

潘晓曦,关一鸣,吴连举. 生防菌 B-09 对人参灰霉病病原菌的抑制作用及生物防治效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):74-76.

生防菌 B-09 对人参灰霉病病原菌的抑制作用及生物防治效果

潘晓曦,关一鸣,吴连举

(中国农业科学院特产研究所,吉林长春 130112)

摘要:菌株 B-09 是 1 株从人参根际土壤中筛选出的生防菌。为明确 B-09 菌株在人参灰霉病生防应用中的潜力,进行了 B-09 室内抑菌效果和温室防治效果试验。结果表明,室内抑菌试验 B-09 活体菌株对人参灰霉病病原菌的抑菌圈直径达 32 mm;B-09 无菌发酵液对人参灰霉病病原菌菌丝生长的抑制率达 90% 以上,对人参灰霉病病原菌孢子萌发的抑制率达 87% 以上。在温室控病试验中,B-09 无菌发酵液对人参灰霉病的防治效果达 78.6% 左右,与化学药剂处理组效果相当,表明供试生防菌可开发为生物农药的潜力。

关键词:生防菌;人参灰霉病;抑菌作用;生物防治

中图分类号: S435.675 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0074-02

人参为五加科多年生草本植物,以根茎、叶、花、果实入药,具有大补元气、复脉固脱、补气益血、生津、安神等功效^[1]。人参灰霉病是 20 世纪 80 年代国内新发现的病害,该病以危害人参的叶片、叶柄、花、果实为主,严重时危害根部,1981—1988 年吉林省栽培人参该病的发病率达 20%~30%。自 2002 年以来,吉林省人参灰霉病发生频繁,已成为影响人参产量的主要病害之一^[2]。目前,该病的防治主要以化学防治为主,由于长期大量使用化学农药,给生态环境、药材品质带来了不可忽视的危害;另外因植物病原菌对常用化学药剂抗药性的逐渐增强,使其防效不断下降。因此,有针对性地使用生物农药,开发微生物杀菌剂是植物病害防治的必然趋势。试验以抗菌谱较广的生防菌 B-09 为材料,对菌株的抑菌活性和控病作用开展了研究,明确了生防菌 B-09 对人参灰霉病的抑制效果,为进一步开发生物农药奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试生防菌枯草芽孢杆菌 B-09,分离自吉林省抚松县人参根际土壤。供试病原菌人参灰霉病病原菌,分离自吉林省吉安市人参种植基地人参灰霉病病株。化学药剂。80% 多菌灵可湿性粉剂,北京绿怡园科技发展有限公司生产。培养基。PDA 培养基、NA 培养基、营养肉汤培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 生防菌 B-09 无菌发酵液的制备 将菌株 B-09 接种于 NA 培养基活化 24 h 后,取直径 3mm 的菌饼转接于营养肉汤培养基中,于 37℃、200 r/min 振荡培养 72 h,离心后取上清液,再用 0.22 μm 微孔滤膜滤去上清液中残留菌体,制

得 B-09 无菌发酵液。

1.2.2 B-09 菌株平板内拮抗作用 利用平板对峙法^[3],在 PDA 平板中央接种直径为 6 mm 的病原菌菌饼,距菌饼 25 mm 处用接种针点接生防菌,以不接生防菌的 PDA 平板作为空白对照,于 25℃ 温箱培养,6 d 后检测生防菌株对病原菌菌丝生长的抑制作用,并测定抑菌圈直径大小。每处理 3 次重复(下同)。

1.2.3 B-09 无菌发酵液对病原菌菌丝生长的抑制作用 将 B-09 无菌发酵液与冷却至 50℃ 左右的 PDA 培养基分别以 1:4、1:6、1:10、1:18 的体积比混匀(发酵液终浓度为 20%、14%、9%、5%)倒平板,冷却后于平板中央接种直径 6 mm 病原菌菌饼,以装有营养肉汤培养基与 PDA 培养基混合物的平板为对照,比例同上,于“1.2.2”节的条件下培养 6 d 后测量各处理病原菌菌丝直径,并计算抑制率。

1.2.4 B-09 无菌发酵液对病原菌孢子萌发的抑制作用 用无菌水配制灰霉病病原菌孢子悬浮液,浓度为 1×10^6 CFU/mL。将 B-09 无菌发酵液 100%、50%、25% 的稀释液与等体积的灰霉病病原菌孢子悬浮液混合(发酵液终浓度为 50%、25%、12.5%),用载玻片悬滴法^[4]于 25℃ 培养,以加入营养肉汤培养基的孢子悬浮液为对照,24 h 后镜检孢子萌发情况。

1.2.5 B-09 无菌发酵液对人参灰霉病防治试验 取 3 年生人参盆栽苗,每株人参苗针刺 8 个伤口,用人参灰霉病病原菌孢子悬浮液(浓度约为 2×10^5 CFU/mL)喷洒接种,接种后保湿,36 h 后喷洒 B-09 无菌发酵液,6 株为 1 处理,每处理设 3 次重复。10 d 后观察发病情况,统计发病率和病情指数,并计算防治效果^[5-6]。对照组和化学药剂组分别喷洒无菌水与多菌灵 1 000 倍液。病情分级标准如下^[7]:0 级,无病斑;1 级,病斑面积占整个叶面积 5% 以下;3 级,病斑面积占整个叶面积 6%~10%;5 级,病斑面积占整个叶面积 11%~20%;7 级,病斑面积占整个叶面积 21%~50%;9 级,病斑面积占整个叶面积 50% 以上。

收稿日期:2013-07-30

基金项目:吉林省自然科学基金(编号:201115130)。

作者简介:潘晓曦(1983—),女,吉林长春人,硕士,助理研究员,研究方向为药用植物病理学,E-mail:pxxfirst11@163.com。

通信作者:吴连举,副研究员。E-mail:wulianju62@sina.com。

2 结果与分析

2.1 B-09 菌株平板内抑菌效果

从图 1 可见,生防菌与灰霉病原菌对峙培养 6 d 后,在生防菌周围形成直径为 32 mm 的透明抑菌圈,且直径大小不随时间的推移而改变。显微镜下观察可见,抑菌圈周围的病原菌菌丝生长缓慢,部分菌丝顶端膨大,并且细胞壁被破坏,原生质体外泄,表现出溶菌现象(图 2)。

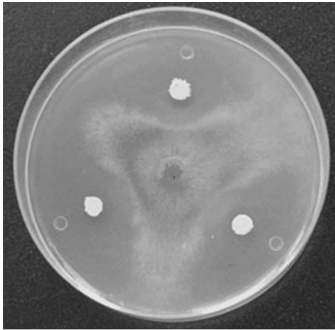
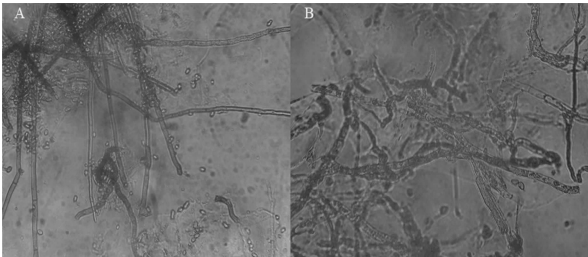


图1 B-09菌株对人参灰霉病原菌菌落生长的抑制效果



A. 正常菌丝 B.畸形菌丝

图2 菌株B-09对人参灰霉病原菌菌丝生长的抑制效果

2.2 B-09 菌株无菌发酵液对病原菌菌丝生长的抑制作用

从表 1 可见,B-09 无菌发酵液在 5.0% 的浓度下对菌丝生长有抑制作用,但效果不明显;在 14%、20% 浓度下的抑菌效果较好,且二者没有显著差异。表明分无菌发酵液在 14% 的浓度下已能有效抑制病原菌菌丝的生长。

表 1 B-09 菌株无菌发酵液对人参灰霉病原菌菌丝生长的抑制效果

无菌发酵液浓度 (%)	病原菌菌落直径 (mm)	抑制率 (%)
0(对照)	89.7 ± 0.5	
5.0	73.3 ± 0.5	18.2 ± 0.5a
9.0	24.0 ± 0.8	73.0 ± 0.8b
14.0	11.7 ± 0.5	87.0 ± 0.6c
20.0	8.7 ± 0.4	90.3 ± 0.2c

注:抑制率 = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径)/对照组菌落直径 × 100%。同列中数据后不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$),表 2、表 3 同。

2.3 B-09 无菌发酵液对病原菌分生孢子萌发的抑制效果

B-09 菌株无菌发酵液浓度在 50%、25%、12.5% 时均能对人参灰霉病原菌孢子的萌发产生抑制作用,其中以 50% 浓度为最佳,浓度为 12.5% 时抑制作用最弱(表 2)。进一步观察,灰霉病原菌孢子在浓度 12.5% 时虽大量萌发,但畸形孢子比例较大,不能发育成为完整的菌丝体。

表 2 B-09 菌株无菌发酵液对人参灰霉病原菌孢子萌发的抑制效果

无菌发酵液终浓度 (%)	孢子萌发率 (%)	抑制率 (%)
0(对照)	87.0 ± 0.2	
12.5	72.2 ± 0.3	17.1 ± 0.4a
25.0	17.0 ± 0.2	80.4 ± 0.2b
50.0	10.6 ± 0.2	87.9 ± 0.2c

注:抑制率 = (对照组孢子萌发数 - 处理组孢子萌发数)/对照组孢子萌发数 × 100%。

2.4 温室盆栽试验

接种 10 d 后调查结果,经无菌发酵液处理后的人参盆栽苗植株发病率和病情指数均大幅降低,植株生长发育正常,对照组植株几乎全部发病,生长发育完全受到影响,严重整个植株枯萎。经 B-09 处理后的防治效果高达 78.6%,与 1 000 倍多菌灵处理效果相当,表明 B-09 具有被开发为生物农药的潜力(表 3)。

表 3 菌株 B-09 温室防治人参灰霉病的效果

处理	发病率 (%)	病情指数	防治效果 (%)
对照	98.0 ± 0.4a	60.0 ± 1.2a	
B-09 发酵液	32.6 ± 0.9b	12.8 ± 1.0b	78.6 ± 0.5a
多菌灵 1 000 倍液	30.3 ± 0.2b	11.4 ± 0.4b	81.0 ± 0.8a

注:病情指数 = $\sum[(\text{各级病叶数} \times \text{相对级数值})/\text{调查总数} \times \text{最高级值}] \times 100$;防治效果 = (对照组病情指数 - 处理组病情指数)/对照组病情指数 × 100%。

3 讨论与结论

近年来,某些国家正在逐渐淘汰化学农药,越来越多采用生物农药和生物肥料等生物防治措施控制和消灭植物病虫害,并取得了显著进展^[8-9]。生物农药包括细菌农药、真菌农药、病毒农药和抗生素农药四大类。由于生物农药具有选择性强、效率高、成本低、不污染环境、对人畜无害等特点,某些国家正越来越多地将其应用于农作物防病、治虫、防草等方面,推广应用前景广泛。

生防菌 B-09 是从 200 余个人参土壤根际菌中经过反复筛选后获得的抗菌活性很强的菌株。试验结果表明,供试菌株的活菌体能够良好地抑制人参灰霉病原菌菌丝的生长能力;菌株的无菌发酵液对人参灰霉病原菌菌丝生长与孢子萌发均表现出显著的抑制作用。在温室盆栽试验中,B-09 无菌发酵液对人参灰霉病的防治效果达到 78.6%,与常用化学农药效果相当,但温室是一个相对可控的系统,影响因素相对于田间要少,菌株 B-09 虽然具有一定开发为生物农药的潜力,但防控效果还需要进一步进行田间试验来验证。

参考文献:

[1] 杨春澍. 药用植物学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998: 251-252.
[2] 徐怀友,马友德,张 辉,等. 人参灰霉病安全高效防治药剂组合筛选研究[J]. 吉林农业大学学报,2008,30(专辑):44-47.

宋萍萍,耿茂林,殷 茜,等. 5 种伞形科植物提取物对斜纹夜蛾的生物活性[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):76-77.

5 种伞形科植物提取物对斜纹夜蛾的生物活性

宋萍萍,耿茂林,殷 茜,汪洪江,米泉喜,王年鹤,吕 晔

(江苏省中国科学院植物研究所/南京中山植物园,江苏南京 210014)

摘要:以蛇床子不同溶剂提取物为阳性对照,利用浸渍叶碟法测定白芷、防风、独活及胡萝卜籽等几种伞形科植物不同溶剂提取物对 3 龄斜纹夜蛾幼虫的生物活性。结果表明,5 种植物提取物对斜纹夜蛾均有一定的拒食活性;胡萝卜籽油醚提取物和乙酸乙酯提取物、防风石油醚提取物和乙酸乙酯提取物分别处理 48 h 后,斜纹夜蛾幼虫拒食率相对较高,分别为 92.40% 和 81.27%、82.27% 和 77.49%;独活乙酸乙酯提取物及胡萝卜籽甲醇提取物胃毒活性相对较高,校正死亡率为 40.00%。

关键词:伞形科;斜纹夜蛾;拒食活性;触杀活性

中图分类号: S433.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)03-0076-02

斜纹夜蛾 (*Prodenia litura* Fabricius) 属鳞翅目夜蛾科昆虫,食性杂,全国各地均有分布,是一种暴食性害虫,主要危害十字花科、茄科等植物,对番茄、豆类、瓜类、棉花等植物危害尤其严重。食性杂、世代重叠现象严重、抗性上上升快等原因,致使农药用量越来越大,防效越来越差,防治难度也越来越大^[1]。

近年来,开发天然资源物质,创制新型、高效、低毒杀虫剂倍受人们重视,特别是利用天然植物活性成分作为杀虫剂更是引人注目。目前,已开发了烟碱、苦参碱、鱼藤酮、茵蒿素、黎芦碱、茶皂素、川楝素、印楝素、蛇床子素等十种植物源杀虫剂,在防治多种害虫方面表现出良好的效果^[2-4]。蛇床子素为近年来由江苏省农业科学院开发的植物源农药,来源于伞形科植物蛇床子中,已有文献报道蛇床子提取物具有杀虫活性^[5]。本试验以蛇床子不同溶剂提取物为阳性对照,测定了白芷、防风、独活和胡萝卜籽等 4 种伞形科植物不同溶剂提取物对斜纹夜蛾的活性,为伞形科植物作为植物源农药在有害生物治理中的应用提供理论依据。

1 材料与方 法

收稿日期:2013-07-28

基金项目:江苏省自然科学基金(编号:BK2011685)。

作者简介:宋萍萍(1981—),女,河南洛阳人,博士,助理研究员,主要从事中药及植物源农药开发研究。Tel:(025)84347076;E-mail:17818145@qq.com。

通信作者:吕 晔,研究员,主要从事植物资源及中药开发研究。Tel:(025)84347037;E-mail:1020915216@qq.com。

[3] 李小俊,成丽霞,吴彦彬,等. 拮抗菌抗菌谱及发酵液拮抗能力测定的新方法[J]. 生物技术,2007,17(1):55-58.

[4] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1998:152.

[5] Brunner K, Zeilinger S, Ciliento R, et al. Improvement of the Fungal Biocontrol Agent *Trichoderma atroviride* to Enhance both Antagonism and Induction of Plant Systemic Disease Resistance[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7):3959-3962.

[6] 农业部农药检定所. 农药田间药效试验准则(一)[M]. 北京:中

1.1 供试材料

1.1.1 供试虫源 将田间采集的斜纹夜蛾带回室内,用未施药、新鲜干净的甘蓝叶继代饲养,稳定繁殖,挑选健壮、大小一致的 3 龄幼虫用于生物活性测定。

1.1.2 供试中药材 蛇床子、白芷、防风、独活饮片均购于安徽省亳州市中药材市场,由亳州市中药饮片厂生产;胡萝卜种子“大禹特级三红(五寸参)”由河北大禹种业有限公司生产。供试植物产地或来源、使用部位等信息见表 1。

表 1 供试植物种类

种名	科名	使用部位	来源或产地
蛇床子	伞形科	果实	安徽
白芷	伞形科	根	安徽
防风	伞形科	根	东北
独活	伞形科	根	湖北
胡萝卜籽	伞形科	种子	河北

1.2 试验方法

1.2.1 样品制备 将各供试植物材料在 40℃ 烘箱内烘干,取出,用粉碎机充分粉碎,制成干粉;分别称取 500 g 干粉,用 95% 乙醇热回流提取 3 次,回收溶剂的浸膏;浸膏用水溶解后,先用石油醚萃取至颜色较淡,再用乙酸乙酯萃取至颜色较浅,剩余部分用甲醇溶解;将石油醚萃取液、乙酸乙酯萃取液及甲醇提取液分别回收,溶剂用丙酮溶解后再用水稀释,同时加入几滴吐温 80 作乳化剂,稀释成一定浓度的溶液作为供试样品备用。

1.2.2 采用浸渍叶碟法进行活性测定^[6] 将新鲜甘蓝叶片剪成 20 mm×20 mm 的叶碟,放入供试样品内浸 2~3 s,取出

国家标准出版社. 1998:45-51.

[7] 王存兴,李光武. 植物病理学[M]. 北京:化学工业出版社. 2012:92-94.

[8] 陈志谊,张荣胜. 植物病害生防芽孢杆菌研究进展[J]. 江苏农业学报,2012,28(5):999-1006.

[9] 杨敬辉,吉沐祥,文平兰,等. 黄麻链霉菌 NF0919 菌株对水稻纹枯病的生防活性[J]. 江苏农业学报,2012,28(6):1288-1293.