

文章编号 :1003-8701(2013)06-0062-04

西洋参病原菌拮抗细菌的分离筛选与鉴定

林红梅¹, 施建飞¹, 李岳桦², 孙卓¹, 杨利民^{1*}

(1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 长春三真实业有限公司, 长春 130024)

摘要:为了寻找西洋参病原菌的高效生防菌,从多年生西洋参根际土壤中筛选出7株对西洋参病原菌有较强拮抗能力的细菌,并对多种西洋参病原菌有良好的拮抗作用,表现出拮抗的广谱性。通过扩增、测序得到7株菌的16S rDNA序列,运用ClustalX进行多重序列对比,并通过MEGA5.0方法构建16SrDNA系统发育树,结合菌体形态特征、生理生化特性鉴定,2株确定菌株SJF-5、SJF-20为*Bacillus methylotrophicus strain*、菌株SJF-8为*Bacillus aerophilus strain*、菌株SJF-14为*Bacillus amyloliquefacie*、菌株SJF-24为*Bacillus pumilus strain*。2株*Brebbiacillus*属中,菌株SJF-6、SJF-26均为*Brebbiacillus borstelensis strain*。本文首次报道了解淀粉酶芽孢杆菌、短杆芽孢杆菌、甲基营养型芽孢杆菌对西洋参病原菌有抑制作用。

关键词:连作;西洋参;拮抗细菌;筛选;鉴定

中图分类号:S567.5*3

文献标识码:A

Isolation and Identification of Antagonistic Bacteria of *Panax quinquefolium* L. Pathogeny Fungus

LIN Hong-mei¹, SHI Jian-fei¹, LI Yue-hua², SUN Zhuo¹, YANG Li-min^{1*}

(1. College of Herbal Medicine, Jilin Agricultural University, Chang Chun 130118;

2. Changchun Sanzhen Industrial Co, Ltd. Chang Chun 130024, China)

Abstract: To find efficient bio-control bacteria against pathogens of *Panax quinquefolium* L., 7 strains strongly antagonized pathogens of ginseng were selected from perennial *Panax quinquefolium* L. rhizosphere soil, all of which had good antagonisms against various pathogens of ginseng and featured broad-spectrum antagonism. The 16SrDNA sequences of the above 7 strains were obtained by amplification and sequencing. Multiple sequence alignment was performed by ClustalX, and the 16SrRNA phylogenetic tree was reconstructed by MEGA5.0. Based on identifications of thallophytic morphological, physiological and biochemical characteristics, strain SJF-5 and SJF-20 were *Bacillus methylotrophicus*. Strain SJF-8 was *Bacillus aerophilus*, strain SJF-14 was *Bacillus amyloliquefacie*, and strain SJF-24 was *Bacillus pumilus*. Among 2 *Brebbiacillus* strains, strain SJF-6 and SJF-26 both were *Brebbiacillus borstelensis*. This is the first paper reported *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevundimonas* sp., *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus vallismortis* antibiotic against *Panax quinquefolium* L. pathogeny fungus.

Keywords: Continuous cropping; *Panax quinquefolium* L.; Antagonistic bacteria; Isolation; Identification

西洋参(*Panax quinquefolius* L.)为五加科人参属多年生宿根阴性双子叶植物,原产美国和加

拿大,是名贵保健药品,在我国临床应用最早,已有300多年应用历史。自20世纪80年代我国引种西洋参成功后,已形成东北、北京和山东三大产区,而东北是我国西洋参的主产区。

栽培西洋参病害比较严重,长期以来通过农药等化学手段来防治西洋参病害,不仅加重环境污染,导致西洋参农残超标,而且降低药材使用安

收稿日期:2013-08-30

基金项目:国家科技支撑计划(2011BAI03B01-02)

作者简介:林红梅(1980-),女,讲师,博士研究生,主要从事药用植物资源生态方面研究。

通讯作者:杨利民,男,教授,博士,E-mail: ylmh777@126.com

全性和商品价值。因此,人们把防治重点逐步转向生物防治措施和农业防治措施上^[1-7]。利用西洋参根际土筛选出的大量有益微生物可调节改善土壤微环境,具有拮抗效果的微生物亦可对西洋参土传病害进行生物防治。生物防治符合国家 GAP 标准要求,在药用植物病害防治上,具有广谱、无毒、无污染等优点,已成为当今病害防治的一个研究热点,特别是对病原拮抗菌的分离和研究越来越受到关注^[8]。但目前有关西洋参病害生防菌资源的开发研究基础较为薄弱,特别是对于生防细菌广谱拮抗性方面的相关报道较少,尚未开发出西洋参专用生防菌剂。本研究从生物防治的角度出发,以吉林抚松不同连作年限的西洋参根际土壤为研究对象,从中分离筛选出 7 株对西洋参病原菌具有较强拮抗能力的细菌菌株,并通过对其形态特征、生理生化特性以及 16S rDNA 基因的序列的分析,对菌株进行了鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

本拮抗实验所用西洋参病原真菌均来自吉林农业大学农学院:西洋参根腐菌 (*Fusarium solani*)、西洋参锈腐菌 (*Cylindrocarpon destructans*)、西洋参黑斑病菌 (*Alternaria panax Whetz*)、西洋参立枯病丝菌 (*Rhizoctonia solani*)、西洋参疫病菌 (*Phytophthora cactorum*) 和西洋参菌核病菌 (*Sclerotinia schinseng*)、西洋参灰霉菌 (*Botrytis spp.*) 等 7 种。

1.1.2 土壤

土壤采自吉林省抚松县万良镇西洋参栽培地,取多年生西洋参根际 30 cm 以内的土壤备用。

1.1.3 培养基

马铃薯葡萄糖培养基(PDA, 1 000 mL)的制备:去皮马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 22 g, pH 为 7.0。牛肉膏蛋白胨培养基(1 000 mL):牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10.0 g、NaCl 5.0 g, pH 7.0 ~ 7.2, BPY 液体培养基。

1.1.4 主要试剂和仪器

DNAMarker 和 PCR 扩增试剂盒 (TaKaRa 公司), PCR 产物纯化试剂盒(上海生工), 细菌通用引物(长春联星生物技术有限公司合成), UV-1700 型紫外/可见分光光度计 (SHIMADZU), GAPS-9700 型 PCR 仪 (AB Applied Biosystems),

HPG-320H 型人工气候箱(哈尔滨东联电子科技有限公司), DYCP-31DN 水平电泳仪(北京市六一仪器厂), GIS-2010 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司)。

1.2 菌株的分离筛选

采用平板稀释法,称取 10 g 土样,加无菌水振荡 1 min,取 1 mL 上清液,加入 9 mL 0.05% SDS 液,40℃保温 20 min,取 1 mL,加入 9 mL 无菌水,按梯度依次稀释至 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} ,各取 100 μ L 稀释液在牛肉膏蛋白胨平板上涂布,3 次平行,34℃培养 48d,选取长出的单菌落细菌菌株纯化保藏,用于抑菌圈实验。

1.3 菌株发酵液的制备

将 12 株拮抗菌制备牛肉膏蛋白胨种子液后,以 5%接种量接种到液体 BPY 培养基中,用容量 200 mL 三角瓶每瓶装 BPY 培养液 50 mL,34℃、185 r/min 下振荡培养 24 h,收集发酵液。发酵液 12 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 0.22 μ m 细菌过滤器过滤,保存过滤液供拮抗活性检测和抑菌谱测定。

1.4 拮抗活性测定

将分离出的菌株用直径为 8 mm 的打孔器在活化后的西洋参病原菌培养基上打孔,挑取菌苔放于无菌的 PDA 平板中央,然后把灭菌的直径为 1 cm 的 4 片滤纸圆片对称地粘于平板中,其中 3 片每片滤纸圆片上点接 20 μ L 供试菌悬液(浓度约为 108cfu/mL),1 片滤纸圆片点接 20 μ L 无菌水,每个处理重复 3 次,然后置于 34℃ 的培养箱中培养 24 h,观察是否有抑菌圈出现。

1.5 抑菌谱测定

分别将待测西洋参病原真菌接种于 PDA 固体培养基中央,28℃下培养 24 h 后在新长成的菌丝周围打孔($\Phi=8$ mm),将待测活性物质注入孔内,每孔 100 μ L,用灭菌水作空白对照,28℃培养 24 ~ 48 h,观察抑菌状况及抑菌圈大小,重复 3 次。

1.6 形态学鉴定

革兰氏染色确定菌体形态,在 10 倍目镜 100 倍油镜下观察进行形态学鉴定。

1.7 生理生化实验

通过还原硝酸盐实验、耐盐性培养(2%、5%、7%、10%)实验、运动性实验、淀粉水解实验、明胶水解实验、硝酸盐还原实验、柠檬酸钠盐利用实验、乙酰甲基甲醇实验(V-P 反应)、厌氧生长实验、酪氨酸、酪蛋白水解实验、接触酶实验、碳水化

合物利用实验 (D- 葡萄糖、L- 阿拉伯糖、D- 木糖、D- 甘露醇) 研究其生理生化特性。

1.8 16S rRNA 基因序列分析

1.8.1 细菌基因组的提取

应用 TaKaRa MiniBEST Bacterial GenomicDNA Extraction Kit Ver.2.0 试剂盒 [宝生物工程(大连)有限公司], TaKaRa Code :DV810A 提取基因组。

1.8.2 PCR 引物

PCR 扩增所用通用引物为 16S1F :5'-A-GAGTTTGATCCT-GGCTCAG-3' 和 16S1R :5'-TACGGCTACCTGTTACG-ACTT-3'。

1.8.3 16S rDNA 基因

PCR 扩增体系 (50 μ L) : 基因组 DNA 2 μ L、dNTP (10 mmol/L) 2 μ L、10 \times Buffer 5 μ L、16S1F 2 μ L、16S1R 2 μ L、Taq 酶 (2.5U/ μ L) 2 μ L、双蒸水 35 μ L。PCR 扩增条件 :94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min ;

94 $^{\circ}$ C 1 min ,58 $^{\circ}$ C 30s ,70 $^{\circ}$ C 90s ,35 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.8.4 凝胶回收测序

采用 TIANGEN 凝胶回收试剂盒于生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.8.5 菌株序列分析、菌株系统发育分析和系统发育树构建

将扩增出目的片断的菌液进行序列测定,通过 BLAST 寻找与目的序列同源性最高的已知分类地位菌种的 16S rDNA 序列进行比较鉴定。从 GenBank 中查找到已经测序的同属菌的 16SrDNA 序列及 1 个外群菌株的 16S rDNA 序列共同用 ClustalX 进行比对分析,以该菌的 16SrRNA 序列为基础,利用 MEGA5.0 软件以 UPGMA 法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 菌株发酵液的室内拮抗活性及抑菌谱

表 1 拮抗菌株对不同病原菌的抑菌谱

拮抗菌株	根腐	立枯	灰霉	锈腐	黑斑	菌核	疫病
SJF-5	+++	+++	-	++	++	-	-
SJF-6	-	+++	-	-	-	++	-
SJF-8	-	+++	+	-	-	+	-
SJF-14	+++	+++	++	++	+++	-	-
SJF-20	-	-	-	++	-	+	+++
SJF-24	-	-	++	+	-	+	-
SJF-26	-	-	+	++	-	-	-

注：“+”、“++”、“+++”分别表示平均抑菌圈半径为小于 5 mm、5~10 mm、大于 10 mm。

通过对西洋参主要病害的对峙实验研究,从分离得到 101 株细菌中筛选出 7 株拮抗菌(表 1),通过计算抑菌率,发现体外抑菌实验中菌株 SJF-14 对根腐菌、立枯丝菌、灰霉菌、锈菌和黑斑菌都有抑制作用,菌株 SJF-5 对根腐病菌、立枯丝菌、锈菌、黑斑病菌有抑制作用,且抑制效果极显著,表现出较强的广谱性,菌株 SJF-6 和菌株 SJF-20 分别对立枯丝菌、菌核菌和灰霉菌、锈菌

有抑制作用,其中菌株 SJF-6 对立枯丝菌抑制效果极显著,菌株 SJF-20 对疫病菌抑制效果极显著,表现出较强的专一性;菌株 SJF-5、SJF-6、SJF-8、SJF-14 对立枯丝菌有抑制作用且抑制效果明显;菌株 SJF-6、SJF-8、SJF-20、SJF-24 对菌核菌有抑制作用,但抑菌效果不显著。

2.2 形态学和生理生化特性

2.2.1 形态学特性

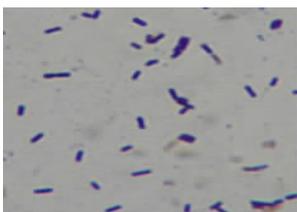


图 1 菌株 SJF-6 革兰氏形态



图 2 菌株 SJF-24 革兰氏形态

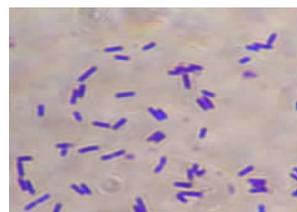


图 3 菌株 SJF-14 荚膜形态

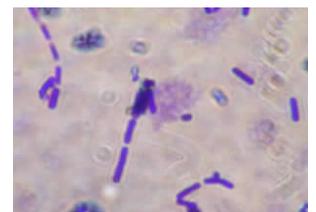


图 4 菌株 SJF-26 荚膜形态

2.2.2 生理生化特性

反应、糖醇发酵、柠檬酸钠盐的利用等生理生化特

依据《伯杰明细菌手册》对该菌进行了 V-P

性的测定(如表 2 所示)。

表 2 拮抗细菌的形态与生理生化指标

理化性质	拮抗菌株						
	SJF-5	SJF-6	SJF-8	SJF-14	SJF-20	SJF-24	SJF-26
细胞形状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	直杆状	杆状
细胞大小(μm)	0.5~0.6×2.0~2.5	0.7~0.8×3.0~3.1	0.6~0.7×3.2~4.1	0.3~0.4×3.4~3.5	0.3~0.4×3.0~3.1	0.5~0.6×1.2~1.3	0.6~0.7×3.1~3.2
运动性	+	+	+	-	-	+	+
革兰氏染色	+	+	+	+	+	+	-
厌氧生长	+	-	+	-	-	-	-
D- 葡萄糖	+	+	+	-	-	+	+
L- 阿拉伯糖	+	-	-	+	+	+	-
D- 木糖	+	+	+	-	+	+	-
脂肪酶	+	+	+	-	-	+	-
甘露醇	+	-	-	+	+	+	+
硝酸盐还原	+	+	+	+	+	-	-
利用 - 柠檬酸盐	-	+	-	-	-	+	+
淀粉水解	+	-	-	+	+	-	+
明胶水解	+	+	+	+	+	+	+
酪蛋白水解	+	+	+	+	+	+	-
酪氨酸水解	+	-	-	-	-	-	+
接触酶	+	+	+	+	+	+	+
V-P 测试	+	-	-	+	+	+	-
5%耐盐试验	+	-	±	-	+	+	-
10%耐盐试验	+	-	-	-	-	±	-

注 + 表示呈阳性反应；- 表示呈阴性反应。

2.3 16SrDNA 基因序列分析

测定 7 株拮抗细菌的 16SrDNA 序列，序列长度为 1320~1413 bp，将序列提交到 GenBank，获得登录号。菌株 SJF-5、SJF-6、SJF-8、SJF-14、SJF-20、SJF-24、SJF-26 的登录号依次为 KC511100、KC511101、KC511102、KC511103、KC511104、KC511105、KC511106，并将序列在 GenBank 中 BLAST 进行比对。

2.4 构建进化树

获得的 7 株拮抗细菌与相关 6 株细菌的 16SrDNA 序列进行遗传距离计算，并根据 MEGA5.1 软件得到系统发育树，见图 5。

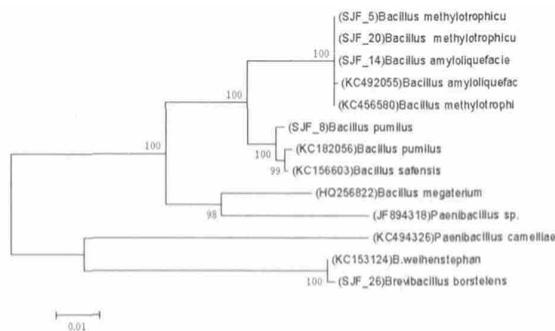


图 5 拮抗菌和相关菌株的系统发育树

3 讨论

本实验从西洋参拮抗细菌入手，在西洋参根际土壤中分离、纯化、筛选出对不同病原菌有显著

效果的拮抗细菌并进行了初步的鉴定。通过梯度稀释涂布法和平板对峙法对西洋参土壤中拮抗细菌进行分离、纯化和筛选，得到 7 株对不同病原菌有拮抗作用的拮抗细菌。菌株 SJF-5、SJF-14 对 4 种病原菌以上有显著拮抗效果，表现出较强的广谱性；菌株 SJF-6、SJF-20 对立枯丝菌和疫病菌有显著拮抗效果，表现出较强的单一性。

结合形态学鉴定、生理生化实验以及 16SrDNA 基因测序等手段对拮抗细菌进行了初步的鉴定。7 株拮抗细菌中有 5 株为 Bacillus 菌属，另外 2 株为 Brevibacillus 属。经鉴定 5 株 Bacillus 菌属中，菌株 SJF-5、SJF-20 为甲基营养型芽孢杆菌(Bacillus methylotrophicus strain)、菌株 SJF-8 为嗜气杆菌菌株(Bacillus aerophilus strain)、菌株 SJF-14 为解淀粉酶芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefacie)、菌株 SJF-24 为短小芽孢杆菌(Bacillus pumilus strain)。2 株 Brevibacillus 属中，菌株 SJF-6 和菌株 SJF-26 均为波茨坦芽孢杆菌(Brevibacillus borstelensis strain)。甲基营养型芽孢杆菌(B.methylotrophicus)和解淀粉酶芽孢杆菌(B. amyloliquefaciens)分别在蔬菜和旱地植物的研究中，被鉴定为具有明显拮抗作用^[9-10]；本研究筛选鉴定出的 7 株拮抗细菌对西洋参土传病害具有生防潜力的外生细菌菌株，这些拮抗细菌能否成功定殖，并在根际土壤维持菌群数量是其能否发挥生防作用的关键。由于所(下转第 75 页)

- [12] 陈建明, 余晓平, 程家安. 叶绿素荧光动力学及其在植物抗逆生理研究中的应用[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(1): 51-55.
- [13] Sarijeva G, Knapp M, Lichtenthaler H K. Differences in photosynthetic activity, chlorophyll and carotenoid levels, and in chlorophyll fluorescence parameters in green sun and shade leaves of Ginkgo and Fagus[J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(7): 950-955.
- [14] Klughammer C, Schreiber U. Complementary PSII quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method [J]. PAM Application Notes, 2008(1): 27-35. <http://walz.asia/downloads/pan/PAN078007.pdf>
- [15] 钱永强, 周晓星, 韩 蕾, 等. Cd²⁺ 胁迫对银芽柳 PSII 叶绿素荧光光响应曲线的影响 [J]. 生态学报, 2011, 31(20): 6134-6142.
- [16] 韩 炜, 徐新文, 李 利, 等. 白榆(*Ulmus pumila* L.) 光驯化后的快速光曲线变化特征 [J]. 干旱区研究, 2010, 27(5): 738-744.
- [17] Basu P. S, Sharma Ashoo, Sukumaran N. P. Changes in net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in potato leaves induced by water stress[J]. Photosynthetica, 1998, 35(1): 13-19.
- [18] Jefferies R. A. Effect of drought on chlorophyll fluorescence in potato. I. Plant water status and the kinetics of chlorophyll fluorescence[J]. Potato Research, 1992(35): 25-34.

(上接第 13 页)

- [2] 苏培玺, 杜明武, 张立新, 等. 日光温室草莓光合特性及对 CO₂ 加富的响应[J]. 园艺学报, 2002, 29(5): 423-426.
- [3] 林伟宏. 植物光合作用对大气 CO₂ 升高的反应 [J]. 生态学报, 1998, 18(5): 529-538.
- [4] Sun J D, Kelly M. Gibson, et al. Interactions of nitrate and CO₂ enrichment on growth, carbohydrates, and rubisco in Arabidopsis starch mutants. Significance of starch and hexose[J]. Plant Physiology, 2002(130): 1573-1583.
- [5] 惠俊爱, 李永华, 李 卓, 等. 高浓度 CO₂ 对紫星凤梨光合作用和生长发育的影响[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 1027-1032.
- [6] 惠俊爱, 叶庆生. 高浓度二氧化碳处理后凤梨光合作用的恢复[J]. 应用生态学报, 2007, 18(5): 1003-1008.
- [7] 王精明, 李永华, 黄胜琴, 等. CO₂ 加富对凤梨叶片生长和光合特性的影响 [J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(6): 511-514.
- [8] 张志良, 瞿伟菁. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 88-92, 169-170.
- [9] 徐昌杰, 陈文峻, 陈昆松, 等. 淀粉含量测定的一种简便方法—碘显色法[J]. 生物技术, 1998, 8(2): 41-43.
- [10] 叶庆生, 潘瑞焜, 丘才新. 墨兰光合途径的研究[J]. 植物学报, 1993, 35(6): 441-446.
- [11] 张其德, 卢从明, 冯丽洁, 等. CO₂ 加富对紫花苜蓿光合作用原初光能转换的影响[J]. 植物学报, 1996, 38(1): 77-82.
- [12] Hugo H R, Brett R G and Sagar V K. Plant response to atmospheric CO₂ enrichment with emphasis on roots and the rhizosphere[J]. Environmental Pollution, 1994(83): 155-189.

(上接第 65 页) 筛选出的菌株均来自土壤, 对于后续菌株的定殖研究提供了便利的条件, 且具有很好的研究开发前景。

参考文献:

- [1] 程惠珍, 陈 君, 丁万隆. 中药材生产中的植保问题及对策 [J]. 中药材, 2001, 24(1): 11-13.
- [2] 谢文艳. 药用植物病虫害防治存在问题及对策 [J]. 陕西农业科学, 2009(4): 108-109.
- [3] 梁建根, 施跃峰, 竺利红. 生物防治在植物病虫害防治中存在的问题及对策[J]. 现代农业科技, 2008(19): 173.
- [4] 龙汉广. 生物防治在植物病虫害防治中存在的问题及对策 [J]. 农业与技术, 2013, 33(2): 36.
- [5] 郝慧荣, 李振方, 熊 君, 等. 连作怀牛膝根际土壤微生物区系及酶活性的变化研究 [J]. 中国生态农业学报, 2008, 16(2): 307-311.
- [6] 齐艳春. 甜叶菊斑枯病生物防治拮抗菌株的筛选[J]. 中国农学通报, 2008, 24(11): 65-68.
- [7] 张鸿雁, 薛泉宏. 人参连作障碍防治研究进展[J]. 江西农业学报, 2010, 22(6): 68-71.
- [8] 邱德文. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 15-18.
- [9] 陈新春, 张喜喜, 汪钱龙, 等. 蔬菜根际细菌 R2-2 的鉴定及其抑菌活性 [J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2012, 38(2): 177-180.
- [10] 谢永丽, 马莉贞, 徐志伟, 等. 青海柴达木极端干旱沙地分离芽孢杆菌的分子鉴定及拮抗活性分析 [J]. 微生物学通报, 2012, 39(8): 1079-1086.