

关一鸣,潘晓曦,王莹,等. 哈茨木霉菌、枯草芽孢杆菌对人参灰霉病和根腐病病原菌的拮抗作用[J]. 江苏农业科学,2014,42(5):123-125.

哈茨木霉菌、枯草芽孢杆菌对人参灰霉病和根腐病病原菌的拮抗作用

关一鸣^{1,2}, 潘晓曦¹, 王莹², 吴连举¹

(1. 中国农业科学院特产研究所, 吉林长春 130112; 2. 吉林农业大学, 吉林长春 130118)

摘要:已有研究表明,从健康人参根际土壤筛选的哈茨木霉菌 SF-08 和枯草芽孢杆菌 B11 是有较高抑菌活性和广谱作用的生防菌。初步研究表明,哈茨木霉菌 SF-08 及其代谢物可以抑制人参灰霉病病菌和根腐病病菌菌丝的生长,枯草芽孢杆菌 B11 可以抑制人参灰霉病病菌和根腐病病菌菌丝的生长和孢子萌发,且均表现出强烈的抑制作用。SF-08 对人参灰霉病病菌、根腐病菌菌丝生长的抑制率分别达到 71.4%、72.0%,其代谢产物原液的抑制率分别达到 71.3%、70.5%。B11 菌株对人参灰霉病病菌、根腐病病菌的菌丝生长有较强的抑制作用,原液对人参灰霉病病菌、根腐病病菌菌丝的生长抑制作用均达到 80% 以上,对孢子萌发抑制率均超过 85%;显微观察显示,SF-08、B11 菌株通过重寄生作用、竞争作用、溶菌作用使病原菌菌丝生长受到影响,从而起到抑菌作用。

关键词:哈茨木霉;枯草芽孢杆菌;人参灰霉病;人参根腐病

中图分类号: S435.675 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0123-02

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)为五加科(Araliaceae)多年生草本植物,药用价值为世界所公认,被誉为“万能药”,是人们长期以来广泛研究和利用的药中珍宝^[1]。2012 年中国政府允许人参进入食品领域,使得本就做作为化妆品、保健品和药品原材料的人参需求量越来越大,对人参品质的要求也越来越高。中国的人参主要分布在东北地区,而在人参的栽培生产中,灰霉病和根腐病是影响其产量的重要病害,并造成化学农药的使用频率高,进而导致残留超标,从而严重影响人参的价值,因此,对人参进行生防菌的筛选工作显得尤为必要。哈茨木霉菌和枯草芽孢杆菌在生物防治工作中占有重要地位,并且目前国内外市场上已经有相应不同类型的生防制剂^[2-3]。笔者所在的课题组经过多年的生防基础工作,筛选到木霉、芽孢杆菌等多种具有生防作用的菌株。本试验旨在通过研究生防菌对人参灰霉病和根腐病的抑制效果,以期为人参的栽培加工防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病原菌人参灰霉病灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers.)、人参根腐病腐皮镰刀菌[*Fusarium solani* (Mart.) App. et Wollenw.],均由中国农业科学院特产研究所分离、鉴定并保存。

供试生防菌枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B11、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) SF-08,均由中国农业科学院特产

研究所分离、鉴定并保存。

1.2 培养基制备^[4]

PDA 培养基:200 g 马铃薯,15 g 琼脂,20 g 葡萄糖,加水定容至 1 L,121 ℃ 灭菌 25 min 备用。

LB 培养基:10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母粉,10 g 氯化钠,加水定容至 1 L,121 ℃ 灭菌 25 min 备用。

1.3 哈茨木霉对供试病原菌菌丝生长的拮抗作用

采用平板对峙培养法测定哈茨木霉对供试病原菌菌丝生长的抑制作用。供试病原菌和哈茨木霉均通过 PDA(马铃薯琼脂培养基)培养 3 d 后使用 0.4 cm 打孔器打孔,取病原菌和哈茨木霉,均匀放置在距培养皿中心点 2 cm 处的中心线上对峙培养。每个处理设 3 次重复,以病原菌和未接种哈茨木霉的 PDA 培养基作对照。25 ℃、12 h-12 h 光暗交替培养 7 d。逐日观察木霉菌和病原菌的生长情况,并分别测量处理病原菌的直径和对照病原菌的直径,3 d 后根据下面公式计算抑菌效果。

抑菌率 = [(对照菌落半径 - 处理菌落半径) / 病原菌对照菌落半径] × 100%

当 2 个菌落生长到重叠后,观察记载哈茨木霉对病原菌的抑制、包围、侵入并占领病原菌营养空间的过程。

拮抗系数分级标准^[5]: I,哈茨木霉菌丝占据平皿 100%; II,哈茨木霉菌丝占据平皿 $\geq 3/4$; III,哈茨木霉菌丝占据平皿 $< 3/4$ 、 $\geq 2/3$; IV,哈茨木霉菌丝占据平皿 $< 2/3$ 、 $\geq 1/3$; V,哈茨木霉菌丝占据平皿 $< 1/3$; VI,病原菌菌丝占据平皿 100%。

1.4 哈茨木霉代谢产物对病原菌菌丝生长的影响

采用生长速率法测定。接种活化后的 6 块 0.4 cm 大小的哈茨木霉菌饼于含 100 mL 合成培养基的三角瓶中,25 ℃ 黑暗培养,隔天摇动。培养 7 d 后用 2 层无菌滤纸过滤,再用 2 层擦镜纸过滤,所得滤液经 0.22 μm 滤膜过滤即得无菌哈茨木霉代谢产物粗提液^[6]。分别将其配制成质量分数 20%、

收稿日期:2013-09-12

基金项目:吉林省科技发展规划(编号:201115130、20120257)。

作者简介:关一鸣(1981—),男,吉林长春人,硕士,助理研究员,研究方向为植物病理学。E-mail:ym-guan@163.com。

通信作者:吴连举,男,硕士,研究员,主要从事药用植物保护研究。E-mail:wulianju62@sina.com。

40%、60%、80% 原液的 PDA 培养基,同时设立空白对照。PDA 平板接种人参灰霉病灰葡萄孢菌和人参根腐病腐皮镰刀菌,每个处理 3 次重复,25 ℃、12 h-12 h 光暗交替培养,72 h 后测定菌落半径,计算抑菌率,具体参照“1.3”。

1.5 枯草芽孢杆菌对供试病原菌菌丝生长的拮抗作用

将枯草芽孢杆菌在 LB 液体培养基上进行培养,于 37 ℃ 摇菌 18 h,分别稀释 10²、10⁴、10⁶ 倍。将 25 ℃ 活化 3 d 的病原菌饼(0.4 cm)接种到的 PDA 平板中心,培养 48 h 后,在距培养皿边缘 15 mm 处均匀放置 3 片已灭菌的滤纸片,成正三角形,使病原菌在中心位置,在每个滤纸片上注入 30 μL 枯草芽孢杆菌梯度稀释液菌液,每个处理 3 次重复,以滤纸片上注入无菌水作为对照。接种后的培养皿置于 26~28 ℃ 下培养,用接种病原菌和 LB 培养基的平板作为对照。3~5 d 后对平板抑制情况拍照,并计算菌丝生长抑制率(参照“1.3”节)。挑取 0.4 cm 的供试病原菌菌丝块分别接入培养液和 B11 菌液中,于 25 ℃、180 r/min 摇床中培养 48 h 后取出菌丝,在光学显微镜下观察菌丝形态变化。

1.6 枯草芽孢杆菌对病原菌孢子萌发的抑制作用

用无菌水制备病原菌的孢子悬浮液,调整浓度为显微镜视野 10×20 倍下 20~30 个为宜。取等体积孢子悬浮液和上述梯度枯草芽孢杆菌稀释液加到凹玻片中,25 ℃、12 h/12 h 光暗交替培养,24 h 后观察并记录分生孢子萌发数量,设置加无菌水为空白对照,每个处理 3 次重复^[7]。计算孢子萌发抑制率,公式如下:

孢子萌发抑制率=(对照萌发率-处理萌发率)/对照萌发率×100%。

2 结果与分析

2.1 哈茨木霉对供试病原菌菌丝生长的拮抗作用

哈茨木霉对人参灰霉病菌和根腐病菌有抑制作用,病原菌的生长速度明显低于对照,说明哈茨木霉代谢的某些物质抑制了病原菌的生长。哈茨木霉对人参灰霉病的抑制率低于根腐病,拮抗系数分别为Ⅲ级和Ⅱ级。哈茨木霉对人参灰霉病和根腐病菌的抑制率分别达到 71.4%、72.0%。

在对峙培养过程中,哈茨木霉与 2 个供试病原菌均形成重叠的抑菌带,挑取交叉部分菌丝显微观察发现,哈茨木霉的菌丝与供试病原菌菌丝相互缠绕,抑或穿透病原菌菌丝寄生,吸取病原菌的营养,使相接触地方的菌丝逐步消解死亡。在交叉部分,病原菌的孢子明显被哈茨木霉孢子所覆盖,哈茨木霉长势极强,与病原孢子争夺营养和生存空间,使竞争方生长畸形、扭曲,从而抑制了病原菌的侵染能力。

2.2 哈茨木霉代谢产物对供试病原菌菌丝生长的抑制作用

由表 1 可见,哈茨木霉无菌粗提代谢产物对人参灰霉病和根腐病病菌菌丝生长都有较强的抑制作用,抑制率随着代谢产物浓度增高而增强,代谢产物原液对人参灰霉病和根腐病病菌菌丝生长抑制率分别达到 71.3%、70.5%,和哈茨木霉直接与病原菌对峙生长的抑制率相差不大。

2.3 枯草芽孢杆菌对供试病原菌菌丝生长的抑制作用

由表 2 可见,菌株 B11 对人参灰霉病菌和根腐病菌 2 种供试病原菌有较强的抑制作用,原液对二者的抑制作用均达

表 1 哈茨木霉代谢产物对人参灰霉病菌和根腐病菌的菌丝抑制作用

人参灰霉病菌		人参根腐病	
质量分数(%)	抑制率(%)	质量分数(%)	抑制率(%)
20	15.0	20	9.3
40	31.0	40	28.9
60	58.6	60	61.6
80	71.0	80	70.3
原液	71.3	原液	70.5

到 80% 以上,而菌株的每个同样浓度处理对人参根腐病菌的抑制率都要比人参灰霉病菌高。原液与 10² 稀释液处理抑制率相差无几,但随着浓度降低,抑制率均呈下降趋势。

显微镜下观察菌液对病原菌菌丝生长的影响发现,对照的菌丝生长正常,表面光滑,形态规则,而菌丝在 B11 菌液中生长,病原菌菌丝扭曲,部分菌丝膨大,细胞膜受损破裂,内含物外渗,出现了溶菌现象。

表 2 枯草芽孢杆菌 B11 对人参灰霉病菌和根腐病菌的菌丝抑制作用

人参灰霉病菌		人参根腐病菌	
稀释倍数	抑制率(%)	稀释倍数	抑制率(%)
原液	81.3	原液	84.3
10 ²	80.4	10 ²	83.4
10 ⁴	70.0	10 ⁴	75.0
10 ⁶	65.3	10 ⁶	68.3

2.4 枯草芽孢杆菌对病原菌孢子萌发的抑制作用

由表 3 可见,菌株 B11 培养液对人参灰霉病和人参根腐病病菌孢子的萌发抑制作用明显,原液对供试病原菌孢子萌发抑制率均超过 85%,但随着浓度下降,抑制率显著下降,在 10⁴、10⁶ 稀释倍数下抑制率下降到 10% 以下。

表 3 枯草芽孢杆菌 B11 对人参灰霉病菌和根腐病菌的孢子萌发抑制作用

人参灰霉病菌		人参根腐病菌	
稀释倍数	抑制率(%)	稀释倍数	抑制率(%)
原液	85.5	原液	89.3
10 ²	40.4	10 ²	53.4
10 ⁴	5.0	10 ⁴	8.0
10 ⁶	5.3	10 ⁶	4.8

3 讨论

本研究所使用的哈茨木霉和枯草芽孢杆菌是在健康人参根际土壤筛选到的 200 多株生防菌中活性较强的菌株,它们对地上部和地下部病害的病原菌都有拮抗作用。而人参灰霉病和根腐病是栽培人参中非常重要的 2 个病害,对其生物防治的研究报道较少,尤其是人参进入食品行业后,农药的残留问题严重,开发对人参本身无污染,对环境安全的天然生物农药制剂就具有相当广阔的前景。

生防菌的拮抗作用机制有很多方面的因素。重寄生作用、竞争作用、溶菌作用都可以使目标病原菌受到抑制,生防菌持效性长短和制剂类型多样化将是应用的关键,尤其是生防菌的代谢产物也同样具有抑菌活性,在菌株的发酵培养方面的研究也非常必要。

谢佳燕, 林 佳. 亚致死浓度吡虫啉对禾谷缢管蚜实验种群生命表参数的影响[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 125–126.

亚致死浓度吡虫啉对禾谷缢管蚜实验种群生命表参数的影响

谢佳燕, 林 佳

(武汉轻工大学生物与制药工程学院, 湖北武汉 430023)

摘要: 采用生命表技术研究了吡虫啉亚致死浓度对禾谷缢管蚜实验种群的影响。结果表明, 吡虫啉亚致死浓度处理禾谷缢管蚜后, 其当代和子代禾谷缢管蚜实验种群的内禀增长率、净增殖率、世代时间、周限增长率均与对照无明显差异, 吡虫啉较低亚致死浓度对禾谷缢管蚜试验种群无重要影响。

关键词: 禾谷缢管蚜; 杀虫剂; 生命表; 种群

中图分类号: S433.39; S482.3⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0125-02

禾谷缢管蚜 [*Rhopalosiphum padi* (L.)] 是我国长江流域麦区的重要害虫, 可危害多种禾本科、莎草科和香蒲科植物^[1]。蚜害在我国麦田已连续多年发生, 化学防治依然是田间有效的害虫防治措施之一^[2]。吡虫啉 (imidacloprid) 是一类新型氯化烟碱类药剂, 对飞虱、蚜虫等刺吸式口器害虫具有较高的毒力作用^[3]。杀虫剂在田间喷洒后, 在环境中的浓度会随着时间的延续和空间的差异逐渐递减到亚致死剂量^[4-5]。众多研究表明, 杀虫剂对昆虫具有明显的亚致死效应, 吡虫啉亚致死剂量处理桃蚜 (*Myzus Persica*) 后可抑制其繁殖能力和寿命^[6], 却可刺激褐飞虱 (*Nilaparvata lugens*) 的产卵量^[7]。利用生命表可以在种群水平上分析种群动态规律, 环境因素对昆虫种群的影响^[8]。本研究通过构建禾谷缢管蚜的生殖力生命表, 分析研究吡虫啉亚致死浓度处理禾谷缢管蚜后对其种群动态的影响, 旨在为吡虫啉的合理使用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

禾谷缢管蚜为本实验室内人工饲养多代。在人工气候培养箱内 (26 ± 1) °C, 相对湿度 60% ~ 80%, 光照周期 14 h -

10 h 条件下, 盆栽小麦苗饲养, 饲养期间不接触任何药剂。10% 吡虫啉可湿性粉剂为江苏丰山集团有限公司产品。

1.2 生物测定

采用浸叶法进行生物测定。将小麦叶段及其无翅成蚜浸于吡虫啉系列浓度中 10 s 后取出, 滤纸吸去多余液体, 晾干 30 min 后放入垫有滤纸的培养皿中, 置于人工气候培养箱内培养 24 h, 检查死亡个体数, 以蒸馏水为对照。每个处理重复 3 次, 每个重复 30 ~ 50 头成蚜。以 SPSS 14.0 软件计算毒力回归方程。

1.3 生命表的组建及参数估计

禾谷缢管蚜约 100 头成蚜接于新鲜麦苗上饲养 12 h 后剔出, 留幼蚜饲养 5 d 作为试虫。依据毒力回归方程, 用亚致死浓度吡虫啉按照生物测定方法处理试虫, 以蒸馏水为对照, 24 h 后挑取存活成蚜接于新鲜麦苗上单头饲养 (F₀ 代), 每日观察, 记录产蚜量, 并挑走仔蚜, 直至成蚜死亡。取 F₀ 代所产第一批仔蚜接于新鲜麦苗上单头饲养 (F₁ 代), 与 F₀ 代一样进行观察记录, 直至成蚜死亡。生命表构建参照徐汝梅等的方法^[8], 分别计算禾谷缢管蚜各处理种群的内禀增长率 (r_m)、净增殖率 (R_0)、周限增长率 (λ) 和种群倍增时间等生命表参数, 通过比较上述参数来评价吡虫啉亚致死浓度对禾谷缢管蚜种群的作用。

2 结果与分析

2.1 生物测定

采用浸叶法对禾谷缢管蚜进行了生物测定。结果表明, 吡虫啉对禾谷缢管蚜的毒力回归方程为 $y = 4.02 + 1.26x$ 。

收稿日期: 2013-11-26

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31201729); 武汉市青年科技晨光计划 (编号: 200950431197)。

作者简介: 谢佳燕 (1974—), 女, 云南文山山人, 博士, 副教授, 主要从事分子生态和昆虫毒理学的研究。E-mail: xjyaphid@yahoo.com。

参考文献:

- [1] 王铁生. 中国人参[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2001.
- [2] Harman G E. Myths and dogmas of biocontrol changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22[J]. Plant Disease, 2000, 84(4): 377–393.
- [3] Zimand G, Elad Y, Chet I. Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity[J]. Phytopathology, 1996, 86(11): 1255–1260.

- [4] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [5] Bell D K, Wells H D, Markham C R. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens[J]. Phytopathology, 1982, 72(4): 379–382.
- [6] 朱天辉, 邱德勋. *Trichoderma harzianum* 对 *Rhizoctonia solani* 的抗生现象[J]. 四川农业大学学报, 1994, 12(1): 11–15.
- [7] Fan Q, Tian S P, Li Y X, et al. Biological control of postharvest brown rot in peach and nectarine fruits by *Bacillus subtilis* (B-912)[J]. Acta Botanica Sinica, 2000, 42(11): 1137–1143.