

· 论著 ·

深绿木霉 D16 生物菌肥对丹参生长和次生代谢的影响

叶冰竹¹, 翟欣¹, 秦路平^{1,2}, 韩婷¹ (1. 海军军医大学药学院生药学教研室 上海 200433; 2. 浙江中医药大学药学院 浙江 杭州 310053)

[摘要] 目的 研究深绿木霉 D16 固体菌肥不同剂量在盆栽和大田环境下对丹参苗生长和次生代谢的影响, 为深绿木霉生物菌肥在生产上的应用提供参考。方法 分别在温室和陕西商洛丹参规范化生产基地开展实验, 设置不同剂量(5、15、25 g)的 D16 菌肥处理组 3 组, 25 g 不加菌的固体菌种培养基为对照组, 测定不同剂量 D16 菌肥对丹参苗生物量、有效成分含量的影响。结果 不同剂量的 D16 菌肥对丹参生长和有效成分积累均有显著影响, 施用 15 g 的菌肥用量效果较优, 收获时在盆栽和大田环境下干重分别是同期对照组的 5.61 倍和 1.42 倍, 有效成分含量最高可达盆栽同期对照组的 27.91 倍和大田同期对照组的 1.89 倍。结论 15 g 的深绿木霉菌肥能显著促进丹参苗的生长和有效成分积累, 为内生真菌提升中药质量的生产实践做出了有益的探索。

[关键词] 深绿木霉 D16; 菌肥; 丹参; 次生代谢

[中图分类号] S567.53; Q93

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2019)03-0216-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.005

Effects of fungal biofertilizer from *Trichoderma atroviride* D16 on the growth and secondary metabolism of *Salvia miltiorrhiza*

YE Bingzhu¹, ZHAI Xin¹, QIN Luping^{1,2}, HAN Ting¹ (1. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China; 2. School of Pharmacy, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective** To investigate effects of different dosages of fungal biofertilizer from *Trichoderma atroviride* D16 on the growth and secondary metabolism of *Salvia miltiorrhiza*. **Methods** *S. miltiorrhiza* and fungal biofertilizer from *T. atroviride* D16 were served as test materials. Effects of different D16 dosages on biomass and active compounds accumulation were studied. **Results** Different D16 fertilizer dosages significantly influenced the growth and secondary metabolism of *S. miltiorrhiza*. 15 g D16 exhibited the best results. The dry weights of *S. miltiorrhiza* harvested from potted and field were 5.61 and 1.42 times of the weights from corresponding control groups. The maximum level of active compounds were increased 27.91 times compared with the corresponding control in the potted and 1.89 times in the field. **Conclusion** 15 g D16 fungal biofertilizer enhanced the growth and secondary metabolism of *S. miltiorrhiza* significantly. This study offered an exploratory evidence for the quality and productivity improvement of traditional Chinese medicine with endophytic fungi.

[Key words] *Trichoderma atroviride* D16; fungal fertilizer; *Salvia miltiorrhiza*; secondary metabolism

内生真菌是指在其生活史的一定阶段或全部阶段, 生活于健康植物组织内部而不引起植物病害的真菌^[1]。大量研究发现某些内生真菌能够促进药用植物次生代谢产物的合成, 产生与宿主相同或相似的药用活性成分而且存在借助三磷酸肌醇(IP₃)等信号作用, 对植物次生代谢产物如生物碱等的积累产生影响^[2-3], 因此, 药用植物内生真菌的研究对于

开发利用药用植物及药用植物保护有非常重要的经济与生态效益。丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bunge 为唇形科鼠尾草属药用植物, 其干燥根及根茎入药, 常用于治疗心血管疾病、炎症、肝硬化等^[4-6]。由于丹参需求量日益增大、野生资源匮乏, 加之栽培品种退化和活性成分含量稳定性差, 使得药材质量得不到保证。因此, 寻找一条大幅提高活性产物含量, 可持续、低成本地获得高品质丹参药材的新途径, 已成为目前丹参资源开发迫切需要解决的问题。据文献报道, 应用有益内生真菌制成的菌肥可有效提高植株产量和品质^[7-8]。目前还未见深绿木霉固体菌肥应用于丹参盆栽及大田种植的研究报道, 因此, 本实验

[基金项目] 国家自然科学基金(81872953, 81473301)

[作者简介] 叶冰竹, 硕士研究生, 研究方向: 内生真菌对中药品质的影响, Email: 18321899592@163.com

[通讯作者] 韩婷, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 中药资源及品质研究, Email: than927@163.com

分别在盆栽和大田条件下,探讨施用不同剂量菌肥对丹参苗生长和活性成分含量的影响,以期为大规模应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

丹参种子和种苗取自陕西商洛丹参规范化生产基地,经海军军医大学药学院生药学教研室秦路平教授鉴定。内生真菌深绿木霉 D16 由陆军军医大学药学院副教授明乾良分离自丹参根部,经形态和核糖体 rDNA ITS 序列分析分子鉴定为 *Trichoderma atroviride* [9]。

1.2 深绿木霉 D16 菌肥的制备

固体菌种培养基为:麦麸 250 g、棉籽壳 250 g、葡萄糖 20 g、 KH_2PO_4 3 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g,每 1 L 去离子水,搅匀,121℃ 高压灭菌 2 h。将已经长满 D16 菌丝的 PDA 培养基,用直径为 1 cm 的接种环接种 3~4 个菌片于麦麸-棉籽固体培养基中培养 4~6 d,然后用灭菌的玻璃棒搅拌,使其充分接触,菌丝长满 2~3 d,任取 3 个培养瓶进行活菌数检验,保证菌数含量 ≥ 1 亿个活菌/g。正常条件下,麦麸-棉籽培养的菌种 D16 可以在密封状态下,室温存储 5~7 d,菌种仍可正常生长,实验测得其菌数含量在 1~2 亿个活菌/g 范围内。生物菌肥 D16 由菌种和固体培养基组成,菌种与固体培养基重量比为 1:19。

1.3 D16 菌肥与盆栽丹参苗共培养

2016 年 5 月,课题组将丹参种子用 75% 的酒精消毒处理 5 min,而后用无菌水冲洗 3~5 遍,栽种在丹参的混合栽培基质中(珍珠棉:腐殖土:蛭石=1:3:1),定期浇灌足量的无菌水。待丹参种子发芽生长到 10 cm 左右时,在丹参组培苗根部接触基质的地方均匀撒 5 g 固体菌种和 20 g 不加菌的固体菌种培养基(D16 5 g 组)、15 g 固体菌种和 10 g 不加菌的固体菌种培养基(D16 15 g 组)、25 g 固体菌种(D16 25 g 组),对照组撒 25 g 不加菌的固体菌种培养基(对照组)。用灭菌的盆栽土基质将丹参组培苗根部埋好,用无菌水将植株浇透。将花盆移入温室[温度(25±1)℃,每日光照 16 h,光照度 2 000 lx],前 1 周用保鲜膜拱膜保湿。每隔 2~3 d,每盆浇灌无菌水 500 ml。共培养至第 4 个月、6 个月、8 个月分别收获,称量各组根的鲜重,干燥至恒重后,称量记录各组干重。

1.4 大田试验

实验于陕西商洛丹参规范化生产基地进行。选取 4 个整块田地,每块约种植 100 株丹参(从丹参种子培育 5 个月的露地越冬苗,规格一致),对照组正常进行栽种,实验组挖穴种植,穴深 15 cm。2017 年 4 月,开始施加固体菌肥,分组同“1.3”项。根据生长情况,每半年(2017 年 10 月)进行一次生物菌肥追肥并观察。从 2017 年 5 月 31 日至 2018 年 1 月 31 日,每 3 个月收取 15 株丹参苗,测定其生物量和有效成分。

1.5 HPLC 分析

HPLC 分析过程同明乾良的博士论文《内生真菌对丹参毛状根生长和次生代谢的影响及其分子机制》第二章第二节[10]。

2 结果

2.1 不同剂量的 D16 菌肥对盆栽丹参生物量和有效成分含量的影响

从图 1、图 2 可以看出,共培养第 4 个月到第 8 个月的过程中,不同处理组的丹参根生物量不断升高,且不同剂量 D16 菌肥(5、15、25 g)处理的丹参根鲜重和干重均存在显著性差异。共培养第 4 个月,5 g 和 15 g D16 处理效果较优,鲜重分别是对照组的 1.43、2.39 倍,干重分别为对照组的 2.03、1.99 倍;共培养第 6 个月,不同剂量 D16 处理组丹参苗生物量依次为 15 g 组>25 g 组>5 g 组,其中 15 g D16 处理下的丹参鲜重和干重分别是对照组的 2.48 倍和 3.02 倍;在共培养的第 6 个月至第 8 个月,各组丹参苗快速生长,至 2017 年 1 月,15 g D16 处理的丹参鲜重是对照组的 4.13 倍,干重为对照组的 5.61 倍。综上,15 g D16 菌肥处理对丹参实生苗生物量促进效果最优。

从图 3 可以看出,共培养过程中,不同剂量 D16 菌肥处理组丹参根中的迷迭香酸、丹酚酸 B、二氢丹参酮 I、隐丹参酮、丹参酮 I 和丹参酮 II A 的含量随着时间的增加均呈现先增加后下降的趋势,在第 6 个月达到峰值。不同剂量 D16 菌肥处理组的各有效成分含量存在显著性差异。其中,15 g 菌肥处理组效果优于其他组,在共培养 6 个月后,6 种有效成分含量分别是对照组的 1.67、1.66、27.91、11.34、11.68、8.74 倍;25 g 菌肥处理组次之,分别为对照组的 1.55、1.37、6.63、6.57、6.75、5.74 倍;而 5 g 菌肥处理对丹酚酸 B 有一定的抑制作用。

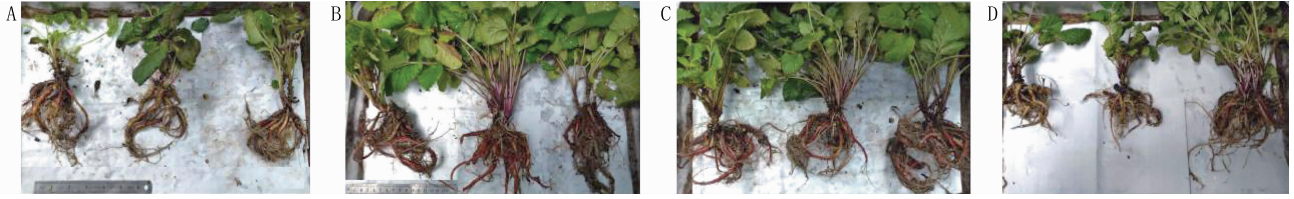


图1 不同剂量 D16 菌肥对盆栽丹参苗形态的影响

A. 对照组; B. D16 5 g 组; C. D16 15 g 组; D. D16 25 g 组

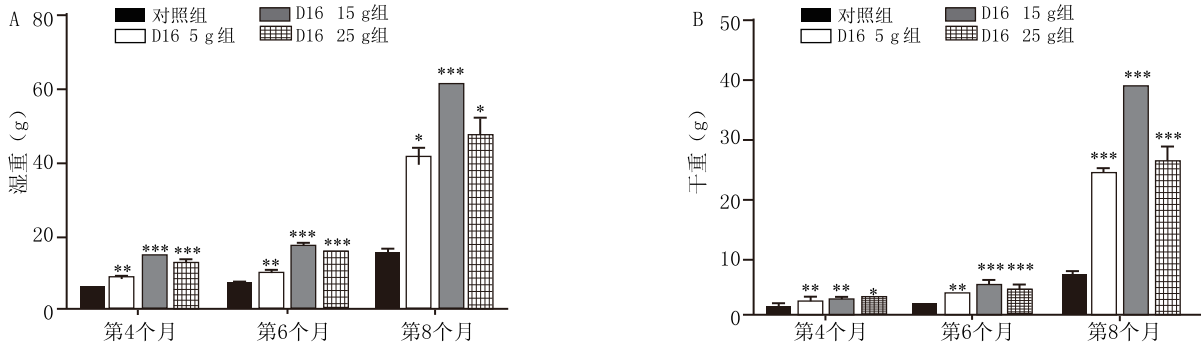


图2 不同剂量 D16 菌肥对丹参盆栽苗生物量的影响

A. 鲜重; B. 干重; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较

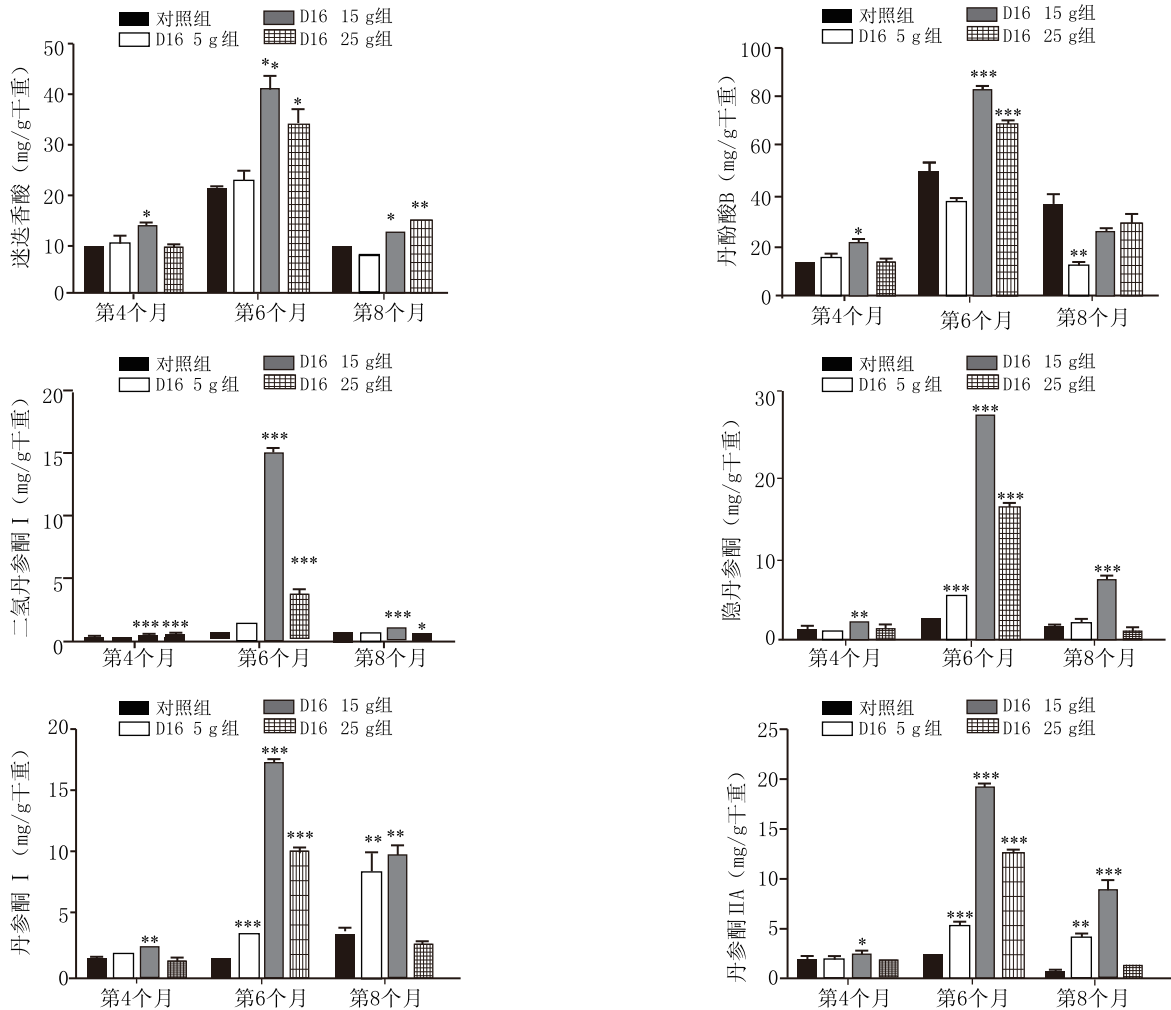


图3 不同剂量 D16 菌肥对丹参盆栽苗有效成分的影响

A. 迷迭香酸; B. 丹酚酸B; C. 二氢丹参酮 I; D. 隐丹参酮; E. 丹参酮 I; F. 丹参酮 II A

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较

2.2 大田试验

为了验证深绿木霉 D16 作为菌肥在实际生产中的作用,在陕西商洛进行大田实验。将施加 D16 菌肥第 1、4、7、10 个月的丹参植株收获,称量各组根的鲜重。烘干后,称量记录其干重。由图 4、图 5 可见,丹参移栽成活后,从 2017 年 5 月到 8 月,丹参根部生长缓慢,D16 15 g 组作用效果明显,丹参根鲜重和干重分别

是对照组的 2.29、2.94 倍。2017 年 8 月到 11 月,丹参进入了快速生长期,对照组的丹参根生长也十分迅速。D16 15 g 组的丹参生长尤快,丹参根鲜重和干重分别达对照组的 1.63 倍和 1.89 倍。2017 年 10 月,对丹参不同处理组进行一次同等剂量的施肥。施肥之后,D16 5 g 组的丹参生物量急剧上升,超过 D16 15 g 组,鲜重和干重分别是对照组的 1.63 倍和 1.42 倍。



图 4 不同剂量 D16 菌肥对大田丹参苗形态的影响

A. 对照组;B. D16 5 g 组;C. D16 15 g 组;D. D16 25 g 组

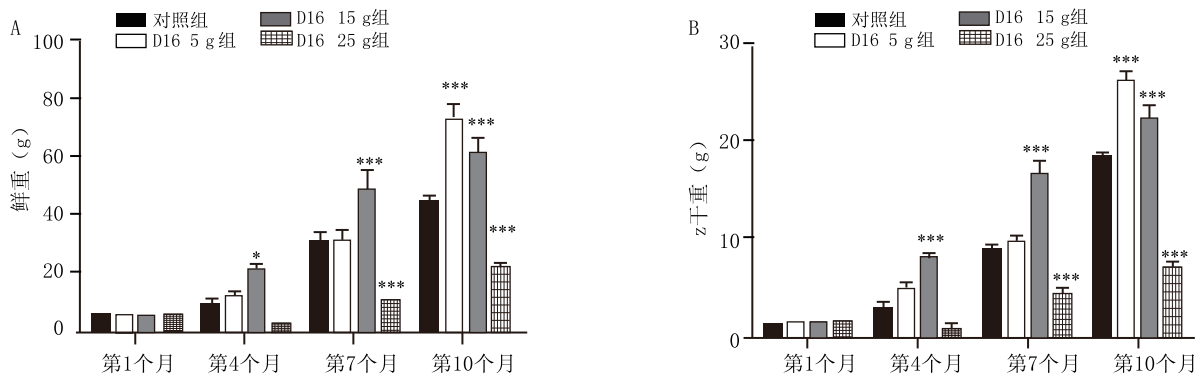


图 5 不同剂量 D16 菌肥对大田丹参苗生物量的影响

A. 鲜重;B. 干重;* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$,与对照组比较

根据结果可知(图 6),在实际栽培过程中,丹参根中各有效成分积累量最多的时期有所差异。迷迭香酸在移栽后第 4 个月含量急剧升高,D16 5 g 组升高速度最快,是对照组的 1.30 倍;到第 7 个月,迷迭香酸含量急剧下降,但 D16 5 g 和 15 g 组含量仍显著高于对照组,分别是对照组的 1.58 倍和 1.88 倍;第 7 个月,处理组与对照组的迷迭香酸含量无显

著性差异。丹酚酸 B 含量在第 7 个月达到峰值,D16 5 g 和 15 g 组含量显著提高,分别是对照组的 1.44、1.52 倍。4 种丹参酮类成分变化趋势相似,在前 7 个月不同剂量 D16 菌肥对各丹参酮类成分作用不一,到了第 10 个月,施加 D16 15 g 菌肥能显著提高二氢丹参酮 I、丹参酮 I 和丹参酮 II A 的含量,分别是对照组的 1.89、1.85、1.59 倍。

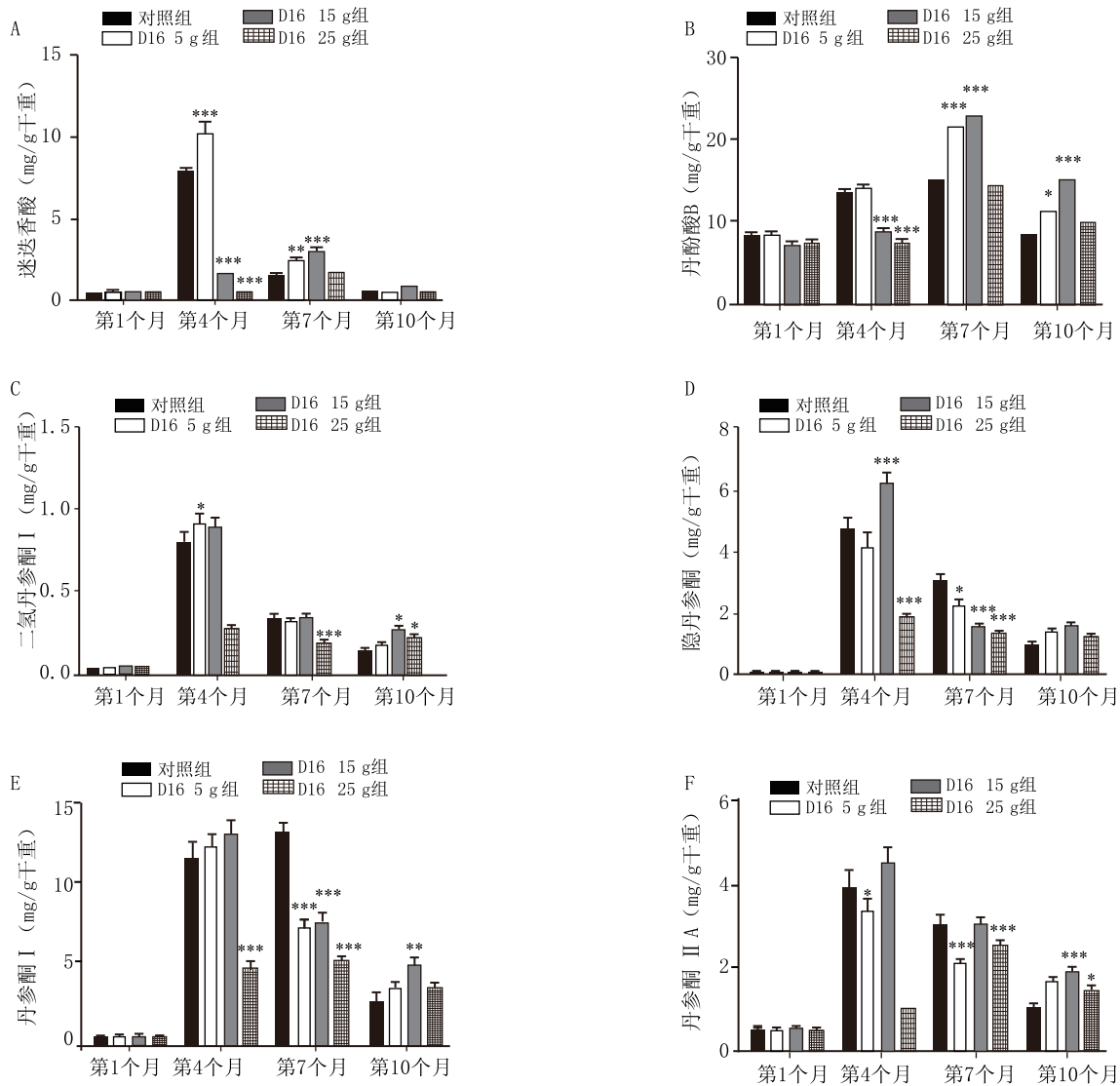


图6 不同剂量D16菌肥对大田丹参苗有效成分的影响

A. 迷迭香酸; B. 丹酚酸B; C. 二氢丹参酮I; D. 隐丹参酮; E. 丹参酮I; F. 丹参酮II A

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与对照组比较

3 讨论

药用植物产地的道地性与各地区外部环境和内在菌群的差异分布存在一定关系,共同影响药用植物的组分及相应含量,使不同地区药材呈现出不同治疗效果,最终形成了药材的道地性。非主产区丹参品质差、疗效低,而已有文献报道利用道地产区分离得到的内生菌可解决某些非道地性药材的生长和品质问题。本课题组^[9,11]从丹参道地产区陕西商洛丹参根中分离得到的深绿木霉D16能够促进丹参毛状根生长,进一步研究发现该菌能产丹参酮类成分并促进宿主丹参酮的合成。

随着化肥的大量施用,肥料利用率低、环境污染等问题日趋严重^[12]。生物菌肥是指一类含有活的微生物,并通过微生物的特定作用给植物提供营养、

调节植物生长的特定制品^[13]。大量研究证明,施用生物菌肥不仅能促进植株生长和次生代谢、增强抗病性,还能减少环境污染、提高肥料利用率^[14-15],但其效果往往受到土壤条件(如养分、有机质、水分、酸碱度等)和环境因素(如温度、通气、光照等)的制约。

本研究中,通过盆栽实验得到深绿木霉D16菌肥能促进丹参苗的生长和有效成分的积累。随着共培养时间的增长,经过不同剂量的D16菌肥处理,丹参的鲜重和干重增长倍数均不断升高,说明菌肥对丹参生长的效应并没有随着时间推移下降,反而不断升高。综合不同剂量菌肥处理组,15g D16菌肥处理效果更佳。温室条件相对稳定,但大田环境更加复杂多变、不易控制,因此开展大田试验进一步验证深绿木霉D16在实际栽培上的效果。

实际大田栽培过程中,初期丹参根部生长缓慢,

培养至第4个月后丹参进入了快速生长期,15 g D16 菌肥作用效果明显,生物量大幅增加。各处理组丹参根中各有效成分积累量最多的时期有所差异,且施加 D16 菌肥在一定程度上能改变有效成分积累量最多的时期,而 25 g 菌肥在一定程度上抑制各有效成分的积累,这可能是由于菌肥施用量过大,导致丹参本身无法形成良好的微生物环境,反而对丹参的生长和有效成分积累造成了负面作用。以上结果与已有研究^[16-17]相似,说明菌肥效果受外界环境的影响。

综上,15 g D16 菌肥对生物量和有效成分积累的促进效果最好,但是从投入产出比的角度来看,5 g D16 菌肥的性价比更高,有良好的应用前景。

【参考文献】

[1] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew[J]. *Science*, 1993, 260(5105): 214-216.
[2] 周敏. 内生真菌及其诱导子与长春花悬浮细胞生物碱合成代谢相关性研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2005.
[3] 杨靖, 江东福, 马萍. 特异性真菌作用于龙血树材质形成血竭的研究[J]. *中草药*, 2004, 35(5): 572-574.
[4] TANG W, EISENBRAND G. Chinese drugs of plant origin: chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine[M]. Berlin: Springer-Verlag, 1992.
[5] ZHOU R, HE L F, LI Y J, et al. Cardioprotective effect of water and ethanol extract of *Salvia miltiorrhiza* in an experimental model of myocardial infarction[J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 139(2): 440-446.
[6] LAM F F, YEUNG J H, CHEUNG J H, et al. Pharmacological evidence for calcium channel inhibition by danshen (*Salvia*

miltiorrhiza) on rat isolated femoral artery[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47(1): 139-145.

[7] 宋富海, 王森, 张先富, 等. 球毛壳 ND35 菌肥对苹果连作土壤微生物和平邑甜茶幼苗生物量的影响[J]. *园艺学报*, 2015, 42(2): 205-213.
[8] 李玉奇, 辛世杰, 奥岩松. 微生物菌肥对温室黄瓜生长、产量及品质的影响[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(1): 259-263.
[9] MING Q L, HAN T, LI W C, et al. Tanshinone II A and tanshinone I production by *Trichoderma atroviride* D16, an endophytic fungus in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(3-4): 330-333.
[10] 明乾良. 内生真菌对丹参毛状根生长和次生代谢的影响及其分子机制[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
[11] MING Q L, SU C Y, ZHENG C J, et al. Elicitors from the endophytic fungus *Trichoderma atroviride* promote *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone biosynthesis [J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(18): 5687-5694.
[12] 王连新, 栾翠华, 张兆伟, 等. 包膜控释肥对设施草莓生长及产量品质的影响[J]. *山东农业科学*, 2010, 42(3): 51-55.
[13] 李海云, 王静, 吕福堂, 等. 生物菌肥发展现状与展望[J]. *中国农村小康科技*, 2008(10): 53-54.
[14] ZHANG F G, ZHU Z, YANG X M, et al. *Trichoderma harzianum* T-E5 significantly affects cucumber root exudates and fungal community in the cucumber rhizosphere[J]. *Appl Soil Ecol*, 2013, 72: 41-48.
[15] 刘云龙, 何永宏, 张旭东. 哈茨木霉对辣椒生长的影响[J]. *云南农业大学学报*, 2002, 17(4): 345-346.
[16] 李云玲, 谢英荷, 洪坚平. 生物菌肥在不同水分条件下对土壤微生物生物量碳、氮的影响[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(6): 790-793.
[17] 彭飞, 黄敦元, 余江帆, 等. 生物菌肥对于油茶的应用前景以及施用条件和方法初探[J]. *江西林业科技*, 2013(1): 39-41.

[收稿日期] 2019-02-19 [修回日期] 2019-03-21

[本文编辑] 李睿旻

(上接第 215 页)

[37] DE KRUIF J K, LEDERGERBER G, GAROFALO C, et al. On prilled nanotubes-in-microgel oral systems for protein delivery[J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2016, 101: 90-102.
[38] TOWN A R, GIARDIELLO M, GURJAR R, et al. Dual-stimuli responsive injectable microgel/solid drug nanoparticle nanocomposites for release of poorly soluble drugs [J]. *Nanoscale*, 2017, 9(19): 6302-6314.
[39] 董晓明. PLGA-PEG-PLGA 温度敏感水凝胶在防粘连及骨髓炎治疗中的应用研究[D]. 吉林大学, 2017.
[40] WU Y, YAO J, ZHOU J, et al. Enhanced and sustained topical ocular delivery of cyclosporine A in thermosensitive hyaluronic acid-based in situ forming microgels[J]. *Int J Nanomedicine*, 2013, 8(Issue 1): 3587-3601.

cine, 2013, 8(Issue 1): 3587-3601.

[41] KENECHUKWU F C, ATTAMA A A, IBEZIM E C, et al. Surface-modified mucoadhesive microgels as a controlled release system for miconazole nitrate to improve localized treatment of vulvovaginal candidiasis[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2018, 111: 358-375.
[42] GÓMEZ C, BENITO M, KATIME I, et al. In vitro transdermal and biological evaluation of ALA-loaded poly(N-isopropylacrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) microgels for photodynamic therapy[J]. *J Microencapsul*, 2012, 29(7): 626-635.

[收稿日期] 2018-08-14 [修回日期] 2018-10-15

[本文编辑] 陈盛新