王莉,王雅竹,张如,等.黄芩根腐病生防菌的筛选鉴定及生防作用测定[J].山西农业大学学报(自然科学版),2024,44(5):68-77.
Wang L, Wang Y Z, Zhang R, et al.Selection, identification, and biocontrol efficacy assessment of biocontrol bacteria against *Scutellaria baicalensis* root rot disease[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2024,44(5):68-77.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202402037

黄芩根腐病生防菌的筛选鉴定及生防作用测定

王莉[1],王雅竹[1],张如[2],王娟娟[3],韩立荣[4*]

(1.咸阳职业技术学院 仪祉农林学院,陕西 西安 712000;2.陕西省天然林保护工程管理中心(陕西省林业基金管理中心),陕西 西安 710082;3.陕西省林业调查规划院,陕西 西安 710082;4.西北农林科技大学 林学院,陕西 杨凌 712100)

摘　要:[目的]茄病镰孢菌(*Fusarium solani*)是引起黄芩根腐病的主要病原菌之一,该病害已成为制约陕西地区黄芩生产的瓶颈问题,限制了黄芩种植产业的进一步发展。本研究旨在从土壤中分离筛选具有优良拮抗活性的生防菌以期为黄芩根腐病的防治提供新思路、新方法。[方法]利用平板对峙法筛选具拮抗活性生防菌株,进一步结合生长速率法、盆栽药效试验和田间药效试验测定该菌株对黄芩根腐病的生防效果,此外还通过形态学和分子生物学方法对其进行鉴定。[结果]从陕西省商洛市健康黄芩根际土壤中分离筛选获得2株茄病镰孢菌高效拮抗菌HQ-53和HQ-75,初步将2株菌鉴定为灰橙链霉菌(*Streptomyces griseoaurantiacus*)和巴西链霉菌(*Streptomyces brasiliensis*),活性测定结果表明,其无菌发酵液对茄病镰孢菌菌丝生长抑制率分别为65.3%和77.5%,对孢子萌发抑制率分别为43.5%和55.4%。扫描电镜观察发现HQ-53和HQ-75菌株发酵液处理后茄病镰孢菌菌丝均出现不同程度的肿胀和生长畸形。进一步的盆栽和田间药效试验表明,株菌HQ-53和HQ-75均能显著降低根腐病的发生,3次药后田间防效分别达到了67.3%和56.2%。[结论]本研究分离获得的2株链霉菌HQ-53和HQ-75对黄芩根腐病有优良拮抗活性,具有开发成生防菌剂的应用潜力,也为其他茄病镰孢菌引起的根腐病的防控提供了新型微生物资源。

关键词:黄芩; 根腐病; 拮抗菌; 生物防治
中图分类号:S763.1　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2024)05-0068-10

黄芩(*Scutellaria baicalensis*)为唇形科(Labiatae)黄芩属(Scutellaria)多年生草本植物,是我国常用大宗药材之一,传统中医主要以其根部入药,具有清凉、消炎和健胃等功效[1-2]。随着人们生活水平和医疗保健意识逐步提高,传统中医人体保健理论逐渐被人们重视,近年来中药材黄芩的需求量不断上升,人工栽培黄芩的面积逐年扩大。据报道,2006年我国黄芩种植面积为6万亩[3],2019年国家中医药管理局组织开展的第四次全国中药资源普查数据显示,全国黄芩种植总面积超过了50万亩,种植热度多年未减。陕西商洛位于秦岭南麓,独特的山地气候和土壤条件使其有"天然药库"之称,近年来陕西省政府大力扶持特色中药材产业发展,商洛市中药材产业得到了长足的发展,据统计,截至2022年底,全市中药材总面积达250.39万亩,总产量82.89万吨,药材产值61.84亿元,产量和面积均居全省之首。但由于目前黄芩规模化、集约化种植经验不足以及连作年限的延长,其根腐病连年发生危害严重且难以防治,对黄芩的产量和品质均有重大影响[4]。

目前黄芩根腐病已成为陕西地区黄芩生产上连作障碍的瓶颈问题,已有学者对商洛地区黄芩根腐病病原物进行了分离鉴定,证明其优势病原菌为茄病镰孢菌(*Fusarium solani*)[5]。目前陕西地区黄芩根腐病的防治主要以化学药剂为主,该方法速效性强,但过度施用化学农药会造成生态环境污染并影响中药材的药用品质[6],而选择环境友好的生物农药进行替代和补充是促进商洛地区黄

收稿日期:2024-02-29　　**修回日期**:2024-04-12
基金项目:陕西省林业科技推广重大项目(H2022-10);咸阳职业技术学院博士启动基金项目(2022BK03)
作者简介:王莉(ORCID: 0009-0005-0906-9199),高级工程师,博士,研究方向:植物病害防治,E-mail: 271650850@qq.com
*通信作者:韩立荣(ORCID: 0000-0002-0364-4712),教授,博士生导师, E-mail: hanlr@nwafu.edu.cn

芩产业绿色可持续发展的有效方法之一[7],从而活性微生物的筛选成为生物防控黄芩根腐病的研究热点。近年来国内外针对中药材根腐病的生物防治技术开展了大量研究,目前研究较多且应用较广泛的主要有木霉菌 *Trichoderma*[8]、芽孢杆菌 *Bacillus*[9]和链霉菌 *Streptomyces*[10]等相关微生物活体及其代谢产物。

本研究拟从陕西省商洛地区健康黄芩根际土壤中分离获得具有生防潜力菌株,以商洛地区黄芩根腐病优势病原菌茄病镰孢菌为测试对象,综合评价生防菌株对黄芩根腐病的生防效果,以期为商洛地区黄芩根腐病的生物防治提供依据,并为开发具有应用价值的生防菌剂提供理论指导。

1　材料与方法

1.1　供试材料

土壤样本于2023年7月24日采集自陕西省商洛市商州区柳树渠村(33° 45′36″N, 110° 10′33.67″E),共采集8个样点,合并为2份样品。

黄芩根腐病病原茄病镰孢菌(*Fusarium solani*)由本课题组从商洛市商州区李家河滩村黄芩根腐病高发田块分离并保存。

1.2　培养基配方

马铃薯葡萄糖培养基(Potato Dextrose Agar, PDA):马铃薯 200 g·L^{-1}、葡萄糖 20 g·L^{-1},琼脂 15～20 g·L^{-1},液体培养基不添加琼脂;

高氏一号培养基(Gauze′s Synthetic Medium No. 1):可溶性淀粉 20 g·L^{-1}, KNO_3 1 g·L^{-1}, K_2HPO_4 0.5 g·L^{-1}, $MgSO_4·7H_2O$ 0.5 g·L^{-1}, NaCl 0.5 g·L^{-1}, $FeSO_4·7H_2O$ 0.01 g·L^{-1},琼脂15～20 g·L^{-1},pH为7.4～7.6,液体培养基不添加琼脂;

燕麦琼脂培养基ISP3 (International *Streptomyces* Project 3):燕麦粉 20 g·L^{-1}, NaCl 1 g·L^{-1}, pH为7.0～7.5;

铬天青检测培养基(Chrome azurol S Assay Medium):铬天青S(CAS)0.06 g·L^{-1},十六烷基三甲基溴化铵 0.072 g·L^{-1}, $FeCl_3·6H_2O$ 0.002 g·L^{-1}, $NaH_2PO_4·2H_2O$ 0.295 g·L^{-1}, $Na_2HPO_4·12H_2O$ 1.213 g·L^{-1}, NH_4Cl 0.125 g·L^{-1}, KH_2PO_4 0.037 5 g·L^{-1}, NaCl 0.062 5 g·L^{-1},琼脂9 g·L^{-1};

阿须贝氏无氮培养基(Ashby Nitrogen-free Agar):KH_2PO_4 0.2 g·L^{-1}, $CaCO_3$ 5.0 g·L^{-1}, $MgSO_4·7H_2O$ 0.2 g·L^{-1}, NaCl 0.2 g·L^{-1}, $CaSO_4·2H_2O$ 0.1 g·L^{-1},甘露醇 10 g·L^{-1},琼脂17～20 g·L^{-1}。

1.3　生防菌株的分离纯化及活性筛选

1.3.1　待测菌株分离、纯化与保存

采用梯度稀释涂布法对采集土样的放线菌进行分离纯化[11]。称取5 g土壤样本,使用45 mL无菌水悬浮后置于30 ℃、180 r·min^{-1}恒温振荡培养箱中处理15 min。样本置于室温待土壤沉淀后,吸取5 mL上清液移至加有45 mL无菌水的锥形瓶中,配制成体积比1∶10的土壤悬浮液,分别将其稀释成10^{-6}～10^{-1}梯度稀释液。取各梯度稀释的悬浊液涂布至含终浓度为50 μg·mL^{-1}重铬酸钾的高氏一号培养基[12],置于28 ℃恒温培养箱中倒置培养。待菌落形成后,挑取单菌落至高氏一号平板上划线培养,将纯化后的单菌落接种于2 mL高氏一号斜面培养基中4 ℃保存备用。

1.3.2　待测菌拮抗活性筛选

采用平板对峙法[11]对供试菌株进行筛选,用灭菌的打孔器将活化培养好的黄芩根腐病病原菌制备成直径0.7 cm的菌饼,将其接种在直径9 cm的PDA平板中心,然后在距中心3 cm的对称四点处接种不同拮抗菌株,每个处理3次重复。将平板转移至28 ℃恒温培养箱内,3～5 d后观察各平板生长情况,并初步筛选出对黄芩根腐病原菌具有拮抗作用的生防菌株。

1.3.3　生防菌发酵液抑菌能力测定

(1)采用生长速率法[13]测定供试生防菌株发酵液对黄芩根腐病菌的抑制率。将初筛获得的拮抗菌接种于高氏一号培养基平板,4～6 d后使用0.7 cm打孔器打制菌饼,接种至装有100 mL高氏一号液体培养基的三角瓶中,每瓶接种5～7个菌饼。继续置于180 r·min^{-1} 28 ℃恒温摇床摇培5 d,发酵液经13 000 g离心5 min后,取上清液用细菌过滤器(0.22 μm)过滤得到无菌发酵液。将无菌发酵液与PDA培养基按体积比1∶9均匀混合,分别以终浓度为100 μg·mL^{-1}的多菌灵和等体积无菌水为对照。平板中央接种黄芩根腐病菌后将其置于28 ℃恒温培养箱内继续培养3～5 d。通过十字交叉法测量各处理组病原菌菌落直径,并计算抑制率。

切取黄芩根腐病菌边缘菌落,经3%(v/v)戊二醛磷酸缓冲液(100 mmol·L^{-1}, pH为6.8)中固定20 h、系列乙醇脱水、乙酸异戊酯置换、临界点CO_2干燥及喷涂处理后在扫描电子显微镜(S-4800,

日本株式会社日立制作所)下观察菌体显微形态[14]。

(2)参考王珺等[15]方法测定生防菌株发酵液对黄芩根腐病菌孢子萌发的抑制作用。取供试病原菌的孢子配成适当浓度的孢子悬浮液(10×10低倍镜下,每视野含30~40个孢子为宜)。将发酵液与孢子悬浮液等体积混合,以等量无菌水为对照处理,各取一滴滴加在无菌单凹载玻片上,并使液滴倒悬在保湿盒内,每处理重复3次。在25 ℃下培养10~16 h后检查对照孢子的萌发情况。当对照的萌发率达到85%以上,检查各处理孢子萌发率(以孢子芽管长度大于孢子短半径者为萌发标准),试验重复3次,按下式计算抑制孢子萌发率[16]。

$$\text{萌发抑制率}=\frac{\text{对照组萌发率}-\text{处理组萌发率}}{\text{对照组萌发率}}\times 100\%$$

1.4 供试生防菌防治黄芩根腐病药效试验

1.4.1 盆栽药效试验

参考郑豆豆等[17]方法测定供试生防菌对黄芩根腐病的防治作用。选取长势一致的健康2年生黄芩,将其移栽至装有300 g无菌土的花盆(直径16.5 cm,高23.0 cm)中生长。(1)治疗效果测定:采取伤根灌注法[18]接种黄芩根腐病菌孢子悬液,每盆接种20 mL,每组处理6盆,24 h后再向其中灌入含菌发酵液50 mL。(2)保护效果测定:将50 mL供试含菌发酵液灌入供试植株根际土壤,24 h后再接种黄芩根腐病菌孢子悬液。以等量40%多菌灵可湿性粉剂500倍液和无菌水为对照。处理14 d后观察记录各处理组植株发病情况并统计株高、根长及地上部鲜重。按病情指数法计算各处理组药效,以黄芩根部病斑所占面积的百分率来进行病害分级[19],具体划分标准为:0级,无病斑;1级:感病面积不高于整个根部面积的10%;3级:感病面积占整个根部面积的11~30%;5级:感病面积占整个根部面积的31~50%;7级:感病面积占整个根部面积的50%以上。

$$\text{病情指数}=\frac{\sum(\text{各级病株总数}\times\text{代表级值})}{\text{调查总株数}\times\text{最高病级代表值}}\times 100\%$$

$$\text{防效}=\frac{\text{对照病情指数}-\text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}}\times 100\%$$

1.4.2 田间药效试验

试验设在陕西省商洛市商州区李河滩村农户自留缓坡地,土质为沙壤土,肥力中等,试验地土壤、水肥条件一致,田间管理同大田生产基本一致,供试植株为三年生黄芩,试验期间黄芩根腐病轻度至中度发生。试验处理组分别为HQ-53和HQ-75的含菌发酵液,对照药剂为40%多菌灵可湿性粉剂500倍液,将供试生防菌发酵液稀释至孢子浓度为10^9 CFU·mL^{-1},施入黄芩根部,每株施加500 mL[20],以清水处理为空白对照组,每处理3次重复,小区面积25 m^2(5 m×5 m),按地势随机区组排列。

在施药前按1.4.1所述统计黄芩根腐病的病情指数,每隔7 d施一次药,共施药3次,采用五点取样法统计各小区第一次施药后7 d和末次施药后7 d黄芩植株情况,按1.4.1所述计算病情指数和防治效果。

1.5 生防菌株鉴定

1.5.1 菌株形态学鉴定

将纯化后的菌株划线于ISP3培养基,将其置于30 ℃恒温培养箱内继续培养1~2周,参考《伯杰细菌鉴定手册》[21],利用光学显微镜观察并记录菌丝形态特征。另取少量菌体按1.3.3所述处理后在扫描电子显微镜下观察菌体和孢子特征。

1.5.2 分子生物学鉴定

菌株经高氏一号培养基摇培2~3 d后,挑取生长旺盛菌丝,使用改良CTAB法提取DNA[22],通过扩增其16srRNA序列进行分子鉴定,引物分别为27F(AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)和1492R(CTACGGCTACCTTGTTACGA),PCR扩增体系为:Taq PCR Mix预混液(上海生工生物工程股份有限公司)12.5 μL,正反引物各1.0 μL,DNA模板1.0 μL,补充ddH_2O至25.0 μL。PCR扩增条件为:94 ℃预变性5 min,94 ℃变性30 s,56 ℃退火30 s,72 ℃延伸1 min,32个循环后72 ℃保温10 min[23],扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测合格后送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序。测序所得序列结果应用于EzBioCloud(https://www.ezbiocloud.net/)网站与所有已发表的典型菌株进行相似度分析,选择下载与鉴定生防菌序列相似性较高的条目,以*Nocardiopsis rhodophaea* YIM 90096^{T}为外群,通过MEGA 6.0软件使用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建目标菌株的16srRNA序列系统发育树[24],分析并确定其分类地位。

1.6　生防菌生物学特性测定

1.6.1　菌株生长曲线测定

取已活化后的生防菌悬液100 μL接种至含100 mL高氏一号液体培养基的锥形瓶中,将其置于180 r·min^{-1},28 ℃恒温震荡培养箱摇培,于接种后的0～120 h内每隔12 h吸取菌悬液,使用分光光度计测定其OD_{600}值[25],以不接种生防菌悬液的高氏一号培养基为空白对照,绘制菌株生长曲线。

1.6.2　菌株固氮能力测定

将待测菌株接种至阿须贝氏无氮培养基(Ashby)平板[26],将其置于28 ℃黑暗培养,若菌株能在该培养基上正常生长,则表明菌株具有固氮作用;

1.6.3　菌株产铁载体能力测定

挑取生长旺盛待测菌株的菌饼接种至铬天青检测培养基(CAS)蓝色检测平板,当有铁载体存在时,由于铁载体能够与Fe^{3+}形成更稳定的螯合物,伴随着铁离子从其结合紧的蓝色化合物转移到铁载体中而使其颜色从蓝色转变为橙色[27]。平板置于28 ℃黑暗培养,观察菌饼周围培养基颜色变化。

2　结果与分析

2.1　拮抗菌株筛选

本研究从商洛地区健康黄芩根际土壤中共分离得到的92株放线菌,进一步对其抗茄病镰孢菌的活性进行测定,共筛选得到9株对茄病镰孢菌具有拮抗活性的菌株(图1)。其中HQ-53和HQ-75 2株菌对黄芩根腐病病原菌具有良好拮抗效果,可观察到产生明显抑菌带,而菌株HQ-12、HQ-13、HQ-15、HQ-25、HQ-26、HQ-27和HQ-72这6株菌对茄病镰孢菌的抑制效果相对较差。

2.2　生防菌发酵液抑菌能力测定

选择经初筛后具有拮抗活性的9株放线菌,测定其发酵液对茄病镰孢菌菌丝生长和孢子萌发的抑制效果。与上述平板对峙结果一致,菌株HQ-53和HQ-75的原发酵液对茄病镰孢菌的菌丝生长抑制效果最好,抑制率分别为65.3%和77.5%,与对照药剂100 μg·mL^{-1}的多菌灵(70.3%)相当,两株菌的抑制效果均显著高于其余7株供试菌株(图2A);对茄病镰孢菌孢子萌发的抑制活性测定与上述结果类似,菌株HQ-53和HQ-75的原发酵液表现出较好的孢子萌发抑制活性,但相较于对

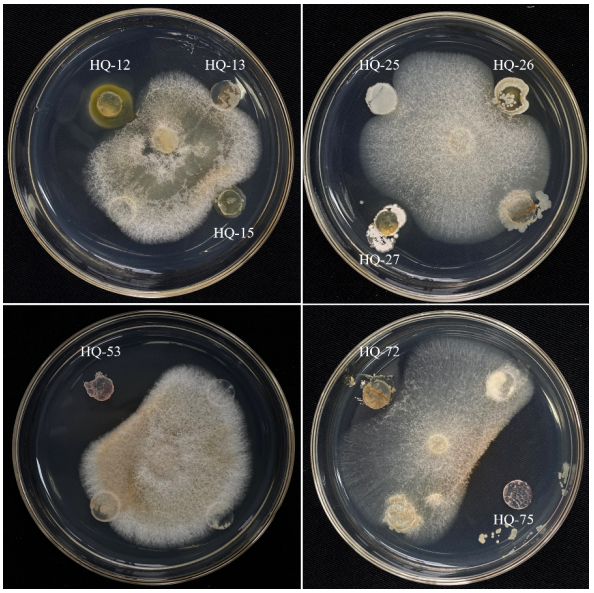


图1　自商洛地区健康黄芩根际土壤分离得到的9株防线菌对茄病镰孢菌的拮抗效果

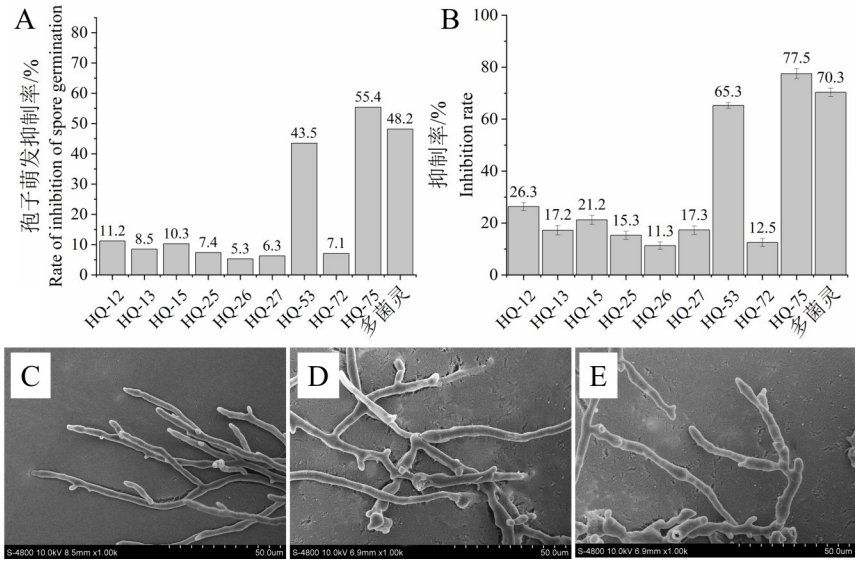
Fig.1　Antagonistic effects of nine antagonistic bacteria isolated from the rhizosphere soil of healthy *Scutellaria baicalensis* roots in the Shangluo region against *Fusarium solani* the pathogen causing tomato wilt

菌丝生长的抑制活性,2菌株原发酵液对孢子萌发抑制活性相对较弱,抑制率分别为43.5%和55.4%(图2B),HQ-75的孢子萌发抑制活性优于对照药剂100 μg·mL^{-1}的多菌灵(48.2%)。此外,菌株HQ-53和HQ-75的原发酵液处理后,黄芩根腐病病原菌茄病镰孢菌的菌丝形态有明显变化,对照处理菌丝光滑,分支正常(图2C),菌株HQ-53和HQ-75处理后其菌丝均表现肿胀变粗且分支异常,畸形生长(图2D-图2E)。

2.3　供试生防菌防治黄芩根腐病药效试验

2.3.1　盆栽药效试验

各处理组对黄芩根腐病的盆栽药效试验结果如表1所示,生防菌HQ-53和HQ-75原发酵液对黄芩根腐病均有较优良的保护效果,分别达到了77.3%和72.2%,优于对照药剂40%多菌灵可湿性粉剂500倍液(56.2%)。2菌株对黄芩根腐病的治疗效果则相对较差,分别为43.7%和32.7%,与对照药剂相当(41.2%)。此外,2生防菌发酵液处理对黄芩生长也有较大影响(表2),2株生防菌HQ-53和HQ-75原发酵液处理组对黄芩株高、根长和地上部鲜重均有不同程度的促进作用,相较于对照药剂40%多菌灵可湿性粉剂500倍液,2处理组植株的株高分别提高了27.3%和35.1%,根



A：供试生防菌对茄病镰孢菌丝生长抑制效果测定；B：供试生防菌对茄病镰孢菌孢子萌发抑制效果测定；C：茄病镰孢菌丝微观形态；D：菌株HQ－53发酵液处理后茄病镰孢菌丝微观形态；E：菌株HQ－75发酵液处理后茄病镰孢菌丝微观形态

A: Evaluation of the inhibitory effects of the tested biocontrol agents on the mycelial growth of *F. solani*; B: Assessment of the inhibitory effects of the tested biocontrol agents on the spore germination of *F. solani*; C: Microscopic morphology of *F. solani* mycelium; D: Microscopic morphology of *F. solani* mycelium after treatment with the fermentation broth of strain HQ－53; E: Microscopic morphology of *F. solani* mycelium after treatment with the fermentation broth of strain HQ－75

图2 供试生防菌发酵液抑菌能力测定

Fig.2 Assessment of the antimicrobial capabilities of the tested biocontrol agents

长提高33.5%和44.0%，地上部鲜重增加了20.1%和37.2%，值得注意的是HQ-75原发酵液虽对黄芩根腐病防效较HQ-53略低，但对黄芩植株促生作用更强。上述试验结果表明2株生防菌不仅对黄芩根腐病有较优良的防效，且对黄芩植株的生长和药材质量均有显著提高。

表1 不同药剂处理对黄芩根腐病的防效

Table 1 Efficacy of different treatments on the prevention of *S. baicalensis* root rot

处理组 Treatment	保护活性 Prevention effect		治疗活性 Therapeutic effect	
	病情指数 Disease index	防效/% Control effect	病情指数 Disease index	防效/% Control effect
清水对照	62.5±2.42a	—	68.2±3.52a	—
HQ－53	17.4±3.37c	72.2±2.11a	41.8±1.66b	38.7±1.65a
HQ－75	14.2±2.81c	77.3±2.52a	38.4±2.11c	43.7±2.23a
40%多菌灵可湿性粉剂500倍液	27.3±3.21b	56.2±1.97b	40.1±1.83c	41.2±1.47a

注：同列不同小写字母表示差异极显著($P<0.05$)

Note: Values followed by different lowercase letters in the same column indicated significant differences between different treatments at the 0.05 level

2.3.2 田间药效试验

各处理组防治黄芩根腐病田间药效结果如表3所示，在第一次药后7 d，对照药剂40%多菌灵可湿性粉剂500倍液防效最优，达到了54.8%，生防菌HQ-75与其效果相当(48.4%)。而生防菌HQ-53防效则相对较差，为31.2%。随着用药次数和时间的增加，末次施药后7 d，生防菌HQ-75的防效最优，为67.3%，显著优于对照药剂多菌灵可湿性粉剂500倍液的防效(60.1%)，在该时间点，生防菌HQ-53的防效与对照药剂相当，为56.2%。上述试验结论证明生防菌HQ-75和HQ-53在田间应用防治黄芩根腐病有较优良的防效，且其药效随使用时间和次数的增加而逐渐提高，此外在田间统计药效时也发现，生防菌HQ-75和HQ-53处理后的黄芩植株叶片更宽大，株高相对更高，植株整体长势有所提高，表明2株生防菌

兼具对植株生长的促进作用。

表2　不同药剂处理对黄芩植株生长影响

Table 2　Impact of different treatments on the growth of *Scutellaria baicalensis*.

处理组 Treatment	株高/cm Plant height	根长/cm Root length	单株地上部鲜质量/g Fresh weight of aboveground
清水对照	18.4±2.31b	16.2±2.16b	28.1±2.12b
HQ-53	31.2±2.83a	26.2±3.61a	38.2±3.42a
HQ-75	29.4±2.56a	24.3±2.34a	36.4±2.11a
40%多菌灵可湿性粉剂500倍液	23.1±3.21b	18.2±2.67b	30.2±3.41b

注:同列不同小写字母表示差异极显著($P<0.05$)

Note: Values followed by different lowercase letters in the same column indicated significant differences between different treatments at the 0.05 level

表3　不同药剂处理对黄芩根腐病的田间防效

Table 3　Field efficacy of different treatments against *Scutellaria baicalensis* root rot.

处理组 Treatment	施药前病情指数 Disease index before treatment	第一次施药后7 d 7 d after first treatment		末次施药后7 d 7 d after last treatment	
		病情指数 Disease index	防效/% Control effect	病情指数 Disease index	防效/% Control effect
清水对照	2.1±0.92a	31.4±2.11a	—	61.2±2.41a	
HQ-53	2.1±0.46a	21.6±2.76b	31.2±1.92b	26.8±2.22b	56.2±3.21b
HQ-75	1.9±0.43a	16.2±3.22c	48.4±2.44a	20.0±1.55c	67.3±3.73a
40%多菌灵可湿性粉剂500倍液	1.8±0.53a	14.2±2.36c	54.8±2.21a	24.4±1.92b	60.1±2.12b

注:同列不同小写字母表示差异极显著($P<0.05$)

Note: Values followed by different lowercase letters in the same column indicated significant differences between different treatments at the 0.05 level

2.4　生防菌株形态学鉴定

两菌株在ISP3培养基生长形态特征总结如表4所示,菌株HQ-53在高氏一号培养基中生长较快速,基生菌丝烟灰色,气生菌丝丰富,呈淡粉色,不产生可溶性色素(图3A),其孢子呈圆柱状,孢子丝直形略波曲,大小约为0.6 μm×0.5 μm(图3B);放线菌HQ-75在高氏一号培养基中生长快速,其基生菌丝白色,气生菌丝白色,产红棕色可溶性色素(图3C),其孢子为长椭圆形,孢子丝直形略波曲,大小约为1.2 μm×0.5 μm(图3D)。2株菌上述形态特征均符合链霉菌属典型菌株特征。

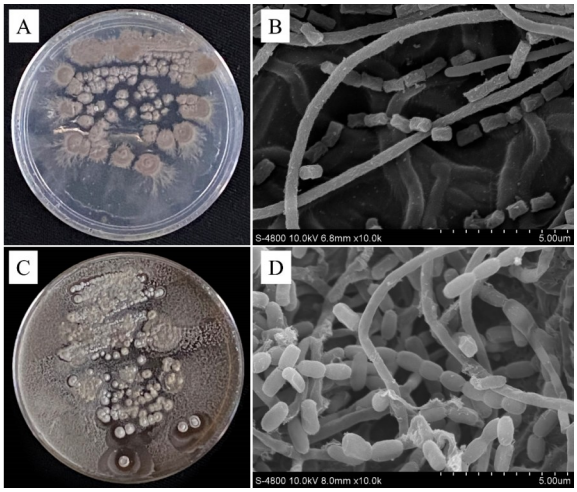
表4 供试菌株形态特征

Table 4　Morphological characteristics of the tested strains.

菌株编号 No. of isolate	培养特征 Colony characteristics			孢子特征 Spore characteristics		
	气生菌丝 Aerial hyphae	基内菌丝 Substrate hyphae	可溶性色素 Soluble pigment	孢子形态 Spore morphology	孢子丝形态 Spore filament morphology	孢子大小/μm Spore size
HQ-53	淡粉色	烟灰色	无	圆柱形	直形略波曲	0.6×0.5
HQ-75	白色	白色	红棕色	长椭圆形	直形略波曲	1.2×0.5

2.5　生防菌株分子生物学鉴定

通过对菌株HQ-53和HQ-75的16srRNA序列进行扩增和测序,分别得到长度为1484 bp和1465 bp的目标序列,已提交至NCBI数据库,登录号分别为PP124573和PP124574。2菌株序列经比对分析后采用邻位连接法(Neighbour-Joining)构建系统发育树(图4)。结果表明,菌株HQ-53与灰橙链霉菌属(*Streptomyces griseoaurantiacus* NBRC 15440^{T})聚在一个分支,菌株HQ-75与巴西链霉菌属(*Streptomyces brasiliensis* NBRC 101283^{T})聚在一个分支,两者Bootstrap value检验值均为100,支持了2菌株的分支地位,且其他相似度较高序列的



A：菌株HQ－53在ISP3培养基内培养5 d菌落形态；B：菌株HQ－53菌丝显微形态；C：菌株HQ－75在ISP3培养基内培养5 d菌落形态；D：菌株HQ－75菌丝显微形态

A：Colony morphology of strain HQ－53 cultured in ISP3 medium for 5 days；B：Microscopic morphology of the mycelium of strain HQ－53；C：Colony morphology of strain HQ－75 cultured in ISP3 medium for 5 days；D：Microscopic morphology of the mycelium of strain HQ－75

图3 供试菌株菌落形态及菌丝显微图

Fig.3 Colony morphology and microscopic images of mycelium for the tested strains

菌株也均为链霉菌属，与上述结论一致。

2.6 生防菌生物学特性测定

2.6.1 菌株生长曲线测定

分别将待测菌株HQ-53和HQ-75接种至高氏一号液体培养基中摇培，28 ℃ 180 r·min^{-1}震荡培养，每隔12 h取样1次，离心收集菌体后测定菌丝体干重，结果如图5A所示，2菌株生长曲线趋势一致，0～36 h为潜伏期，36～72 h为对数生长期，72 h后开始进入衰亡期。菌株HQ-53和HQ-75均在培养72 h时达到最大细胞干重，分别为6.57 g·L^{-1}和5.93 g·L^{-1}。

2.6.2 菌株促生能力测定

菌株HQ-53和HQ-75促生能力检测结果如图5B和5C所示，2菌株在CAS培养基上均不产生橘红色透明圈，证明2菌株均不产生铁载体。菌株HQ-75在阿须贝氏无氮培养基上生长良好，可见明显辐射状菌落，证明其具有较强的固氮效果，菌株HQ-53则较弱。结果表明两株黄芩根际链霉菌在促进植物生长方面具有较大的应用潜力。

3 讨论

陕西省商洛市是黄芩的传统种植地区，近年来当地政府多项政策的出台极大地推动了黄芩人工种植产业的发展[28]，但在生产上，由于商洛地区可耕种土地面积小，普遍存在的连作现象导致黄芩根腐病发生严重[4]。采用化学药剂防治黄芩根腐病是最有效的方式之一，朱广啟等[29]利用针对黄芩根腐病菌茄病镰刀菌(*Fusarum solani*)进行室内药剂毒力测定，结果表明嘧菌酯和咯菌腈对病原菌生长繁殖有较强的抑制效果，其抑制率分别为58.0%和63.2%。例如甲基硫菌灵、苯醚甲环

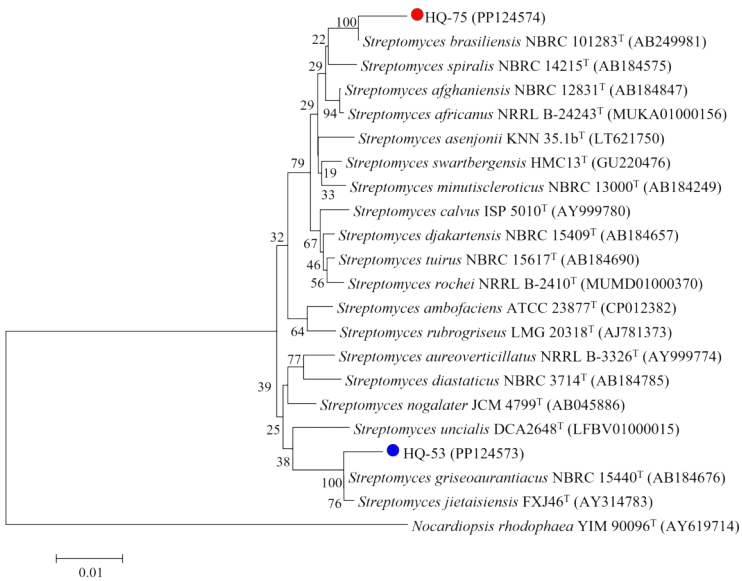
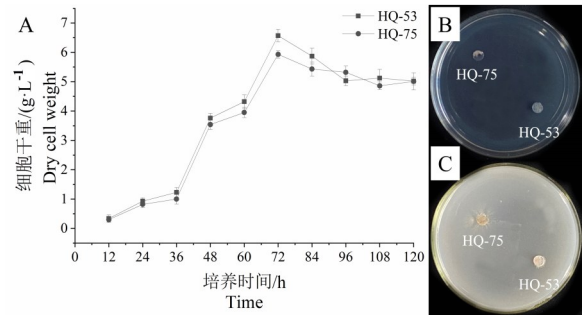


图4 菌株HQ-53和HQ-75与其他相似典型菌株构建的系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree constructed with strains HQ-53 and HQ-75 and other similar reference strains.



A：菌株HQ－53和HQ－75在高氏一号液体培养基中的生长曲线；B：菌株HQ－53和HQ－75在CAS培养基产铁载体测定；C：菌株HQ－53和HQ－75在阿须贝氏无氮培养基固氮效果测定

A: Growth curves of strains HQ－53 and HQ－75 in Gauze's Synthetic Medium No. 1; B: Determination of siderophore production by strains HQ－53 and HQ－75 on CAS medium; C: Nitrogen fixation assay of strains HQ－53 and HQ－75 on ashby medium

图5　菌株HQ-53和HQ-75生物学特性测定

Fig.5　Determination of the biological characteristics of strains HQ-53 and HQ-75

唑、甲基托布津以及多菌灵等复配制剂在田间黄芩根腐病的防治中也有广泛应用[30]。尽管化学防治方法见效快,长期不合理使用化学药剂易导致农药残留超标问题,严重影响黄芩的药用价值,此外还有病原菌抗性的产生以及环境压力增大等问题,化学药剂的使用往往受限较大,远不能达到预期效果,不利于中药材产业绿色可持续发展。

相比于传统化学农药防治方法,生物农药在中药材等高附加值作物中有极大的应用潜力,应用根际细菌和植物内生菌不但能拮抗病原菌,而且兼具促进植物生长的作用,例如李堆淑[31]使用细黄链霉菌(*Streptmyces microflavus*)发酵液处理黄芩,可增强黄芩叶片中多种抗病相关酶的活力,增强黄芩对根腐病的抗病性。类似地,贺超等[32]在黄芩根部接种丛植菌根类真菌摩西球囊霉(*Glomus mosseae*),其可与黄芩根系形成良好共生关系并改善黄芩叶片的光合特性,提高黄芩根系化学元素、黄芩苷质量分数及其根系干质量。还有研究报道了使用商品化生防菌剂防治黄芩根腐病的田间药效试验。结果表明,供测微生物菌剂力锐特、坤益建、菌淋天下等对黄芩根腐病均有良好防效,其中力锐特效果最好,为81.97%,此外,研究者还比对了不同药剂组处理后黄芩鲜重、根长、产量等经济性状,除坤益建以外,其余商品化药剂均增产16%以上。生物防治方法因其安全性高,对环境友好,目前已成为当前防治植物病害的重要手段之一,具有广阔的应用前景。

4　结论

本研究从陕西省商洛市地区黄芩根际土壤筛选获得2株对黄芩根腐病表现优良拮抗活性的放线菌,进一步结合形态学和16s rRNA测序比对,将菌株HQ-53初步鉴定为灰橙链霉菌属(*Streptomyces griseoaurantiacus*),菌株HQ-75初步鉴定为巴西链霉菌属(*Streptomyces brasiliensis*),进一步活性测定结果表明,2菌株的无菌发酵液对茄病镰孢菌菌丝生长抑制率抑制率分别为65.3%和77.5%,对其孢子萌发抑制率分别为43.5%和55.4%,结合扫描电子显微镜观察处理后病原菌超微结构,发现2生防菌的无菌发酵液处理后茄病镰孢菌菌丝均出现了不同程度的肿胀和生长畸形,表明其发酵液中存在活性代谢物。此外2株菌还具有固氮作用,兼具对植物生长的促进作用。2株生防菌的含菌发酵液在盆栽和田间药效试验中对黄芩根腐病均表现出优良防效,但在田间应用时效果相对较差,还需进一步针对菌株的田间应用开展相关研究。综合来看2株生防菌仍表现出较大的开发应用潜力。

参　考　文　献

[1]蒋晶晶,陈爱昌,魏周全,等. 甘肃陇西黄芩镰孢菌根腐病病原鉴定及其病株根部元素含量的变化[J]. 草业学报,2023,32(7):109-121.
Jiang J J, Chen A C, Wei Z Q, et al. Identification of *Fusarium* species from *Scutellaria baicalensis* root rot in Longxi, Gansu Province and effects on element contents of root [J]. Acta Prataculturae Sinica,2023,32(7): 109-121.

[2]李金玲. 黄芩素对酒精诱导的小鼠急性肝损伤的保护作用[D].长春:吉林农业大学,2022.
Li J L. Protective effect of baicalein on alcohol-induced acute liver damage in mice [D]. Changchun: Jilin Agricultural University,2022.

[3]崔璐,路俊仙,林慧彬,等. 我国黄芩资源及生产现状调查研究[J]. 时珍国医国药,2009,20(9):2279-2280.
Cui L, Lu J X, Lin H B, et al. Investigation on the resources and production status of *Scutellaria baicalensis* Georgi in China [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2009, 20(9):2279-2280.

[4]常瑾,杨玉秀,淡静雅,等. 陕西黄芩主要病害及其综合防治技术研究[J]. 西安文理学院学报(自然科学版),2007,10(2):30-32.
Chang J, Yang Y X, Dan J Y, et al. Study on comprehensive control of the disease of *Scutellaria baicalensis* geogi in Shaanxi Province[J]. Journal of Xi'an University of Arts and Science (Natural Science Edition),2007,10(2):30-32.

[5]朱广啟,曾志海,赵晋,等. 商洛市黄芩根腐病病原菌分离与鉴

定[J]. 陕西农业科学,2017,63(11):63-64.
Zhu G Q,Zeng Z H,Zhao J,et al. Isolation and identification of pathogen of *Scutellaria baicalensis* root rot in Shangluo city[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences,2017,63(11):63-64.

[6]赵晋,曾志海,盛琳,等.咯菌腈、嘧菌酯等4种药剂防治黄芩根腐病试验效果分析[J].陕西农业科学,2018,64(07):29-32.
Zhao J, Zeng Z H, Sheng L, et al. Analysis for experimental effects of 4 medicament (rotoronitrile and pyridium etc.) on controlling *Scutellaria* root rot [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences,2018,64(7):29-32.

[7]张锡唐,吴小芹,陈飞. 瓦雷兹芽孢杆菌JK-XZ8对樱花根癌病的防效与抑菌物质初探[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2020,40(5):75-82.
Zhang X T, Wu X Q, Chen F. The control effect of *Bacillus velezensis* JK-XZ8 on cherry blossom crown gall and preliminary study on its antibacterial substance [J]. Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition),2020,40(5):75-82.

[8]祁鹤兴,李金福,段晓明,等. 青海省三种药用植物根腐病生物防治药剂筛选[J]. 青海农林科技,2023(3):65-71.
Qi H X,Li J F,Duan X M,et al. Screening of biological control agents for root rot of three medicinal plants in Qinghai Province [J]. Science and Technology of Qinghai Agriculture and Forestry,2023(3):65-71.

[9]王锋,卫国羽,赵微,等. 贵州多花黄精根腐病病原菌鉴定及生防菌筛选[J]. 广东农业科学,2023,50(8):143-153.
Wang F, Wei G Y, Zhao W, et al. Identification of pathogen causing root rot in *Polygonatum cyrtonema Hua* and screening of biocontrol bacterias[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2023,50(8):143-153.

[10]石义妃,耿佩冰,吴皓,等. 金黄垂直链霉菌DF06的分类鉴定及防病促生作用[J]. 中国生物防治学报,2023,39(2):407-417.
Shi Y F, Geng P B, Wu H, et al. Classification and identification of *Streptomyces aureoverticillatus* DF06 and its effect on disease control and growth promotion[J]. Chinese Journal of Biological Control,2023,39(2):407-417.

[11]方中达. 植病研究方法[M].3版.北京:中国农业出版社,1998:122-173.
Fang Z D. Methods for plant disease research[M] 3rd Ed. China Agriculture Press,1998:122-173.

[12]孙莹,甘霖,林睿,等. 四合木内生放线菌RE4的分离鉴定及其促生活性研究[J]. 北方农业学报,2021,49(5):100-105.
Sun Y, Gan L, Lin R, et al. Isolation and identification of endophytic actinomycete RE4 and its growth-promoting activity in *Tetraena mongolica* [J]. Journal of Northern Agriculture,2021,49(5):100-105.

[13]Sun H Y, Cai S Y, Liu H Q, et al. *FgSdhC* paralog confers natural resistance toward SDHI fungicides in *Fusarium graminearum* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2023,71(51):20643-20653.

[14]Xu T, Cao L D, Zeng J R, et al. The antifungal action mode of the rice endophyte *Streptomyces hygroscopicus* OsiSh-2 as a potential biocontrol agent against the rice blast pathogen[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology,2019,160:58-69.

[15]王珺,郭庆港,苏振贺,等. 脂肽类抗生素fengycin对大丽轮枝菌孢子萌发和微菌核形成的影响[J]. 植物病理学报,2020,50(6):739-747.
Wang J, Guo Q G, Su Z H, et al. Effect of fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 on the conidial germination and microsclerotia formation of *Verticillium dahliae* [J]. Acta Phytopathologica Sinica,2020,50(6):739-747.

[16]张建强,吴康莉,张晓梦,等. 一株燕麦根腐病生防菌的鉴定及其防治效果[J]. 草业科学,2021,38(11):2266-2273.
Zhang J Q, Wu K L, Zhang X M, et al. Identification of a biocontrol strain of oat root rot and its control effect [J]. Pratacultural Science,2021,38(11):2266-2273.

[17]郑豆豆,牛世全,周璇,等. 黄芪根腐病复合生防放线菌筛选鉴定及防治作用[J]. 生态学杂志,2019,38(3):753-761.
Zheng D D, Niu S Q, Zhou X, et al. Screening, identification and efficacy of combined biocontrol actinomycete strains against root rot disease of *Astragalus membranaceus* [J]. Chinese Journal of Ecology,2019,38(3):753-761.

[18]邹庆道,朱华,张子君,等. 番茄抗青枯病材料的筛选[J]. 北方园艺,2011(2):28-29.
Zou Q D, Zhu H, Zhang Z J, et al. Identification of resistant material to tomato bacterial wilt[J]. Northern Horticulture, 2011(2):28-29.

[19]辛中尧,徐红霞,陈秀蓉. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)B_1、B2菌株对当归、黄芪的防病促进生长效果[J]. 植物保护,2008,34(6):142-144.
Xin Z Y, Xu H X, Chen X R. Effects of *Bacillus subtilis* B_1 and B2 on preventing diseases and promoting growth of *Angelica sinensis* and *Astragalus membranaceus* [J]. Plant Protection,2008,34(6):142-144.

[20]杨琳,闫向楠,王兰英,等. 一株放线菌SW20防病促生效应研究[J]. 江西农业大学学报,2023,45(1):69-77.
Yang L, Yan X N, Wang L Y, et al. Effects of actinomycete SW20 on disease prevention and growth promotion[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis,2023,45(1):69-77.

[21]Buchanan R E, Gibbons N E. 伯杰氏系统细菌学手册(第八版)[M].北京:科学技术出版社,2004:830-1207.
Buchanan RE, Gibbons NE. The eighth edition of Berger's system bacteriology handbook [M]. Beijing: Science and Technology Press, 2004:830-1207.

[22]张颖慧,魏东盛,邢来君,等. 一种改进的丝状真菌DNA提取方法[J]. 微生物学通报,2008,35(3):466-469.
Zhang Y H, Wei D S, Xing L J, et al. A modified method for isolating DNA from fungus[J]. Microbiology, 2008, 35(3): 466-469.

[23]Rajawat M V S, Singh S, Tyagi S P, et al. A modified plate assay for rapid screening of potassium-solubilizing bacteria[J]. Pedosphere,2016,26(5):768-773.

[24]曾钰涵,赵心宇,胡玉,等. 大豆根腐病生防链霉菌IRHB47的鉴定、生物学特性及防治效果[J]. 四川农业大学学报,2023,41(5):801-810.
Zeng Y H, Zhao X Y, Hu Y, et al. Identification, biological characteristics and control efficacy of *Streptomyces virginiae*

IRHB47 against soybean root rot[J]. Journal of Sichuan Agricultural University,2023,41(5):801-810.

[25]侯正欣,董超,马萱,等. 海洋来源链霉菌MY0504产纤溶酶的发酵条件优化[J]. 微生物学通报,2017,44(5):1009-1016.
Hou Z X,Dong C,Ma X,et al. Optimization of fermentation for fibrinolytic enzyme production by *Streptomyces* MY0504 from ocean[J]. Microbiology China,2017,44(5):1009-1016.

[26]杜叶,周雪莹,连宾. 胶质芽孢杆菌的胞外分泌物与细菌的解钾作用[J]. 地学前缘,2008,15(6):107-111.
Du Y,Zhou X Y,Lian B. The extracellular secretion of *Bacillus mucilaginosus* and its capability of releasing potassium from potassium-bearing minerals[J]. Earth Science Frontiers,2008,15(6):107-111.

[27]魏本杰,曾晓希,刘志成,等.产铁载体菌的筛选鉴定及活化镉的性能探究[J].环境科学与技术,2014,37(11):26-31.
Wei B J,Zeng X X,Liu Z C,et al. Isolation,identification and study on cadmium-mobilization ability of sidorophores-producing bacteria[J]. Environmental Science & Technology,2014,37(11):26-31.

[28]朱广启. 商洛市中药材病虫害发生现状与控制对策[J]. 陕西农业科学,2006,52(3):81-83.
Zhu G Q. Occurrence status and control countermeasures of diseases and insect pests of traditional Chinese medicine in Shangluo city[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences,2006,52(3):81-83.

[29]朱广啟,曾志海,赵晋,等.嘧菌酯与咯菌腈对黄芩根腐病病原菌的抑制作用研究初报[J].陕西农业科学,2018,64(02):7-8.
Zhu G Q,Zeng Z H,Zhao J,et al. Prelininary report on inhibition effect of pyridol and clonitrile on pathogenic bacteria in *Scutellaria baicalensis* root rot [J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences,2018,64(2):7-8.

[30]马玉蓉.山西省黄芩镰孢根腐病菌种群结构分析及对6种化学药剂的敏感性测定[D].太谷:山西农业大学,2022.
Ma Y R. Population structure and sensitivity of *Fusarium* species associated with root rot on *Scutellaria baicalensis* to six fungicides in Shanxi Province[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2022.

[31]李堆淑.细黄链霉菌对黄芩抗根腐病的诱导反应[J].贵州农业科学,2016,44(2):89-92.
Li D S. Induced reaction of *Streptomyces microflavus* to *Fusarium solani* in *Scutellaria baicalensis* [J]. Guizhou Agricultural Sciences,2016,44(2):89-92.

[32]贺超,贺学礼,马丽,等.AM真菌和施磷量对黄芩光合特性和根系生长的影响[J].西北农业学报,2014,23(11):180-184.
He C,He X L,Ma L,et al. Effects of inoculation AM fungi and phosphote application on growth and photosynthetic characteristics of *Scuteliaria baiealensis*[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2014,23(11):180-184.

Selection, identification, and biocontrol efficacy assessment of biocontrol bacteria against *Scutellaria baicalensis* root rot disease

Wang Li[1], Wang Yazhu[1], Zhang Ru[2], Wang Juanjuan[3], Han Lirong[4*]

(*1.Yizhi College of Agriculture and Forestry, Xianyang Vocational Technical College, Xi'an 712000, China; 2.Natural Forest Protection Project Management Center of Shaanxi Province/Shaanxi Provincial Forestry Fund Management Center, Xi'an 710082, China; 3.Shaanxi Institute of Forest Inventory and Planning, Xi'an 710082, China; 4.College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, China*)

Abstract:[Objective]*Fusarium solani*, the pathogen causing root rot in *Scutellaria baicalensis*, is one of the main pathogens responsible for this disease, which has become a bottleneck issue in *S. baicalensis* production in Shaanxi province, and limits the further development of the *S. baicalensis* planting industry. This study aimed to isolate and screen biocontrol bacteria with excellent antagonistic activity from soil, providing new approaches and methods for the control of *S. baicalensis* root rot. [Methods]Antagonistic bacteria were screened using the dual-culture plate method, and their biocontrol efficacy against *S. baicalensis* root rot was assessed through growth rate method, pot experiments, and field efficacy trials. Additionally, the bacteria were identified through morphological and molecular biological methods. [Results]Two highly effective antagonistic strains, HQ-53 and HQ-75, were isolated from the rhizosphere soil of healthy *S. baicalensis* in Shangluo City, Shaanxi Province. These strains were preliminarily identified as *Streptomyces griseoaurantiacus* and *Streptomyces brasiliensis*. The active compound extracts of these strains showed inhibition rates of 65.3% and 77.5% on mycelial growth and 43.5% and 55.4% on spore germination, respectively. Scanning electron microscopy revealed that the mycelium of *F. solani* treated with the fermentation extracts of HQ-53 and HQ-75 exhibited swelling and growth abnormalities. Further pot and field efficacy trials showed that both strains significantly reduced the incidence of root rot, with field efficacies reaching 67.3% and 56.2% after three treatments, respectively. [Conclusion]The two isolated *Streptomyces* strains, HQ-53 and HQ-75, exhibited excellent antagonistic activity against *S. baicalensis* root rot and have the potential to be developed into biocontrol agents. They also provided new microbial resources for the prevention and control of root rot diseases caused by other *F. solani* strains.

Keywords:*Scutellaria baicalensis*, Root Rot, Antagonistic Bacteria, Biological Control　　(编辑:吕俊俐)