

中药材丹参根腐病生防菌的分离与鉴定

周莹¹, 袁孟娟¹, 韩军¹, 董惠钧¹, 藏香银², 陈芳¹

(1. 聊城大学 药学院, 山东 聊城 252059; 2 山东东阿阿胶股份有限公司, 山东 聊城 252200)

摘要:以聊城市茌平县杜郎口镇中药材种植基地采集的丹参根际土壤为试材,采用梯度稀释法和平板对峙培养法在丹参根际土壤中筛选对丹参根腐病具有较好抑制作用的生防菌。结果表明:初步筛选出 10 株具有抑菌活性的有益微生物;进一步通过复筛及其抑菌谱的测定分离出 2 株抑菌效果较好的菌株,分别为 2-1 和 9-2。通过形态学和分子生物学鉴定,2-1 和 9-2 分别为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),该试验可为今后高效生防菌剂的研发奠定基础。

关键词:丹参;根腐病;生防菌;鉴定

中图分类号:S 567.5⁺3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)01-0145-03

丹参是我国传统常用中药材,有近 2000 年的应用历史,是国内外药材市场的重要商品。具有活血调经、祛瘀止痛、凉血消痈、清心除烦、养血安神的功效^[1],用于治疗心绞痛、冠心病等,是我国传统医药学中应用最早而且最广泛的药物之一^[2],是临床上被广泛用于心脑血管疾病治疗的常用药物^[3]。

近年来,丹参根腐病传播蔓延较快,患病后的丹参植株长势衰弱,严重时地上部枯死,根的木质部完全腐烂成黑褐色,产量显著降低,并且其外观性状也不符合药用的要求。丹参产区均有不同程度的病害发生,造成经济损失,如河北行唐丹参产区损失高达 60%~80%。根腐病在整个生长期均可发生,每年 6—7 月为发病盛期^[4]。丹参根腐病主要是由一种镰刀菌(*Fusarium*)引起的根部病害。镰刀菌属半知菌亚门镰刀菌属真菌。病原菌以分生孢子在土壤或种根上越冬,成为翌年发病的初次侵染源。在丹参根腐病的防治中,一般化学农药很难起到有效作用,而且滥用化学农药会造成农药的残留和污染,因此寻求有效的生物防治措施成为可持续发展的迫切需要。为此,该研究从聊城市茌平县杜郎口镇中药材种植基地采集丹参根际土壤,采用梯度稀释法和平板对

峙培养法分离筛选对丹参根腐病具有较好抑制作用的生防菌,以期今后高效生防菌剂的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*)、茄交链孢(*Alternaria solani*)、毛霉(*Mucor*) (由实验室保存)。霉菌均用 PDA 培养基,细菌均用 LB 培养基(配制方法略)。

1.2 试验方法

1.2.1 丹参根际土壤拮抗生防菌的分离 土样取自山东聊城杜郎口中药材种植基地,取土样 1 g,加入装有 9 mL 无菌水的试管中,震荡 15 min,然后进行梯度稀释,依次稀释 10 倍,分别为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ^[5]。吸取稀释液 100 μ L,放入准备好的 LB 平板和 PDA 平板上均匀涂布。稀释度以每平板菌落数 100~150 为宜,于 30℃ 下倒置 LB 培养 1~2 d, PDA 培养 3~5 d。挑取不同类型的菌落于 LB、PDA 平板上纯化 3 次后,4℃ 保存于斜面上备用^[6]。

1.2.2 根腐病菌株拮抗活性测定 以丹参根腐病菌腐皮镰刀菌为靶标菌进行拮抗活性测定。生防细菌筛选采用平板对峙培养法:将天南星根腐病菌接种于 PDA 培养基中间,30℃ 恒温培养 1 d 后,在菌落四周接上供试生防菌,接着培养 2~3 d,查看是否有抑菌圈并比较抑菌圈大小^[7]。

1.2.3 生防菌抑菌谱的测定 按上述抑菌活性测定的方法,以尖孢镰刀菌、炭疽杆菌、茄交链孢菌、毛霉为靶

第一作者简介:周莹(1987-),女,山东聊城人,硕士研究生,研究方向为生物制药研究。E-mail:hebel1183@yeah.net.

责任作者:陈芳(1980-),女,山东惠民人,博士,副教授,现主要从事微生物制药等研究工作。E-mail:chenfang20045@163.com.

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2013CQ019);聊城大学博士科研启动基金资助项目(3010)。

收稿日期:2014-09-26

菌,按点接的方法进行抑菌谱的测定。

1.2.4 生防菌鉴定 形态鉴定:将筛选出的生防菌点种于 LB 固体培养基上,30℃过夜培养。观察菌落形态,包括色泽、是否有褶皱、致密或者疏松、质地、边缘沟纹等^[8]。细菌鉴定参照《常见细菌系统鉴定手册》^[9-10]。分子生物学鉴定:16SrDNA 基因序列测定相结合的方法。单克隆细菌接种于血平板上,培养 48 h 后收集菌落于生理盐水小试管中,离心后收集菌体,抽提细菌的总 DNA (抽提方法略)。依据细菌 16SrDNA 中最保守的序列设计及合成引物,正向引物:5'-GAGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3';反向引物:5'-AAGGAGGAGGTGATC-CARCCGCA-3'(其中 R 代表 A/G)。PCR 反应条件:30 μL 的反应体系中含基因组 DNA 0.2 μg, dNTP 0.2 mmol/L,正反向引物各 1 μmol/L, Mg²⁺ 1.5 mmol/L,

10×PCR Buffer 3.0 μL, Taq 酶 2 U, 92℃变性 4 min 后进入循环,92℃再作用 1 min, 60℃退火 1 min, 72℃延伸 2 min, 共计 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物克隆于 pGEM-T 载体,经过抽提质粒和酶切验证酶连产物正确,然后测序仪测序^[11]。

2 结果与分析

筛选结果:共 10 株,其中 1 号菌株,菌落特征为:菌落圆形或不规则形,表面粗糙不透明,污白色,中间褶皱,边缘波纹状,革兰氏染色阳性^[12]。并结合其系统发育分析,鉴定为枯草芽孢杆菌,9 号菌株为解淀粉芽孢杆菌。枯草芽孢杆菌 2-1 (deposition number CGMCC No. 9256);解淀粉芽孢杆菌 9-2 (deposition number CGMCC No. 9257)。

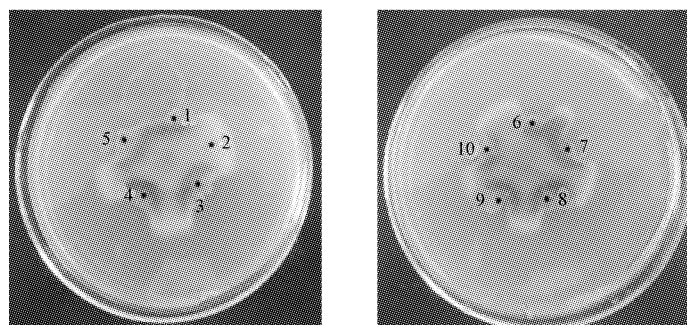


图 1 腐皮镰刀菌作为拮抗菌的抑菌结果

Fig. 1 The antibacterial results of *Fusarium solani* as antagonistic bacteria

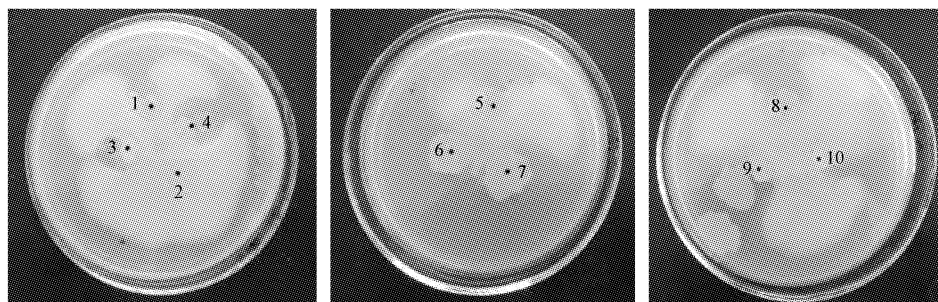


图 2 毛霉作为拮抗菌的抑菌结果

Fig. 2 The antibacterial results of *Mucor* as antagonistic bacteria

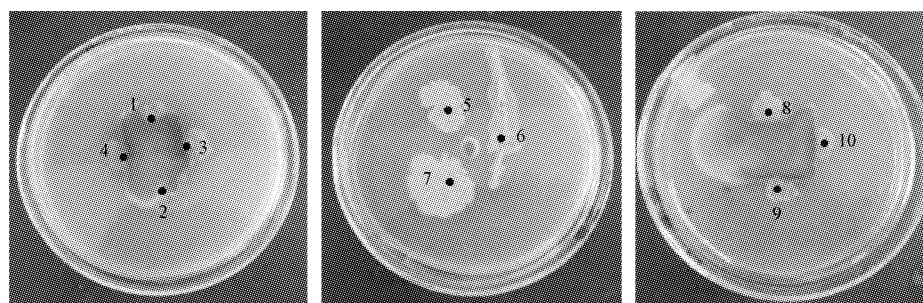


图 3 炭疽作为拮抗菌的抑菌结果

Fig. 3 The antibacterial results of *Bacillus anthracis* as antagonistic bacteria

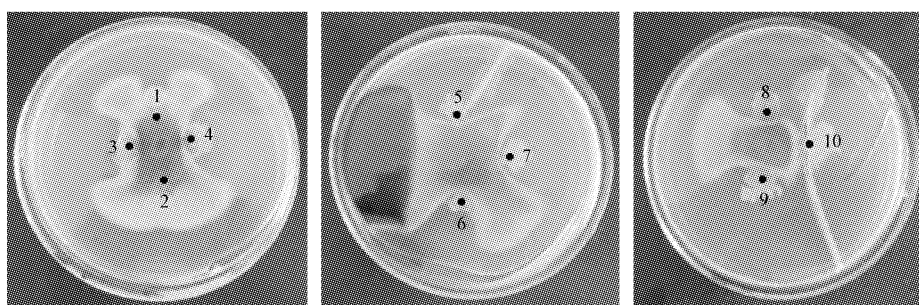


图4 茄交链孢作为拮抗菌的抑菌结果

Fig. 4 The antibacterial results of *Alternaria solani* as antagonistic bacteria

3 结论与讨论

根腐病菌的严重发生已经成为天南星和丹参等根茎类中药产业中的重要限制因子,由于其可以在土壤中存活多年,轮作倒茬很难实行,同时缺乏有效的抗病品种和防治药剂,从而导致根腐病危害越来越严重,因此从中药根际土壤筛选能有效防治根腐病的生防菌就显得尤为迫切。通过大量采样、分离和筛选,最终获得了10株能有效防治根腐病的生防菌,其中2-1和9-2分别为枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌,为聊城地区根腐病的防治提供了解决方法。

该研究以天南星根腐病菌及丹参根腐病菌为材料,测定了其土壤根际筛选出的生防菌的作用效果,发现生防菌和分泌的抗菌物质对天南星根腐病菌有抑制作用,并且测定筛选出的生防菌的抑菌谱。生防微生物,种类多分布广,抑菌谱广,抗病增产作用明显,明显优于其它拮抗微生物;另外目前在天南星根腐病菌方面的生物防治还不全面,仅仅是筛选出了生防菌而没有对其防治机制和效果有深入的研究,但这些生防菌的生物防治潜力很大,因此要加大在天南星根腐病生防菌方面的研究。

参考文献

[1] 卫生部药典委员会,中国药典(一部)[M].北京:化学工业出版社,

1995;63.

[2] Du G H,Zhang J T. The general situation and progress of the modern research of red sage root (*Radix salviae miltiorrhizae*)[J]. Herald of Medicine, 2004,23:355-360.

[3] 文家富,陈光华,王刚云,等. 丹参根部病害发生与综合防治技术[J]. 中国植保导刊,2009,29(10):32-33.

[4] 王刚云,文家富,郑小惠,等. 陕西商洛丹参根部病害调查研究[J]. 陕西农业科学,2009,55(3):53-54.

[5] 朱伟杰,王楠,郁雪平,等. 生防菌 *Pseudomonas fluorescens* 2P24 对甜瓜根围土壤微生物的影响[J]. 中国农业科学,2010,43(7):1389-1396.

[6] 刘晓妹,刘文波,范秀利. 芒果细菌性黑斑病生防菌的筛选及防效测定[J]. 中国生物防治,2006(10):94-97.

[7] 李旭,马福海,王秀娟,等. 大豆根腐病生防菌 KJB04-11 的鉴定及其产生的脂肽类抗生素[J]. 生态学杂志,2012,31(6):1453-1460.

[8] 汪雪静. 草莓尖孢镰刀菌根腐病生防细菌的分离鉴定及抑菌作用的初步研究[D]. 北京:北京农学院,2012:14-16.

[9] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:267-388.

[10] 中国科学院微生物所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京:科学出版社,1978.

[11] 陈开森,余阳,孙爱娣,等. 一株马脉片球菌的分离、鉴定及其部分16SrDNA基因序列测定[J]. 江西医学院学报,2009,49(2):41-43.

[12] 刘海龙,李春杰,许艳丽. 生防细菌的抑菌谱和对大豆根腐病的防治[J]. 大豆通报,2008(1):10-13.

Isolation and Identification of Traditional Chinese Medicine *Salvia miltiorrhiza* Bunge Root Rot Biocontrol Agents

ZHOU Ying¹, YUAN Meng-juan¹, HAN Jun¹, DONG Hui-jun¹, ZANG Xiang-yin², CHEN Fang¹

(1. College of Pharmacy, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059; 2. Shandong Dong'e E Jiao Co., Ltd., Liaocheng, Shandong 252200)

Abstract: Taking rhizosphere soil of Chinese medicine *S. miltiorrhiza* Bunge root that from langkou town Chinese herbal medicine planting base in Chiping Connty Liaocheng city as material, used gradient dilution method and dual culture method, better inhibitory biocontrol agents to root rot were selected. The results showed that in the rhizosphere soil of *Salvia miltiorrhiza* Bunge discovered 10 strains beneficial microorganisms. And through the determination of reduplicative screening and its antibacterial spectrum, isolated 2 bacteriostatic strains: 2-1 and 9-2. With the morphology and molecular biology identification, 2-1 and 9-2 were bacillus subtilis and bacillus amyloliquefaciens. This laid a foundation for effective bio-control bacteria agent research and development.

Keywords: *S. miltiorrhiza* Bunge; root rot; biocontrol agents; identification