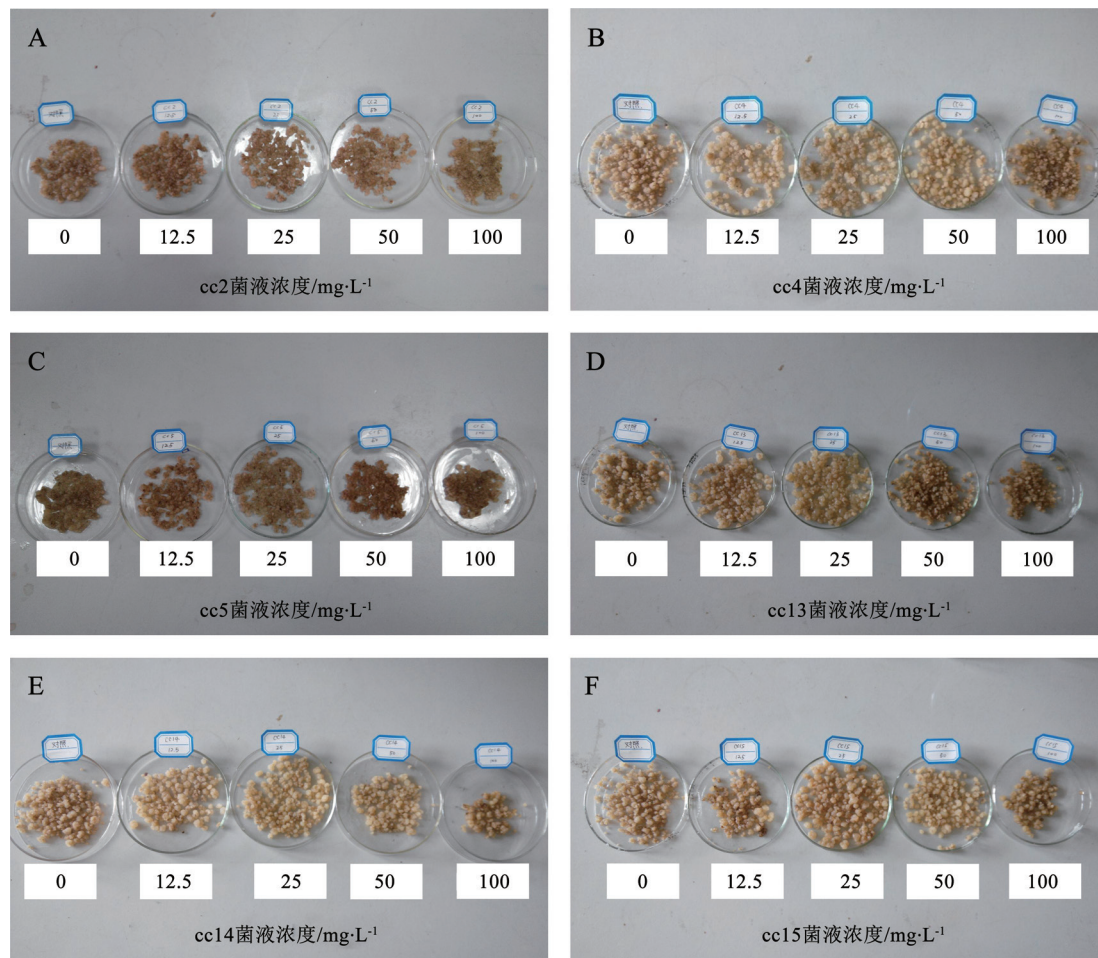


图4 六种内生菌诱导子对细胞生物量的影响

Fig.4 Effects of 6 kinds of endophytes on biomass accumulation

A~F分别表示添加cc2、cc4、cc5、cc13、cc14以及cc15菌液后测得的‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量。

含量均达到最大值, 分别为 $15.61 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $26.82 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。对于cc13 (图5-D), 随着诱导子浓度 ($12.5\sim 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 的增大, 细胞生物量呈现先增大后减小的趋势, 且在诱导子浓度为 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞生物量达到最大值($14.80 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$); 而对于绿原酸的积累, 诱导子浓度在低浓度($12.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时, 具有较高的绿原酸含量 [$25.91 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]。对于cc14而言(图5-E), 随着浓度的增加($12.5\sim 100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 细胞的生物量和绿原酸的含量均呈现出先增大后降低的趋势, 且浓度在 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞生物量 ($18.09 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和绿原酸含量 [$17.76 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)] 均达到最大值。当添加cc15诱导子时(图5-F), 诱导子浓度在 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 生物量达最大, 为 $17.27 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 对于绿原酸的含量, 依然是较低浓度($12.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)时具有较高的绿原酸含量 [$27.00 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]。

综上所述, 内生菌诱导子的浓度为 $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右时, 灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量及绿原酸含量均可以达到最大; 当浓度增大至 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 细胞生物量及绿原酸含量不但没有增大, 细胞反而容易发生褐变。

讨 论

植物内生菌研究的真正意义不仅在于其生态独特性, 更在于微生物在宿主体内和宿主植物的协同作用及协同作用所产生的新功能和物质(王志伟等2015)。然而, 在这种协同作用下, 内生菌不仅能够促进植物的生长, 而且还可以促进植物次生代谢产物的积累(谭燕等2013; 魏宝阳等2011)。本研究首次从灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’中分离、鉴定并得到其内生菌, 通过探究内生菌对宿主细胞生

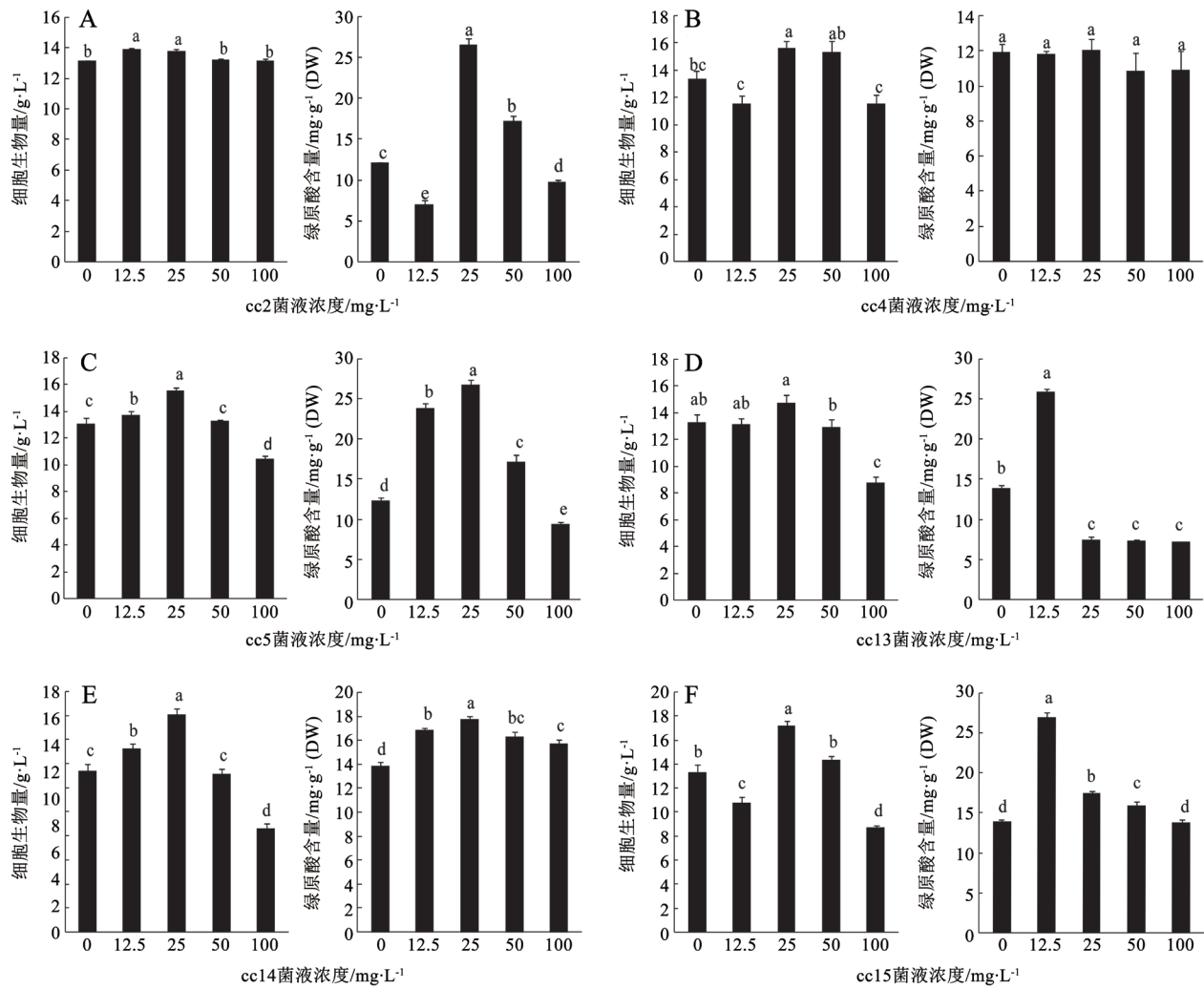


图5 六种内生菌诱导子对‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量及绿原酸含量的影响

Fig.5 Effects of 6 kinds of endophytes on biomass accumulation and chlorogenic acid production

A~F分别表示添加cc2、cc4、cc5、cc13、cc14以及cc15不同浓度菌液后测得的‘渝蕾1号’悬浮细胞生物量和绿原酸含量;每个小图各柱形上小写字母不同表示不同菌液浓度处理的生物量或绿原酸含量之间有显著性差异($P < 0.05$)。

长及对次生代谢产物绿原酸含量的影响,得出以下结论:6株内生菌在某些浓度能显著地提高‘渝蕾1号’细胞的生物量或绿原酸的含量,会是什么原因呢?在有关内生菌的相关报道中,近年内生菌促进植物生长和次生代谢产物积累方面的报道尤其居多。如Fouda等(2015)在乳草内生菌的研究中指出,内生菌Aa-27(互隔交链孢霉)和Pc-25(黄青霉)能明显促进玉米植株根系的生长。同样,Pereira和Castro(2014)研究也表明,玉米粟内生菌(苍白杆菌、食酸曲霉等)也能有效地促进玉米根和玉米幼苗的生长。Wang等(2012)在对苍术植物内生真菌*Gilmaniella* sp.的研究中提出,*Gilmaniella* sp.可以

有效地提高苍术代谢物苍术素、苍术酮、苍术醇以及桉叶油醇的含量。可见内生菌促进植物生长和代谢产物的积累具有较多的例证。但究竟是什么什么原因呢?研究报道表明,不同的内生菌作用机制差别较大。如姜云等(2015)研究表明,人参的内生菌苏云金芽孢杆菌可以产吡啶乙酸,进而促进人参的生长。曲发斌(2014)在研究中指出,芽孢杆菌促进植物生长原因有:分泌植物生长激素、分泌能够降解土壤中难溶性肌醇六磷酸的植酸酶从而改善植物磷元素营养状况以及释放挥发性化合物来刺激植物生长。除此之外,师尚礼(2005)报道根瘤菌与植物的固氮有关系。许长嵩等(2001)报

道荧光假单孢菌产生有效铁载体、抗生素、HCN、葡聚糖酶、几丁质酶等一些对宿主细胞有益的物质来对抗植物病原菌对宿主植物体的危害。王庆云(2014)的研究表明,盾壳霉发酵物能提高SOD活性。本研究从‘渝蕾1号’中分离鉴定出来的菌种是否也是通过以上的作用机制影响灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’的生理生化过程,还有待进一步探索。

另外值得一提的是,本研究是在我们前期探索的其他因素影响‘渝蕾1号’细胞生物量和绿原酸含量基础上做的更进一步的研究(李群等2015;唐明等2015)。在前期的研究中,绿原酸积累最多为 $18.84 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (DW)。而本次研究中,绿原酸积累最多为 $27.00 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ (DW)。与前期的研究相比较,绿原酸含量明显提高,可见,对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’来说,其自身植物体内的内生菌作为诱导子对绿原酸积累影响最大。以后可以加大这方面的研究。

本研究旨在鉴定‘渝蕾1号’内生菌,并探究内生菌对细胞生物量及次生代谢产物绿原酸含量的影响,取得了较好的结果,今后将进一步研究相关的机理,为绿原酸的工业化生产打下基础。

参考文献

- 陈龙,梁子宁,朱华(2015). 植物内生菌研究进展. 生物技术通报, 31 (8): 30~34
- 陈倩,刘善江,白杨,李亚星,郝春花,张强,李建华(2014). 山西矿区复垦土壤中解磷细菌的筛选及鉴定. 植物营养与肥料学报, 20 (6): 1505~1516
- 陈绍华,王亚琴,罗立新(2008). 天然产物绿原酸的研究进展. 食品科技, (2): 195~199
- 姜云,田磊,陈长卿,张冠军,李桐,陈京秀,王雪(2015). 一株人参内生生产喙喙乙酸细菌的筛选及鉴定. 中国中药杂志, 40 (2): 213~217
- 冷慕婵,董诚明,乔毅琳,叶海东(2007). 金银花中产绿原酸内生真菌的分离与鉴定. 河南农业科学, 43 (7): 107~111
- 李群,谭韵雅,梁红英,唐明,马丹炜,王亚男(2015). 不同外源激素对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’愈伤组织生物量生长和绿原酸含量的影响. 广西植物, 35 (5): 692~696
- 隆丽林,易有金,周金伟,程远渡,夏延斌(2015). 虎杖内生菌转化虎杖苷和转化产物抗氧化活性研究. 现代食品科技, 31 (5): 76~83, 162
- 刘颖,魏希颖(2014). 内生菌对植物次生代谢产物的转化. 天然产物研究与开发, 26: 300~303, 267
- 罗磊,郭晓园(2008). 金银花中绿原酸的研究进展. 农产品加工业, (8): 60~62
- 裴冬丽,张红岩,刘苗,李成伟(2015). 药用植物麦冬土壤中拮抗放线菌的分离和筛选. 广东农业科学, (1): 61~63, 91
- 秦新苗,高云飞,景兵,王中华,肖恩时(2015). 土壤微生物中向日葵核盘菌抗性资源的挖掘及分子鉴定. 西北农业学报, 24 (5): 157~162
- 曲发斌,于明礼,张柱岐,袁丁,李明(2014). 短小芽孢杆菌对番茄种子萌发及幼苗生长的影响. 北方园艺, (15): 109~111
- 师尚礼(2005). 苜蓿根瘤菌固氮研究进展及浅评. 中国草地, 27 (5): 63~68
- 谭燕,贾茹,陶金华,杨念云,段金殿,钱大玮,江曙(2013). 内生真菌诱导子调控药用植物活性成分的生物合成. 中草药, 44 (14): 2004~2008
- 唐明,汪超,谭韵雅,李群(2015). 不同种类的无机盐对灰毡毛忍冬‘渝蕾1号’ (*Lonicera macranthoides* Hand. GMazz ‘Yulei’) 悬浮培养体系中细胞生长和绿原酸含量的影响. 广西植物, DOI: 10.11931/guihaia.gxzw
- 王蒂(2004). 植物组织培养. 北京: 中国农业出版社
- 王红,杨镇,肖军,王娜,肇莹,陈珣,龚娜,曹君,杨涛(2014). 两种植物内生真菌的醇提取物对水稻根部基因表达谱的分析. 作物杂志, (2): 48~51
- 王庆云(2014). 盾壳霉发酵物对向日葵的促生作用及SOD活性的影响. 山西农业学, 42 (12): 1274~1275, 1282
- 王志伟,纪燕玲,陈永敢(2015). 植物内生菌研究及其科学意义. 微生物学通报, 42 (2): 349~363
- 魏宝阳,曹亮,李顺祥,黄丹,周晋,魏小翊(2011). 内生菌与药用植物的关系及对次生代谢产物的影响. 中国农学通报, 27 (19): 83~88
- 许长嵩,岳东霞,陈融,范环,陈秀为(2001). 荧光假单孢菌的生防遗传改良. 天津农业科学, 7 (3): 4~7
- 朱燕,房李艳,赵亚洲,刘军海(2010). 绿原酸的应用及其研究热点. 农产品加工业, (4): 34~37
- Belkaid A, Currie JC, Desgagnés J, Annabi B (2006). The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression. *Cancer Cell Int*, 6: 7
- Chen XM, Sang XX, Li SH, Zhang SJ, Bai LH (2010). Studies on a chlorogenic acid-producing endophytic fungi isolated from *Eucommia ulmoides* Oliver. *J Ind Microbial Biotechnol*, 37 (5): 447~454
- Fouda AH, Hassan SED, Eid AM, Ewais EED (2015). Biotechnological applications of fungal endophytes associated with medicinal plant *Asclepias sinaica* (Bioss.). *Ann Agric Sci*, 60 (1): 95~104
- Jaiswal R, Müller H, Müller A, Karar MGE, Kuhnert N (2014). Identification and characterization of chlorogenic acids, chlorogenic acid glycosides and flavonoids from *Lonicera henryi* L. (Caprifoliaceae) leaves by LC-MS. *Phytochemistry*, 108: 252~263
- Kabir F, Katayama S, Tanji N, Nakamura S (2014). Antimicrobial effects of chlorogenic acid and related compounds. *J Korean Soc Appl Boil Chem*, 57 (3): 359~365
- Kim JH, Baik SH (2015). Preparation and characterization of fermented dandelion (*Taraxacum officinale*) beverage using *Lactobacillus acidophilus* F46 having cinnamoyl esterase activity. *Food Sci Biotechnol*, 24 (2): 583~593
- Nallamuthu I, Devi A, Khanum F (2015). Chlorogenic acid loaded chitosan nanoparticles with sustained release property, retained antioxidant activity and enhanced bioavailability. *Asian J Pharm Sci*, 138: 203~211
- Pereira SIA, Castro PML (2014). Diversity and characterization of culturable bacterial endophytes from *Zea mays* and their poten-

- tial as plant growth-promoting agents in metal-degraded soils. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21: 14110~14123
- Shao P, Zhang JF, Fang ZX, Sun PL (2014). Complexing of chlorogenic acid with β -cyclodextrins: inclusion effects, antioxidative properties and potential application in grape juice. *Food Hydrocolloid*, 41: 132~139
- Wang Y, Dai CC, Cao JL, Xu DS (2012). Comparison of the effects of fungal endophyte *Gilmaniella* sp. and its elicitor on *Atractylodes lancea* plantlets. *World J Microbiol Biotechnol*, 28: 575~584
- Wang ZH, Li XL, Zhen SJ, Li XY, Wang CW, Wang YJ (2013). The important role of quinic acid in the formation of phenolic compounds from pyrolysis of chlorogenic acid. *J Therm Anal Calorim*, 114: 1231~1238
- Zatorski H, Salaga M, Zielinska M, Polanczyk AP, Owczarek K, Kordek P, Lewandowska L, Chen CQ, Fichna J (2015). Experimental colitis in mice is attenuated by topical administration of chlorogenic acid. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 388: 643~651