

桔梗根腐病拮抗菌的筛选及生防机制初探

郑昭焕¹, 余函纹¹, 梁笑¹, 张玉洁¹, 王铁霖², 蒋超², 池秀莲², 查良平^{1,3*},
桂双英^{1,3,4,5}, 刘娟^{2*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室, 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700; 3. 安徽中医药大学, 新安医学与中医药现代化研究所, 安徽 合肥 230012; 4. 省部共建安徽道地中药材品质提升协同创新中心, 安徽 合肥 230012; 5. 安徽省道地药材品质提升与开发利用工程研究中心, 安徽 合肥 230012)

摘要: 根腐病是桔梗种植过程中主要的根部病害之一, 筛选对根腐病具有拮抗作用的生防菌株, 可为绿色防控桔梗病害提供优质的菌种资源。本研究采用高通量分菌技术分离并纯化了桔梗根系的内生细菌, 通过平板对峙培养法筛选出根腐病拮抗菌株 R34B7, 平板对峙抑菌率为 52.18%; 结合形态学特征、生理生化特性以及分子鉴定结果, 确定拮抗内生细菌 R34B7 菌株为普城沙雷氏菌 (*Serratia plymuthica*); 使用桔梗组培苗接种评价其对桔梗根腐病的防治效果, 发现菌株 R34B7 对桔梗根腐病的防效为 44.44%, 同时其发酵上清液对病原菌菌丝生长和孢子萌发具有明显抑制作用; 通过检测拮抗菌株 R34B7 胞外水解酶和促生指标, 发现该菌株具备产生蛋白酶、几丁质酶、固氮、解磷、合成铁载体和吲哚乙酸的能力, 具有潜在促生作用。本文筛选出的桔梗拮抗菌 R34B7 展现出良好的根腐病生防活性, 具有深入开发和利用的广阔前景。

关键词: 桔梗; 根腐病; 生物防治; 拮抗; 普城沙雷氏菌

中图分类号: R931 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)03-0825-09

Screening and biocontrol mechanism of antagonistic bacteria against root rot of *Platycodon grandiflorum*

ZHENG Zhao-huan¹, YU Han-wen¹, LIANG Xiao¹, ZHANG Yu-jie¹, WANG Tie-lin²,
JIANG Chao², CHI Xiu-lian², ZHA Liang-ping^{1,3*}, GUI Shuang-ying^{1,3,4,5}, LIU Juan^{2*}

(1. College of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 2. State Key Laboratory for Quality Assurance and Sustainable Use of Dao-di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. Center for Xin'an Medicine and Modernization of Traditional Chinese Medicine of IHM, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China; 4. MOE-Anhui Joint Collaborative Innovation Center for Quality Improvement of Anhui Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012, China; 5. Anhui Engineering Research Center for Quality Improvement and Utilization of Genuine Chinese Medicinal Materials, Hefei 230012, China)

Abstract: Root rot represents a significant disease affecting the cultivation of *Platycodon grandiflorum*. The screening of biocontrol strains with antagonistic properties against this disease can provide valuable microbial

收稿日期: 2024-11-05; 修回日期: 2024-12-15.

基金项目: 国家自然科学基金区域联合基金项目 (U21A20406); 大健康研究院新安医学与中医药现代化研究所专项资金 (2023CXMMTCM008); 安徽省自然科学基金优秀项目 (2208085Y30); 中华中医药学会青年人才托举工程项目 (CACM-2023-QNRC2-B23); 国家中医药管理局高水平中药重点学科中药资源学 (药用植物学) 建设项目 (zyyzdk-2023095).

*通讯作者 E-mail: zlp_ahtcm@126.com; juanliu126@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-1094

resources for the environmentally friendly prevention and control of *Platycodon grandiflorum* diseases. In this investigation, high-throughput bacterial isolation techniques were utilized to isolate and purify endophytic bacteria from the roots of *Platycodon grandiflorum*. An antagonistic bacterial strain R34B7, was identified through the plate confrontation culture method, exhibiting a notable inhibitory rate of 52.18% against the pathogen causing root rot. Morphological characteristics, physiological and biochemical properties, and molecular identification results collectively confirmed that the antagonistic endophytic bacterium R34B7 belonged to the species *Serratia plymuthica*. The control efficacy of strain R34B7 against *Platycodon grandiflorum* root rot was assessed using tissue-cultured seedlings of *Platycodon grandiflorum*, revealing a disease control efficacy of 44.44%. Furthermore, the fermented supernatant of strain R34B7 demonstrated considerable inhibitory effects on both the mycelial growth and spore germination of the pathogen. By examining the extracellular hydrolytic enzymes and growth-promoting factors of strain R34B7, it was discovered that this strain possesses the abilities to produce protease, chitinase, fix nitrogen, solubilize phosphorus, synthesize siderophores, and produce indole-3-acetic acid, indicating its potential for growth promotion. The antagonistic bacterium R34B7 identified in this study exhibits promising biocontrol activity against root rot and holds considerable potential for further development and utilization.

Key words: *Platycodon grandiflorum*; root rot; biological control; antagonism; *Serratia plymuthica*

桔梗为桔梗科植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A.DC. 的干燥根^[1], 其性平, 味苦、辛, 具有宣肺、祛痰、止咳等功效, 属于药食同源品种^[2]。野生桔梗在自然环境下病害并不严重, 但鉴于桔梗兼具良好的药用与食用价值, 其人工栽培规模持续扩大, 由密集式种植带来的病害问题也日益成为人们关注的焦点^[3]。目前, 桔梗栽培面临的最大的生长威胁是根腐病, 该病由半知菌亚门的镰刀菌引发, 是一种通过土壤传播的根部病害^[4]。在病害初期, 根部靠近地面的部位会显现出褐色的坏死现象, 并逐渐向下蔓延, 大约 15~20 天后, 整个根部都会遭受坏死, 与此同时, 地面上的茎和叶会逐渐萎蔫至死亡^[5]。引起桔梗根腐病的镰刀菌种类众多, 主要包括尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*) 等, 其中尤以尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 最为常见^[6], 也是甘草^[7]、川芎^[8]、西洋参^[9]等多数药用植物根腐病的致病菌, 严重阻碍了中药材产业的进步与发展^[10]。

选育抗病品种是防治病害最经济有效的措施之一^[11], 然而因其工作量大、周期长、效率低等问题, 难以适应当前农业生产的迫切需求^[12]。化学防控虽以高效迅速、广泛适用以及经济节约的特性而著称^[13], 但部分化学农药在消灭土壤中病原菌的同时, 也会无差别地杀灭有益微生物, 从而打破了土壤微生物群落与根际微生物之间的和谐平衡^[14]。生物防治手段是通过微生物及其所产生的代谢产物有效控制和预防植物病害的发生^[15], 与以上防治植物病害的方法相比具有周期短、效率高、自然环境友好等特点^[16]。如沙雷氏菌属 (*Serratia*) 能够产生多种具有抗菌活性的代谢产物, 例如灵菌红素、脂肽、碳青霉烯、几丁质酶、异硫霉素和嗜

铁素等, 这些物质能够有效抑制不同种类的植物病原真菌生长, 对于生物防治菌剂和生物农药的研发具有积极作用^[17]; Zhang 等^[18]通过将贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*) BY6 应用于遭受根腐病侵害的杨树幼苗根部后, 观察到了植物生长参数 (包括干重、鲜重以及株高) 的显著提升, 并激活了与生长素信号传导相关的基因表达, 病害指数降低了 49.53%, 具有明显的病害缓解效果。

本研究采用平板对峙法从桔梗内生菌中筛选出对根腐病病原菌有拮抗作用的菌株 R34B7, 基于形态学特征、生理生化特征和分子鉴定, 确定菌株 R34B7 为普城沙雷氏菌 (*Serratia plymuthica*); 通过检测生理生化特性、胞外水解酶、促生指标和防病效果, 初步探究其抑菌机制, 对拮抗菌株在防治桔梗根腐病方面的潜力进行综合评估, 旨在为桔梗根腐病的田间防治提供基础, 为生物防治制剂的开发提供优质的菌种资源。

材料与方法

样品 桔梗内生菌分离的植株于 2022 年 9 月采集于安徽省桐城市桔梗种植基地 (116°43'55.58"E, 30°59'2.54"N), 品种为“皖桔梗 2 号”。选取生长状态健康、无机械损伤的材料带回实验室备用。

病原真菌 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*)、胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 由中国中医科学院中药研究所提供。禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 由安徽中医药大学药学院提供。

试剂与培养基 氯化镁 (批号: Lf0622141856) 购自上海皓鸿生物医药科技有限公司; 琼脂粉 (批号: K525BA0002) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公

司; 脱脂奶粉 (批号: 34240229008) 购自北京索莱宝科技有限公司; 吡啶乙酸 (批号: JS238972)、L-色氨酸 (批号: M20IS210217) 均购自上海源叶生物科技有限公司; Salkowski 比色液 (批号: 20240321) 购自福州飞净生物科技有限公司; 马铃薯葡萄糖 (PDA) 培养基 (批号: JS248895), PDA 固体培养基为 PDA 培养基加琼脂粉, 购自上海源叶生物科技有限公司; 胰蛋白胨大豆肉汤 (TSB) 培养基 (批号: 3555418) 购自美国 OXOID 公司; 纤维素培养基 (批号: 20240731)、无机磷检测培养基 (批号: 20231214)、阿须贝氏无氮培养基 (批号: 20240902)、铁载体检测培养基 (批号: 20240119) 均购自青岛海博生物科技有限公司; β -1,3 葡聚糖培养基 (批号: MM34112721) 购自北京酷莱博科技有限公司; 几丁质培养基 (批号: 20240928) 购自南京锐捷特生物科技有限公司。蛋白质培养基: 脱脂奶粉 3 g, 琼脂粉 3 g, 蒸馏水 200 mL, 115 °C 高压蒸汽灭菌 10 min。

仪器 ETC821 型聚合酶链式反应 (PCR) 仪 (北京东胜创新生物科技有限公司); BHP-75 恒温培养箱 (合肥右科仪器设备有限公司); Multifuge X1R 型高速冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); MQL-61R 型恒温摇床培养箱 (上海旻泉仪器有限公司); ZHJH-C1112C 型超净工作台 (上海智城分析仪器制造有限公司); Panthera U 型数码显微镜 (麦克奥迪实业集团有限公司); GI54TR 型高压蒸汽灭菌锅 (美国 ZEALWAY 公司); Infinite 200PRO 型多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司)。

内生细菌的分离纯化 参照 Zhang 等^[19]方法, 使用高通量分离培养和鉴定桔梗根系的内生细菌。使用无菌磷酸缓冲液充分清洗桔梗根系, 称取 0.02 g 根系组织并加入 200 μ L 氯化镁溶液 (10 mmol·L⁻¹), 用无菌研磨棒将根系研至匀浆状, 随后转移至含有 25 mL 氯化镁溶液的无菌离心管中, 混匀。吸取 500 μ L 根系匀浆液加入到含有 1 L 10% TSB 液体培养基的试剂瓶中并摇匀, 用排枪将稀释液分装到 45 个 96 孔细胞培养板中, 每孔 160 μ L, 同时取不含根系匀浆液的 10% TSB 液体培养基转移至 3 个细胞板中做阴性对照。使用封口膜封口, 将细胞培养板置于 28 °C 恒温培养箱中培养 14 d, 保留约 30% 的孔呈现肉眼可见的浑浊状态的培养板。

使用双侧标签两步 PCR 扩增法鉴定细菌的 16S rRNA 基因。第一轮 PCR 使用引物 799F (5'-AACMG GATTAGATACCKG-3') 和 1193R (5'-ACGTCATCCC CACCTTCC-3') 进行扩增, 将扩增产物用无核酸酶水稀释 40 倍后作为第二轮 PCR 扩增的模板, 第二轮 PCR 使用带有标记的 799F 和 1193R 引物进行扩增, 扩增完

成后, 混合第二轮 PCR 产物并经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格, 送至上海美吉生物医药科技有限公司进行高通量测序。基于测序结果, 按照 Zhang 等^[19]方法选择细胞培养板中的单一菌株进行保藏。

拮抗菌株的筛选 内生细菌接种在 TSB 固体培养基, 待其长出单菌落后, 挑取单菌落于 TSB 液体培养基中, 置于恒温摇床培养箱 (28 °C、180 r·min⁻¹) 培养 24 h 制成菌悬液。采用平板对峙培养法筛选对病原真菌有拮抗作用的菌株, 选择 3 种镰刀属真菌尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 以及 1 种与桔梗根腐病常伴随发生的炭疽病致病菌胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 为指示菌, 将其接种至 PDA 培养基, 28 °C 恒温培养 6 d 备用。用无菌手术刀切取菌块接种至新鲜 PDA 培养基中央, 在距菌饼周围 2.5 cm 处的 4 个方向接种 5 μ L 菌悬液, 以不接种菌悬液为对照, 每个处理重复 3 次, 28 °C 培养 7 d 后观察并测定病原菌菌落直径, 计算抑菌率 (式 1)。

抑制率 (%) = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / 对照组菌落直径 \times 100% (1)

菌株形态观察与生理生化特征鉴定 将筛选得到的拮抗菌, 利用平板划线法接种于 TSB 固体培养基上, 置于 28 °C 恒温培养箱培养 2 d, 观察并记录菌落的生长状况及大小、色泽等形态特征, 并进行革兰染色。生理生化特性的测试依据《常见系统细菌鉴定手册》^[20]与《伯杰细菌鉴定手册》^[21]对菌株进行甲基红、Voges-Proskauer (V-P)、接触酶、淀粉水解等试验。

菌株 16S rRNA 基因序列分析 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (Applied Biosystems, USA) 的步骤进行拮抗菌株的总 DNA 提取, 使用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTACGACTT-3') 扩增菌株的 16S rRNA 基因。PCR 反应体积为 50 μ L, 包括 2 \times Hieff PCR Master Mix 25 μ L, 正反引物各 2 μ L (10 μ mol·L⁻¹), DNA 模板 2.5 μ L, ddH₂O 18.5 μ L。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。扩增完成后使用 1% 琼脂糖凝胶电泳确定目标条带, 将 PCR 产物送至通用生物 (安徽) 股份有限公司进行测序。登录 NCBI 数据库, 将拼接好的序列用 BLAST 进行同源性比对, 利用 MEGA 11.0 软件, 使用 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

拮抗菌株 R34B7 对桔梗根腐病生防效果的测定 实验采用桔梗组培苗作为供试植株, 桔梗组培苗体系课题组前期已建立 (培养液配方: 1/2MS 培养基

2.47 g·L⁻¹、蔗糖 30 g·L⁻¹)。取生长状况一致且健康的组培苗,在超净工作台内自然晾干,用无菌针头刺伤根部,接种新鲜的桔梗根腐病致病菌 *Fusarium oxysporum* 菌饼,置于培养瓶中。共设置 3 个处理组:① 对照组,培养瓶中只含有培养液;② 只接种病原菌处理组;③ 病原菌与拮抗菌共同处理组,在接种病原菌后,加入拮抗菌悬液 5 mL ($A_{600} = 0.5$)。每个处理组设置 3 个重复,置于光照强度 400 $\mu\text{mol}\cdot(\text{m}^2\cdot\text{s})^{-1}$ 、光照时间 12 h·d⁻¹、温度 25 ± 2 °C 人工气候室培养,并在接种 15 d 后统计发病情况及生长指标(式 2、3)。桔梗根腐病的病情分级标准参照 Li^[22]的方法。

病情指数 = $[\sum (\text{各级病株数} \times \text{各级代表值}) / \text{调查株数} \times \text{最高级代表值}] \times 100$ (2)

防治效果 = $(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数} \times 100\%$ (3)

拮抗菌株胞外酶活及促生特性检测 将菌株分别接种在纤维素酶检测培养基、蛋白酶检测培养基、几丁质酶检测培养基、 β -1,3 葡聚糖酶检测培养基、无机磷检测培养基、铁载体检测培养基和阿须贝无氮培养基上,每个处理重复 3 次,于 28 °C 恒温培养 3~4 d,观察菌落周围有无透明圈的产生以及在阿须贝无氮培养基中生长情况。

菌株产吡啶乙酸能力检测参照 Zou 等^[23]方法有所改动。挑取单菌落接种于含有 L-色氨酸 (2.5 mg·L⁻¹) 的 TSB 液体培养基中,28 °C、180 r·min⁻¹ 振荡培养 4 d,取 200 μL 菌悬液与等量的 Salkowski 比色液混匀,并配制吡啶乙酸标准溶液作为对照。室温下避光静置 30 min,溶液变为粉红色则表明该菌株具有产生吡啶乙酸的能力。

拮抗菌发酵上清液的制备 挑取新鲜菌株 R34B7 的单菌落,接种至 TSB 液体培养基,置于 28 °C、180 r·min⁻¹ 摇床中进行震荡培养 24 h。按照 1% 的接种比例,将上述菌悬液以 28 °C、180 r·min⁻¹ 的条件下进行扩大培养 4 d。发酵液以 12 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,上清液使用 0.22 μm 的一次性无菌微孔滤膜过滤 2 次,得到发酵上清液。

拮抗菌发酵上清液对病原菌菌丝生长的影响 将发酵上清液分别按照 5%、20%、50% 的比例与经高压灭菌的 PDA 培养基混合均匀后倒平板,并以不含发酵上清液的 PDA 平板作为对照。待其凝固后,使用无菌手术刀切取尖孢镰刀菌菌块,接种于平板中央,每个处理重复 3 次,28 °C 恒温培养 7 d,并在光学显微镜下观察病原菌菌丝形态变化。

拮抗菌发酵上清液对病原菌孢子萌发的影响 向含有 50 mL PDA 培养基的锥形瓶中接种新鲜的尖孢镰刀菌菌块,置于恒温摇床培养箱中,25 °C、180 r·min⁻¹

摇培 7 d,用三层无菌纱布过滤收集孢子,制得孢子悬浮液备用。将拮抗菌发酵上清液与 1.5% 水琼脂培养基按一定比例混合,制备成一系列含有不同发酵滤液体积分数(分别为 5%、20%、50%)的培养基,并以 TSB 培养基替代发酵滤液,与水琼脂培养基混合作为对照。在洁净的无菌载玻片上滴加上述培养基并轻轻倾斜,使水琼脂凝成平整的薄层。吸取 10 μL 孢子悬浮液均匀地涂抹在水琼脂薄层表面,并将载玻片置于底部铺有湿润滤纸的培养皿中,于 28 °C 恒温培养箱中培养,每个处理重复 3 次。使用光学显微镜分别在 2、12、24 h 后观察孢子萌发情况,芽管长度 \geq 孢子直径的一半视为萌发,每次镜检至少 100 个孢子。按式 4、5 计算孢子萌发率和萌发抑制率。

孢子萌发率 (%) = $\text{萌发孢子数} / \text{镜检孢子总数} \times 100\%$ (4)

孢子萌发抑制率 (%) = $(\text{对照组萌发率} - \text{处理组萌发率}) / \text{对照组萌发率} \times 100\%$ (5)

数据统计与分析 采用 Microsoft Excel 2021 软件对试验数据进行整理。采用 IBM SPSS Statistics 20.0 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA),并采用 Duncan 法进行差异显著性分析 ($P < 0.05$)。

结果

1 拮抗菌株的分离及筛选

从桔梗根系中共分离纯化到 90 株内生细菌,采用平板对峙法筛选到一株对 3 种镰刀菌和 1 种炭疽病致病菌均有不同抑制作用的菌株 R34B7 (图 1)。在 PDA 平板中,菌株 R34B7 对尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的抑菌率为 52.18%;对其他 3 种病原真菌的抑菌率分别为 39.83%、49.36%、43.57%。因此,选择 R34B7 菌株作为后续实验研究对象,对其进行分类地位和防病促生的探究。

2 拮抗菌株的鉴定

2.1 形态特征及生理生化特性分析 拮抗菌株 R34B7 于 28 °C 恒温箱中培养 2 d 后,在 TSB 平板上菌落呈现

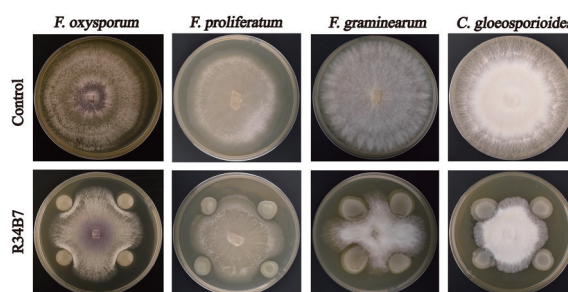


Figure 1 Inhibition effects of strain R34B7 against four pathogenic fungi

黄白色, 圆形或近圆形, 有黏性, 不透明, 边缘规则整齐, 表面湿润并有突起 (图2A), 光学显微镜下观察, 革兰染色结果显示为阴性, 菌体短杆状 (图2B)。生理生化指标检测结果表明, 菌株 R34B7 能利用葡萄糖, V-P、明胶液化、氧化酶、硝酸盐还原试验呈阳性, 淀粉水解试验呈阴性。

2.2 分子生物学鉴定 拮抗菌株 R34B7 的 16S rRNA 基因经通用引物扩增后, 获得一条序列长度约为 1 344 bp 的片段。使用 NCBI 数据库对获得的序列进行 BLAST 同源性比对, 结果显示菌株与沙雷氏菌的相似性较高。选择相似度 > 99% 的菌株序列和相关的沙雷氏菌属的菌株序列, 使用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树, 结果显示 (图2C), 菌株 R34B7 与 *Serratia plymuthica* (FJ711594.1) 聚为一枝。因此, 综合形态学特征和生理生化特性分析结果, 将菌株 R34B7 鉴定为普城沙雷氏菌 (*Serratia plymuthica*)。

3 菌株 R34B7 对桔梗根腐病的防效测定

不同处理下的桔梗组培苗生长形态如图3所示,

仅接种尖孢镰刀菌的组培苗出现整体矮小、根系褐色且须根数量少、叶片几乎全部萎蔫变黄的现象; 与同时接种尖孢镰刀菌和拮抗菌 R34B7 的组培苗相比, 处理后的组培苗发病状况明显减轻, 出现植株高度增长、根系褐色减轻、叶片健康仅部分变黄的现象。以只添加病原菌的处理为对照, 病原菌处理组的病情指数为 100; 经拮抗菌 R34B7 处理后, 病情指数降低为 55.56, 防治效果达 44.44%, 且在株高、鲜重方面均显著高于病原菌处理组 (表1)。

4 菌株 R34B7 胞外酶活及促生特性检测

生防菌株发挥作用的能力与其胞外水解酶和各种促生特征密切相关, 因此本试验对菌株 R34B7 的胞外水解酶和促生指标进行了测定。结果显示, 菌株 R34B7 在纤维素酶、 β -1,3 葡聚糖酶检测平板上未出现明显的透明圈 (图4A、B), 表明菌株不能产生纤维素酶和 β -1,3 葡聚糖酶; 在蛋白质酶、无机磷、几丁质酶和铁载体检测平板上, 菌株周围均出现不同大小的透明圈 (图4C~F), 表明菌株能够产生蛋白质酶、几丁质酶, 并

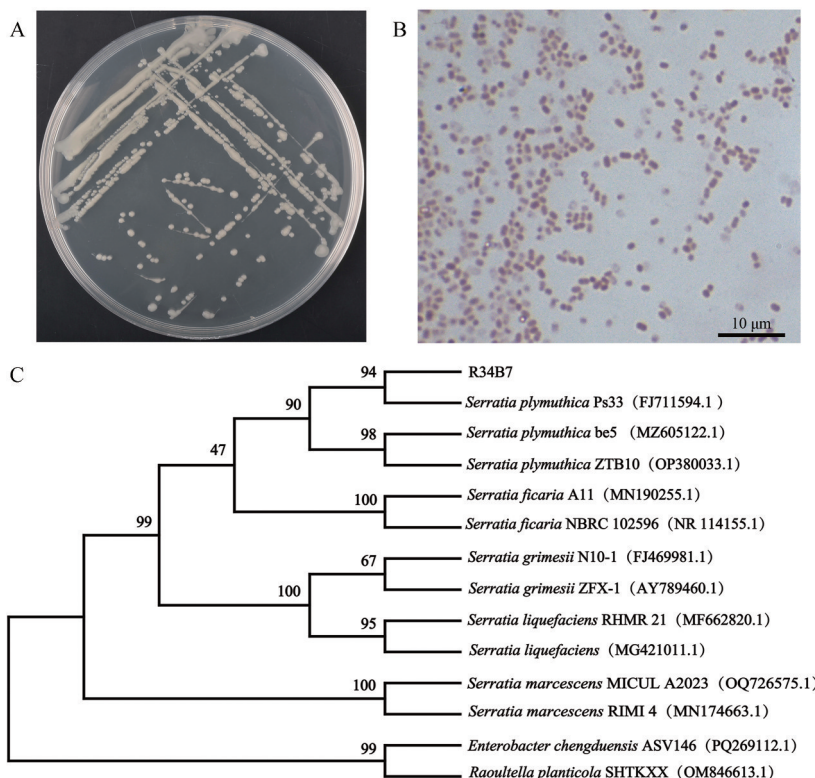


Figure 2 Morphological characteristics and phylogenetic tree of strain R34B7. A: Colonial morphology; B: Gram stain (1 000×); C: Phylogenetic tree based on 16S rRNA

Table 1 Effect of strain R34B7 on root rot of *Platycodon grandiflorus*. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$ vs *F. oxysporum*

Treatment	Plant height/cm	Green weight/g	Disease index	Control efficiency
Control	10.27 ± 1.59*	1.55 ± 0.09*	0	-
<i>F. oxysporum</i>	6.90 ± 0.53	0.37 ± 0.89	100	-
<i>F. oxysporum</i> +R34B7	9.00 ± 0.70*	1.15 ± 0.07*	55.56	44.44%



Figure 3 Morphology of *Platycodon grandiflorus* seedlings under different treatments. A: Controls; B: Pathogen treatment; C: Pathogen and strain R34B7 co-treatment

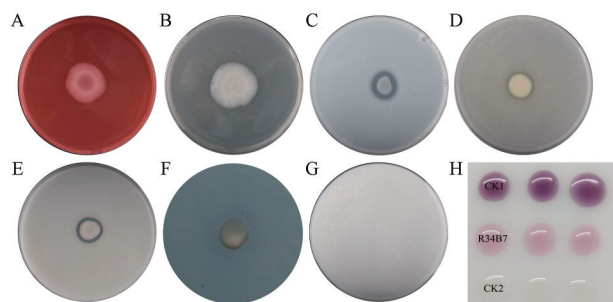


Figure 4 Detection of extracellular enzymes and growth promoting indexes of strain R34B7. A: Cellulase; B: β -1,3 Glucanase; C: Protease; D: Phosphate solubilization; E: Chitinase; F: Siderophore; G: Nitrogen fixation; H: Indoleacetic acid (IAA), CK1: $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ IAA; R34B7: Bacterial suspension; CK2: TSB

具有解磷、合成铁载体的能力;在阿须贝无氮培养基上,菌株可正常生长(图4G),表明菌株具有固氮的能力。吲哚乙酸定性试验结果显示,Salkowski检测液变为粉红色(图4H),说明菌株R34B7具有产吲哚乙酸的能力。

5 拮抗菌对病原菌拮抗机制的探究

5.1 菌株发酵上清液对病原菌菌丝生长的影响 不同体积浓度的菌株R34B7发酵上清液,对*F. oxysporum*菌丝生长均有一定的抑制作用。光学显微镜观察微观形态特征发现(图5),未经发酵上清液处理的菌丝结构完整均匀、平整光滑且饱满;而经过拮抗菌处理的菌丝畸形、末端分叉、表面褶皱不平整,呈现不同程度的扭曲折叠等现象。

5.2 菌株发酵上清液对病原菌孢子萌发的影响 菌株R34B7发酵上清液对尖孢镰刀菌孢子萌发的测试结果显示,不同体积浓度的发酵上清液对病原菌孢子萌发均有抑制作用,且随发酵上清液的浓度增大,孢子萌发数量逐渐减少(图6)。试验处理2 h后,对照组孢子还未萌发。对照组孢子培养12 h后,萌发率达81.67%,不同处理组的孢子萌发率均明显低于对照组,分别为29.33%、48.67%、64.67%。处理24 h后,对

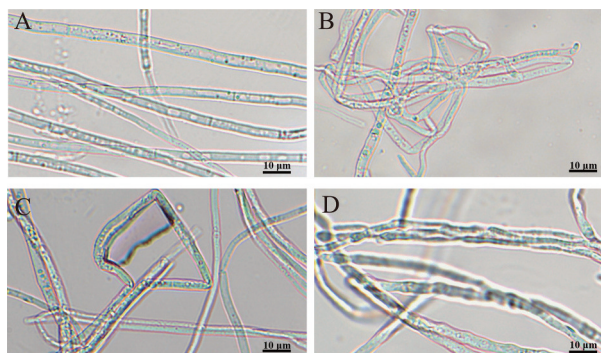


Figure 5 Effect of fermentation supernatant of strain R34B7 on the morphological features of *F. oxysporum* (400 \times). A: Control; B-D: Mycelium treated with different volume concentrations of fermentation supernatant (50%, 20%, 5%)

照组孢子萌发较完全,不同处理组的发酵上清液仍对孢子萌发保持抑制作用,萌发抑制率分别为50.55%、33.07%、13.95%。

讨论

根及根茎类药材普遍遭受严重的土传病害侵袭,其中根腐病作为最具破坏性的土传病害之一,因其高传染性、高发病率及难以防治的特性,被形象地称为“植物癌症”^[24]。在引发根腐病的多种致病菌中,镰刀属真菌是较为常见的一种。其中部分病原菌拥有广泛的寄主范围,能够侵害多种药用植物,例如茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)可导致三七^[25]、黄连^[26]、人参^[27]等多种药用植物发生根腐病。Wang等^[28]研究发现,桔梗的茎、根部腐烂病症是由*Fusarium armeniacum*引起的,这一病害致使幼苗的死亡率达10%。针对桔梗根腐病,常见的预防与控制手段涵盖了实施轮作制度、采取科学管理措施以及应用化学药剂进行防治,其中使用药剂防治被认为是最高效的手段^[29]。然而,长期采用化学防治手段,也引发了一系列问题,诸如防治效果的持续时间短、病原菌产生抗药性以及整体防治效率低

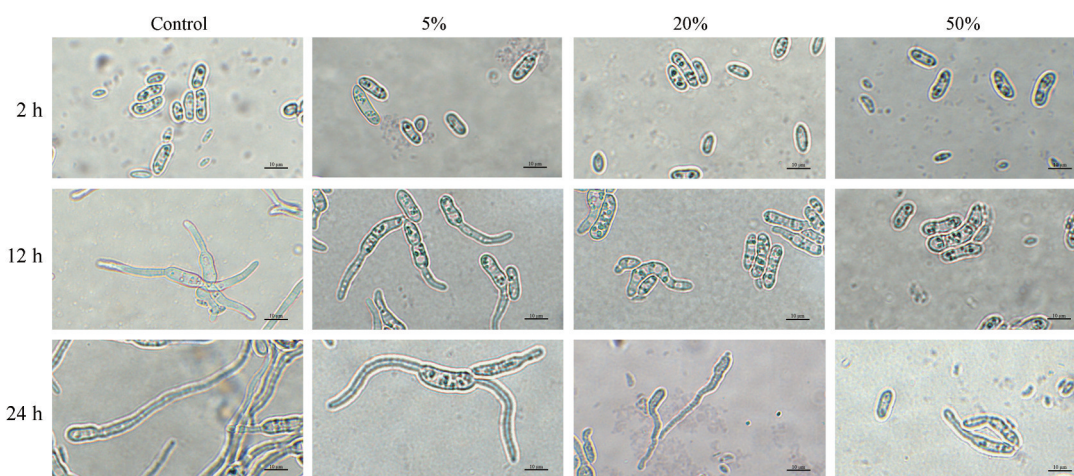


Figure 6 Microscopic observation of spore germination of *F. oxysporum* (400×)

下等。当前生态农业发展中,探索安全、环保且高效的防控技术已成为研究焦点,其中,利用生物拮抗菌来对抗各类植物病害已被确认为一种创新的防控途径^[30]。

据文献^[31]报道,沙雷氏菌可以产生大量的胞外及胞内酶,在生防菌剂应用上,其次级代谢产物具有很好的应用前景。其中普城沙雷氏菌(*S. plymuthica*)能够合成多种酶类以降解细胞壁,同时产生硝吡咯菌素、植物生长素以及多种具有生物活性的因子,可以作为有效的生物防治剂和植物生长促进菌^[32],此前已被德国开发并注册为生物农药^[33]。关于沙雷氏菌在生物防治方面的应用,国内外均有不断的报道出现。Shen等^[34]研究指出,普城沙雷氏菌(*S. plymuthica*) A21-4能够显著增强辣椒叶片对辣椒疫霉菌的抵抗力,并且对辣椒的生长起到了促进作用。He等^[35]从白术中筛选获得一株内生菌黏质沙雷氏菌(*S. marcescens*) BZ-8,具有解磷和产吲哚乙酸的能力,对白术具有明显的促生作用。Kim等^[36]研究表明普城沙雷氏菌(*S. plymuthica*) C-1作为一种生物防治剂,对于控制高丽参根腐病具有显著效果。Gong等^[37]从茶的根际中成功分离出一种黏质沙雷氏菌(*S. marcescens*) Pt-3,该菌株能够产生一种挥发性物质二甲基二硫化物,这种物质对真菌细胞结构具有强烈的破坏作用,从而对7种植物病原菌具有显著的抑制作用。本研究从桔梗根系中筛选获得一株内生细菌,平板拮抗试验展现出对尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)的抑制率达52.18%,同时对3种常见的病原真菌均有较好的拮抗作用。本文基于16S rRNA序列的系统发育分析、生理生化特性以及形态学特征的考察,确定了桔梗抗根腐病的内生菌R34B7菌株为普城沙雷氏菌(*S. plymuthica*)。使用菌株R34B7菌悬液处理已接种病原菌的桔梗组培苗,可使病情指数降低至55.56。由此说明菌株R34B7具有潜力被进一步研

发成为针对桔梗根腐病的生物防治手段。为了更准确地评估其实际效用,后续研究将在温室条件下进行盆栽试验,并在大田环境中实施生物防治试验,以此来全面验证菌株R34B7对桔梗根腐病的防治效果。

本研究进一步探究了菌株R34B7的无菌发酵上清液在不同浓度下对尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)菌丝生长和孢子萌发的影响。结果表明,无论是通过增加处理时长还是提升发酵上清液的浓度,都能观察到抑菌效果的明显增强。这些现象可能归因于菌株R34B7产生的多种拮抗代谢产物如蛋白酶、几丁质酶等,这些物质在对病原菌的生物控制过程中扮演了重要角色。研究^[38]表明,拮抗菌可以通过瓦解病原菌的细胞膜或细胞壁结构,导致其功能受损,细胞内容物流失,并最终引发细胞死亡。使用光学显微镜观察,经菌株R34B7处理后的尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)菌丝呈现出弯曲折叠,其表面显现出褶皱、下陷以及干缩等特征。Li等^[39]同样观察到,在使用不同浓度的拮抗菌发酵上清液进行处理后,病原菌菌丝呈现出变小、尖端肿胀的现象,且伴随着内容物的大量外泄,导致菌丝生长速度减慢,并出现异常的弯曲生长等特征。

菌株R34B7除具有抗病原菌活性之外,还展现出对植物生长有益的特质,具备溶磷、固氮、产生铁载体以及吲哚乙酸的能力。植物促生菌通过多种机制,包括磷的增溶作用、生物固氮过程以及植物激素的产生等,来促进植物的生长发育^[40]。已有研究结果显示,菌株所生成的铁载体能够与有害病原体竞争植物根部周围土壤中的铁资源,进而抑制这些有害病原体的生长,从而间接地有利于植物的生长发育。同时,生防菌产生的吲哚乙酸能够显著降低植物对重金属元素的吸收量,并增强植物对重金属的耐受性,干扰重金属离子在植物体内的迁移过程^[41]。据此推断,菌株R34B7在有

效遏制尖孢镰刀菌 (*F. oxysporum*) 生长的同时, 可能还通过促进桔梗的生长发育来增强其对逆境的抵抗能力。然而, 本研究只初步鉴定了一些促生特征的存在, 下一步将进行盆栽试验, 以此来深入探究菌株 R34B7 的促生机制。

作者贡献: 郑昭焕负责实验操作、数据分析和文章撰写; 余函纹、梁笑、张玉洁、王铁霖、蒋超、池秀莲负责数据收集; 查良平、桂双英、刘娟负责提供研究思路和文章修改。

利益冲突: 所有作者均声明本论文不存在利益冲突。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Vol I. Beijing: Chinese Medical Science Press, 2020: 320, 1601.
- [2] Wang X, Shi Y, Man JH, et al. Specific DNA barcodes screening, germplasm resource identification, and genetic diversity analysis of *Platycodon grandiflorum* [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2024, 59: 243-252.
- [3] Zhao ZJ. Research on the Classification and Disease Diversity of Parasitic Nematodes on *Platycodon* Root (桔梗根寄生线虫分类及病害多样性研究) [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2022.
- [4] Shi YL, Yuan LF, Yang Y, et al. Key points of efficient cultivation techniques of *Platycodon grandiflorum* under forest [J]. World Tropical Agric Inf (世界热带农业信息), 2022, (8): 7-9.
- [5] Chen XY. Prevention and control of root rot disease and standardized cultivation techniques of *Platycodon grandiflorum* in Yimeng mountains [J]. Bull Agric Sci Technol (农业科技通讯), 2018, 9: 291-292, 341.
- [6] Tang FF. Preliminary report on pathogen identification and chemical screening for the control of root rot disease of *Platycodon grandiflorum* [J]. South China Agric (南方农业), 2020, 14: 26-29, 37.
- [7] Cao XM, Li SB, Zhang HL, et al. Identification of the pathogens causing root rot of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch [J]. Acta Phytopathol Sin (植物病理学报), 2014, 44: 213-216.
- [8] Li JH. Research into Root Rot Disease of *Ligusticum chuanxiiong* Hort Investigation of the Incidence and Identification of the Fungal Pathogens (川芎根腐病调查与病原菌的鉴定研究) [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2016.
- [9] Guo SH. Identification of Pathogens of Root Rot Disease and Anthracnose of the *Panax quinquefolius* L., Screening of Biocontrol Agents and Evaluation of their Biocontrol Effects (西洋参根腐病和炭疽病原菌鉴定、生防菌筛选及效果评价) [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2024.
- [10] Chen QH. Identification of Pathogens Causing *Chrysanthemum morifolium* wilt Disease, and Study on Rhizosphere Microorganisms of Wilt Plants (药用菊花枯萎病原菌鉴定及患病植株根际微生物研究) [D]. Wuhan: Hubei University of Chinese Medicine, 2022.
- [11] Sun ZQ. Identification of Tobacco Root Rot Pathogen and Screening of Control Agents (烟草根腐病原菌鉴定及防治药剂筛选) [D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2023.
- [12] Pan WH. Identification of the Pathogen Causing Root Rot of Sand Pear and Screening of Fungicides in Laboratory (砂梨根腐病原菌鉴定与防控药剂室内筛选) [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022.
- [13] Zhang JN, Xie TP, Yang LH, et al. Research progress on root rot disease in medicinal plants [J]. Chin Wild Plant Resour (中国野生植物资源), 2024, 43: 60-67.
- [14] Ling N, Wang TT, Kuzyakov Y, et al. Rhizosphere bacteriome structure and functions [J]. Nat Commun, 2022, 13: 836.
- [15] Shi ZG. Research progress on control of *Fusarium* wilt of plants [J]. Mod Agric Sci Technol (现代农业科技), 2016, 20: 102-103.
- [16] Li K, Wang HY, Guo XZ, et al. Advances in research and application of *Trichoderma* for inducing resistance against root rot diseases in root and rhizome of Chinese medicinal materials [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2023, 48: 4942-4949.
- [17] Bai TF, Liu YQ. A survey of synthesis mechanism of antibiotic secondary metabolites by *Serratia* spp. [J]. J Microbiol (微生物学杂志), 2017, 37: 115-119.
- [18] Zhang P, Xie G, Wang L, et al. *Bacillus velezensis* BY6 promotes growth of poplar and improves resistance contributing to the biocontrol of *Armillaria solidipes* [J]. Microorganisms, 2022, 10: 2472-2479.
- [19] Zhang JY, Liu YX, Guo XX, et al. High-throughput cultivation and identification of bacteria from the plant root microbiota [J]. Nat Protoc, 2021, 16: 988-1012.
- [20] Dong XZ, Cai MY. Handbook of Identification of Common Bacterial (常见细菌系统鉴定手册) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [21] Bergey DH, Holt JG. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology [M]. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [22] Li DS. Study on oligosaccharide-induced resistance to root rot in *Platycodon grandiflorum* [J]. Jiangsu Agric Sci (江苏农业科学), 2018, 46: 65-68.
- [23] Zou L, Wang Q, Li MY, et al. Identification, biocontrol and plant growth-promoting potential of endophytic bacterial strain JY-3-1R from *Aconitum carmichaelii* Debx. [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2023, 39: 246-255.
- [24] Chen Y, Zhu L, Guo FX, et al. Isolation and identification of the pathogens causing *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* root rot in Weiyuan of Gansu Province [J]. Acta Phytopathol Sin (植物病理学报), 2011, 41: 428-431.
- [25] Wang J, Liang ZS, Kang B, et al. Identification of root rot pathogen of *Panax notoginseng* from Wenshan [J]. J Northwest For

- Univ (西北林学院学报), 2015, 30: 158-163.
- [26] Wu XL, Wang Y, Liu F, et al. Identification of *Coptis chinensis* root rot disease pathogenic *Fusarium* spp. fungi [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2020, 45: 1323-1328.
- [27] Zhang JJ, Zhang N, Hua S, et al. Identification and pathogenicity detection of the pathogen of ginseng root rot [J]. Mol Plant Breeding (分子植物育种), 2021, 19: 6448-6452.
- [28] Wang Y, Lu BH, Yang LN, et al. First report of *Fusarium armeniacum* causing stem and root rot on *Platycodon grandiflorus* in Jilin Province, China [J]. Plant Dis, 2015, 99: 1644.
- [29] Han XY, Liu LM, Liang RY, et al. Screening of *Platycodon grandiflorum* root rot control agents [J]. Spec Econ Anim Plants (特种经济动植物), 2024, 27: 20-22.
- [30] Xu WF, Li HY, Zhang H, et al. Efficacy and its mechanism of bacterial strain HX0037 on the control of anthracnose disease of *Trichosanthes kirilowii* Maxim [J]. Biotechnol Bull (生物技术通报), 2024, 40: 228-241.
- [31] Wang ZW, Liu ZM. Advance in study and application on chitinase produced by microbes [J]. Lett Biotechnol (生物技术通讯), 2006, 17: 439-442.
- [32] Matilla MA, Drew A, Udaondo Z, et al. Genome sequence of *Serratia plymuthica* A153, a model rhizobacterium for the investigation of the synthesis and regulation of haterumalides, zeamine, and andrimid [J]. Genome Announc, 2016, 4: e00373-16.
- [33] Hong CL, Chen XH, Zhu FX, et al. Study on the control effect of biocontrol bacterial fertilizer on watermelon fusarium wilt [J]. Mod Agric Sci Technol (现代农业科技), 2012, 14: 93-96.
- [34] Shen SS, Chang SX, Zhu HY, et al. Growth promoting and root colonization ability of *Serratia plymuthica* A21-4 and its effect on induced resistance in pepper against *Phytophthora blight* [J]. Acta Phytopathol Sin (植物病理学报), 2013, 43: 636-642.
- [35] He Y, Xu SY, Hu XJ, et al. A plant growth-promoting bacterium in *Atractylodes macrocephala* Koidz: isolation, identification, and optimization of culture conditions [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2023, 50: 3983-3996.
- [36] Kim HJ, Kim YC. Complete genome resource of *Serratia plymuthica* C-1 that causes root rot disease in Korean Ginseng [J]. Plant Dis, 2021, 105: 202-204.
- [37] Gong AD, Wang GZ, Sun YK, et al. Dual activity of *Serratia marcescens* Pt-3 in phosphate-solubilizing and production of antifungal volatiles [J]. BMC Microbiol, 2022, 22: 26.
- [38] Elsherbiny EA, Dawood DH, Safwat NA. Antifungal action and induction of resistance by β -aminobutyric acid against *Penicillium digitatum* to control green mold in orange fruit [J]. Pestic Biochem Physiol, 2021, 171: 104721.
- [39] Li Y, Ou T, Jiao WL, et al. Isolation and identification of an endophytic *Bacillus subtilis* from mulberry and preliminary exploration of its biocontrol mechanisms against mulberry fruit sclerotinose [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2024, 64: 3253-3268.
- [40] Vacheron J, Desbrosses G, Bouffaud ML, et al. Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning [J]. Front Plant Sci, 2013, 4: 356.
- [41] Deng XX, Xie X, Pan YM, et al. Screening and identification of strains against *Fusarium solani* isolated from *Camellia sinensis* and analysis of its biocontrol and growth promotion characteristics [J]. J Tea Sci (茶叶科学), 2023, 43: 67-77.