

# 蒙古黄芪内生细菌对果树病原菌的抑制作用初探

王芳芳<sup>1</sup>, 马光<sup>1</sup>, 梁平<sup>2</sup>, 崔文宁<sup>1</sup>, 翟硕莉<sup>1</sup>, 梁魁景<sup>1</sup>, 于占晶<sup>1</sup>, 李月英<sup>3,4\*</sup>

(1. 衡水学院生命科学系, 河北衡水 053000; 2. 衡水市园林中心, 河北衡水 053000; 3. 饶阳国家气候观察台, 河北衡水 053900; 4. 河北省湿地生态与保护重点实验室, 河北衡水 053000)

**摘要:**以中药蒙古黄芪为供试材料, 通过对蒙古黄芪根、茎、叶部位内生细菌的分离纯化, 利用平板对峙试验, 研究黄芪内生细菌对3种果树病原菌的抑制效果。结果表明: 从黄芪各组织中共分离出可培养内生细菌12株; 12株菌株对葡萄白腐病菌有抑菌作用, 已达到100%, 而对苹果枝干轮纹病菌和梨黑斑病菌的抑菌作用均为91.7%; 对峙培养筛选出4株(J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>和Y<sub>1</sub>)对苹果枝干轮纹病菌、梨黑斑病菌和葡萄白腐病菌抑制作用明显的细菌, 4菌株之间没有显著的差异性, 其中J<sub>1</sub>对3种病菌菌丝生长的拮抗作用最强, 分别为72.87%、59.75%和66.98%。

**关键词:** 蒙古黄芪; 内生细菌; 果树病原菌; 拮抗

中图分类号: S436

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)03-0044-04

## Antagonistic Screening of Endophytic Bacteria of *Astragalus membranaceus* against Fruit Pathogen

WANG Fangfang<sup>1</sup>, MA Guang<sup>1</sup>, LIANG Ping<sup>2</sup>, CUI Wenning<sup>1</sup>, ZHAI Shuoli<sup>1</sup>, LIANG Kuijing<sup>1</sup>, YU Zhanjing<sup>1</sup>, LI Yueying<sup>3,4\*</sup>

(1. Department of Life Science, Hengshui University, Hengshui 053000; 2. Hengshui City Garden Center, Hengshui 053000; 3. Raoyang National Climate Observatory, Hengshui 053900; 4. Hebei Key Laboratory of Wetland Ecology and Conservation, Hengshui 053000, China)

**Abstract:** The endophytic bacteria with antibacterial activity were screened with *Astragalus membranaceus* as test material. Through the separation and purification of endophytic bacteria in roots, stems and leaves, and to examine their suppressive effects on three kinds of pathogenic fungi commonly found in fruit trees by using a pairwise competition experiment. The results showed that, 12 strains were isolated from *Astragalus membranaceus*. The effective action on *C. diplodiella* of 12 strains was 100%, while the effect on *B. dothidea* and *A. alternata* was 91.7%. Four strains (J<sub>1</sub>, J<sub>2</sub>, G<sub>2</sub> and Y<sub>1</sub>) were screened from the antagonism test between endophytic bacteria and *B. dothidea*, *A. alternata*, *C. diplodiella*. The differences between the effects of the four bacterial strains were not significant. Among these, strain J<sub>1</sub> exhibited the strongest antagonistic effect on the mycelial growth of the three pathogens at 72.87%, 59.75% and 66.98%, respectively.

**Key words:** *Astragalus membranaceus*; Endophytic bacteria; Pathogen; Antagonistic

我国是世界上第一水果生产大国, 其中苹果、梨和葡萄作为主要水果品种, 分别约占水果总产量的17.3%、6.8%和6.3%。但果树病害是影响我

国水果产业可持续健康发展的限制性因素, 给果农造成严重损失。苹果枝干轮纹病、梨黑斑病、葡萄白腐病是当前发生最为普遍, 危害最为严重的病害种类。其中苹果轮纹病不仅危害田间枝、叶、果实, 还会危害贮藏期果实, 致使该病成为苹果生产中严重病害之一; 梨黑斑病是一种世界性广泛发生的病害, 造成树体衰弱, 缩短结果年限, 降低梨品质和产量<sup>[1]</sup>; 葡萄白腐病为生长后期经常发生的病害, 严重影响葡萄的产量和质量<sup>[2]</sup>。植物内生菌是指定殖在植物细胞内且与寄主植物共同生存的一类微生物, 研究发现, 许多内生菌

收稿日期: 2020-06-17

基金项目: 衡水市科技计划项目(2022014029Z); 河北省现代农业产业技术体系梨产业创新团队建设衡水综合试验推广站项目(HBCT2021210402); 河北省高等学校科学技术研究项目(ZC2023143)

作者简介: 王芳芳(1980-), 女, 讲师, 硕士, 主要从事园林植物的教学与科研工作。

通讯作者: 李月英, 女, 高级工程师, E-mail: 2320023041@qq.com

能帮助植物抵抗病虫害,提高植物的抗逆性,是具有较大潜力的微生物新资源<sup>[3-4]</sup>。如孔阳等<sup>[5]</sup>研究一株烟曲霉属白花夹竹桃内生真菌,对白菜黑斑病菌、苹果腐烂病菌和葡萄炭疽病菌的抑制率分别为91.8%、89.1%和90.6%;路杨等<sup>[6]</sup>研究了植物内生白僵菌对多种害虫、病原菌具有双重生防活性和促进作物生长的作用;龙良鲲等<sup>[7]</sup>试验表明,番茄菌株能拮抗青枯病菌;王万能等<sup>[8]</sup>从烟草的根部分离得到防治烟草黑胫病的内生细菌;王夏等<sup>[9]</sup>研究内生菌对苗期和生长期的西瓜都有明显促生作用,微生物菌剂与化学肥料配施,可提高西瓜对枯萎病的抵抗力;邓进超等<sup>[10]</sup>筛选得到的ATB4菌株经鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*),对人参锈腐病菌(*Cylindrocarpon destructans*)有较强的抑制效果。本课题组发现了姜研磨液和蒜内可培养内生细菌对苹果腐烂病菌菌丝的生长抑制效果,但并未对姜和蒜内不可培养内生细菌及其他种类的内生菌对苹果腐烂病的抑菌效果进行试验<sup>[11]</sup>;通过PCR检测发现4个拮抗菌株Md1-14、Md3-14、Md2-17和Md2-35均能扩增获得特异性基因片段,表明4株内生细菌均具有合成某些抑菌活性物质的潜力<sup>[12]</sup>。植物内生菌次生代谢产物应用安全,无任何药害并且能促进番茄生长和增强其抗逆性<sup>[13]</sup>。

蒙古黄芪适应性强,分布广。作为中医药材,其体内的内生菌或分泌物与它具有协同作用,具有抑制病菌生长的化学物质<sup>[14]</sup>。本试验以黄芪为试材,从其根、茎和叶组织内分离纯化可培养内生细菌,研究可培养内生细菌对苹果枝干轮纹病菌、梨黑斑病病菌、葡萄白腐病病菌是否具有拮抗作用,蒙古黄芪内生细菌防治果树上3种病害未见报道,因此,内生细菌作为植物病害防治的天然资源菌,具有广阔的应用与发展前景。分离得到12株细菌,筛选出对果树病原菌具有强拮抗活性的菌株,为果树病害的生物防治提供指导作用。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus*)由邢台市南和县农业嘉年华提供;苹果枝干轮纹病病菌(*Botryosphaeria dothidea*)、梨黑斑病病菌(*Alternaria alternata*)、葡萄白腐病病菌(*Coniothyrium diplodiella*)均由衡水学院生命科学系园林植物实验室和微生物实验室提供。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分离、纯化内生细菌

将蒙古黄芪的根部、茎部、叶片流水冲洗5 min,除去植物表面附着的营养土,室内晾干。分别将根部、茎部、叶片组织剪成2 mm的小段,用75%的酒精浸泡30 s,再用0.1%升汞浸泡2 min,无菌水清洗5次。然后用无菌滤纸将各部分材料水分吸干,随后分别称取0.1 g,放入研钵中加1 mL无菌水充分研磨,静置待用。分别吸取100 μL上清液,涂匀于NA平板上,每组织重复3次,28 °C培养3~4 d。待菌落长出后,观察记录菌落形状、大小、颜色及边缘平滑程度,采用平板划线法挑取单菌落划线纯化,4 °C保存。

#### 1.2.2 检测可培养内生细菌对3种病原菌菌丝生长的抑制效果

平板对峙法。将内生细菌纯化培养,用直径为1 cm的打孔器在复壮后的3种病原菌培养基上打孔,挑取菌饼倒扣于新PDA平板中心位置,用接种针挑取内生菌株,在菌饼左右1.5 cm处各划一条直线,每株内生细菌重复3次。对照为无菌水。PDA平板置于28 °C培养箱培养4~6 d,观察记录其抑菌效果。

抑菌率(%)=[(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径]×100

### 1.3 数据分析

采用Excel 2016对数据进行处理,采用SPSS 16.0进行误差分析( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄芪组织可培养内生菌的分离

从黄芪根、茎和叶中分离得到12株菌株(表1)。其中黄芪根、茎均分离到3株,叶分离到6株。叶分离率达50%,叶器官分离比率比根、茎高可能与其药用功能与营养成分有关。

表1 黄芪组织可培养内生菌的分离结果

分离部位	内生菌编号	数量(株)	分离比率(%)
根	G <sub>1</sub> 、G <sub>2</sub> 、G <sub>3</sub>	3	25
茎	J <sub>1</sub> 、J <sub>2</sub> 、J <sub>3</sub>	3	25
叶	Y <sub>1</sub> 、Y <sub>2</sub> 、Y <sub>3</sub> 、Y <sub>4</sub> 、Y <sub>5</sub> 、Y <sub>6</sub>	6	50
合计		12	100

### 2.2 黄芪组织内拮抗菌株的筛选

#### 2.2.1 内生菌株对苹果枝干轮纹病菌丝生长的抑制作用

各细菌的抑菌效果见图1、表2。苹果枝干轮



图1 J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>、Y<sub>1</sub>对苹果枝干轮纹病菌丝生长的抑制效果

表2 内生菌株对苹果枝干轮纹病菌的菌丝生长抑制效果

分离部位	内生菌编号	菌落直径 (mm)	抑菌率±标准差 (%)
根	G <sub>1</sub>	60.49	31.70±3.08d
	G <sub>2</sub>	28.15	68.22±2.01a
	G <sub>3</sub>	57.07	35.57±4.55cd
茎	J <sub>1</sub>	24.03	72.87±2.69a
	J <sub>2</sub>	26.92	69.61±0.85a
	J <sub>3</sub>	88.81	-0.27±0.95e
叶	Y <sub>1</sub>	26.31	70.29±1.58a
	Y <sub>2</sub>	49.44	44.18±6.58bcd
	Y <sub>3</sub>	49.25	44.39±4.60bcd
	Y <sub>4</sub>	46.81	47.15±7.34bc
	Y <sub>5</sub>	44.03	50.29±6.32b
	Y <sub>6</sub>	45.82	44.50±8.51bcd
对照(CK)		88.57	-

注:表中不同字母表示不同处理间差异显著(P<0.05),下同  
纹病菌菌丝的生长直径越小,抑菌率越高,说明细菌对其抑制效果越好。

由表2可知,除J<sub>3</sub>菌株外,其余11株菌株都对苹果枝干轮纹病菌丝有抑制效果,筛选有效率达到91.7%。其中J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>和Y<sub>1</sub>对苹果枝干轮纹病菌具有稳定的拮抗作用,抑制效果与对照具有

显著差异,该4株菌株间抑制效果没有显著差异,但与其他菌株抑菌效果有显著差异。其中J<sub>1</sub>菌株拮抗活性最强,菌落平均直径为24.03 mm,抑菌率为(72.87±2.69)%,抑菌效果最好。

2.2.2 内生菌株对梨黑斑病菌丝生长的抑制作用  
梨黑斑病菌丝的生长直径越小,抑菌率越高,说明细菌对其抑制效果越好,各细菌的抑菌效果见表3、图2。

表3 内生菌株对梨黑斑病菌菌丝生长的抑制效果

分离部位	内生菌编号	菌落直径 (mm)	抑菌率±标准差 (%)
根	G <sub>1</sub>	51.44	28.57±2.26bc
	G <sub>2</sub>	31.09	56.88±3.24a
	G <sub>3</sub>	46.26	35.76±2.82b
茎	J <sub>1</sub>	28.98	59.75±1.51a
	J <sub>2</sub>	30.74	57.31±1.64a
	J <sub>3</sub>	52.66	26.87±4.47c
	Y <sub>1</sub>	34.04	52.73±1.35a
	Y <sub>2</sub>	51.15	28.96±0.87bc
	Y <sub>3</sub>	58.17	19.22±1.53d
叶	Y <sub>4</sub>	58.56	18.68±4.55d
	Y <sub>5</sub>	74.79	-3.87±0.35e
	Y <sub>6</sub>	69.06	4.10±2.54e
对照(CK)		72.01	-



图2 J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>、Y<sub>1</sub>对梨黑斑病菌丝生长的抑制效果

由表3可知,除Y<sub>5</sub>菌株外,其余11株菌株都对梨黑斑病菌丝有抑制效果,筛选有效率达到91.7%。J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>和Y<sub>1</sub>对梨黑斑病菌具有稳定的拮抗作用,抑制效果与对照具有显著差异,4株菌株间抑制效果没有显著差异,但与其他菌株抑菌效果有显著差异。其中J<sub>1</sub>菌株拮抗活性最强,菌落平均直径为28.98 mm,抑菌率为(59.75±1.51)%,抑菌效果最好。

2.2.3 内生可培养内生细菌对葡萄白腐病菌丝生长的抑制作用

葡萄白腐病菌菌丝的生长直径越小,抑菌率越高,说明细菌对其的抑制效果越好,各细菌的抑菌效果见图3、表4。

由表4可知,12株菌株均对葡萄白腐病菌丝有抑制效果,筛选有效率达到100%。J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>、Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>对葡萄白腐病菌具有稳定的拮抗作用,抑制效

图3 J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>、Y<sub>1</sub>、Y<sub>2</sub>对葡萄白腐病菌丝生长的抑制效果

表4 内生菌株对葡萄白腐病菌的菌丝生长的抑制效果

分离部位	内生菌编号	菌落直径 (mm)	抑菌率±标准差 (%)
根	G <sub>1</sub>	75.08	13.45±6.00f
	G <sub>2</sub>	31.77	63.38±1.98a
	G <sub>3</sub>	81.23	6.36±1.99f
茎	J <sub>1</sub>	28.65	66.98±3.99a
	J <sub>2</sub>	30.94	64.33±0.21a
	J <sub>3</sub>	80.80	6.86±2.91f
叶	Y <sub>1</sub>	30.54	64.79±0.41a
	Y <sub>2</sub>	35.15	59.48±3.38ab
	Y <sub>3</sub>	54.75	36.88±6.12de
	Y <sub>4</sub>	50.75	41.50±0.85cd
	Y <sub>5</sub>	61.21	29.44±5.16e
	Y <sub>6</sub>	41.89	51.71±2.78bc
对照(CK)		86.75	-

果与对照具有显著差异,5株菌株间抑制效果没有显著差异,但与其他菌株抑菌效果有显著差异。其中J<sub>1</sub>菌株拮抗活性最强,菌落平均直径为28.65 mm,抑菌率为(66.98±3.99)%,抑菌效果最好。

### 3 结论与分析

黄芪根、茎、叶均能分离到可培养内生细菌,且绝大多数菌株对苹果枝干轮纹病菌丝、梨黑斑病菌丝、葡萄白腐病菌丝生长具有抑制效果,其中对葡萄白腐病菌有拮抗作用的菌株12株,筛选有效率达到100%,而对苹果枝干轮纹病菌和梨黑斑病菌有拮抗作用的菌株为11株,筛选有效率为91.7%。抑菌效果最好的菌株为J<sub>1</sub>、J<sub>2</sub>、G<sub>2</sub>和Y<sub>1</sub>,对3种病原菌的抑菌率分别最高达到72.87%、59.75%和66.98%,可见黄芪内生菌株是潜在的生防菌资源,后续试验将对4株菌株的抗菌谱做进一步验证,特别对J<sub>1</sub>的生理生化指标、鉴定以及抑菌机理等方面进行生物防治深入研究。

目前,黄芪广泛应用于临床配方的药理、病理方面,针对其内生菌的研究较少,近几年集中涉及内生菌菌种的分离、寄主次生代谢物质以及动

物病原细菌抑菌研究等方向<sup>[15]</sup>,并未将其内生细菌作为生防菌应用于果树病害的研究。而果树病害已成为我国水果产业健康发展的重要制约因子之一。药用植物体内生物活性成分很多,具有不同的药理作用,其内生菌自身活性成分对研究药用植物内生菌的抑菌作用具有较大开发价值,可能会成为未来筛选新型生防菌剂的重要资源之一。

### 参考文献:

- [1] 杨晓平,胡红菊,王友平,等.梨黑斑病菌的生物学特性及其致病性观察[J].华中农业大学学报,2009,28(6):680-684.
- [2] 董阳辉,徐佩娟,王艺平,等.葡萄白腐病的发生规律及防治措施[J].江西农业学报,2011(2):107-110,114.
- [3] 卢占慧.人参内生菌群多样性及拮抗菌株的抑菌作用研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2016.
- [4] 任慧爽,徐伟芳,王爱印,等.桑树内生细菌多样性及内生拮抗活性菌群的研究[J].西南大学学报(自然科学版),2017,39(1):36-45.
- [5] 孔阳,马养民,王佳运,等.一株烟曲霉抗植物病原菌活性次生代谢产物的研究[J].东北农业科学,2019,44(2):34-38.
- [6] 路杨,徐文静,隋丽,等.球孢白僵菌植物内生性及其应用研究进展[J].东北农业科学,2016,41(1):73-75.
- [7] 龙良鲲,肖崇刚,窦彦霞.防治番茄青枯病内生细菌的分离与筛选[J].中国蔬菜,2003(2):21-23.
- [8] 王万能,肖崇刚.烟草内生细菌118防治黑胫病的机理研究[J].西南农业大学学报,2003,25(1):28-31.
- [9] 王夏,刘金平,孙菲菲.内生菌肥料对设施西瓜生长的影响[J].北方园艺,2019(4):80-84.
- [10] 邓进超,关一鸣,吴连举,等.人参锈腐病菌拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J].东北农业科学,2017,42(3):31-38.
- [11] 侯晓杰.姜蒜汁液及其可培养内生菌对苹果腐烂病的拮抗筛选研究[J].北方园艺,2014(10):116-119.
- [12] 杨瑞先,刘萍,彭彪彪,等.药用牡丹根部内生细菌的抑菌活性研究[J].北方园艺,2018(23):44-52.
- [13] 王娜,牛世伟,刘国丽,等.植物内生菌次生代谢产物对设施番茄生长的影响[J].北方园艺,2016(18):36-38.
- [14] 姜怡,杨颖,陈华江,等.植物内生菌资源[J].微生物学通报,2005,32(6):146-147.
- [15] 张开雪,刘振鹏,闫崇,等.黄芪次生代谢研究进展[J].世界科学技术(中医药现代化),2016(5):875-882.

(责任编辑:刘洪霞)