

· 中药农业 ·

人参病害生防微生物菌剂的抑菌活性评价[△]丁万隆¹, 王蓉¹, 郝单丽², 张晓云¹, 李勇^{1*}

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 明确12种市售微生物菌剂产品中分离菌株对人参黑斑病菌和人参灰霉病的抑菌效果, 为人参病害绿色防控提供参考依据。方法: 采用稀释平板法从微生物菌剂中分离活体菌株; 对峙培养法评价分离菌株的抑菌活性; 十字交叉法测量菌落直径。结果: 5种木霉菌剂产品中仅有1种分离到活体菌株, 尽管该菌株对人参黑斑病菌和人参灰霉病的抑菌活性较高(抑菌率分别为65.18%和76.82%), 但菌剂中活菌的分离数偏低。7种芽孢杆菌菌剂中均能分离到活体菌株, 除微囊粒剂和水剂外, 其他菌剂产品中活体菌株分离数均较高; 上述分离菌株对人参黑斑病菌和人参灰霉病的抑菌活性低于木霉菌, 抑菌率分别为27.21%~33.04%和10.74%~29.40%。结论: 芽孢杆菌和木霉杀菌剂均具有防治人参病害的生防潜力, 考虑菌剂产品的稳定性和环境耐受性, 芽孢杆菌类微生物菌剂更适合人参病害的田间防控。

[关键词] 人参黑斑病; 人参灰霉病; 芽孢杆菌; 木霉; 抑菌活性

Evaluation of Antagonistic Activity of Biocontrol Microbial Agents against Ginseng Diseases

DING Wan-long¹, WANG Rong¹, HAO Dan-li², ZHANG Xiao-yun¹, LI Yong^{1*}

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences &

Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Science, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To ensure the inhibition of fungal and bacterial strains isolated from 12 commercial microbial agents against *Alternaria panax* and *Botrytis cinera*. **Methods:** The living strains were isolated from microbial agents by dilution plate method. Antagonistic activities were evaluated by plate confrontation culture method. The diameters of pathogens were measured by crossing method. **Results:** The living strain only isolated from 1 out of 5 *Trichoderma* agents. Though *Trichoderma* isolate shown high antagonistic activity against *A. panax* and *B. cinera*, with the inhibitive rate of 65.18% and 76.82%, respectively. However, the number of the living spores was very low. On the contrary, the living bacteria were successfully isolated from all 7 *Bacillus* agents, and except for microencapsulant and water agents, the number of the living bacteria isolated from the other *Bacillus* agents were significantly higher than that from *Trichoderma* agent. And the inhibitive rate of them against *A. panax* and *B. cinera* were varied from 27.21% to 33.04%, and from 10.74% to 29.40%, respectively. **Conclusion:** *Bacillus* agents and *Trichoderma* agents having biocontrol potential against *A. panax* and *B. cinera*. Considering the stability and environmental tolerance, *Bacillus* agents were more fitted for the biocontrol of ginseng diseases in the field.

[Keywords] *Alternaria Panax*; *Botrytis cinera*; *Bacillus*; *Trichoderma*; inhibitive activity

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180606002

人参黑斑病由人参链格孢 *Alternaria panax* Whetz 引起, 属该菌半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 链格孢属真菌^[1]。人参灰霉病病原为葡萄孢菌 *Botrytis cinera* Pers. ex Fr., 属半知菌亚门, 丝孢纲, 丝孢目, 暗丛梗孢科, 葡萄孢属^[2]。两种病害是人参、西洋

参生产上主要的叶部病害, 主要为害人参叶片, 常造成人参叶片大面积早期脱落或干枯, 严重影响人参生长后期干物质积累, 对人参产量影响较大^[3]。另外, 两种病害还可侵染人参茎秆、花梗和果实, 造成参籽减产^[4]。

[△] [基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2016-I2M-3-017); 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JL-27)

* [通信作者] 李勇, 研究员, 研究方向: 药用植物病害生物防治; E-mail: liyong@implad.ac.cn

目前, 对人参黑斑病、灰霉病等真菌性病害的防治, 主要依赖农业措施和化学农药^[5-6]。由于单一农药的防治效果并不理想, 多种农药长期使用不仅加大了病原微生物抗药性产生的潜在风险, 还严重破坏了大气、水源、土壤等生态环境因子以及赖以生存的生物以及微生物系统平衡^[2,7]。另外, 中药材中残留的化学农药对用药安全也构成极大的安全隐患^[8]。

通过绿色防控手段减少化学农药使用, 是中药材农残超标问题的关键。木霉菌和芽孢杆菌是生防微生物的重要组成部分, 其在植物病害绿色防控过程中发挥重要作用^[9]。目前, 国内市场微生物菌剂产品较多, 但是其使用范围仅局限于农作物及设施蔬菜等, 是否适用于中药材病害防治需要研究后确认。为此, 本研究直接从微生物菌剂中分离菌株, 以人参黑斑菌和人参灰霉菌为病原靶标, 通过对峙培养评价不同微生物菌剂中分离菌株的抑菌效果, 从而间接评价上述菌剂产品用于人参病害防治的可行性, 为人参病害绿色防控提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株: 人参黑斑菌 *Alternaria panax* Whetz 和人参灰霉菌 *Botrytis cinerea* Pres. ex Fr. 由中国医学科学院药用植物研究所植保室保存。

生防菌株: 供试生防菌剂共计 12 种, 包括: 枯草芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌、坚强芽孢杆菌和多粘芽孢杆菌可湿性粉剂 7 种; 哈茨木

霉、绿色木霉等木霉菌制剂 5 种。具体信息详见表 1。

1.2 菌株分离、纯化

将木霉菌剂和芽孢杆菌制剂根据包装浓度稀释成 1×10^6 cfu · mL⁻¹ 菌悬液。木霉菌用移液器取 50 μL 于 PDA 平板, 涂布器均匀涂布整个平板, 25 ℃ 恒温倒置培养 5 d, 从菌落边缘挑取菌丝于 PDA 平板上纯化培养。芽孢杆菌用接种环蘸取适量, 在 LB 培养基上划线, 30 ℃ 恒温倒置培养 12 ~ 24 h, 挑取单菌落, 纯化培养。每种菌剂 3 次重复。

1.3 抑菌活性评价

将木霉菌、人参黑斑菌和人参灰霉菌分别接种到 PDA 平板上, 25 ℃ 恒温倒置培养 5 d。用打孔器制成 Φ 5 mm 菌饼, 分别将木霉菌和病菌对称接种于 PDA 平板两端, 菌饼相距 5 cm。以 PDA 培养基单独接种人参致病菌作为空白对照。

将纯化的芽孢杆菌划线接种到 LB 平板, 30 ℃ 恒温倒置培养 1 d。将人参致病菌接种于 PDA 平板一侧, 将活化的芽孢杆菌接种到平板的另一侧, 二者相距 5 cm。以 PDA 培养基单独接种人参致病菌作为空白对照。

将接种后的培养基置于 25 ℃ 恒温倒置培养 7 ~ 10 d 后, 记录人参致病菌菌落生长情况, 根据病菌统计结果计算抑菌率。每种处理 3 次重复。

$$\text{抑菌率}(\%) = \frac{r_{\text{对照组}} - r_{\text{处理组}}}{r_{\text{对照组}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 数据处理

Excel 2007 软件用于原始数据的统计分析及绘图。

表 1 供试生物杀菌剂相关信息

编号	名称	剂型	含量/cfu · g ⁻¹	生产企业
1#	枯草芽孢杆菌	可湿粉剂	100 亿	德强生物股份有限公司
2#	枯草芽孢杆菌	微囊粒剂	1 亿	成都特普生物科技股份有限公司
3#	枯草芽孢杆菌	水剂	2 亿	河南省莱思坪园林植保有限公司
4#	蜡质芽孢杆菌	可湿性粉剂	8 亿	山东泰诺药业有限公司
5#	解淀粉芽孢杆菌	可湿性粉剂	10 亿	陕西先农生物科技有限公司
6#	坚强芽孢杆菌	可湿性粉剂	25 亿	宁国市百立德生物科技有限公司
7#	多粘芽孢杆菌	可湿性粉剂	50 亿	山西省临猗中晋化工有限公司
8#	木霉	可湿性粉剂	2 亿	山东泰诺药业有限公司
9#	木霉	水分散粒剂	2 亿	云南星耀生物制品有限公司
10#	木霉	母液	25 亿	山东泰诺药业有限公司
11#	哈茨木霉	水分散粒剂	1 亿	成都特普生物科技股份有限公司
12#	绿色木霉	可湿性粉剂	50 亿	盐城市神微微生物菌种科技有限公司

2 结果与分析

2.1 生防菌株的分离纯化

微生物菌剂对温度、湿度、光照、储藏时间等因素敏感,流通、储存等环节操作不当极易造成菌剂失活。研究发现,供试 5 种木霉制剂中,仅有哈茨木霉制剂(11#)中分离获得活体菌株,木霉三种剂型(8#~10#)和绿色木霉可湿性粉剂(12#)均未分离到活体菌株。相对而言,芽孢杆菌类杀菌剂质量相对稳定,7 种芽孢杆菌制剂均分离到活体菌株。但不同剂型之间差别明显,可湿性粉剂分离到的活菌数量明显高于微囊粒剂和水剂(表 2)。

表 2 12 种微生物杀菌剂中活菌株的分离情况

编号	名称	剂型	菌株分离数量
1#	枯草芽孢杆菌	可湿性粉剂	+++
2#	枯草芽孢杆菌	微囊粒剂	+
3#	枯草芽孢杆菌	水剂	+
4#	蜡质芽孢杆菌	可湿性粉剂	+++
5#	解淀粉芽孢杆菌	可湿性粉剂	+++
6#	坚强芽孢杆菌	可湿性粉剂	+++
7#	多粘类芽孢杆菌	可湿性粉剂	+++
8#	木霉	可湿性粉剂	—
9#	木霉	水分散粒剂	—
10#	木霉	母液	—
11#	哈茨木霉	水分散粒剂	++
12#	绿色木霉	可湿性粉剂	—

注:“+++”表示活菌分离量大;“++”表示活菌分离量较大;“+”表示活菌分离量小;“—”表示未分离到活菌。

2.2 分离菌株对人参黑斑菌的抑菌活性

人参黑斑菌(对照组)接种后生长迅速,第 3 d 与木霉处理组形成显著差异,第 5 d 与芽孢杆菌处理组形成显著差异。与芽孢杆菌对峙培养过程中,自第 5 d 开始,人参黑斑菌与芽孢杆菌之间形成明显的抑菌带,病菌生长基本停滞。与哈茨木霉对峙培养过程中,木霉生长迅速,第 3 d 就将人参黑斑菌包围,病菌生长明显减缓;第 5 d 后人参黑斑菌生长空间进一步被哈茨木霉压缩,到第 7 d 能观察到哈茨木霉菌丝已经覆盖人参黑斑菌,病菌生长趋于停滞(图 1)。

试验结果表明,哈茨木霉生长迅速,对峙过程中对人参黑斑菌的抑菌作用显著,抑菌率达到 65.18%;芽孢杆菌没有真菌发达的菌丝体结构,无法快速生长,对人参黑斑菌的抑菌效果不如木霉菌显著,且不同菌株间的抑菌作用差异不显著,抑菌

率仅为 27.21%~33.04%。

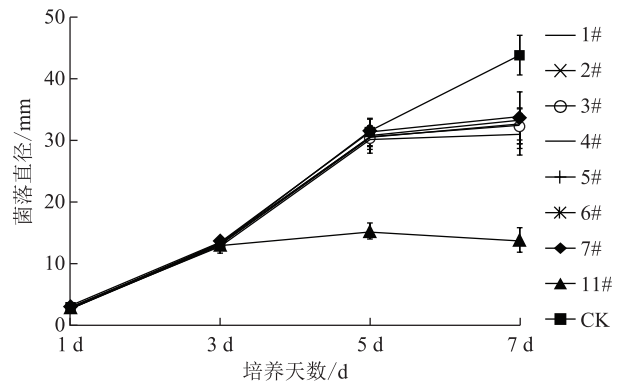


图 1 生防菌株与 人参黑斑菌 对峙培养的生长情况

表 3 生防菌株对 人参黑斑菌 的抑菌效果

编号	菌剂名称	病菌半径/mm	抑菌率(%)
1#	枯草芽孢杆菌	32.3±0.58 c	30.23
2#	枯草芽孢杆菌	32.7±1.33 c	29.37
3#	枯草芽孢杆菌	32.3±1.53 c	30.23
4#	蜡质芽孢杆菌	31.0±1.00 c	33.04
5#	解淀粉芽孢杆菌	31.0±1.00 c	33.04
6#	坚强芽孢杆菌	33.7±1.17 c	27.21
7#	多粘类芽孢杆菌	33.7±1.52 c	27.21
11#	哈茨木霉	14.0±1.00 b	65.18
CK	—	46.3±0.56 a	—

注:表中不同英文字母表示在 $P<0.05$ 水平存在显著差异。

2.3 分离菌株对 人参灰霉菌 的抑菌活性

人参灰霉菌(对照组)接种后生长迅速,第 3 d 与木霉及芽孢杆菌(2#菌株外)处理组形成显著差异。与芽孢杆菌对峙培养过程中,人参灰霉菌病菌自第 3 d 生长速度趋缓,第 5 d 时与对照组形成显著差异,第 7 d 后病菌生长基本停滞,此时能观察到明显的抑菌带。芽孢杆菌 2# 菌株无抑菌带生成,病菌菌丝能越过 2# 菌株继续生长。与哈茨木霉对峙培养过程中,木霉生长迅速,第 3 d 将人参灰霉菌完全包围,此后人参灰霉菌菌落逐渐减小,到第 7 d 能观察到哈茨木霉菌丝已经覆盖人参灰霉菌,病菌生长趋于停滞(图 2)。

抑菌试验结果表明,哈茨木霉对 人参灰霉菌 的抑菌作用显著,抑菌率 76.82%;供试芽孢杆菌菌株对 人参灰霉菌 的抑菌效果存在较大差异,其中 3#、4#、7# 菌株的抑菌效果较好,抑菌率 25.17%~29.40%;1#、5#、6# 菌株的抑菌效果较差,抑菌率 16.74%~20.32%;2# 菌株的抑菌效果最差,抑菌率仅有 10.74%。

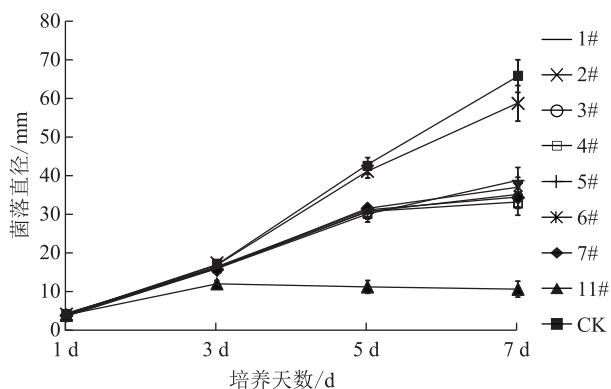


图2 生防菌株与人参灰霉菌对峙培养的生长情况

表4 生防菌株对人参灰霉菌的抑菌效果

编号	菌剂名称	平均半径 (mm)	抑菌率 (%)
1#	枯草芽孢杆菌	38.40 ± 3.10 d	17.60%
2#	枯草芽孢杆菌	58.73 ± 0.42 e	10.74%
3#	枯草芽孢杆菌	34.87 ± 1.89 c	25.17%
4#	蜡纸芽孢杆菌	32.9 ± 1.67 c	29.40%
5#	解淀粉芽孢杆菌	38.80 ± 0.60 d	16.74%
6#	坚强芽孢杆菌	37.13 ± 1.22 d	20.32%
7#	对粘类芽孢杆菌	34.40 ± 0.72 c	26.18%
11#	哈茨木霉菌	10.80 ± 0.40 b	76.82%
CK	—	65.8 ± 0.60 a	—

注：表中不同英文字母表示在 $P < 0.05$ 水平存在显著差异。

3 讨论

病害防治一直是困扰人参产业发展的棘手问题。人参病害防治过程中农药滥用，导致农药残留问题突出^[10-11]。加快病害防治技术革新，利用环境友好的微生物菌剂实现人参病害绿色防控，是解决人参等中药材农残超标问题的关键。目前，尽管枯草芽孢杆菌和哈茨木霉在人参病害防治过程中已取得合法登记，但市场上同类微生物菌剂标注的使用范围大多局限于农作物或设施蔬菜，其是否对人参病害有确切防效缺乏科学依据。为此，本研究以人参黑斑菌和人参灰霉菌为靶标，随机从市场上选取了12种不同剂型木霉和芽孢杆菌微生物菌剂产品，通过活体菌株分离及抑菌活性验证，明确了供试菌剂在人参病害防治上的适用性，研究结果对于人参病害防治过程中微生物杀菌剂的选择具有一定的指导意义和参考价值。

木霉菌分生孢子易受温度、光照、湿度等环境因子影响，储藏不当极易造成分生孢子部分或全部失活^[12]。本研究发现，供试5份木霉菌剂中仅有1份分离到活体菌株，且数量很少，推测可

能是菌剂流通过程中保存不当所致。芽孢杆菌能够产生内生芽孢，对外界不良环境具有较强的耐受力^[13]。本文研究结果也充分证实了上述观点。全部供试5份芽孢杆菌可湿性菌剂均能大量分离到活体菌株。但是，2份芽孢杆菌水剂和微囊剂中分离到的活菌数量明显偏低，由于2份菌剂与可湿性粉剂是同批次产品，说明两种剂型并不适合芽孢杆菌的长期保存。因此，建议尽可能购买最新批次的木霉或芽孢杆菌菌剂产品，以确保防病效果。上述菌剂室内抑菌活性仅作参考，实际防病效果以田间数据为准。

参考文献

- [1] 孙卓,杨利民,马秀杰,等. 人参黑斑病拮抗细菌的分离筛选和鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2014, 36(3): 276-281.
- [2] 孙卓,杨利民. 人参灰霉病拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. 植物保护学报, 2016, 43(6): 935-942.
- [3] 潘晓曦,关一鸣,吴连举. 生防菌 B-09 对人参灰霉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.
- [4] 陈长卿,李桐,李欣莲,等. 人参内生细菌 NJ13 在宿主体内定殖特性及对人参黑斑病的防治效果[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(10): 1782-1787.
- [5] 韩润亭,张金花,任金平,等. 25% 阿米西达悬浮剂防治人参黑斑病田间药效试验. 吉林农业科学, 2007, 32(1): 40-41.
- [6] 王春伟,白庆荣,高洁,等. 22 种杀菌剂及其不同配比对人参灰霉病菌的毒力测定[J]. 农药, 2011, 50(1): 61-64.
- [7] 丁宪文,宋明海,刘维翠,等. 人参黑斑病低残留防治药剂对比试验[J]. 人参研究, 2007, 19(1): 38-39.
- [8] 康传志,郭兰萍,周涛,等. 中药材农残研究现状的探讨[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(2): 155-159.
- [9] 邱德文. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略[J]. 植物保护, 2010, 36(4): 15-18.
- [10] 荣维广,郭华,杨红. 我国中药材农药残留污染研究现状[J]. 农药, 2006, 45(5): 302-305.
- [11] 佟鹤芳,薛健,吴晓波. 中药材农药残留检测方法与研究[J]. 中国现代中药, 2011, 13(6): 49-51.
- [12] 张晶晶,黄亚丽,马宏,等. 木霉厚垣孢子可湿性粉剂的研制[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 103-109.
- [13] 王晓阁. 枯草芽孢杆菌研究进展与展望[J]. 中山大学研究生学刊(自然科学、医学版), 2012, 33(3): 14-23.

(收稿日期 2018-06-06)