

林星辰,田义新,王 泽,等. 内生细菌 B69 定殖能力及其对人参根腐病防效研究[J]. 江苏农业科学,2019,47(10):135-137,143.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.029

内生细菌 B69 定殖能力及其对人参根腐病防效研究

林星辰, 田义新, 王 泽, 牛林飞

(吉林农业大学中药材学院, 吉林长春 130118)

摘要: 研究人参内生菌 B69 菌株在人参根、茎、叶及其根际土壤中的定殖规律, 以及 B69 菌株对人参根腐病的防效, 以期为新型人参根腐病生防制剂的开发提供理论依据。采用抗生素标记法, 筛选出最佳标记菌株; 采用盆栽和田间试验测定自然土与无菌土处理下 B69 菌株在人参植株内和根际土壤中的定殖能力。结果表明, 标记菌株与未标记菌株在形态特征、拮抗能力、防病效果等方面无显著差异; B69 菌株能够高效定殖在人参根部; B69 菌株对人参根腐病有较好的防治效果, 田间试验结果表明该菌处理后的病情指数为 25.41, 对根腐病的相对防效为 58.56%。说明 B69 菌株是有防治人参根腐病潜力的生防菌。

关键词: 内生细菌; B69 菌株; 定殖能力; 人参根腐病; 生物防治; 生防制剂开发应用

中图分类号: S432.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0135-03

随着植病防治策略的改变以及公众对环境与健康问题的日益关注, 生物杀菌剂的地位越来越重要^[1-2], 但是进入产业化的品种很少, 主要原因是生物杀菌剂的作用范围一般比较窄等。微生物制剂的缺陷已经受到研究人员的重视, 并且致力于多功能微生物制剂的研究^[3]。人参根腐病主要侵染人参的根部, 造成根部软化腐烂, 植株萎蔫死亡^[4]。人参根腐病致使人参产量、质量大幅度下降, 造成巨大经济损失。随着人们对无公害食品的需求的日益增加以及对环境保护的日益关注, 生物防治成为了人们控制植物病害的理想途径^[5-6]。因此, 筛选出生物活性高、抗菌谱广的菌株具有重要的意义。目前国内外对番茄^[7]、大蒜^[8]、黄瓜^[9]等植物生物防治的研究已经取得了较大的进展, 但对人参病害的生物防治还罕有报道。本研究从人参的根际土壤中筛选出 1 株对人参根腐病原菌有极强拮抗作用的菌株 B69, 研究该菌株在人参的根、茎、叶和土壤的定殖规律及其对根腐病的盆栽和田间防治效果, 以期开发出具有应用价值的生防菌剂奠定基础。

1 材料与与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 内生细菌 B69 菌株由课题组从人参根中分离得到, 经鉴定为死谷芽孢杆菌 (*Bacillus vallismortis*), 保存在吉林农业大学药用植物栽培研究室。人参根腐病原菌 [*Fusarium solani* (Mart.) App. et Wollenw], 由吉林农业大学菌物研究中心提供。

1.1.2 供试植株 人参根腐病防效试验所用的人参植株来自吉林省白山市抚松县万良镇, 5 年生。

收稿日期: 2017-12-06

基金项目: 吉林省重点科技攻关项目 (编号: 20160204001YY)。

作者简介: 林星辰 (1992—), 女, 吉林辽源人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物规范化生产与质量控制。E-mail: 905537901@qq.com。

通信作者: 田义新, 博士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为药用植物栽培育种。E-mail: y. x. tian2003@163.com。

1.1.3 供试培养基及其他试剂 供试细菌的保存和培养使用营养琼脂 (NA) 培养基; 供试细菌液体发酵培养使用营养肉汤 (NB) 基础培养基; 病原真菌使用马铃薯葡萄糖 (PDA) 固体培养基; 此外还使用了 PDA 液体培养基。试剂主要有 10 mg/mL 利福平 (Rif) 溶液 (95% 乙醇溶解), 羧甲基纤维素钠 (CMC), 10% 多菌灵可湿性粉剂, 均由吉林农业大学药用植物栽培研究室提供。

1.1.4 试验场地 人参田间试验于 2017 年 6—9 月在吉林农业大学药用植物科技示范园进行, 采用一面坡式荫棚遮荫种植。

1.2 试验方法

1.2.1 抗利福平突变菌株的筛选 将活化好的拮抗细菌在 32 ℃、180 r/min 摇床中培养 2 d 制成拮抗细菌种子液。取 10 mL 种子液接种在含 20 μg/mL Rif 的 NB 培养液中。在 30 ℃、180 r/min 摇床中振荡培养 4~5 d 后, 如果培养液变浑浊, 则吸取 10 mL 接入 Rif 浓度为 40 μg/mL 的 100 mL NB 培养基中, 以后每次培养液中 Rif 的浓度依次增加, 直至标记至 300 μg/mL, Rif 的浓度分别为 40、60、80、100、150、200、300 μg/mL。然后用含 300 μg/mL Rif 的 NB 培养基平板检测并挑取能稳定生长, 且拮抗活性、菌落形态变化不大的标记菌株。为检测其遗传稳定性, 将其在 NB 培养基 (不含 Rif) 中连续培养 10 代后涂布于含 300 μg/mL Rif 的 NB 培养基平板上, 观察是否能正常生长。为检测其拮抗稳定性, 采用平板扩散法^[10], 以原始菌株为对照, 观察抑菌率是否存在差异。

1.2.2 抗利福平标记菌株在人参土壤中的定殖 采用灌根接种法^[11], 每盆 3 株, 于第 1 天、第 3 天、第 5 天、第 7 天、第 10 天、第 15 天、第 20 天、第 30 天分离根际土壤的细菌, 在含有 300 μg/mL 的利福平 NA 培养基平板中均匀涂布稀释液, 3 d 后计数, 计算含菌量。

1.2.3 细菌在植株内的定殖 采用灌根接种法^[11], 用盆钵种植方式, 分别于接菌后第 7 天、第 10 天、第 15 天、第 20 天、第 30 天时随机取 2 株人参苗进行根部、茎、叶目标菌株的分离、回收。

1.2.4 内生菌株 B69 对人参根腐病防效的盆栽试验 盆栽试验采用保护法和治疗法,待人参展叶期时,采用灌根接种法接种 B69 菌株发酵菌液和根腐病病菌孢子悬浮液。保护法:先接种 B69 菌株发酵菌液,3 d 后再接种 3×10^4 个/mL 根腐病病菌孢子悬浮液;治疗法:先接种 3×10^4 个/mL 根腐病病菌孢子悬浮液,3 d 后再接种 B69 菌株发酵菌液;以接种无菌发酵液为对照。每个处理 5 盆,每盆 3 株人参苗,20 d 灌根 1 次,每株接种 B69 菌株发酵菌液的浓度为 10^8 CFU/mL,接种量为 50 mL,共灌根 5 次。处理完成 20 d 后随机取 5 株人参苗观察根腐病发病情况,病情指数分级方法参考马凤茹等的方法^[12]。

1.2.5 内生菌株 B69 对人参田间病害的防治效果 田间试验采用随机区组设计,共设置 4 个处理,每个处理 3 个小区,小区面积为 3.0 m^2 。处理 1:单接病原菌;处理 2:生防菌+病原菌;处理 3:10% 多菌灵可湿性粉剂+病原菌;处理 4:未进行处理(CK)。待人参苗完全展叶后开始处理,处理 1 每个小区每株浇灌 50 mL 病原菌液;处理 2 每个小区每株浇灌 50 mL 根腐病病菌液+50 mL B69 菌株发酵菌液;处理 3 和 4 每个小区喷施 4 g/m^2 药液或清水。每隔 20 d 处理 1 次,共处理 5 次。

人参田间试验每个处理分别在 7 月 5 日、8 月 8 日、9 月 10 日调查 3 次,每个小区随机选择 5 点,每点调查 10 株,记录总叶片数和各叶片发病级数,计算出各处理的病情指数和防治效果。病害严重度分级,即人参根腐病发病程度参考马凤茹等的方法^[12]进行分级计算。

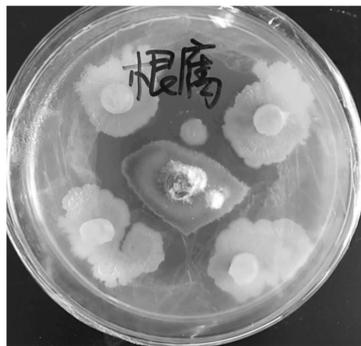


图2 B69 原始菌株

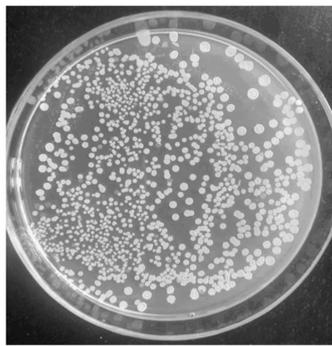


图3 B69 突变菌株在含利福平的 NA 平板上可以生长

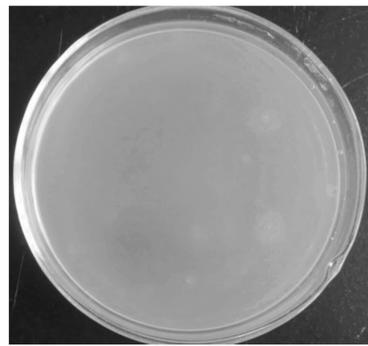


图4 B69 原始菌株在含利福平的 NA 平板上不能生长

2.3 内生菌 B69 菌株在人参植株内及其根际土壤中的定殖动态

2.3.1 内生菌 B69 菌株在根际土壤中的定殖动态 由图 5 可知,B69 菌株具有较好的土壤定殖能力。随着时间的延长,其在自然土和灭菌土中定殖量的消长动态一致,均呈现先降后升再降的趋势。B69 菌株在灭菌土中的定殖量小于在自然土中的定殖量,在灭菌土中的定殖量变化幅度则大于在自然土中的定殖量变化幅度。分析其原因可能是因为土壤灭菌后其理化性质、土壤微生物结构遭到破坏,且没有其他微生物对所接入生防细菌的影响,从而可能相对不利于生防细菌定殖能力的发挥。B69 菌株在土壤中定殖的初始菌量为 1×10^7 CFU/g,第 3 天后在灭菌土和自然土中定殖量迅速下降,第 10 天定殖量达到 1 个峰值,在自然土和灭菌土中分别为 6.57×10^6 、 4.25×10^6 CFU/g;第 10 天以后随着处理时间的延长定殖量逐渐减少,但在第 30 天 B69 菌株在自然土和灭菌

2 结果与分析

2.1 抗利福平突变菌株的筛选

通过对 B69 菌株进行抗利福平筛选,得到能在含利福平的 NA 固体培养基上稳定生长,且菌落形态、颜色等与原始菌株相同的突变菌株(图 1、图 2);在不含利福平的 NB 液体培养基中振荡培养后,其培养液对根腐病菌仍具有抑制作用,且与原始菌株的抑制效果基本相同。

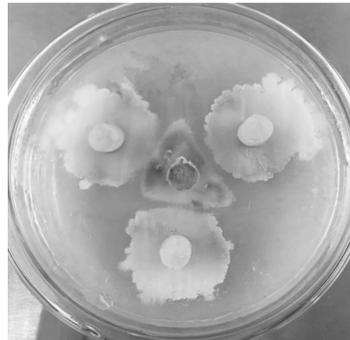


图1 B69 菌株抗利福平的突变菌株

2.2 抗利福平突变菌株的遗传稳定性

挑取抗利福平的突变标记菌株,在不含利福平的 NB 液体培养基中连续培养 10 代后,仍能在含利福平的 NA 固体培养基上生长(图 3、图 4),表明这株生防菌株的突变菌株具有遗传稳定性,可用于定殖研究。

土中的定殖量仍可达到 10^5 CFU/g 以上。

2.3.2 内生菌 B69 菌株在人参植株内的定殖动态 人参定苗的进行标记菌株发酵液灌根,第 3 天开始定期检测标记菌株在人参根、茎、叶中的定殖数量,发现植株的根中可检测到菌株,但对照中无。从定殖数量上看,B69 菌株在人参植株的根内定殖数量最大,茎中次之,叶中最少(图 6,图 7);随着定殖时间的延长,各部分定殖菌量呈现先增后减的趋势,这说明细菌进入植物体内的途径可能与根部有关。B69 菌株在人参体内表现出一定的定殖能力,从不同处理来看,自然土中菌株在人参体内的传导能力优于灭菌土,且自然土中的定殖菌量高于灭菌土,因此推断自然土中存在的某些微生物可能有利于 B69 菌株的定殖。自然土中生防菌株 B69 在人参根、茎、叶内的最大定殖量均出现在第 15 天,分别为 3.54×10^6 、 5.26×10^5 、 2.12×10^5 CFU/g;灭菌土中生防菌株 B69 在人参根、茎、叶内的最大定殖量也出现在第 15 天,分别为 2.11×10^6 、

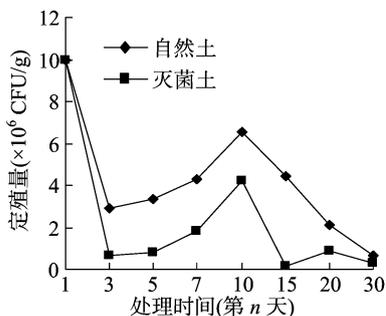


图5 菌株 B69 在自然土和灭菌土的定殖动态

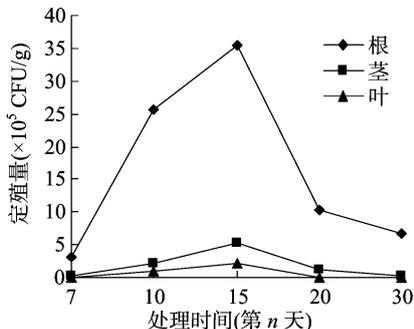


图6 菌株 B69 在人参体内的定殖动态(自然土)

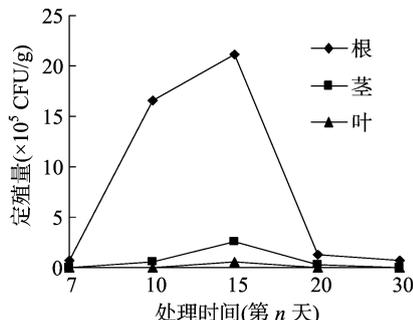


图7 菌株 B69 在人参体内的定殖动态(灭菌土)

2.62 × 10⁵、5.83 × 10⁴ CFU/g。

2.4 内生菌 B69 发酵液对人参根腐病的盆栽防治

由表 1 可以看出,内生菌 B69 菌株发酵液对根腐病的防治效果明显。采用保护作用处理的防效优于治疗作用处理的防效,两者的防效分别达到 60.8%、56.6%,表明菌株 B69 发酵液的预防作用效果较好,但两者防效差异不显著。保护作用处理和治疗作用处理的病情指数分别为 25.32、28.11,均低于对照处理的 47.83,差异达到显著水平(P < 0.05)。

表 1 菌株 B69 发酵液对人参根腐病的防效

处理	病情指数	防治效果 (%)
保护作用处理	25.32 ± 1.45c	60.8 ± 0.75a
治疗作用处理	28.11 ± 2.26b	56.6 ± 0.83a
CK	47.83 ± 1.18a	

注:数据后不同小写字母表示差异显著(P < 0.05),下表同。

2.5 内生菌 B69 对人参根腐病的田间防治

由表 2 可以看出,在不接种病原菌的 CK 中,根腐病发病的病情指数为 41.58,CK 组的病情指数可达单接根腐病菌组的 67%左右。结果表明,5 年生人参苗本身已经存在发病机制,若不接种根腐病病菌,供试人参苗亦可发病。在单接根腐病病菌对照中,病情指数为 61.34;在内生菌 B69 菌株与根腐病病菌混接处理中,病情指数为 25.41,其对根腐病的相对防效为 58.56%;而在 10% 多菌灵可湿性粉剂与根腐病病菌混接处理中,病情指数为 28.14,其对根腐病的相对防效为 54.12%。可见,生防菌 B69 菌株对人参根腐病具有更好的防治效果,且其相对防效显著高于农药处理组(P < 0.05)。

表 2 菌株 B69 发酵液对人参根腐病的田间防治效果

处理	病情指数	相对防效 (%)
生防菌 B69 菌株 + 根腐病病菌	25.41 ± 1.75d	58.56 ± 2.92a
10% 多菌灵可湿性粉剂 + 根腐病病菌	28.14 ± 0.97c	54.12 ± 2.47b
单接根腐病病菌	61.34 ± 0.89a	
CK	41.58 ± 0.84b	

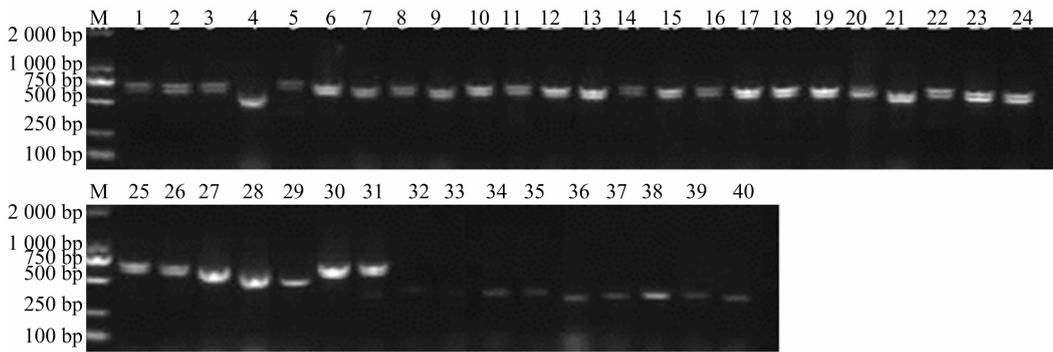
3 结论与讨论

研究表明,定殖是生防菌发挥作用的重要因素,许多室内防治效果显著的菌株在田间很难达到预期的效果,究其原因不能有效定殖于植物根际或体内^[13]。本研究采用抗生素标记法,筛选出最佳标记菌株。定殖动态结果表明,B69 菌株在人参根际可有效定殖 30 d 以上,覆盖人参的整个旺盛生长期,表明 B69 菌株在生产实践上具有较大的生物防治潜力。

细菌作为生防菌防治植物病害主要是利用其强力的竞争机制,其中芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)由于具有抗逆性强、繁殖速度快、易于培养等优点而被广泛用作生防菌源^[14]。Dionisio 利用 *B. amyloliquefaciens* DGA14 防治香蕉的冠腐病取得了较好的效果^[15];Chen 等利用 *B. amyloliquefaciens* S20 控制茄子的细菌性枯萎病效果显著^[16];贾斌等利用解淀粉芽孢杆菌拮抗人参黑斑病病菌,抑制率达到 80%^[17]。本研究结果表明,死谷芽孢杆菌 B69 菌株对根腐病病菌抑制效果明显。盆栽试验结果表明,采用保护作用处理的防效优于治疗作用处理的防效,两者的防效分别达到 60.8%、56.6%,表明 B69 菌株发酵液的预防作用效果较好。保护和治疗作用处理的病情指数分别为 25.32、28.11,均显著低于对照组的 47.83 (P < 0.05)。田间试验结果表明,人参在栽植后单接根腐病病菌的病情指数为 61.34;在生防菌与根腐病病菌混接处理中,人参在栽植后的病情指数为 25.41,其对人参根腐病的相对防效为 58.56%;而在 10% 多菌灵可湿性粉剂与根腐病病菌混接处理中,人参在栽植后的病情指数为 28.14,其对人参根腐病的相对防效为 54.12%,可见,B69 菌株对人参根腐病具有更好的防治效果,且其相对防效较农药组高 4.44%。因此验证了 B69 菌株是防治根腐病的良好菌源,具有较大的开发潜能。

参考文献:

- [1] 陈彩燕,郭刚. 生物杀菌剂研发进展[J]. 热带林业,2002,30(3):16-18,21.
- [2] 赵继红,李建中. 农用微生物杀菌剂研究进展[J]. 农药,2003,42(5):6-8.
- [3] 冯蕾,王志方,张小勇,等. 微生物复合肥对主要农作物增产效果研究[J]. 新疆农业科学,1997(1):24-26.
- [4] 王芝恩,周强,张丽杰,等. 辽宁东部地区林下人参几种常见病害[J]. 现代农业科技,2009(10):112-114.
- [5] Ryu H, Park H, Suh D S, et al. Biological control of *Colletotrichum panacicola* on *Panax ginseng* by *Bacillus subtilis* HK - CSM - 1 [J]. Journal of Ginseng Research,2014,38(3):215-219.
- [6] Jiang C M, Shi J L, Liu Y L, et al. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis* [J]. Food Control,2014,35(1):41-48.
- [7] 冯志珍,李金岭,陈太春,等. 番茄疫霉根腐病拮抗细菌 FC12-05 的筛选、鉴定及其抑菌活性初探[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(4):107-114.



M为DNA marker; 条带1~40对应40个DH植株
图2 小孢子植株分子检测结果

高,也可能没有发生胚状体。在这个未知条件还没有解决之前,由于花期时长有限,试验中尽量保证每天有足够的花蕾是获得较多DH植株的一个简单直接的方式。

除了基因型对小孢子培养的影响外,如何高效利用已经形成的胚状体是一个亟待解决的问题。本试验发现,胚状体的大小对于转绿率的影响比较大,子叶胚宽度小于2 mm时,一般很难转绿,推测由于出胚率较高的品种、有限的空间及培养基限制了胚状体生长空间及获得较多营养物质。笔者尝试将较大的胚状体转出后,换成新的NLN-10培养基继续避光振荡培养,结果显示该方法可促进胚状体的生长,提高转绿率。归因于增加胚状体生存空间及可用营养物质,同时置换掉培养基中胚状体产生的一些有害代谢产物。同一品种在不同时期的出胚率也不一样,说明外在环境条件对胚状体发生也会产生一定影响,探究利于出胚的环境条件,也是一个可以有效提高易出胚品种出胚数的方法。

利用抗根肿病基因特异分子标记可以快速检测大白菜材料含有的抗病基因,本研究利用*CRa*特异分子标记检测获得的40个DH植株,有27个携带抗病基因*CRa*,纯合抗病植株与感病植株比为3:1。所用供试母株材料为杂合植株,根据孟德尔遗传定律中的分离定律,预测试验结果纯合抗病植株与纯合感病植株比为1:1,与本次试验结果相差较大。由于成苗过程中胚状体有大量损耗,所以无法判断是含有抗根肿病*Cra*基因的花粉更容易形成胚状体,还是含有抗病基因的胚状体更容易成苗。在后续试验中,可以通过拓宽供试材料基因型,增加出胚率、提高成苗率等有效方法来获取更多抗根

肿病纯合种质资源,进而应用于抗根肿病育种实践当中。

参考文献:

- [1]田雅琳. 十字花科根肿病研究现状及未来趋势[J]. 天津农业科学,2015,21(4):123-126.
- [2]索欢,陈龙正,徐海,等. 十字花科根肿病研究进展[J]. 安徽农业科学,2015,43(14):115-117,126.
- [3]张红,张斌,闻凤英,等. 大白菜根肿病的遗传规律及抗病基因定位研究[J]. 华北农学报,2017,32(4):60-66.
- [4]原玉香,赵艳艳,魏小春,等. 河南省大白菜根肿病菌生理小种鉴定[J]. 河南农业科学,2017,46(7):71-76.
- [5]杨征. 大白菜抗根肿病品种鉴定与抗病基因定位研究[D]. 青岛:青岛农业大学,2015.
- [6]黄元贵. 十字花科作物根肿病综合防治技术[J]. 现代农业科技,2017(3):111-111.
- [7]Kageyama K, Asano T. Life cycle of *Plasmodiophora brassicae* [J]. Journal of Plant Growth Regulation,2009,28(3):203-211.
- [8]罗延青,李劲峰,俎峰,等. 芸薹属作物根肿病抗性遗传研究进展[J]. 安徽农业科学,2011,39(31):19162-19163.
- [9]Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus* [J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie,1982,105(5):427-434.
- [10]Bhatia R, Dey S, Sood S, et al. Efficient microspore embryogenesis in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) for development of plants with different ploidy level and their use in breeding programme [J]. Scientia Horticulturae,2017,216:83-92.
- [11]卢松,陶莲,吴康云,等. 微型结球白菜小孢子的培养及植株再生[J]. 贵州农业科学,2015,43(8):30-33.
- [8]邓振山,马娜娜,徐文梅,等. 大蒜鳞茎中抗番茄灰霉病内生菌的筛选及其防治效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2012,40(5):50-56.
- [9]韦巧婕,郑新艳,邓开英,等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及其生物防治[J]. 南京农业大学学报,2013,36(1):40-46.
- [10]贾凤安,陈亮,陈立,等. 大棚甜瓜三种主要真菌病害拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 植物保护学报,2010,37(6):505-510.
- [11]孙卓. 人参病害生防细菌的筛选及其防病作用研究[D]. 长春:吉林农业大学,2014.
- [12]马凤茹,邢云章,王韵秋. 人参锈腐病调查方法初探[J]. 中药材,1983(5):12-15.
- [13]Weyens N, Lelie D V D, Taghavi S, et al. Phytoremediation: plant - endophyte partnerships take the challenge [J]. Current Opinion in Biotechnology,2009,20(2):248-254.
- [14]权春善,王军华,徐洪涛,等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报,2006,46(1):7-12.
- [15]Alvindia D G. Enhancing the bioefficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 with inorganic salts for the control of banana crown rot [J]. Crop Protection,2013,51:1-6.
- [16]Chen D, Liu X, Li C, et al. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt [J]. Journal of Environmental Management,2014,137(1):120-127.
- [17]贾斌,赵贞丽,沈国娟,等. 人参黑斑病生防用内生拮抗菌分离鉴定及发酵浓缩液性质[J]. 中国森林病虫,2014,33(3):5-10,17.

(上接第137页)