



三七根腐病原菌拮抗菌的筛选与活性分析

沈永昶, 曹贝贝, 胡淼, 张帅帅, 李晋, 普倩, 李欧, 曾国红, 胡秀芳

(浙江理工大学生命科学与医药学院, 杭州 310018)

摘要: 中药材三七的种植产业发展受根腐病影响十分严重, 通过筛选高效、稳定的三七根腐病原菌拮抗菌株可对三七进行生物防治。采用平板对峙试验, 从三七植株中筛选出 2 株拮抗细菌菌株 WZZ-6 和 WZZ-25, 并对其进一步的活性测定。结果表明: WZZ-6 和 WZZ-25 菌株对柱孢菌(*Ilyonectria mors-panacis*)病原真菌有较好的抑制活性, 病菌菌丝的生长抑制率都超过 50%, 其中菌株 WZZ-6 抑菌率高达 72%; 对三七离体块茎、植株的根腐病均具有较强的拮抗作用, 防治效果高达 100%。16S rDNA 鉴定结果显示: WZZ-6 和 WZZ-25 分别为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*), 序列相似度分别为 100% 和 99%。拮抗菌株 WZZ-6 和 WZZ-25 有望成为三七根腐病生物防治的新材料。

关键词: 三七根腐病; 内生菌; 拮抗菌; 生物防治

中图分类号: S685.13

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2019)11-0806-06

Screening and activity analysis of antagonistic bacteria against root rot on *Panax notoginseng*

SHEN Yongchang, CAO Beibei, HU Miao, ZHANG Shuaishuai, LI Jin, PU Qian,

LI Ou, ZENG Guohong, HU Xiufang

(College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: The development of cultivation industry of *Panax notoginseng* is seriously affected by root rot. To solve this problem, efficient and stable antagonistic strains were screened for biological control of root rot of *P. notoginseng*. Two antagonistic bacteria (WZZ-6 and WZZ-25) were screened from *P. notoginseng* plants by plate confrontation test, and their activity was further determined. The results show that strains WZZ-6 and WZZ-25 had good inhibitory activity against the pathogen of *Ilyonectria mors-panacis*, and the growth inhibition rate of mycelia of the bacteria was over 50%. The antibacterial rate of Strain WZZ-6 was as high as 72%. Both showed strong antagonistic effect against the root rot of in vitro tuber and plant of *P. notoginseng*, with the control efficiency of 100%. 16S rDNA determination result shows that WZZ-6 and WZZ-25 were *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*, respectively. The sequence similarity was 100% and 99%, respectively. The screened antagonistic bacteria are expected to become new materials for biological control of *P. notoginseng* root rot.

Key words: *Panax notoginseng* root rot; endophyte; antagonistic bacteria; biological control

0 引言

三七是中国名贵的中药材, 根腐病是制约三七种植产业持续发展的重要病害之一^[1]。柱孢菌

(*Ilyonectria mors-panacis*)为三七根腐病的优势病原菌, 是引起三七连作障碍性病害的重要病原菌^[2], 拮抗柱孢菌的生长、抑制相应的病害发生是克服连作障碍的重要途径之一^[3]。

收稿日期: 2019-04-25 网络出版日期: 2019-10-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673537); 浙江省重点研发项目(2015C02030)

作者简介: 沈永昶(1994-), 男, 安徽霍山人, 硕士研究生, 主要从事微生物学方面的研究。

通信作者: 胡秀芳, E-mail: huxiuf@zstu.edu.cn

自扩大三七的栽培面积以来,各种病害逐渐出现,其中三七根腐病的危害最为严重,是造成三七减产甚至绝收的重要因素^[4],已成为限制三七种植的技术瓶颈之一,也是影响中国三七中药材健康发展的重要因素^[5]。当前在中药材的病害防治仍以化学农药防治为主^[6],但该手段影响着中药材的食用安全、抑制土壤中的有益微生物、造成环境污染等诸多问题,并且对人类健康造成巨大的威胁^[7]。

利用生物方法防治植物病害不仅避免了化学农药带来的系列问题,而且持久、安全、有效,已成为植物病害防治的重要方向^[8]。植物内生菌在病害生物防治领域具有开发潜力巨大、应用前景广阔,目前已作为生物防治剂或生长调节剂,在替代或减少农药的使用、改善农业生态系统、保持植物微生物生态系统的生物多样性、实现农业可持续发展等方面,发挥重要作用^[9]。研究三七的内生菌生态调节作用不仅具有普遍的生物防治意义,更重要的是内生菌可作为与三七共存的共生体,可保持三七原有的微生态组成,从而保证三七原料的“道地性”^[10]。三七根腐病原菌生防方面的研究主要包括生防菌剂、细菌和真菌,使用含有益生菌的生物菌剂拌苗,能抑制三七根腐病原菌的活性,促进三七种子出苗,但防治效果并不理想^[7]。刘立志等^[11]从三七根际土、轮作土及三七须根里一共筛选出 87 株拮抗细菌,其中芽孢杆菌属的菌株 Y-4-70、X-5-15 和 X-5-32 对毁灭根柱孢菌(*Cylindrocaipon destructans*)具有较强的抑制作用。生防真菌研究中,姚裕群等^[12]发现越南槐内生真菌 TRXY-34-1 对三种三七病原菌均有强的拮抗活性。以上研究均未进行室外效果试验验证,在生产应用上具有很大局限性。

目前,*Ilyonectria* 属病原菌生物防治内生菌及土壤微生物方面的研究还未见报道,本文从三七植株中分离内生拮抗细菌,并对其应用效果进行评价,为三七的病害防治提供稳定高效的拮抗菌株。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试病原菌:三七根腐病原真菌柱孢菌(*Ilyonectria mors-panacis*) G3B,由本实验室分离保存。供试拮抗菌来自本实验室从三七植株内分离保存的内生细菌中筛选出来的内生拮抗细菌。

供试培养基:*I. mors-panacis* G3B 用 PDA 培养基培养;细菌用 NA 培养基培养。

三七植株:采自云南文山的三七植株,分别用于

三七离体块茎、切片和茎段及植株的拮抗效果试验。

1.2 实验方法

1.2.1 拮抗菌的筛选

采用平板对峙方法筛选拮抗菌:用无菌打孔器在 PDA 上生长的 *I. mors-panacis* G3B 菌落边缘,打孔获得菌块,倒置于新的 PDA 培养平板中央,在其四周与植物病原菌等距约 3 cm 的四个点上,分别放置接种含有 10⁸ μL 供试菌(浓度约为 10⁸ 个/mL)的无菌滤纸片,不接细菌的培养皿为空白对照组,每个处理重复 3 次,然后置于 22 °C 的培养箱中培养 7~10 d。测量病原菌的菌落直径,并按照下列公式计算抑制率:

$$M/\% = (L_0 - L_1)/L_0 \times 100 \quad (1)$$

其中:*M* 为抑制率,%;*L*₀ 为单独培养菌落直径,mm;*L*₁ 为对峙培养菌落直径,mm。

1.2.2 拮抗菌的活性检测

1.2.2.1 三七离体切片

将病原菌 *I. mors-panacis* G3B 在 PDA 固体斜面培养基上活化,22 °C 恒温培养箱培养 7~14 d,用无菌 dd H₂O 洗下孢子并制成 10⁶ 个/mL 悬浮液。供试细菌用 NA 斜面培养基培养后,用无菌水将拮抗细菌冲洗,制成 10⁸ 个/mL 菌悬液。将健康的三七根用流水冲洗 30 min,70% 酒精浸泡 20 s,3% 次氯酸钠溶液浸泡 3 min。用无菌 ddH₂O 冲洗 5 次;用无菌手术刀片将表面消毒的根切成 5 mm 厚的薄片(或取等长的离体茎段),置于含有无菌滤纸的培养皿中,培养皿中添加 1 mL 无菌水保湿。分别采用菌液浸泡和菌液点接的方式依次接种拮抗细菌和病原真菌,接种量分别为 20 μL。拮抗细菌提前 24 h 接种,接种后置于 22 °C 培养,7 d 后调查发病情况,统计发病率和病情指数的计算方法参考文献^[4, 13],计算防治效果。试验设置 CK(接无菌水)、接拮抗菌、接拮抗菌加病原菌、病原菌四个处理,每个处理设 3 个重复。

1.2.2.2 三七离体块茎

将无菌针刺过的三七离体块茎浸在 10⁸ 个/mL 的拮抗菌液中,20 min 后取出放入垫有湿润无菌滤纸的培养皿内。间隔 24 h 后,再放入 10⁶ 个/mL 的孢子悬浮液中浸泡 10 min。将平板置于 22 °C 恒温培养箱中并保湿,7 d 后统计发病率和病情指数。试验设置的处理、三七离体块茎根腐症状的分级标准、病情指数和防治效果的计算方法同上。

1.2.2.3 三七植株

三七植株源于云南文山,每盆 3 株;接种方法:

移栽后,将拮抗菌液(10^8 个/mL)接种于三七植株根基部,5 mL/株;24 h后,采用灌根法,将病原菌的孢子液分别加入已移栽好的三七盆栽植株的根部,根部事先适当给予针刺。接种病原菌液(10^6 个/mL),5 mL/株。将植株 22 °C 植物培养箱中并保湿,7 d后调查发病情况,统计发病率和病情指数。

1.2.3 拮抗菌的鉴定

1.2.3.1 形态观察

将5株拮抗细菌接种于NA固体培养基上,30 °C培养36 h后,观察各自的菌落形态。并对菌体进行革兰氏染色,观察菌体形态。

1.2.3.2 分子鉴定

将细菌菌株接种于LB液体培养基中,30 °C、220 r/min 振荡培养14~16 h,收集菌体,用CTAB法提取细菌基因组DNA,具体方法参考文献[14]。

以提取的DNA为模板,采用通用引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R:5'-TACCTGTTCAGACTT-3'进行PCR扩增,PCR反应参数参考文献[14];上述PCR扩增产物纯化后,送往上海生物工程有限公司测序,测序结果用DNA Star进行分析,并在National center for biotechnology information网站上进行blast比对,用Neighbour-joining method(MEGA version 5.0),构建菌株的系统发育树的方法参考文献[15]。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选

通过平板对峙培养法,对分离自三七植株的35株内生细菌进行抑菌效果检测,结果表明细菌WZZ-6和WZZ-25均能够显著抑制*I. mors-panacis* G3B的生长(图1)。

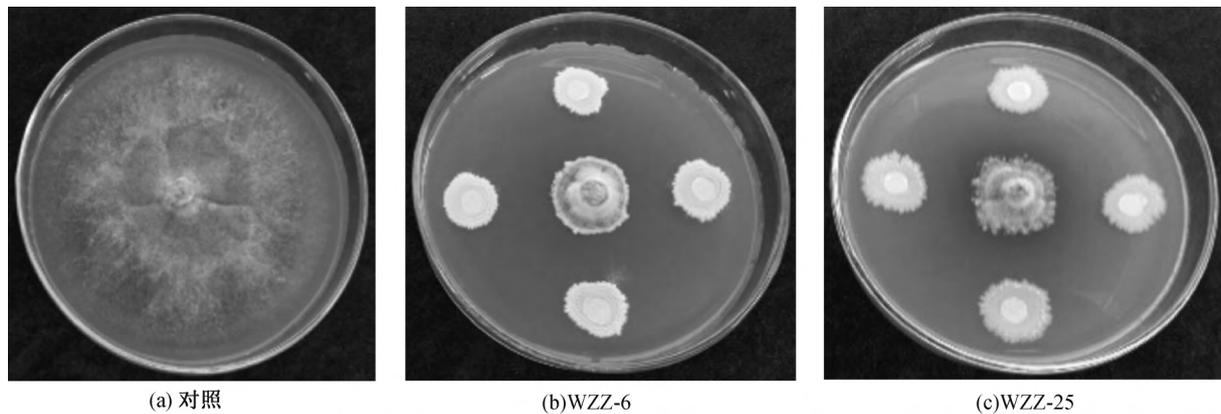


图1 内生拮抗菌对G3B的抑菌效果

进一步测定2株拮抗细菌对供试病原菌菌丝生长的抑制率,结果见表1。由表1可知,菌株WZZ-6与WZZ-25对供试病原菌具有显著的抑制活性,对病原菌丝的生长抑制率为54.8%,其中菌株WZZ-6的拮抗活性最强,抑制率高达72.2%。

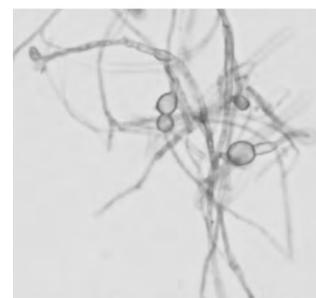
表1 三七拮抗活性测定结果

菌株代码	抑菌条带宽/mm	菌丝生长抑制/%
WZZ-6	2.5	72.2
WZZ-25	1.1	54.8

对拮抗效果较强的拮抗菌WZZ-6,进一步分析对*I. mors-panacis* G3B菌丝的影响结果如图2所示。图2(a)结果表明,对照菌丝细长,粗细一致,原生质分布均匀,未见厚壁孢子产生;图2(b)显示,菌株WZZ-6对病原菌的菌丝有显著的致畸作用,菌丝局部出现膨大变粗,膨大部分变成节,甚至断裂,菌丝变短、分支增多,胞壁加厚并诱导促进厚壁孢子的产生。



(a) 病原菌G3B正常菌丝形态



(b) 病原菌G3B畸形菌丝形态

图2 WZZ-6对菌丝形态的影响

2.2 拮抗活性检测

2.2.1 三七切片和块茎

WZZ-6 和 WZZ-25 分别在三七块根、茎段上进行拮抗活性测定,结果如图 3 所示。由图 3 可知,2

株拮抗菌拮抗效果相同,*I. mors-panacis* G3B 处理的块根表面及四周均出现明显的腐烂症状,而拮抗菌处理显著抑制块根腐烂,空白对照组和拮抗菌的块根保持完好。

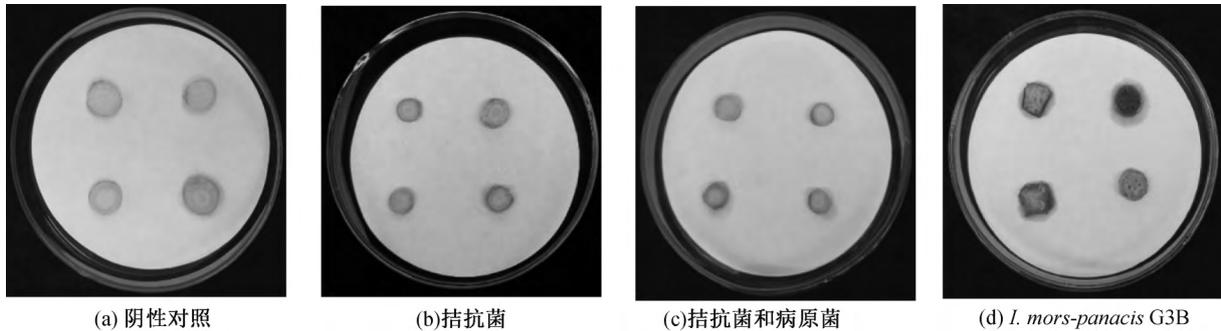


图 3 拮抗菌对三七块根根腐病的抑制效果

拮抗菌对三七茎段根腐病防治效果效果图 4 所示。图 4 表明,2 株拮抗菌拮抗效果相同,*I. mors-panacis* G3B 处理的三七茎段表面及周围出现明显

的腐败症状,而拮抗菌能显著抑制茎段腐烂,空白对照和拮抗菌茎段完好。

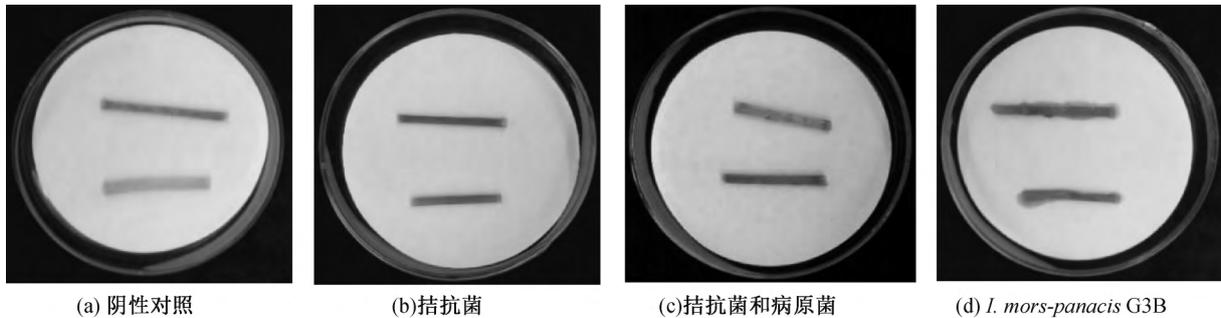


图 4 拮抗菌对三七茎段根腐病的抑制效果

图 5 为 2 株供试拮抗菌在三七离体切片上显示了不同程度的拮抗效果。图 5(d)表明,*I. mors-panacis* G3B 处理三七离体切片四周及下半部分均有明显的腐烂现象;而图 5(b)和图 5(e)显示,2 株

拮抗菌 WZZ-6 和 WZZ-25 均显著抑制病原菌引起的离体切片组织腐烂;图 5(c)和图 5(e)拮抗菌和病原菌混合处理显著降低三七离体切片腐烂程度。

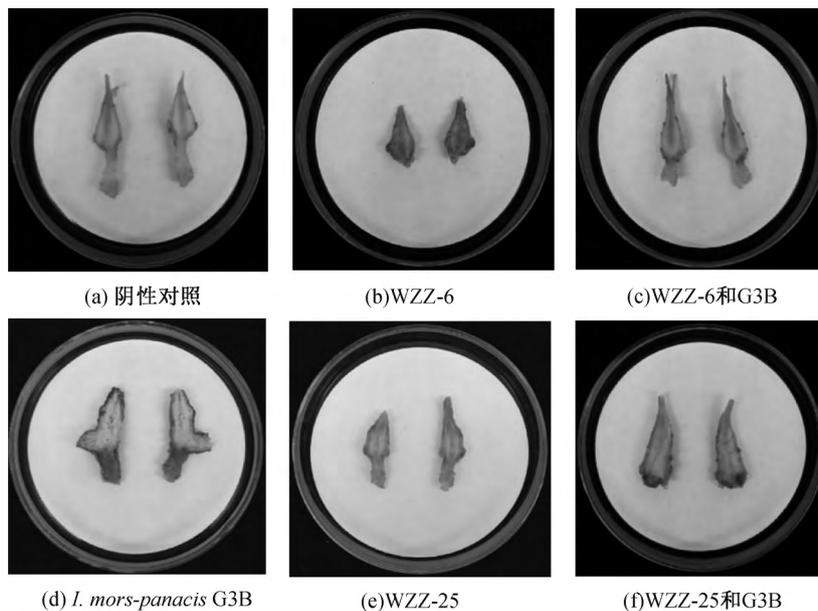


图 5 拮抗菌对三七离体切片的抑制效果

拮抗菌对三七根腐病的防治效果统计分析结果见表2。由表2可知,WZZ-6和WZZ-25对病原菌G3B具有显著的拮抗效果,其中菌株WZZ-6对三七块根切片及块根的腐烂病防治率达到100%,对三七茎段的防治

率达到80.07%。菌株WZZ-25对三七块根切片的腐烂病防治率为88.89%,对三七茎段及块根的防治率为100%。以上结果表明,2个拮抗细菌显著抑制 *I. mors-panacis* G3B引起三七块根和茎的腐烂。

表2 拮抗菌对三七不同离体材料根腐病的抑制效果

菌株代码	三七根切片		三七茎切片		三七离体块茎	
	病情指数/%	防治效果/%	病情指数/%	防治效果/%	病情指数/%	防治效果/%
CK0(阴性对照)	0.00	—	0.00	—	0.00	—
CK1(阳性对照)	100.00	—	83.33	—	100.00	—
WZZ-6	0.00	100.00	16.60	80.07	0.00	100.00
WZZ-25	11.11	88.89	0.00	100.00	0.00	100.00

2.2.2 三七植株

进一步验证2株内生拮抗细菌对三七盆栽植株的拮抗效果如表3和图6所示。表3表明,接种菌

株WZZ-6和WZZ-25的三七植株生长良好,根腐病的发病率为0,表明2个拮抗菌均显著抑制植株根腐病的发生,防治效果为100%。

表3 拮抗细菌的三七植株防治效果

菌株代码	病情指数/%	防治效果/%	5%差异水平	1%差异水平
CK0(阴性对照)	0.00	—	—	—
CK1(阳性对照)	100.00	—	—	—
WZZ-6	0.00	100.00	a	A
WZZ-25	0.00	100.00	a	A

注:a表示5%差异水平下WZZ-6和WZZ-25防治效果相同;A表示1%差异水平下WZZ-6和WZZ-25防治效果相同。

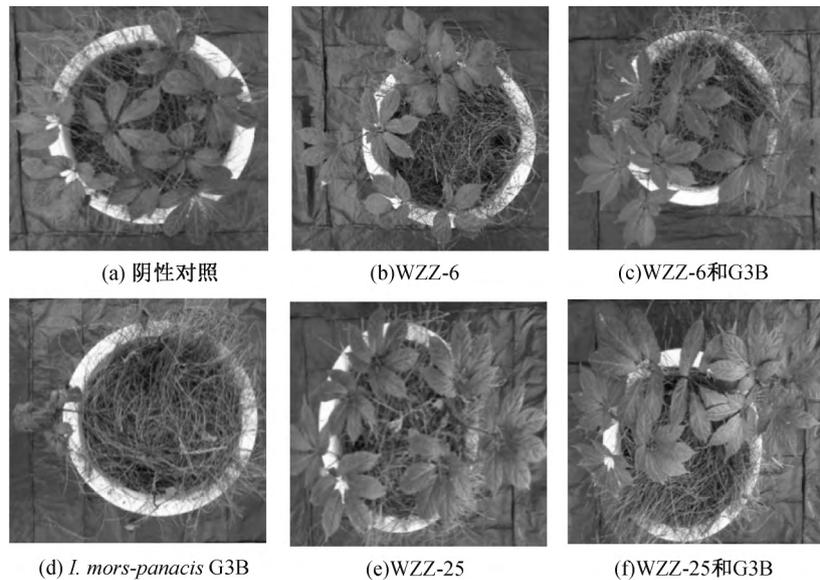


图6 拮抗菌对三七植株根腐病的抑制效果

图6为拮抗菌对三七盆栽植株的抑制效果。图6(d)显示,*I. mors-panacis* G3B处理的三七盆栽植株叶片凋落,植株死亡;图6(b)和图6(e)表明,两种拮抗菌WZZ-6和WZZ-25均显著抑制 *I. mors-panacis* G3B对三七植物的腐败作用;图6(c)和图6(f)说明拮抗菌和病原菌混合处理显著抑制病原菌对三七植物的侵染。

2.3 拮抗菌的鉴定

2.3.1 形态鉴定

在NA平板上观察2个拮抗菌的菌落形态,如表4所示。表4显示,菌落特征多为光滑、边缘圆整、不透明和湿润/半湿润,菌体均为杆状,产芽孢,符合芽孢杆菌属的特征,因此菌株WZZ-6和WZZ-25属于革兰氏阳性菌。

表4 拮抗菌的菌落和菌体特征

形态特征	WZZ-6	WZZ-25
菌落表面	光滑凸起	光滑扁平
菌落边缘	圆整	圆整
菌落透明度	不透明	不透明
菌落颜色	乳粉色	乳粉色
含水状况	半湿润	半湿润
菌落大小/(mm·30 h ⁻¹)	3	4
生长速度	慢	慢
菌体形状	杆状	椭圆状或柱状
菌体大小/ μm	(0.68~0.95)× (1.55~2.78)	(0.75~0.86)× (1.95~2.98)
革兰氏染色	+	+
芽孢	+	+

2.3.2 分子鉴定

进一步基于16S rDNA序列分析进行分子鉴定,blast对比分析结果表明:WZZ-6和WZZ-25均属于芽孢杆菌属,分别为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *Plantarum* FZB42)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC 6633),其序列同源性分别为99%和100%。

3 结论

本文通过筛选分离高效的三七根腐病拮抗菌来进行生物防治,主要结论如下:

a)本文从三七植株中分离获得两株高效拮抗菌为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

b)两株拮抗菌均有效抑制病原菌 *I. mors-panacis* G3B引起的三七块根、茎和植株的腐烂,防治效果达100%,在三七种植中显示较好的应用前景。

解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌产生具有抗逆性较强的芽孢,广泛用于农业生产中,本文结果为菌剂的生产、开发和应用提供了便利。

参考文献:

[1] 李楚芬,郑立. 中药材三七的药用价值分析[J]. 内蒙古中医药, 2015, 34(3): 52.

- [2] 汪静,梁宗锁,康冰,等. 文山三七根腐病原真菌的鉴定与药剂防治[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(1): 158-163.
- [3] Qian P, Mi C Y, Jiang K, et al. Phylogenetic and metabolic responses of rhizosphere microbes to the cultivation of *Panax notoginseng* [J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2016, 10(5): 370-377.
- [4] 高园园,胡秀芳. 半夏软腐病内生拮抗真菌的筛选及鉴定[J]. 山东农业科学, 2013, 45(11): 103-106.
- [5] Park Y H, Mishra R C, Yoon S, et al. *Endophytic Trichoderma citrinoviride* isolated from mountain-cultivated ginseng (*Panax ginseng*) has great potential as a biocontrol agent against ginseng pathogens [J]. Journal of Ginseng Research, 2019, 43(3): 408-420.
- [6] 杨丽英,杨斌,李林玉,等. 6种云南道地中药材病害发生及抗病育种研究进展[J]. 中药材, 2010, 33(7): 1186-1188.
- [7] 赵阿娜,丁万隆. 利用拮抗微生物防治中药材土传病害研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(7): 485-487.
- [8] 王文凯,熊远健. 植物病害生物防治方法分析[J]. 农家参谋, 2018, 579(7): 134.
- [9] 何艺琴,卢晨,徐文杰,等. 小麦内生细菌 XG-7 对赤霉病菌的拮抗作用及其生物学特性[J]. 甘肃农业大学学报, 2019, 54(1): 110-116.
- [10] 叶云峰,付岗,胡凤云,等. 三七主要病害生防真菌 F2 的抑菌作用测定及其鉴定[J]. 西南农业学报, 2015, 28(5): 2112-2115.
- [11] 刘立志,王启方,张克勤,等. 三七根腐病拮抗菌的筛选及活性产物的初步分离[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2004, 26(4): 357-359.
- [12] 姚裕群,李良波,黄荣韶. 内生真菌 TRXY-34-1 对三七病原菌的拮抗活性及其鉴定[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(2): 644-650.
- [13] Mi C Y, Yang R H, Rao J F, et al. Unveiling of dominant fungal pathogens associated with rusty root rot of *Panax notoginseng* based on multiple methods [J]. Plant Disease, 2017, 101(12): 2046-2052.
- [14] 王凡,洪葵. CTAB法提取野野村菌基因组DNA[J]. 微生物学通报, 2010, 37(8): 1211-1215.
- [15] Evans J, Sheneman L, Foster J. Relaxed neighbor joining: a fast distance-based phylogenetic tree construction method [J]. Journal of Molecular Evolution, 2006, 62(6): 785-792.

(责任编辑:唐志荣)