

抗人参根腐病生防菌剂的研发与评价

黄贻杰¹, 董林林^{2*}, 尉广飞², 张小会³

(1. 大理大学, 云南大理 671003; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 中国医学科学院北京协和医学院医学信息研究所, 北京 100020)

[摘要] **目的:**研发安全有效的抗人参根腐病微生物菌剂。**方法:**平板对峙试验筛选三七内生菌,形态学及分子生物鉴定拮抗菌株,单因素试验优选菌株发酵条件,响应面法优化微生物菌剂的载体及助剂配比制定生产工艺,通过对峙及盆栽试验验证菌剂验证防治效果。**结果:**平板对峙试验筛选出一株具有显著抗根腐病的菌株 *Fusarium pseudoanthophilum*,其抑菌率为53.33%。单因素试验结果表明 *F. pseudoanthophilum* 的发酵条件为发酵时间 60 h,培养温度 26 °C,最适摇瓶发酵转速 120 r·min⁻¹,pH 6.5。响应面优化试验结果表明,草炭 60.00 g,羧甲基纤维素钠 3.50 g,海藻酸钠 4.76 g 时,活菌数达到最大为 5.23×10⁹ cfu·g⁻¹,载体及助剂对活菌数的影响程度为草炭>羧甲基纤维素钠>海藻酸钠。菌剂对峙试验结果表明,菌剂质量浓度>1.00 g·L⁻¹时,对根腐病原菌尖孢镰刀菌具有显著的抑制作用且抑菌率>42.3%。盆栽试验结果表明,生防菌剂接种 28 d后,显著降低了人参幼苗根腐病的发病率(66.99%)和病情指数(61.69%),且显著促进了人参幼苗的叶长(33.04%)和鲜重(34.48%)。**结论:***F. pseudoanthophilum* 菌剂具有较好的根腐病防治效果,值得进一步开发与利用。

[关键词] 人参;三七;内生菌;根腐病;发酵;生防菌剂

[中图分类号] R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)02-0182-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211516

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20211102.0937.001.html>

[网络出版日期] 2021-11-03 9:15

Development and Evaluation of Biocontrol Agents Against *Panax ginseng* Root Rot

HUANG Yi-jie¹, DONG Lin-lin^{2*}, WEI Guang-fei², ZHANG Xiao-hui³

(1. Dali University, Dali 671003, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences,
Beijing 100700, China; 3. Institute of Medical Information,

Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100020, China)

[Abstract] **Objective:** To develop safe and effective microbial agents against *Panax ginseng* root rot. **Method:** *P. notoginseng* endophytes were screened in plate confrontation tests, followed by morphological and molecular biological identification of antagonistic strains, optimization of strain fermentation conditions in a single factor test, and determination of optimal carriers and auxiliary agents of the microbial agent and their ratio using response surface methodology for formulating the production process. The prevention and control effects of the microbial agent were verified in the confrontation and pot culture experiments. **Result:** The plate confrontation test yielded a strain named *Fusarium pseudoanthophilum* with significant resistance to root rot, and its antibacterial rate was 53.33%. According to the single factor test, the fermentation conditions of *F. pseudoanthophilum* were determined to be fermentation time 60 h, fermentation temperature 26 °C, speed 120 r·min⁻¹, and pH 6.5. The response surface optimization results showed that the number of viable bacteria reached

[收稿日期] 20210908(005)

[基金项目] 北京市科技新星项目(Z181100006218020);国家中医药管理局项目(GZYYGJ2020013)

[第一作者] 黄贻杰,硕士,从事中药资源学研究,E-mail:17671741073@163.com

[通信作者] *董林林,博士,副研究员,从事中药资源学研究,Tel:010-57203877,E-mail:lldong@icmm.ac.cn

the maximum (5.23×10^9 cfu·g⁻¹) when the peat was 60.00 g, sodium carboxymethylcellulose 3.50 g, and sodium alginate 4.76 g. The influences of carriers and auxiliary agents on the number of viable bacteria were sorted by degree in a descending order as follows: peat>sodium carboxymethylcellulose >sodium alginate. The confrontation test results showed that when the microbial agent concentration was greater than 1.00 g·L⁻¹, it had a significant inhibitory effect on the root rot pathogen *F. oxysporum* and the inhibitory rate was more than 42.3%. As demonstrated by the pot culture experiment, the inoculation of biocontrol agent for 28 d significantly reduced the incidence (66.99%) of root rot in *P. ginseng* seedlings and disease index (61.69%) and increased their leaf length (33.04%) and fresh weight (34.48%). **Conclusion:** *F. pseudoanthophilum* inoculant is efficient in preventing and controlling the root rot, making it worthy of further development and utilization.

[Keywords] *Panax ginseng*; *P. notoginseng*; endophytes; root rot; fermentation; biocontrol agent

人参为五加科人参属植物人参的干燥根,有“百草之王”的美誉。人参生长周期较长,喜阴凉,因此很容易遭受各种病原菌的侵染。人参根腐病是危害人参最为严重的病害之一,主要侵染人参的根部和叶片,造成根部软化腐烂、叶片褪绿变黄,萎蔫死亡^[1-2]。人参病害的普遍发生和流行,严重影响了人参产业健康发展。根腐病主要包括化学防治、农业防治和生物防治等^[3-4]。化学防治见效快,但容易造成环境污染和耐药性,不能从根本上解决根腐病现象^[5]。农业防治主要运用绿肥回田、良种选育、合理布局和适时松土等手段减少病害^[2],但费时费力,不适合大面积作物推广^[6]。生物防治在根腐病防治中效果显著,尤其是拮抗菌的利用,已经成为此类病害的重要防治方法之一^[7]。根腐病安全低毒的防治方式是保障中药材安全有效的条件之一,因此通过拮抗菌株筛选及生防菌剂的开发是当前人参根腐病防治研究的热点。

植物内生菌是存在于健康植物组织内部的细菌、真菌和放线菌,与宿主植物形成互利共生的关系^[8],在促进植物生长和提高植物抗逆能力方面表现出巨大潜力,具有重要的应用前景^[9]。植物内生菌通过生物固氮和调节植物激素等作用促进宿主植物的生长和产量的增加^[10]。从植物内生菌发酵液中提取的次生代谢产物具有抗菌、促生长、抗病毒和抗氧化等多种功能,促进了新型生物菌剂的开发和研制^[11-13]。同时,内生菌产生的次级代谢产物有利于病虫害生物防治和污染土壤的生物修复,进而减少化肥和化学药剂的使用,促进农业的可持续发展^[14]。因此基于内生菌拮抗菌的筛选及生防菌剂的研发是根腐病防治的有效方法及途径。目前有关内生菌对药用植物影响的研究多数是基于其次生代谢产物而进行的,以内生菌为原料的微生物菌剂研究不多。本研究从前期实验室分离的三七

内生菌中筛选拮抗根腐病的生防菌,经过发酵培养,载体助剂优化后,在盆栽试验下验证抗人参根腐效果,旨在为人参开发特异性微生物菌剂奠定基础。

1 材料

三七内生菌(中国中医科学院中药研究所实验室保存,从云南三七种植基地三七样品根、茎、叶中分离得到);人参根腐病致病菌尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*,由实验室分离并保存菌株^[15]。

供试人参种子由盛实百草药业有限公司提供,经中国中医科学院中药研究所董林林副研究员鉴定,确认为五加科人参属植物人参 *Panax ginseng* 的种子。

真菌采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)进行培养,马铃薯200 g,葡萄糖20 g(国药集团化学试剂有限公司,批号20180327),琼脂13 g(国药集团化学试剂有限公司,批号20180722),蒸馏水溶解并定容至1 000 mL。细菌采用Luria-Bertani(LB)进行培养,胰蛋白胨10 g(北京索莱宝科技有限公司,批号20190424),酵母提取物5 g(北京奥博星生物技术有限公司,批号20190721),氯化钠10 g(北京化工厂有限责任公司,批号20190807),蒸馏水溶解并定容至1 000 mL,调pH至7.0。

FastDNA[®] Spin Kit for Soil试剂盒(MP BIO公司,批号20200731),真菌通用引物(北京擎天生物科技有限公司,批号20200824),乳酸酚棉蓝染色液(福州飞净生物科技有限公司,批号20200526),草炭(石家庄圣田生物科技有限公司,批号20200324);高岭土,硅藻土,羧甲基纤维素钠,聚山梨酯-80,聚四氟乙烯浓缩分散液,海藻酸钠,糊精,可溶性淀粉(上海源叶生物科技有限公司,批号分别为20200823,20200826,20200605,20200426,20200625,20200613,202000630,20200327)。

ME203E/02型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),DL-CJ-1NP-II型无菌操作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司),FR-2L型三目荧光显微镜(北京世纪科信科学仪器有限公司),2720型聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems®公司),DYY-8C型电泳仪(北京六一仪器厂),HYC-C型恒温振荡箱(苏州培英实验设备有限公司),DH-420型电热恒温培养箱(北京科伟永兴仪器有限公司)。

2 方法

2.1 根腐拮抗菌的筛选 采用平板对峙法筛选病原尖孢镰刀菌的拮抗菌株^[16],将尖孢镰刀菌在PDA平板培养5 d后,用直径1.00 cm打孔器取出菌饼转到新的PDA培养基中。同时三七内生细菌及真菌分别培养在LB及PDA固体培养基上,挑取能稳定生长的单菌落接种于PDA培养基距离中心2.50 cm处的4个点,进行对峙试验筛选具有拮抗作用的菌株。以培养皿中心只接种尖孢镰刀菌菌丝块的PDA平板为对照。培养皿封口后置于28 °C培养箱中培养5 d,每个菌株3次重复,测定其培养皿中尖孢镰刀菌菌落直径,并计算抑菌率。抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌柄直径)×100%。

2.2 拮抗功能菌的鉴定

2.2.1 拮抗菌株形态学鉴定 将筛选得到的拮抗菌株接种于PDA平板上,28 °C培养5 d,观察单菌落形态、色泽等形态特征。同时采用显微观察进行形态学鉴定,采用透明胶带法^[17],挑取生长状况良好的菌丝、孢子制成临时装片,于显微镜下观察菌丝形态、孢子形状、孢子隔膜及隔膜数量等性状,并依据《真菌鉴定手册》^[18]进行鉴定。

2.2.2 拮抗菌株分子生物学鉴定 采用FastDNA® Spin Kit for Soil(MPBIO)试剂盒提取分离的真菌的总DNA。使用真菌通用引物ITS1上游(5'-CTTGTCATTTAGAGGAAGTAA-3')和ITS2下游(5'-GCTGCGTTCTTCATCGATGC-3'),扩增获ITS2 rRNA基因片段235 bp^[19]。PCR反应条件:95 °C预变性3 min;95 °C变性30 s,52 °C退火30 s,72 °C延伸45 s,最后72 °C延伸10 min,共计30个循环。获得PCR产物经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测合格后,用胶回收试剂盒进行切胶回收,PCR产物送美吉生物医药科技有限公司测序。测序结果与美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库中序列,利用Blast在线工具进行同源比对分析,使用MEGA

7.0软件构建系统发育树。

2.3 拮抗菌株适宜发酵条件筛选 将拮抗菌株接种于PDA培养基中,在28 °C恒温培养5 d,待长出明显的单菌落后,用直径1.00 cm的打孔器取出菌饼,将其放入PDA培养基中,于28 °C,180 r·min⁻¹摇瓶进行培养,用无菌水调整菌液浓度为1×10⁸ cfu·mL⁻¹,存于4 °C冰箱待用。

单因素试验考察培养时间、摇瓶转速、温度及初始pH对菌株发酵的影响。活菌数用平板稀释涂布法统计,方法参考《微生物学实验》^[20],每组3次重复。

2.4 生防菌剂载体及助剂配比筛选

2.4.1 单因素试验筛选载体材料和分散剂、保护剂

取拮抗菌株发酵液调节活菌数为1×10⁸ cfu·mL⁻¹,分别筛选载体材料(草炭、硅藻土、高岭土),分散剂(聚山梨酯-80,羧甲基纤维素钠,聚四氟乙烯浓缩分散液),保护剂(糊精、海藻酸钠、可溶性淀粉),对菌剂活菌数的影响,确定该拮抗菌株适宜的载体材料、分散剂以及保护剂。保护剂处理在紫外灯下照射6 h。每组3次重复。

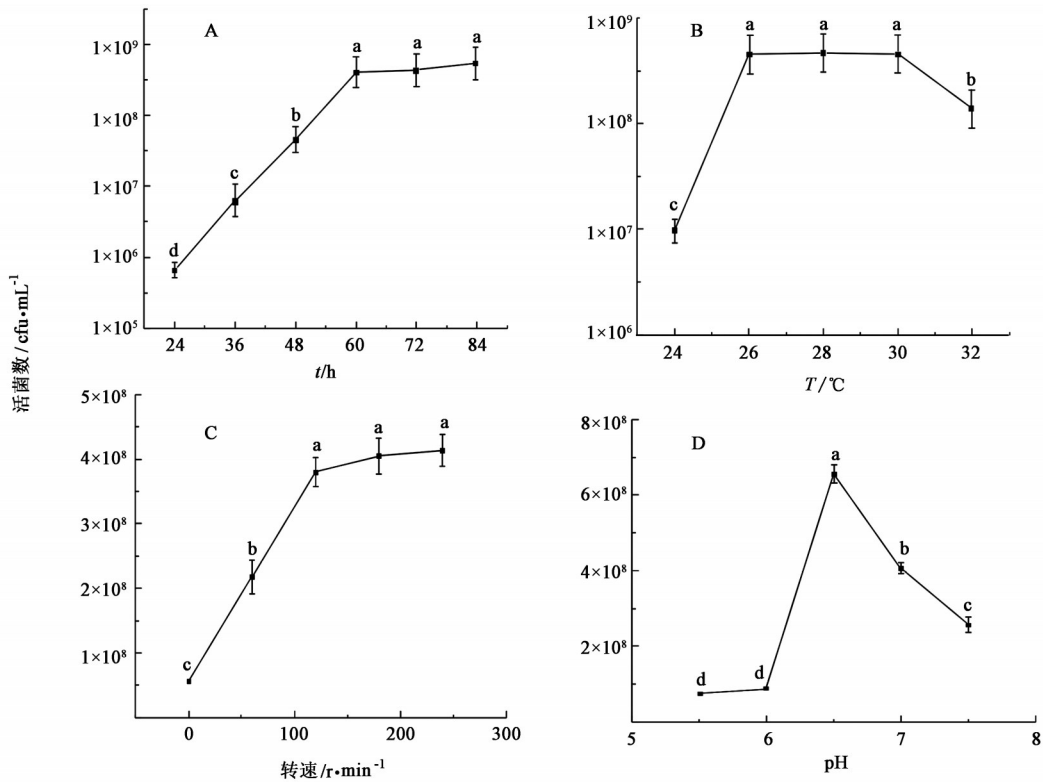
2.4.2 响应面设计 由单因素筛选出的载体及助剂为基础,考察草炭、羧甲基纤维素钠、海藻酸钠3个因素作为响应因变量,利用Design Expert 8.0.6软件,按照Box-Behnken的中心组合试验设计原理,以菌剂中活菌数为响应值,通过响应面曲面分析进行试验条件的优化,从而得到最佳的配比工艺。响应面设计因素及草炭(20,40,60 g),羧甲基纤维素钠(1,3,5 g),海藻酸钠(1,3,5 g)。

2.5 生防菌剂的制备 参考蒋永梅^[21]的方法略有改动。分别称取不同载体及助剂组合风干样,置于灭菌锅120 °C,间歇灭菌2次。待灭菌完的基质在无菌操作台降至室温后倒入到玻璃瓶中,加入适量的无菌水混合均匀后补加菌液50 mL,搅拌均匀,盖上盖。一切操作均在无菌条件下进行。将制作好的菌剂置于28 °C培养箱中培养7 d,取出风干,打粉成型,待用。采用稀释涂布法测定活菌数^[20]。

2.6 生防菌剂效果验证

2.6.1 对峙试验验证 取微生物菌剂1.00 g于具塞试管中,无菌水涡旋混匀并分别调节菌液质量浓度为100.00,10.00,1.00,0.10,0.01 g·L⁻¹。以尖孢镰刀菌为病原指示菌,采用对峙试验验证菌剂的抑菌效果^[16],一切操作均在无菌条件下进行。

2.6.2 盆栽试验验证 将灭菌的腐殖土装入塑料材质的育苗盘,筛选出芽一致且表面消毒的人参种



A. 时间; B. 温度; C. 转速; D. pH; 不同小写字母表示 $P < 0.05$

图3 菌株 *Fusarium pseudoanthophilum* 在各因素条件下生长曲线 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Growth curve of strain *Fusarium pseudoanthophilum* under various factors ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 载体材料、分散剂及保护剂筛选 不同载体、分散剂和保护剂对菌株 *F. pseudoanthophilum* 活菌数的影响, 见表1。草炭作为载体时, 活菌数最高, 达到 3.63×10^9 cfu·g⁻¹, 显著高于其他载体, 因此选用草炭作为菌剂载体。羧甲基纤维素钠作为分散剂时, 活菌数最高, 达到 3.56×10^9 cfu·g⁻¹, 显著高于其他分散剂, 因此选用羧甲基纤维素钠作为菌剂分散剂。海藻酸钠作为保护剂时, 活菌数最高, 达到 3.67×10^9 cfu·g⁻¹, 显著高于其他保护剂, 因此选用海藻酸钠作为菌剂保护剂。结果表明, 选择优良载体助剂的组合为草炭、羧甲基纤维素钠和海藻酸钠。

3.4 生防菌剂载体及助剂配比优化 Box-Behnken 效应面因素水平及结果, 见表2。经过 Design-expert 8.0.6 软件多元回归拟合, 得到菌株活菌数的预测模型方程 $Y = 3.86 + 1.02A + 0.28B + 0.27C - 0.055AB + 1.2AC - 0.052BC + 0.16A^2 - 0.40B^2 - 0.22C^2$, 其中 Y 为活菌数, A 为载体含量, B 为分散剂含量, C 为保护剂含量。

回归方程方差分析见表3。整体模型的 $P < 0.01$, 表明该二次方程模型高度显著; 失拟项 $F = 1.82, P = 0.2839 (P > 0.05)$, 表明方程模型误差较小。决定系数为 0.9494, 表明其因变量与全体自变量之

表1 载体及助剂单因素考察 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Single factor investigation of carrier and adjuvant ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 材料 | 名称 | 活菌数/($\times 10^9$) cfu·g ⁻¹ |
|-----|------------|---|
| 载体 | 草炭 | 3.63±0.24 ^a |
| | 硅藻土 | 2.12±0.11 ^c |
| | 高岭土 | 2.68±0.15 ^b |
| 分散剂 | 聚山梨酯-80 | 3.12±0.15 ^b |
| | 羧甲基纤维素钠 | 3.56±0.13 ^a |
| | 聚四氟乙烯浓缩分散液 | 2.56±0.14 ^c |
| 保护剂 | 糊精 | 3.34±0.16 ^b |
| | 海藻酸钠 | 3.67±0.22 ^a |
| | 可溶性淀粉 | 2.81±0.18 ^c |

注: 同一材料同一列不同小写字母表示 $P < 0.05$ (表4, 5同)。

间的多元回归关系显著, 表明回归方程对试验拟合情况较好, 可用该回归方程对助剂不同配比下的菌株活菌数进行预测。由 F 值的大小可知, 对活菌数影响强弱的顺序依次是载体 > 分散剂 > 保护剂。

根据回归分析结果绘制出3个因素对菌剂活菌数的影响及其交互作用, 见图4。三维响应面图和等高线图解释了活菌数与所涉及的3个因素的关系。在交互项对活菌数的影响中, 载体与分散剂之

表2 Box-Behnken效应面实验因素水平及结果

Table 2 Box-Behnken effect surface experimental factor levels and results

| 试验号 | A载体/g | B分散剂/g | C保护剂/g | Y活菌数/($\times 10^9$) cfu·g ⁻¹ |
|-----|-------|--------|--------|--|
| 1 | 60 | 3 | 1 | 4.24 |
| 2 | 20 | 3 | 1 | 2.83 |
| 3 | 60 | 5 | 3 | 5.11 |
| 4 | 40 | 3 | 3 | 3.71 |
| 5 | 60 | 3 | 5 | 5.01 |
| 6 | 40 | 3 | 3 | 4.12 |
| 7 | 60 | 1 | 3 | 4.54 |
| 8 | 40 | 5 | 5 | 3.70 |
| 9 | 40 | 5 | 1 | 3.21 |
| 10 | 40 | 1 | 1 | 2.73 |
| 11 | 20 | 1 | 3 | 2.01 |
| 12 | 40 | 3 | 3 | 3.62 |
| 13 | 40 | 3 | 3 | 4.12 |
| 14 | 40 | 3 | 3 | 3.71 |
| 15 | 20 | 3 | 5 | 3.11 |
| 16 | 40 | 1 | 5 | 3.32 |
| 17 | 20 | 5 | 3 | 2.80 |

表3 回归方程方差分析

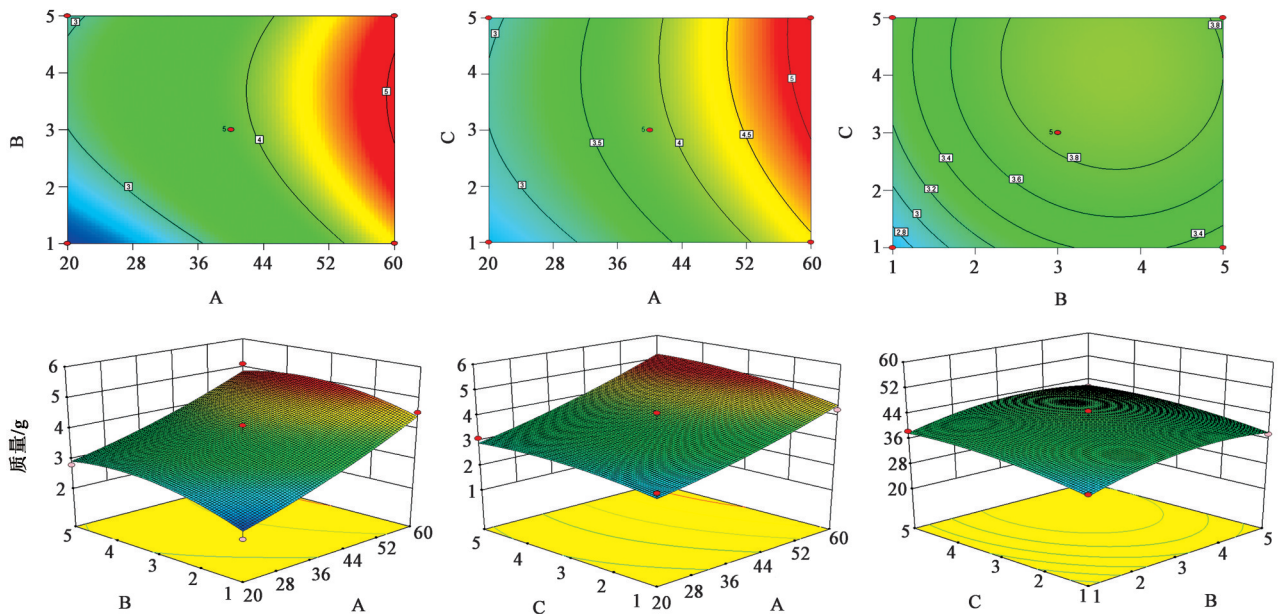
Table 3 Analysis of variance of regression equation

| 来源 | SS | Df | MS | F | Prob>F |
|-------------------------------|---------|----|---------|--------|------------------------|
| 模型 | 10.56 | 9 | 1.17 | 14.59 | 0.000 9 ²⁾ |
| A | 8.30 | 1 | 8.30 | 103.47 | <0.000 1 ²⁾ |
| B | 0.62 | 1 | 0.62 | 7.68 | 0.027 7 ¹⁾ |
| C | 0.57 | 1 | 0.57 | 7.07 | 0.032 5 ¹⁾ |
| AB | 0.012 | 1 | 0.012 | 0.15 | 0.709 3 |
| AC | 0.060 | 1 | 0.060 | 0.75 | 0.415 7 |
| BC | 0.002 5 | 1 | 0.002 5 | 0.031 | 0.864 9 |
| A ² | 0.11 | 1 | 0.11 | 1.31 | 0.289 3 |
| B ² | 0.67 | 1 | 0.67 | 8.36 | 0.023 2 ¹⁾ |
| C ² | 0.20 | 1 | 0.20 | 2.47 | 0.160 4 |
| 残差 | 0.56 | 7 | 0.080 | | |
| 失拟项 | 0.32 | 3 | 0.11 | 1.82 | 0.283 9 |
| 纯误差 | 0.24 | 4 | 0.059 | | |
| 总差 | 11.10 | 16 | | | |
| R ² | 0.949 4 | | | | |
| R ² _{adj} | 0.884 3 | | | | |
| R ² _{pre} | 0.499 4 | | | | |

间交互作用明显,表现为曲线最为较陡,响应值变化较大。分散剂与保护剂的交互作用较小,曲线较为平滑,响应值变化较小,结果与表4模型分析结果相吻合。对回归方程一阶求导,在活菌数达到最大

注:¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

值时,载体助剂配比分别为载体 60.00 g,分散剂 3.50 g 和保护剂 4.76 g,此时活菌数达到最大,为 5.23×10^9 cfu·g⁻¹。



A. 草炭;B. 羧甲基纤维素钠;C. 海藻酸钠

图4 影响活菌数的三因素响应面交互影响

Fig. 4 Response surface three-dimensional diagram of interaction of two factor

表4 不同浓度菌剂与病原菌对峙试验中病原菌的直径 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

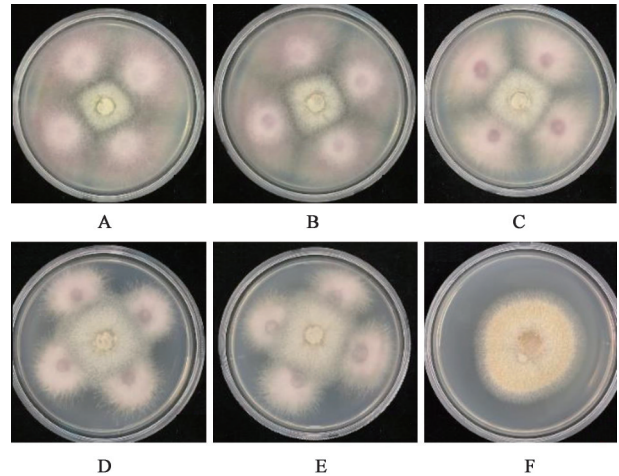
Table 4 Diameter of pathogenic fungi in antagonistic experiments with various concentrations of inoculum ($\bar{x} \pm s, n=3$)

| 组别 | 剂量/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | 菌落直径 | 抑菌率/% |
|----|------------------------------------|-------------------|-------|
| 空白 | | 5.13 ± 0.42^a | 0 |
| 菌剂 | 100 | 2.44 ± 0.12^b | 52.4 |
| | 10 | 2.63 ± 0.22^b | 48.7 |
| | 1 | 2.96 ± 0.35^b | 42.3 |
| | 0.1 | 3.45 ± 0.13 | - |
| | 0.01 | 4.30 ± 0.24 | - |

3.5 菌剂生防效果验证

3.5.1 对峙试验验证 不同浓度生防菌剂 *F. pseudoanthophilum* 对根腐病原菌(尖孢镰刀菌)有抑制作用,且抑制效果与其浓度有关,见图5。当菌剂质量浓度在 $1.00 \sim 100.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,病原菌的直径 $2.44 \sim 2.96 \text{ cm}$,抑菌率在 $42.3\% \sim 52.4\%$,对人参根腐病原菌尖孢镰刀菌有较好的抑制作用。当质量浓度为 $0.01 \sim 0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,内生菌对病原菌无拮抗作用,适宜菌剂质量浓度为 $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.5.2 盆栽试验验证 通过盆栽回接试验验证生防菌剂对根腐病原菌的防治效果,见表5。结果表明,生防菌剂促进了人参幼苗的生长,其幼苗叶



A. $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; B. $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; C. $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; D. $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; E. $0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; F. 空白

图5 不同浓度菌剂对病原菌的影响

Fig. 5 Influence of different concentrations of microbial agents on pathogenic bacteria

长、全株鲜重均显著高于未接菌剂的处理组,分别提高了 33.04% 和 34.48% 。病原菌处理组发病率为 98.09% ,病情指数为 41.50 ;生防菌剂+病原菌处理组的发病率为 32.38% ,病情指数为 15.91 。表明生防菌降低了人参幼苗根腐病的发生,其防治效果为 61.69% 。结果表明,该生防菌剂对人参幼苗的生长具有防病和促生双重作用。

表5 菌剂对人参根腐病的防效及生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=36$)

Table 5 Effect of microbial agents on prevention and growth of ginseng root rot ($\bar{x} \pm s, n=36$)

| 处理 | 发病率/% | 病情指数 | 防治效果/% | 株高/cm | 叶长/cm | 鲜重/g |
|------|--------------------|--------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 空白 | - | - | - | 5.34 ± 1.14^a | 2.06 ± 0.03^b | 0.17 ± 0.01^b |
| 接种菌剂 | 32.38 ± 1.17^b | 15.91 ± 0.69^b | 61.69 ± 3.21 | 7.15 ± 1.35^a | 2.59 ± 0.03^a | 0.23 ± 0.02^a |
| 只接病菌 | 98.09 ± 1.16^a | 41.50 ± 0.63^a | | | | |

3.6 定殖能力考察 考虑到具有近源系统发生关系的物种倾向于具有相似的生理性状和生态位偏好。将该菌株的内转录间隔区(ITS)序列与从人参根际土中获得的基于ITS的扩增子数据库进行了对比,以初步评估该菌株在人参根际的定殖潜力。笔者设置了较为严格的阈值 $E\text{-value} < e^{-100}$, $\text{identity} \geq 98\%$ 。结果表明,在人参根际获得的 $5\ 696$ 个运算的分类单元(OTUs)中,有 241 个 OTUs 与本研究鉴定的菌株 *F. pseudoanthophilum* 具有密切的亲缘关系,该结果从侧面为本研究筛选的菌株在人参根际的定殖潜力提供了依据。

4 讨论

内生菌是一类拮抗病原菌的重要资源^[25]。李玲玲等^[26]从银杏中分离得到 58 株内生菌,有 19 株

对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、黑曲霉等具有抗菌活性;王若琳等^[27]从桑树中分离得到一株贝莱斯芽孢杆菌为桑断枝烂叶病的生物防治提供了候选菌株。此外内生菌的次生代谢产物也具有抑菌作用^[28]。ARORA等^[29]发现甘草内生菌发酵液具有显著的抗菌活性,经鉴定为硫代二酮哌嗪衍生物,其中 2 种化合物均能抑制多种细菌的生长,对金黄色葡萄球菌和化脓性链球菌的半抑制浓度 (IC_{50}) $< 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此基于内生菌为原料的生物菌剂研究具有广阔前景。本研究以中药材三七内生菌为材料,通过平板对峙试验筛选出根腐病原菌的拮抗菌株 *F. pseudoanthophilum*,该菌株对致病菌的抑菌率达 53.33% 。

王莉等^[30]以解淀粉芽孢杆菌为材料,采用单因

素及正交试验优化了菌株的发酵条件及生产工艺,将菌剂的活菌数由 1×10^7 cfu·g⁻¹提升到 1×10^9 cfu·g⁻¹。在生防菌剂的研发中,菌株培养中所涉及的营养元素和培养条件影响菌剂质量,筛选菌剂载体及助剂和优化其配比是保障菌剂效果的重要条件^[31]。草炭由于其营养丰富,表面积比较大和吸附性好,有利于菌株的存活及菌剂保存,是理想的载体材料。刘庆莉等^[32]在大豆根瘤菌剂载体的选择中,使用草炭为载体的大豆生物量的积累高于蛭石和高岭土两种载体。王晓^[33]以羧甲基纤维素钠为助剂,制备的荧光假单胞菌 DH 09 菌剂活菌数达到 1×10^7 cfu·g⁻¹证明了其用作菌剂助剂的可行性。张千等^[34]制备 Anammox 菌干粉菌剂,筛选了5种保护剂,最适宜的保护剂为海藻酸钠。本试验通过单因素试验对菌株的培养条件进行了优化,其次筛选了草炭(载体),羧甲基纤维素钠(分散剂),海藻酸钠(保护剂)3种不同的载体助剂,优化了菌剂配方,提高了菌剂的活菌数,更有利于菌剂发挥作用。本研究通过 Box-Behnken 响应面设计优化了菌株载体助剂的配比,提高了菌体的存活率,使菌剂活菌数由 1×10^8 cfu·g⁻¹提升到 5.23×10^9 cfu·g⁻¹。

该生防菌剂具有抗根腐病及促进生长的双重作用。生物菌剂在抗病方面效果显著,王梦园等^[35]通过对草莓施加复合菌剂,结果田间试验表明对草莓根腐病的防治效果高达57.18%~66.00%。生物菌剂在促进植物生长方面表现出优势,苗锦山等^[36]配施复合生物菌剂促进了连作甜瓜株高、茎粗、单株叶面积以及根、叶干物质积累,甜瓜生育进程加快,促生作用效果明显。本研究结果表明,生防菌剂促进了人参幼苗的叶长及鲜重,促生效果显著,降低了根腐病的发病率。该生物菌剂在人参植物根腐病防治中具有显著的效果,该菌剂的应用及推广有助于高品质中药材的生产。

在根腐病的防治中,传统的化学防治易污染环境且对土壤中有益微生物造成危害,不能从根本上解决根腐病现象^[37]。当前的生物防治主要使用的细菌(芽孢杆菌,假单胞菌等)和真菌(木霉菌等)菌株来源单一;其次由于生物防治导致外来生物引入,如果没有科学合理的控制手段易影响生态系统的平衡性^[38]。本研究从人参属三七内生菌进行生防菌株的筛选并开发成菌剂。菌株来源于三七植物,原料安全且菌剂的促生及生防效果显著。本研究为人参根腐病的生物防治提供新的候选菌株,并为药用植物病害防治的专用菌剂开发提供借鉴。

关于 *F. pseudoanthophilum* 菌株能否定殖于人参根际,通过将菌株与人参根际真菌进行比对,结果表明人参根际内含有与本研究菌株具有密切的亲缘关系,从侧面对定殖潜力进行了探索,但对于该菌剂在大田的应用仍然需要进一步验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 袁忠久,李恩友,王远征,等. 人参病害综合防治技术[J]. 农业与技术,2015,35(2):124-125.
- [2] 帕若楠,谢尹颖,武自强. 我国常见农林植物根腐病研究进展[J]. 农业开发与装备,2019(12):31,39.
- [3] 孙亚玲,刘少军,姚甜甜,等. 山药根腐病的发生及防治措施[J]. 生物灾害科学,2020,43(3):257-260.
- [4] 高芬,任小霞,王梦亮,等. 中草药根腐病及其微生物防治研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(21):4122-4126.
- [5] 孙新荣,仲彩萍,张西梅,等. 甘肃定西地区党参根腐病原鉴定与防治研究[J]. 植物保护,2020,46(5):290-297.
- [6] 洪渡,丁扣琪. 农作物病虫害的农业防治措施[J]. 植物医生,2014,27(2):6-7.
- [7] 李巧玲,杨毅,肖忠,等. 木香根腐病生防细菌的筛选与鉴定[J]. 西南大学学报:自然科学版,2020,42(9):71-76.
- [8] 王玉芬,张鹏,刘梦铭. 植物内生菌的研究进展[J]. 现代园艺,2019(11):23-24.
- [9] 任安芝,高玉葆. 植物内生真菌——一类应用前景广阔的资源微生物[J]. 微生物学通报,2001(6):90-93.
- [10] FADIJI A E, BABALOLA O O. Exploring the potentialities of beneficial endophytes for improved plant growth[J]. Saudi J Biol Sci,2020,27(12):3622-3633.
- [11] 施蕊,王娟,叶敏,等. 滇重楼内生菌分离及其发酵液抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):86-88.
- [12] GALLO M B, CHAGAS F O, ALMEIDA M O, et al. Endophytic fungi found in association with *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) as resourceful producers of cytotoxic bioactive natural products[J]. J Basic Microbiol,2010,49(2):142-151.
- [13] 宋新月,汤冰雪,邱君志,等. 竹叶兰内生真菌的分离鉴定及其抗氧化活性研究[J]. 现代食品科技,2018,34(2):82-88.
- [14] 梁志超,杨国萍,白兵,等. 烟草内生细菌YN201448用于烟苗基质和肥料的潜力研究[J]. 云南农业大学学报:自然科学,2019,34(5):838-844.
- [15] 王瑞,董林林,徐江,等. 农田栽参模式中人参根腐病原菌鉴定与防治[J]. 中国中药杂志,2016,41(10):

- 1787-1791.
- [16] 贾鹏莉,沈硕,胡英杰.一株马铃薯干腐病拮抗菌芽孢杆菌的筛选、鉴定及生防因子初探[J].福建农业学报,2020,35(12):1336-1345.
- [17] 冯长海.改良透明胶带法在丝状真菌形态观察中的应用[J].临床检验杂志,2017,35(10):748-749.
- [18] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:上海科学技术出版社,1979:143.
- [19] GARDES M, BRUNS T D. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts[J]. Mol Ecol, 1993,2(2):113-118.
- [20] 沈萍,陈向东.微生物学实验[M].5版.北京:高等教育出版社,2018:40-41.
- [21] 蒋永梅.四种植物根际促生菌筛选及生物菌肥效果研究[D].兰州:甘肃农业大学,2017.
- [22] 刘敏,胡陈云,丁万隆,等.两株内生细菌在人参体内和根区土壤的消长动态研究[J].世界科学技术—中医药现代化,2014,16(4):790-795.
- [23] 马凤茹,邢云章,王韵秋,等.人参锈腐病调查方法初探[J].中药材科技,1983(5):9-10,15-16.
- [24] 马光恕,梁泉,李梅,等.木霉菌对黄瓜生理特性及立枯病防治效果的影响[J].中国生物防治学报,2021,37(2):277-285.
- [25] 李军,李白,高广春.药用植物内生菌抑菌作用研究进展[J].浙江农业科学,2017,58(11):1989-1992,1996.
- [26] 李玲玲,李青爱,易回香,等.银杏内生菌的分离及其抑菌活性筛选[J].生物资源,2019,41(3):249-254.
- [27] 王若琳,徐伟芳,王飞,等.桑树内生拮抗菌的分离鉴定及其对桑断枝烂叶病的生防初探[J].微生物学报,2019,59(11):2130-2143.
- [28] TOGHUEO R M, BOYOM F F. Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological, and pharmaceutical applications[J]. Biotech,2020,10(3):1-35.
- [29] ARORA P, WANI Z A, NALLI Y, et al. Antimicrobial potential of thiodiketopiperazine derivatives produced by *Phoma* sp. an endophyte of *Glycyrrhiza glabra* Linn [J]. Microb Ecol,2016,72(4):802-812.
- [30] 王莉,米佳雯,池明,等.解淀粉芽孢杆菌DS-1菌剂的研制及田间应用效果[J].植物保护,2020,46(5):64-69.
- [31] 刘振华,邢雪琨.微生物农药助剂研究进展[J].基因组学与应用生物学,2016,35(8):2109-2113.
- [32] 刘庆莉,王金生,刘丽君,等.大豆根瘤菌剂载体的选择及最佳施用浓度筛选[J].大豆科学,2014,33(2):207-210.
- [33] 王晓.荧光假单胞菌DH09生防菌剂的制备及其对油菜菌核病的防效研究[J].中国植保导刊,2011,31(10):41-43.
- [34] 张千,徐晓晨,王超,等. Anammox 菌干粉菌剂制备与保藏技术[J].中国环境科学,2017,37(12):4630-4636.
- [35] 王梦园,杜延全,蔡威威,等.复合菌剂防治草莓根腐病的效果研究[J].中国农业科技导报,2020,22(6):100-110.
- [36] 苗锦山,王树勇,刘杰.作物秸秆还田配施复合生物菌剂对棚室连作甜瓜植株生长发育的影响[J].北方园艺,2018(13):68-73.
- [37] 图雅.生物技术在植物病虫害中的有效应用及防治措施探究[J].种子科技,2020,38(20):30-31.
- [38] 韩润霞.生物技术在森林病虫害防治中的应用分析[J].种子科技,2020,38(21):35-36.

[责任编辑 顾雪竹]