

半夏软腐病内生拮抗放线菌的分离与鉴定

李艳华, 董 飞, 胡秀芳

(浙江理工大学生命科学学院, 杭州 310018)

摘 要: 针对半夏生产过程中软腐病废水普遍和危害严重的现状,从 7 个半夏主产区的半夏植株上分离到 47 个内生放线菌,通过平板和组培苗拮抗活性筛选获得两个具有较强活性的菌株 07JX3-2 和 07JX3-7,经形态、培养特征和生理生化实验鉴定,初步确定两个分离物均属于链霉菌属(streptomyces),至于其所在种有待进一步鉴定。两个拮抗菌株的获得为半夏软腐病的生物防治研究和应用奠定了基础。

关键词: 半夏; 内生放线菌; 拮抗; 分离; 鉴定

中图分类号: Q939. 13 **文献标识码:** A

0 引 言

半夏(*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.) 为天南星科半夏属多年生草本植物,是一种重要的药用植物^[1-2]。其性温、味辛,具有镇咳祛痰、降逆止呕、消痞散结、抗心律失常、降血脂、抗肿瘤、抗早孕、镇静催眠和解毒抗炎、降血压等功效,临床应用十分广泛^[3]。据 558 个中药处方微机分析,半夏出现频率位于第 22 位,日本 210 个法定汉方中含半夏者 46 个,半夏在东南亚其它国家应用也十分普遍。

半夏具有广阔的市场,然而多年来由于对野生半夏资源的乱采滥挖,土地资源的不断减少,加上化肥、农药、除草剂的广泛的施用,导致半夏野生资源已近枯竭。为解决供需矛盾和保护野生资源,我国从 20 世纪 70 年代开始半夏野生变家种及其栽培技术研究^[4]。半夏人工栽培后,由于生态环境的改变,常发生病虫害,使产量降低,质量变劣。尤其在高温多湿环境中,半夏易受细菌、真菌等病原的侵染而导致腐烂病、烫叶病^[5]等,危害普遍而严重。据统计,半夏块茎腐烂率为 35%~47.5%,目前多用百菌清、多菌灵等多种化学农药进行防治^[6],但长期、反复和大量使用农药,不仅引起环境污染、农残增加,直接危害人类健康;而且同时破坏微生态平衡,新的安全有效的病害防治途径对中药材的生产极其关键。

生物防治是当前已得到重视的安全、有效和持久的植病防治措施。利用生物防治中药材病害,不仅能够保护土壤中有益微生物的数量,保持生态平衡;而且与化学防治相比,可减少农药对环境的污染及其在药材中的残留,因此适应了中药材规范化种植的要求,具有广阔的应用前景。

本文针对半夏栽培过程中软腐病病害,分离拮抗放线菌,以期半夏软腐病的生物防治提供材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

样品来源:2006 年 5 月至 11 月分别从山东、浙江、安徽、甘肃、四川、贵州、江西等半夏种植地采集健康

和发病较轻的半夏植株,保存于牛皮纸袋,立即带回实验室进行内生放线菌的分离。

半夏软腐病原菌:由浙江理工大学生物工程研究所分离保存的胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种(*Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*)SXR1 菌株。

1.2 实验方法

1.2.1 放线菌分离

将半夏植株用自来水充分冲洗后,将根、球茎、茎分离。根进一步用超声波清洗;球茎去皮后,分别用 70%乙醇浸泡 10~15 s,再用 3%次氯酸钠浸泡 2 min,无菌水冲洗 5 次。取消毒后的根、球茎和茎分别放入无菌碾钵中,加 2 mL 无菌水,充分碾磨。静置 15 min 后,取其悬浮液用无菌水进行系列梯度稀释。将 100 μL 系列稀释液涂布于高氏一号培养基上,28℃培养 7~10 d。设置印迹对照和无菌水最后一次冲洗液对照,进行消毒效果验证,以保证分离的菌为内生菌。

1.2.2 拮抗菌筛选

1.2.2.1 平板筛选

在培养平板上采用对峙培养法初步筛选拮抗放线菌。在琼脂培养平板上对称性点接供试菌块(培养 5~7 d),于 28℃培养 3 d 后,将培养 24 h 的病原菌液(10^5 cfu/mL)涂布于平板中央,继续培养,观察并记录抑菌圈大小。

1.2.2.2 组培苗筛选

供试菌接种于高氏一号液体培养基中,28℃、200 r/min 培养 9 d。吸取 150 μL 菌液(10^8 cfu/mL)接种于培养两周的半夏组培苗茎基部,7 d 后接种 10 μL 病原菌(10^6 cfu/mL)。处理后的组培苗置于温室培养,光照强度 1 500~2 000 lx,光照时间 12 h/d,温度(25±1)℃,第 5、10 d 和 15 d 分别记录软腐病的发病情况,计算病情指数和防治效果,并用 DPS3.0 统计软件分析结果。

半夏软腐病的分级标准为:

- 0 级 无症状;
- 1 级 半夏组培苗的茎部开始出现似开水烫过的软腐发病症状;
- 2 级 半夏组培苗的茎、叶部均出现似开水烫过的软腐发病症状;
- 3 级 半夏组培苗呈现似开水烫过的软腐发病症状,部分分支倒伏;
- 4 级 半夏组培苗完全倒伏。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum \text{各级病株数} \times \text{病情级别值}}{\text{调查总株数} \times \text{最高级别值}} \times 100\%$$
$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

1.2.3 初步鉴定

1.2.3.1 形态观察

将待鉴定菌株用划线接种于高氏合成 1 号培养基平板上,在所划线的边缘斜插上消毒盖玻片(45℃),每皿插 3 块盖玻片,于 28~30℃培养 5~10 d 后将盖玻片取出,直接在显微镜下观察基内菌丝、气生菌丝和孢子丝形态。

1.2.3.2 培养特性

将待测菌株分别接种于高氏 1 号培养基、察氏培养基、克氏 1 号培养基、马铃薯浸汁培养基、葡萄糖酵母膏培养基斜面及马铃薯块上,28℃暗培养,第 7、14 d 及 28 d 观察并记录培养特征,包括气生菌丝体颜色、孢子链及其颜色、基质菌丝体颜色、产色素及生长状况等。

1.2.3.3 生理生化特性

明胶液化、牛奶凝固与胨化、淀粉水解、纤维素水解、H₂S 的产生、产色素及碳源利用的测定按照文献[7-8]进行。

2 结果与分析

2.1 内生菌的分离

从山东、浙江、安徽、甘肃、四川、贵州和江西等省的半夏种植地共采集到 135 株半夏,对这些植株按根、球茎和茎分别进行放线菌的分离,结果从浙江和江西两地采集的样品中共分离到 47 个分离物,其中地上茎分离到 4 个、球茎 36 个、根部 7 个。其余样品中均未分离到放线菌。

2.2 平板筛选

对 47 个分离物进行平板拮抗效果筛选,结果只发现球茎中分离到的两个分离物具有较强的抑菌效果(图 1),两个分离物 07JX3-2 和 07JX3-7 的抑菌直径均为 30 mm。

2.3 组培苗筛选

将以上具有较强抑菌效果的分离物 07JX3-2 和 07JX3-7 分别在组培苗上进一步进行拮抗效果实验,结果见图 2。两个放线菌分离物均有效抑制半夏组培苗的软腐病菌发生,表现出良好的防效,防治效果为 100%。

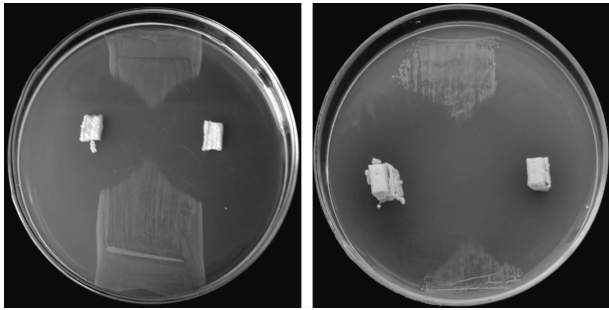
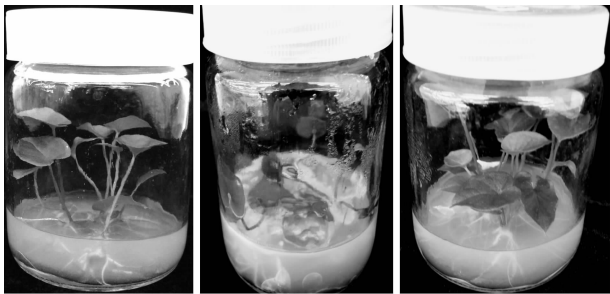


图 1 平板抑菌效果



CK 病原菌 拮抗菌+病原菌

图 2 组培苗上的拮抗效果

2.4 菌株鉴定

2.4.1 形态特征

分离物 07JX3-2 和 07JX3-7 在高氏合成 1 号培养基上的形态特征见图 3。从图 3 可见,两个分离的菌落颜色相似,由白色逐渐变成浅灰紫色,菌丝生长茂盛;气生菌丝多分枝,呈树状;孢子丝螺旋形,孢子椭圆形,表面光滑。

2.4.2 培养特征

两个分离物 07JX3-2 和 07JX3-7 在不同培养基上 的培养特征见表 1。在高氏 1 号培养基、察氏琼脂、葡萄糖酵母膏琼脂、克氏 1 号和马铃薯浸汁琼脂培养基上生长时,两个分离物的气生菌丝分别呈现不同程度的灰紫色;在马铃薯块培养基上生长时,气生菌丝呈灰白色。基质菌丝颜色呈黄色到褐色或棕色,除了在马铃薯浸汁琼脂和马铃薯块上分别产生棕色和褐色可溶性色素外,在其他 4 种培养基上均无可溶性色素产生。

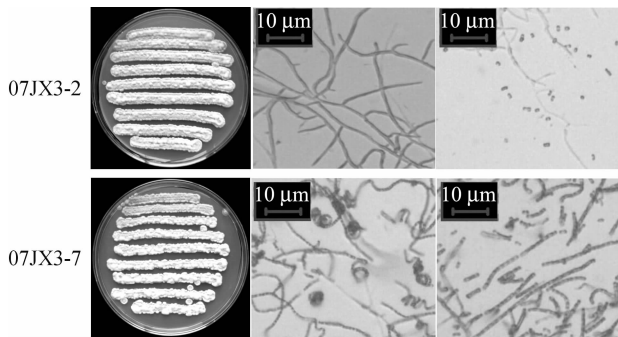


图 3 拮抗菌 07JX3-2 和 07JX3-7 的菌落、菌体和孢子形态

表 1 拮抗放线菌在不同培养基上的培养特征

培养基	气生菌丝	基内菌丝	可溶性色素	生长状况
高氏 1 号	浅灰紫	浅淡黄	无	良好
察氏琼脂	灰紫色	金黄色	无	良好
克氏 1 号	灰紫色	黄色	无	良好
葡萄糖酵母膏琼脂	灰紫色	黄褐色	无	良好
马铃薯浸汁琼脂	灰紫色	黄褐色	褐色色素	良好
马铃薯块	灰白	棕褐	褐色色素	良好

2.4.3 生理生化特征

分离物 07JX3-2、07JX3-7 的生理生化特征见表 2。从表 2 可见,两个分离物均液化明胶、水解淀粉,使牛

奶凝固而不胨化,产浅褐色素,纤维素上不生长,不产生 H₂S,能利用葡萄糖和蔗糖。

表 2 拮抗放线菌株 07JX3-2 和 07JX3-7 的生理生化特征

生理生化特征	结果		生理生化特征	结果	
	07JX3-2	07JX3-7		07JX3-2	07JX3-7
明胶液化	+	+	H ₂ S 产生	—	—
牛奶凝固	+	+	产色素	+	+
牛奶胨化	—	—	葡萄糖	+	+
淀粉水解	+	+	蔗糖	+	+
纤维素生长	—	—			

根据 07JX3-2、07JX3-7 的上述特征,可初步判定该菌株属于链霉菌属,查阅放线菌的分类和鉴定资料,菌株 07JX3-2 和 07JX3-7 的形态特征、培养特征及生理生化特征与链霉菌属最接近,初步定为链霉菌属(*Streptomyces*)。

3 结 论

从 7 个半夏主产区的半夏植株上分离到 47 个内生放线菌,通过拮抗活性筛选获得两个具有较强活性的菌株 07JX3-2 和 07JX3-7,经鉴定两个菌株均属于链霉菌属(*Streptomyces*),至于其所在种有待进一步鉴定。两个高效拮抗菌株的获得为半夏软腐病的生物防治研究和应用奠定了基础。

参考文献:

[1] 李玉先, 刘晓东, 朱照静. 半夏药理作用的研究述要[J]. 辽宁中医学院学报, 2004, 11(6): 459-460.

[2] 范美华, 周吉源. 半夏的研究进展[J]. 西北药学杂志, 2004, 19(2): 90-92.

[3] 蔡世珍, 邹忠梅, 徐丽珍, 等. 半夏属药用植物的研究进展[J]. 国外医药: 中医中药分册, 2004, 26(1): 17-25.

[4] 毛子成, 彭正松. 半夏研究进展[J]. 江西科学, 2002, 1(20): 42-45.

[5] 张小斌, 唐养璇. 商洛半夏块茎腐烂病的原因初探及防治对策[J]. 商洛师范专科学校学报, 2006, 2(20): 37-38.

[6] Hu Xiufang, Ying Feixiang, He Yubo, et al. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft-rot disease on *Pinellia ternata* in China[J]. Eur J Plant Pathol, 2008, 120(3): 305-310.

[7] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定[M]. 北京: 科学出版社, 1992.

[8] 阮继生, 刘志恒, 梁丽糯, 等. 放线菌研究与应用[M]. 北京: 科学出版社, 1990.

Isolation and Characterization of Endophytic and Rhizosphere Bacterial Antagonists of Soft Rot Pathogen from *Pinellia Ternata*

LI Yan-hua, DONG Fei, HU Xiu-fang
(School of Life Sciences, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: *Pinellia ternata* is a traditional Chinese herb medicine that has been used in China for over one thousand years. However, cultivated *P. ternata* is susceptible to a soft rot disease which may cause major loss of yield. In this study, the endophytic Actinomycete are isolated from the plants of *P. ternata* and identified. Altogether, 47 candidate Actinomycete are isolated from surface-sterilized plants of *P. ternata*. In petri dish tests, 2 isolates (07JX3-2 and 07JX3-7) inhibits the growth of strain SXR1. The two isolates significantly reduce the disease incidence on tissue culture seedlings. They are phenotypically identified as *Streptomyces*. This is the first report on the efficacy of endophytic Actinomycete against bacterial pathogens on *P. ternata*, which may provide a more environmental and economical alternative to the control of soil-borne disease on *P. ternata*.

Key words: *Pinellia ternata*; endophytic actinomycete; antagonism; isolation; characterization
(责任编辑: 许惠儿)