

一株白芷根内生菌 BG2 分离鉴定及发酵液稳定性分析

李凤娇, 张冰, 冯梦格, 赫丁轩*

信阳农林学院, 河南 信阳 464000

DOI: 10.61369/ETR.2026130045

摘 要 : 本研究旨在分离鉴定白芷根内具有斑枯病拮抗能力的内生真菌并分析其生物学特性。通过组织分离法从白芷根部分离内生菌, 平板对峙实验筛选拮抗菌株, 结合分子生物学鉴定种属, 并探究其发酵液在不同处理下的稳定性。结果显示, 从白芷根部共分离出 10 株菌株, 其中 3 株对斑枯病病原菌有抑制作用, 代表菌株 BG2 鉴定为镰刀菌属茄镰刀菌 (*Fusarium solani*), 抑菌率达 62.49%。该菌株发酵液中的抑菌物质在 pH 5~7、温度 40℃、紫外照射 30 min 及有机溶剂处理下稳定性较好, 对木瓜蛋白酶和胃蛋白酶则较为敏感。本研究为白芷斑枯病的生物防治提供了新的有效途径, 也为挖掘白芷内生真菌资源奠定基础。

关 键 词 : 白芷根; 斑枯病; 内生真菌; 发酵液

Isolation, Identification, and Fermentation Stability Analysis of Endophytic Bacterium BG2 from *Angelica dahurica* Root

Li Fengjiao, Zhang Bing, Feng Mengge, He Dingxuan*

Xinyang Agriculture and Forestry College, Xinyang, Henan 464000

Abstract : This study aims to isolate and identify endophytic fungi with antagonistic ability against leaf blight in the roots of *Angelica dahurica* and analyze their biological characteristics. Isolation of endophytic bacteria from the roots of *Angelica dahurica* using tissue isolation method, screening of antagonistic strains through plate confrontation experiment, identification of species based on molecular biology, and exploration of the stability of its fermentation broth under different treatments. The results showed that a total of 10 strains were isolated from the roots of Bai Zhi, among which 3 strains had inhibitory effects on the pathogen of leaf blight. The representative strain BG2 was identified as *Fusarium solani* in the genus *Fusarium*, with an inhibition rate of 62.49%. The antibacterial substances in the fermentation broth of this strain have good stability under pH 5–7, temperature 40 °C, UV irradiation for 30 minutes, and organic solvent treatment, and are more sensitive to papain and pepsin. This study provides a new and effective approach for the biological control of Bai Zhi spot disease, and lays the foundation for exploring the endophytic fungal resources of Bai Zhi.

Keywords : Bai Zhi Gen; spot blight disease; endophytic fungi; fermentation broth

引言

白芷是我国重要传统中药材, 根为主要药用部位, 具祛风除湿、通窍止痛、消肿排脓等功效^[1], 临床应用广泛, 其水煎剂还兼具杀虫、灭菌作用。斑枯病是影响白芷生长、产量和品质的重要病害, 病原菌为白芷壳针孢菌^[2-5], 主要危害叶片, 形成病斑并导致叶片枯萎, 不仅降低药材有效成分含量, 还给中药材产业造成巨大经济损失。

植物内生菌是生活于健康植物组织器官内部的微生物^[6-7], 在植物生长发育、抗病虫害、增强环境适应性等方面发挥重要作用^[8], 可通过竞争营养、产生抗生素等方式抑制病原微生物生长^[9], 其代谢产物为植物病害生物防治提供了新思路。本研究采用组织切片法分离白芷根内生真菌^[10-11], 平板对峙法筛选斑枯病拮抗菌, 结合形态学与 DNA 测序鉴定种属, 并考察其发酵液在不同处理下的抑菌活性变化, 以期对白芷斑枯病生物防治提供理论与实践支撑。

基金项目: 国家级大学生创新创业训练计划 (202511326009); 河南省重点研发专项 (241111311400); 河南省科技攻关计划 (252102110216); 河南省高等学校重点科研项目 (25A350005); 河南省本科高校青年骨干教师培养计划 (2025GGJS157)。

作者简介: 李凤娇, 研究方向为天然产物的提取与分析研究。

通讯作者: 赫丁轩, 副教授, 从事中药活性成分研究。

一、材料与方法

(一) 试验材料

1. 供试菌株

白芷斑枯病原菌保存于信阳农林学院药学院药物分析实验室；白芷取自信阳农林学院药园。

2. 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基：马铃薯 200.0 g、琼脂粉 20.0 g、葡萄糖 20.0 g，蒸馏水定容至 1 L，121℃高压灭菌 30 min。马铃薯葡萄糖 (PDB) 液体培养基：马铃薯 200.0 g、葡萄糖 20.0 g，蒸馏水定容至 1 L，121℃高压灭菌 30 min。

3. 主要试剂及仪器

真菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒 (上海生工)；SW-CJ-2F 超净工作台、DHG-9050A 电热恒温培养箱、JE-2002 电子天平、JTL-450 高压灭菌锅、ZHTY-70E 振荡培养箱、N5191100 光学显微镜。

(二) 试验方法

1. 内生菌的分离

采用组织切片法，将白芷根流水洗净、晾干，超净工作台内切成 1 cm×1 cm 组织块，经 75% 乙醇漂洗 30 s、无菌水冲洗 3 次，再用 1% 次氯酸钠漂洗 30 s、无菌水冲洗 6 次，滤纸吸干水分。将组织块置于 PDA 平板，28℃培养 2~3 d，待边缘长出菌丝后，挑取形态不同的菌丝转接至 PDA 平板，纯化三代，获得内生真菌纯菌株。

2. 拮抗菌的筛选

采用平板对峙法，以白芷斑枯病原菌为靶标菌。在 PDA 平板距中心 2 cm 处对称接种靶标菌与待测内生菌，以仅接靶标菌为对照组，每组 3 次重复，28℃恒温培养至对照组菌丝长满平板。观察抑菌现象，测量菌落直径并计算抑菌率，公式为：抑制率 (%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100。

3. 拮抗菌的分子生物学鉴定

采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取 BG2 菌株 DNA，扩增 ITS 基因片段，扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后送上海生工测序。PCR 反应体系 25 μL，含 dNTP Mixture 12.5 μL、引物 ITS1/ITS4 各 1 μL、ddH₂O 9.5 μL、DNA 模板 2 μL；反应条件：95℃预热 5 min，94℃变性 30 s、57℃退火 30 s、72℃延伸 90 s，30 个循环，72℃终延伸 10 min，4℃保温。将测序结果在 NCBI 进行 BLAST 比对，用 MEGA 7.0 软件以临近法构建系统发育树，确定菌株种属。

4. 拮抗菌 BG2 的发酵液稳定性测试

发酵液制备：将 BG2 接种至 50 mL PDB 培养基，28℃、120 r/min 振荡培养 48 h 得种子液，以 10% 接种量接入 100 mL PDB 培养基，同条件振荡培养 2~3 d，培养液经 0.22 μm 滤膜过滤，获得无菌发酵液。

酸碱处理：用 1 mol/L HCl 和 NaOH 将发酵液 pH 调至 3、5、7、9、11，室温静置 6 h 后调回原 pH，每组 3 次重复，以未处理发酵液为对照，测定抑菌活性。

热处理：取 10 mL 发酵液于试管，分别在 40、60、80、100℃水浴及 121℃高压灭菌处理 60 min，每组 3 次重复，设未处理对照，测定抑菌活性。

紫外处理：取 5 mL 发酵液于试管，置于 30 W 紫外灯下分别照射 30、60、90、120、150 min，每组 3 次重复，设未处理对照，测定抑菌活性。

酶处理：取 2 份 50 mL 发酵液，分别加入 5 mg 木瓜蛋白酶、胃蛋白酶，37℃水浴孵育 2 h，pH 调至 7.0，每组 3 次重复，设未处理对照，测定抑菌活性。

有机溶剂处理：向含 5 mL 甲苯、氯仿、正丁醇、丙酮、甲醇的试管中各加入 1 mL 发酵液，40℃减压浓缩后复溶于 1 mL 无菌水，每组 3 次重复，设未处理对照，测定抑菌活性。

5. 数据分析

采用 Excel 2019 和 SPSS 20.0 进行数据统计，通过 LSD 最小显著性差异法进行单因素方差分析，不同字母表示差异显著，相同字母表示差异不显著。

二、结果与分析

(一) 拮抗菌的分离与筛选

从白芷根部共分离出 10 株内生真菌，经平板对峙试验筛选，得到 3 株对白芷斑枯病原菌有明显抑制作用的菌株 BG2、BG8、BG9，其中 BG2 抑菌效果最优，抑菌率达 62.49%。

(二) 拮抗菌 BG2 的分子生物学鉴定

将 BG2 菌株 ITS 序列测序结果在 NCBI 数据库比对，构建系统发育树 (图 1)，结果显示该菌株与茄镰刀菌 (*Fusarium solani*) 相似性最高，鉴定为镰刀菌属茄镰刀菌 (*Fusarium solani*)。

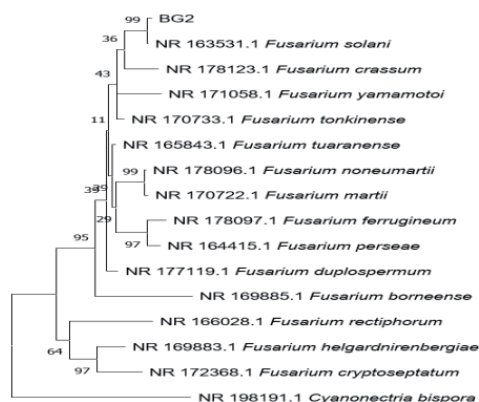


图 1 拮抗菌 BG2 的系统发育树

(三) 拮抗菌 BG2 的发酵液稳定性测试

1. 酸碱度对 BG2 发酵液的稳定性影响

如图 2 所示，BG2 发酵液抑菌率随 pH 升高或降低呈下降趋势。pH 5~7 时抑菌效果较好，抑菌率 44.68%~51.41%，与对照相比仅下降 0.4%~7.13%；pH 3 时抑菌率显著下降，较对照降低 36.31%；pH 11 时抑菌率最低，较对照下降 35.18%。表明发酵液中抑菌物质对强酸强碱耐受性差，对酸碱条件较敏感。

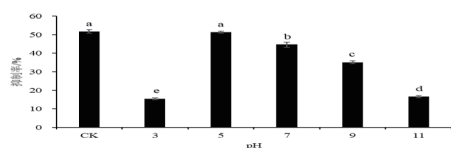


图2 酸碱度对拮抗菌 BG2 发酵液的稳定性影响

2. 温度对 BG2 发酵液的稳定性影响

如图 3 所示，随温度升高，BG2 发酵液抑菌率逐渐下降。40℃处理对抑菌作用影响较小，抑菌物质稳定，较对照仅下降 1.3%；60℃~121℃处理后抑菌率显著下降9.01%~19.31%，121℃时抑菌率最低（22.01%），但仍保持一定抑菌效果，说明发酵液具有一定热稳定性。

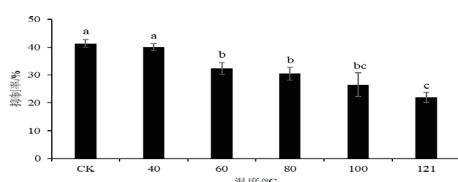


图3 温度对拮抗菌 BG2 发酵液的稳定性影响

3. 紫外线对 BG2 发酵液的稳定性影响

如图 4 所示，30 W 紫外灯照射下，发酵液抑菌率随照射时间延长逐渐下降。照射 30 min 内可保持较好抑菌活性，较对照仅下降 0.35%；照射时间超 30 min 后，抑菌率显著下降，60、90 min 时抑菌率分别为 15.78%、12.88%，较对照下降 24.06%、26.96%；120、150 min 时抑菌率为 11.91%、10.69%，较对照下降 27.93%、29.15%。表明抑菌物质对紫外线较敏感，紫外照射对发酵液稳定性影响较大。

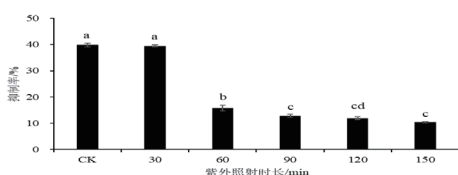


图4 紫外线对拮抗菌 BG2 发酵液的稳定性影响

4. 蛋白酶对 BG2 发酵液的稳定性影响

如图 5 所示，发酵液经木瓜蛋白酶和胃蛋白酶处理后，抑菌率均下降且数值相近。木瓜蛋白酶处理后抑菌率为 36.63%，较对照下降 8.05%；胃蛋白酶处理后抑菌率为 36.14%，较对照下降 8.54%。说明抑菌物质对两种蛋白酶均敏感，发酵液中可能含有蛋白类抑菌效应物。

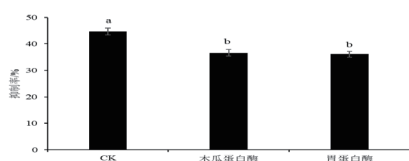


图5 蛋白酶对拮抗菌 BG2 发酵液的稳定性影响

5. 有机溶剂对 BG2 发酵液的稳定性影响

如图 6 所示，发酵液经不同有机溶剂处理后抑菌率均略有下降，除甲醇、丙酮外，与对照差异不显著，且各处理间抑菌率相差较小。其中对甲醇、丙酮较敏感，处理后抑菌率分别为 37.85%、33.39%，较对照下降 3.47%、7.93%；对甲苯、氯仿、正

丁醇相对不敏感，处理后抑菌率为 39.15%、39.80%、38.68%，较对照仅下降 2.17%、1.52%、2.64%。表明发酵液中抑菌物质对有机溶剂敏感性较低，具有较好的有机溶剂稳定性。

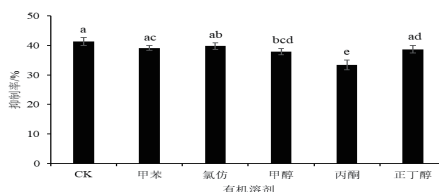


图6 有机溶剂对拮抗菌 BG2 发酵液的稳定性影响

三、讨论与结论

白芷斑枯病严重影响其产量和药用品质，化学农药防治易引发环境污染和病原菌抗药性，因此利用植物内生菌开展生物防治成为研究热点。

本研究筛选得到的拮抗菌 BG2 为镰刀菌属茄镰刀菌（*Fusarium solani*），其对白芷斑枯病病原菌的抑菌率达 62.49%，发酵液中抑菌物质具有特定的稳定性特征：在 pH 5~7、40℃低温、紫外照射 30 min 内及甲苯、氯仿等有机溶剂处理下稳定性较好；对强酸强碱、高温、长时间紫外照射较敏感；同时对木瓜蛋白酶和胃蛋白酶敏感，提示发酵液中可能存在蛋白类抑菌物质。

本研究明确了茄镰刀菌 BG2 的抑菌活性及发酵液的稳定性条件，为该菌株在白芷斑枯病生物防治中的实际应用提供了理论依据，也为进一步分离纯化其抑菌物质、开发新型生物农药奠定了基础。后续可深入研究抑菌物质的结构与作用机制，优化发酵条件，提升其抑菌效果与环境适应性，推动白芷产业绿色防控体系的构建。

参考文献

- [1] 王家鹏. 白芷止痛有良效 [J]. 家庭医学, 2023, (01): 68.
- [2] 孙国志, 段宝忠, 黄文昊, 等. 基于活性成分比例一致性的白芷药材质量评价数据挖掘 [J]. 中草药, 2023, 54(16): 5329-5338.
- [3] 李冰, 宋欢, 王露露, 等. 白芷的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 人参研究, 2022, 34(06): 50-52.
- [4] 梅全喜. 梅全喜论中药全集 [M]. 中国中医药出版社: 2022. 395.
- [5] 冉阳露. 壳针孢斑枯病对罗布麻药用成分的影响及其化学防治 [D]. 兰州市: 兰州大学, 2023.
- [6] 白娜娜, 姜海燕, 狄佳麟. 植物内生真菌生防作用研究进展 [J]. 林业调查规划, 2024, 49(01): 163-166.
- [7] 张静怡, 赵龙飞, 刘梦洁. 植物内生菌多样性、功能及应用研究进展 [J]. 微生物学报, 2025, 65(04): 1446-1468. DOI: 10.13343/j.cnki.wsxb.20250012.
- [8] 覃炜棋, 高乞, 梁莹, 等. 木本药用植物内生真菌研究进展 [J/OL]. 中药材, 2024, (12): 3177-3183.
- [9] 袁桐, 杜欣健, 张国琛, 等. 内生真菌与宿主植物相互作用及代谢产物研究 [J]. 青海农林科技, 2024, (04): 57-61+68.
- [10] 苏杭, 成胜, 孟祥佳, 等. 半夏立枯病拮抗内生细菌的分离鉴定及功能分析 [J]. 南方农业学报, 2023, 54(11): 3277-3291.
- [11] 李枢妍, 阳黎恒, 肖雪婷, 等. 一株香蕉枯萎病拮抗菌的筛选、鉴定及生防效果研究 [J]. 南方农业学报, 2021, 52(07): 1826-1834.
- [12] 姚晓玲, 马春旭, 周德来, 等. 党参农药残留及限量研究进展 [J]. 世界中医药, 2024, 19(24): 3909-3914.