

· 中药农业 ·

半夏软腐病生防菌株筛选和田间应用探究[△]桂颖¹, 蒋春号¹, 程旭^{1,2}, 王超^{1,3}, 周冬梅^{1,4}, 王沫⁵, 郑颖¹, 郭坚华^{1*}, 牛冬冬^{1*}

1. 南京农业大学, 江苏 南京 210095;

2. 襄阳市农业科学院, 湖北 襄阳 441057;

3. 南京国环有机产品认证中心, 江苏 南京 210042;

4. 江苏省农业科学院, 江苏 南京 210014;

5. 华中农业大学, 湖北 武汉 430070

[摘要] 目的: 开展生物防治试验, 探究半夏软腐病绿色防控技术, 为半夏软腐病绿色防控提供有效途径。方法: 通过 16S rRNA 扩增鉴定病原菌, 利用赋值法和温室、田间试验筛选生防菌剂。结果: 2011—2012 年诊断了半夏软腐病症状, 鉴定其病原物为胡萝卜软腐果胶杆菌 *Pectobacterium carotovorum*。2013—2014 年从 15 种生防菌剂和产品中筛选获得有效防治该病的三菌混合生防菌剂 BBS, 并登记为微生物肥“宁盾”。2015—2018 年, 在不同地区开展“宁盾”的用法用量试验及田间示范试验。2019 年, 利用“宁盾”在全程绿色种植体系中开展的推广性田间试验结果表明, “宁盾”对半夏具有明显的防病促生效果, 与对照组相比, 对软腐病的防治效果达 88.7%, 出苗率、珠芽分化率可提高 52.8%、65.7%, 产量提高 21.43%。结论: 半夏软腐病由胡萝卜软腐果胶杆菌引起, “宁盾”对半夏软腐病具有显著防效。

[关键词] 半夏; 生防菌剂“宁盾”; 珠芽分化率; 软腐病; 防治效果

[中图分类号] R282.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2022)10-1952-10

doi: 10.13313/j.issn.1673-4890.20211026002

Screening and Field Application of Biocontrol Strains against Soft Rot of *Pinellia ternata*GUI Ying¹, JIANG Chun-hao¹, CHENG Xu^{1,2}, WANG Chao^{1,3}, ZHOU Dong-mei^{1,4}, WANG Mo⁵, ZHENG Ying¹,GUO Jian-hua^{1*}, NIU Dong-dong^{1*}

1. Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

2. Xiangyang Academy of Agricultural Sciences, Xiangyang 441057, China;

3. Organic Food Development and Certification Center of China, Nanjing 210042, China;

4. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

5. Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

[Abstract] **Objective:** Experiments on biological control for soft rot of *Pinellia ternata* (Thunb.) Brei were carried out to explore the green control method for this disease. **Methods:** The 16S rRNA gene fragment of the pathogen was amplified for identification, and the biocontrol agents were screened by value assignment method and greenhouse and field experiments. **Results:** From 2011 to 2012, the symptoms of the soft rot were diagnosed, and the pathogen was identified as *Pectobacterium carotovorum*. In the next two years, the mixture of three strains (BBS) was screened out from 15 kinds of biocontrol agents and products, which can effectively control the disease. Meanwhile, the mixture was registered as microbial fertilizer "Ningdun". From 2015 to 2018, experiment on the usage and dosage of "Ningdun" and field demonstration experiment were performed in different areas. In 2019, "Ningdun" was used in the green planting system of *P. ternata* and showed remarkable effect in controlling the disease and promoting plant growth. The control effect of "Ningdun" on soft rot was up to 88.7% as compared with the control. In addition, with this biocontrol agent, the emergence rate and

[△] [基金项目] 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助项目

* [通信作者] 牛冬冬, 教授, 研究方向: 病害绿色防治和作用机制; Tel: 025-84399093, E-mail: ddniu@njau.edu.cn
郭坚华, 教授, 研究方向: 中药材绿色防控; Tel: 025-84395312, E-mail: jhguo@njau.edu.cn

bulbil differentiation rate were 52.8% and 65.7% higher, and the yield was 21.43% higher. **Conclusion:** The soft rot of *P. ternata* is caused by *P. carotovorum*, which can be controlled with "Ningdun", a mixture of three biocontrol strains.

[Keywords] *Pinellia ternata* (Thunb.) Brei; biocontrol agent "Ningdun"; differentiation rate of bulbil; soft rot; control effect

半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Brei 为天南星科 (Araceae) 半夏属 (*Pinellia*) 多年生单子叶草本植物, 是我国重要中药材之一^[1-2]。其在我国广泛分布于除内蒙古、新疆、青海、西藏以外的地区, 主产于四川、湖北、河南、贵州、安徽、江苏等地。半夏块茎经炮制可入药, 性温, 味辛, 具有降逆止呕、燥湿化痰、消痞散结的功效^[3]。其有种子繁殖、块茎繁殖和珠芽繁殖3种繁殖方式。但半夏的有性繁殖退化, 结实率和种子的萌发率极低, 在自然中以无性繁殖为主。块茎的收获源于上一生长季节中已存在的个体, 不增加新的个体数, 而生产实际中需种量大, 因此, 着生于叶腋、花序轴等位置繁殖系数大的珠芽成为半夏的主要繁殖器官^[4-5]。

半夏具有很好的药效和商业开发价值, 也是重要的出口产品。近年来, 国内销量及出口量成倍增加, 而野生资源及产量却不断减少, 从而使供求缺口日益扩大。其人工栽培日益兴盛, 使半夏生产中病虫害愈发严重。半夏软腐病是半夏生长过程中主要病害之一, 在全国各种种植地均有发生。7月下旬至8月上旬高温多雨, 是半夏软腐病高发时期, 通常使用多菌灵、百菌清、甲基硫菌灵、毒克星等化学农药进行防治。随着化学农药的滥用, 抗药性、环境污染、土壤板结等问题已经愈发严重。在国家倡导建设生态农业、走可持续发展道路的形势下, 有必要寻找安全且能保障产量的半夏绿色种植方法。据中国农药信息网 (<http://www.chinapesticide.org.cn/hysj/index.jhtml>) 数据显示, 我国国内登记用于防治软腐病的产品共18种, 其中生物农药有4种, 均为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 制剂, 主要防治对象为大白菜。因此, 软腐病的生物防治技术仍有极大的发展空间, 尤其是中药材生防产品的研发。

本研究从田间取样的感病半夏中分离纯化病原菌, 按照科赫氏法则进行了诊断鉴定。针对此病菌, 从本课题组生防菌种质资源库中筛选出三菌合剂BBS; 开展进一步田间试验证明BBS对半夏的促生作用及对细菌性软腐病的防治效果, 并且提高了珠芽分化率、增加了繁殖体数量、促进了光合作用和光合产物的积累, 从而达到提高产量的效果。

1 材料

1.1 样品

本研究所用中药材样品由华中农业大学植物科学技术学院王沫教授鉴定为天南星科多年生草本植物半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Brei 的块茎。本研究所用生防菌株为蜡质芽孢杆菌 *Bacillus cereus* AR156、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* SM21、沙雷氏菌 *Serratia* sp. XY21 等, 均由南京农业大学生物农药及绿色植保实验室前期从不同作物生境分离纯化并保存。

1.2 仪器

YP-3002型电子天平 (上海精密仪器仪表有限公司); PHS-3E型pH计 (上海仪电科学仪器股份有限公司); SPX-2508SH-II型生化培养箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司); ZQLY-180N型振荡培养箱 (上海知楚仪器有限公司); BioMate 3S型紫外分光光度计、MicroCL17型离心机 (赛默飞世尔科技公司); eclipse E100型显微镜 [尼康仪器 (上海) 有限公司]; Avanti J-E型离心机 [贝克曼库尔特国际贸易 (上海) 有限公司]; T100型热循环仪、PowerPac™ Basic型电泳仪 (美国Bio-Rad公司)。

1.3 试剂

酵母提取物 (批号: 4252819-02)、胰蛋白胨 (批号: 3438287) 均购于英国Oxoid公司; 氯化钠 (批号: 20210923)、乙醇 (批号: 20220608)、次氯酸钠 (批号: 20220415)、磷酸二氢钾 (批号: 20150912) 均为分析纯, 均购于广东光华科技股份有限公司; 琼脂粉 (批号: 310U022)、脱脂奶粉 (批号: 712X052)、溴代十六烷基三甲胺 (CTAB) 均购于北京索莱宝科技有限公司; 蛋白胨 (批号: 20130607, 北京奥博星生物技术有限责任公司); 牛肉浸膏 (批号: 20131015)、葡萄糖 (批号: 20130903) 均购于国药集团化学试剂有限公司; 基因组DNA试剂盒 (上海赛百盛生物工程有限公司); Platinum™ Taq高保真DNA聚合酶 (赛默飞世尔科技

有限公司);磷酸二氢铵、氯化钾、七水合硫酸镁、三氯化铁(Ⅲ)六水合物(纯度≥99%)、1,4-哌嗪二乙磺酸(PIPES, 纯度≥99.5%)、刚果红、铬天青S均购于上海晶纯生化科技股份有限公司;几丁质(批号:RT3545U495)、羧甲基纤维素钠(批号:RF2017G615)均购于上海瑞永生物科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS, 批号:C12743758, 纯度≥98.0%)购于上海麦克林生化科技有限公司。

2 方法

2.1 试验地点

生防菌筛选小区试验于2011—2014年在湖北省汉川市庙头镇七屋台村开展,最佳施用浓度田间试验于2015—2016年在同一地方进行;2017—2018年在湖北黄冈英山县开展最佳用法用量试验;2019年在河北省邯郸市广平县胜营村开展田间推广应用试验。

2.2 菌株培养方法

从超低温冰箱中取出保存菌蜡质芽孢杆菌AR156、枯草芽孢杆菌SM21、沙雷氏菌XY21等划线于28℃下培养;待长出单菌落,挑取其接入盛有配制好LB培养基100 mL的250 mL锥形瓶中,置于28℃摇床里培养18~20 h后作为种子液;以1%的接种量将种子液接种于1 L的大锥形瓶培养基里继续于28℃摇床培养22~24 h。LB培养基配方:胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、氯化钠10 g用超纯水定容至1 L,调pH至7.5。BBS制作方法:将AR156、SM21、XY21菌液浓度分别调终浓度为 1×10^8 CFU·mL⁻¹、体积比1:1:1,混合。

2.3 半夏软腐病的诊断和病原物的分离纯化

2011年从湖北汉川半夏试验田采集发病样品,患病叶片初期出现水浸状软腐并死亡,病茎呈现软腐烂状;患病块茎部分或全部腐烂且有臭味。取样品病健交界处处于低倍镜下观察是否具有喷菌现象。将观察到喷菌现象的病健交界处的组织先用缓流自来水冲洗1 min,再于超净工作台中用无菌水漂洗3次后,放到灭菌的1.5 mL的离心管中,加入无菌水200 μL,发病组织研碎或用剪刀剪碎后浸泡15 min,让细菌释放到灭菌水中。灭菌接种环蘸取菌悬液,用三线法分离菌株,做好标记后倒置培养皿,放在26~28℃恒温箱中培养。5 d内连续观

察,根据菌落特征选择目标菌株挑单菌落,在营养琼脂(NA)平板上划线培养,直到所有单菌落形态一致。可挑取1个单菌落在NA斜面(用试管)上划线培养24~48 h,4度冰箱培养保存。每月继代1次,备用;或取纯化好的菌落1环置于含1 mL的30%甘油的灭菌的1.5 mL或2 mL离心管中,振荡混合均匀,于-70℃保存。NA培养基配制方法:牛肉浸膏3 g、蛋白胨5 g、葡萄糖2.5 g用超纯水定容至1 L,调pH至7.0±0.1后加琼脂粉18 g。

2.4 柯赫法则验证半夏软腐病病原菌

将2.3项下从发病部位分离获得的纯化培养物接种到LB液体培养基中,28℃摇床中过夜培养。采用针刺浸泡法接种细菌^[6],选取直径为1.5 cm左右的健康块茎,用75%乙醇浸泡1 min后,在50%次氯酸钠加入0.1% SDS溶液中置于摇床10 min进行表面消毒,用无菌水漂洗5遍。用无菌针在块茎表面扎10个孔,在稀释到 1×10^6 CFU·mL⁻¹的菌液中浸泡5 min,置于铺有湿润滤纸的无菌培养皿中;对照组用无菌培养基浸泡。将培养皿置于28℃培养箱,每24 h观察1次,约48 h可观察到块茎变软,对半切开后组织软腐溃烂。

半夏块茎发病后,在超净台内切取小块发病组织,放入盛有无菌水1 mL的2 mL离心管中,切碎组织后静置15 min,取上层液体在NA平板上划线培养,放置于28℃培养箱中,每天连续观察菌落形态。

2.5 病原菌16S rRNA基因聚合酶链式反应(PCR)扩增鉴定

采用基因组DNA试剂盒提取细菌的基因组DNA后,使用Platinum™ Taq高保真DNA聚合酶进行16S rRNA片段扩增。16S rRNA片段扩增引物序列U8-27(F):5'-AGAGTTTGATC(AC)TGGCTCAG-3'; L1494-1514(R):5'-CTACGG(AG)TACCTTGTTACGAC-3'。反应体系:10×PCR Buffer 2.5 μL, Mg²⁺ 3.75 μL, dNTP 2 μL, 引物P1/P2 0.6 μL, 模板DNA 1 μL, rTaq酶0.5 μL, 加超纯水至25 μL。反应参数:94℃ 5 min; 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30个循环; 72℃ 10 min后至12℃恒温。

2.6 半夏软腐病生防菌筛选试验

2.6.1 生防菌对病原菌平板抑制活性检测 采用平

板对峙法检测本课题组菌种库中的生防菌对分离所得病原细菌和已获得的常见病原菌的拮抗活性,病原指示菌为鉴定为病原物的BX23、镰刀菌属(*Fusarium* sp.),培养平板分别使用LB固体培养基和马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基。按参考文献[7]方法,进行3次独立重复试验,每株参试菌株设置3个重复。

2.6.2 细菌水解酶活性的测定 蛋白酶活性测定:在蛋白酶平板(A:脱脂奶粉8 g,溶于水300 mL中,115℃灭菌10 min;B:琼脂8 g,定容至300 mL,121℃灭菌20 min,A与B分别灭菌后混合)上接菌,30℃培养3 d后观察有无透明圈,并记录大小。

几丁质酶活性测定:将细菌在以胶体状几丁质为唯一碳源的培养基上培养(磷酸二氢铵1.0 g、氯化钾0.2 g、水合硫酸镁0.2 g,质量分数1%的胶体状几丁质100 mL,琼脂20 g,pH为7.0),接菌后30℃培养3 d,观察有无透明圈,并记录大小。

纤维素酶活性测定:把准备好的菌株接到纤维素酶活性测定平板上(蛋白胨10 g、酵母粉10 g、羧甲基纤维素钠10 g、氯化钠5 g、磷酸二氢钾1 g、琼脂18 g,pH为7.0),30℃培养3 d后,用1 g·L⁻¹的刚果红染1 h后,倒掉染液,再用1 mol·L⁻¹氯化钠溶液浸泡1 h,观察有无透明圈,并记录大小。

产嗜铁素活性测定:A[铬天青S 60.5 mg溶于去离子水50 mL,三价铁溶液(1 mmol·L⁻¹ FeCl₃·6H₂O,10 mmol·L⁻¹ 盐酸为溶剂)10 mL,CTAB 72.9 mg溶于去离子水40 mL,上述3个溶液混合定容至100 mL,pH调至中性,121℃灭菌20 min]、B[PIPES 30.24 g加入水-琼脂(WA)培养基900 mL,pH为6.8,121℃灭菌20 min]液混合倒平板,接菌后30℃培养3 d,观察,记录结果。WA培养基:琼脂4 g,超纯水补足100 mL。

2.6.3 潜力生防菌的赋值评估 对拮抗细菌的生防潜力进行赋值评估,平板拮抗BX23、*Fusarium* sp活性、产几丁质酶、纤维素酶和蛋白酶活性各3分,其中抑菌圈或透明圈半径0~3 mm赋1分,3~6 mm赋2分,>6 mm赋3分;产嗜铁素活性1分,总分为16分。

2.6.4 生防菌筛选小区试验 生防菌筛选小区试验面积共2000 m²:每个小区规格为16.0 m×1.5 m,各处理组中间起垄20 cm做间隔;所有田块使用同批次半夏种苗225 g·m⁻²。设置处理组1~30分别为

1×10⁷ CFU·mL⁻¹备选生防菌1~30号处理,处理组31~33分别为相同浓度的A+X、A+S、X+S处理,处理组34~36分别为BBS和乙蒜素(ethylin, E)、清水处理(CK),播种时种子处理(菌液浓度统一稀释调节成5×10⁷ CFU·mL⁻¹搅拌浸种10~15 min)。每个处理重复3次。各个处理组在2013年8月进行块茎浸泡和灌根处理,在9月下旬再次灌根处理,并于2014年10月收获,期间统计软腐病发病情况和产量。

由于BBS前期在其他作物上的防病促生效果,正在将此菌剂开展微生物肥料登记工作,商品名“宁盾”。

2.7 半夏软腐病有效生防菌剂的最佳浓度、用法和用量筛选小区试验

2.7.1 “宁盾”最佳施用浓度筛选小区试验 将2.6项下筛选出的最佳生防菌剂“宁盾”开展施用浓度筛选试验。每个小区规格为16.0 m×1.5 m,各处理组中间起垄20 cm间隔;所有田块使用同批次半夏种苗225 g·m⁻²。设置处理组分别为1×10⁶、1×10⁷、1×10⁸ CFU·mL⁻¹的“宁盾”(S6~S8)和CK,每个处理重复3次。各个处理组在2015年9月进行块茎浸泡和灌根处理,并于2016年10月收获,期间统计软腐病发病情况和产量。

2.7.2 “宁盾”最佳用法用量筛选小区试验 每个小区规格为16.0 m×1.5 m,各处理组中间起垄20 cm做间隔;所有田块使用同批次半夏种苗225 g·m⁻²。“宁盾”按以下不同用法进行试验处理,每个处理重复3次。

用法1:菌液稀释至5×10⁷ CFU·mL⁻¹搅拌浸种10~15 min;用法2:菌原液7.5 mL·m⁻²,稀释至5×10⁷ CFU·mL⁻¹搅拌浸种10~15 min,播种后剩余菌液浇到块茎上之后覆土;用法3:菌原液3 mL·m⁻²稀释至5×10⁷ CFU·mL⁻¹搅拌浸种10~15 min,播种后剩余菌液浇到块茎上之后覆土;出苗后用菌原液4.5 mL·m⁻²以同样浓度对根部喷淋1次;用法4:菌原液3 mL·m⁻²稀释至5×10⁷ CFU·mL⁻¹搅拌浸种10~15 min,播种后剩余菌液浇到块茎上之后覆土;出苗后用菌原液3 mL·m⁻²以同样浓度灌根1次;20 d后地上部喷雾2次,每次处理间隔15 d,每次喷雾的菌原液用量0.75 mL·m⁻²。常规处理:播种前使用80% E乳油2000~2500倍液浸种,出苗后使用多菌灵50~100 mL和代森锰锌25 mL,兑水15 kg

喷雾3~4次。

2.8 田间生防效果验证

2.8.1 试验地点、试验地规划及试验方案 河北省邯郸市试验点“宁盾”处理半夏面积43 300 m²，常规对照面积3333 m²；实验组和CK中间起垄20 cm间隔；所有田块使用同批次半夏种苗225 g·m⁻²。处理组按照上述用法4进行处理；常规对照种植体系以当地常规种植体系为准。

本研究中，除使用“宁盾”来防治病害之外，在处理组中还使用辛硫磷、苦参碱等与“宁盾”具有兼容性的化学杀虫剂防治地下害虫、蚜虫等虫害，出苗后使用稻草覆盖防治草害，构成了有益微生物驱动的全程绿色种植体系（简称BeMMG体系）。当地常规对照体系中施用多菌灵、波尔多液或代森锌防治软腐病，施用吡虫啉、噻虫胺防治虫害，施用精喹禾灵防治草害。

2.8.2 植物生长指标及产量测定 按公式（1）计算出苗率。

$$\text{出苗率} = \text{出苗数} / \text{播种时种子数} \times 100\% \quad (1)$$

半夏生长期采用五点取样法，调查半夏的株高、叶片长、叶绿素和珠芽分化率。按公式（2）计算倒苗时倒苗率。

$$\text{倒苗率} = (\text{出苗最多时统计的苗数} - \text{本次统计的苗数}) / \text{出苗最多时统计的苗数} \times 100\% \quad (2)$$

半夏收获时挖出处理组及CK的半夏球茎，按公式（3）使用游标卡尺测量半夏块茎的直径。

$$\text{半夏块茎直径} = (\text{最大直径} + \text{最小直径}) / 2 \quad (3)$$

除尽泥土和杂物后分别称质量，进行统计分析，折算每公顷产量并比较球茎大小及外观，记录。

2.8.3 软腐病防效统计 软腐病分级按以下标准。0级：健株无病；1级：腐烂面积10%以下；2级：腐烂面积10%~50%；3级：腐烂面积50%以上；4级：全株枯死。按公式（4）~（7）分别计算病害严重度、防治效率、发病率和增产率。

$$\text{病害严重度} = [\sum (\text{病级株数} \times \text{代表级数}) / \text{植株总数} \times \text{最高代表级值}] \times 100\% \quad (4)$$

$$\text{防治效率} = (\text{CK发病率} - \text{处理组防病率}) / \text{CK发病率} \times 100\% \quad (5)$$

$$\text{发病率} = \text{发病株数} / \text{调查总株数} \times 100\% \quad (6)$$

$$\text{增产率} = (\text{处理组产量} - \text{CK产量}) / \text{CK产量} \times 100\% \quad (7)$$

3 结果

3.1 半夏软腐病的诊断其病原物鉴定结果

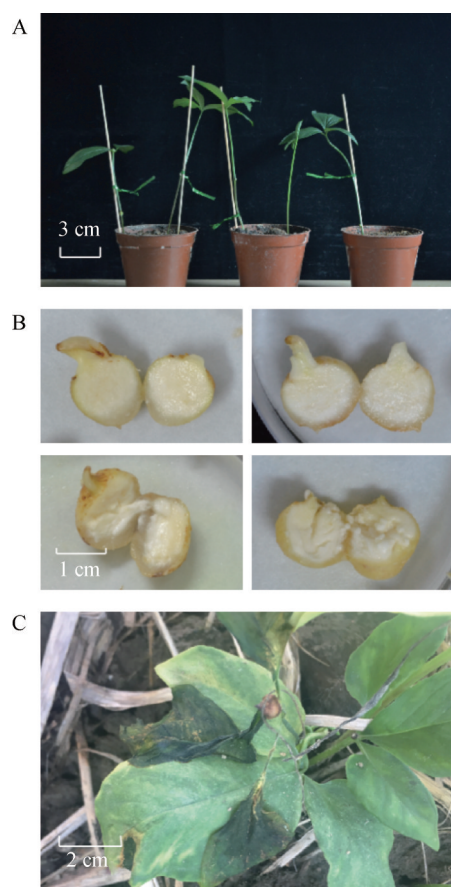
健康半夏地上部通常有叶片2~5枚，有时1枚，幼苗叶片卵状心形至戟形，为全缘单叶；老株三出复叶，呈椭圆形或披针形，两头尖锐（图1A）；块茎呈球形，具须根。感病半夏地上部症状表现为叶片初期出现水烫状，后期表现软腐并最终死亡，病茎呈腐烂状倒伏；患病块茎呈软腐烂状，其内组织呈石灰粉粒状，湿性腐烂且有臭味（图1B~C）。通过柯赫氏法则验证了引起半夏球茎病害的病原菌，首先对发病半夏球茎进行分离，将主要分离物BX23进行纯化培养，采用针刺浸泡和针刺法对健康半夏球茎进行回接。如图1C所示，BX23可造成半夏块茎出现同样的软腐症状。再对BX23处理发病球茎进行分离，并将分离物进行纯培养。提取细菌的基因组DNA后，进行16S rRNA基因片段扩增，扩增结果见图2。从回接发病的组织中分离得到菌株与BX23测序比对结果相同。菌株的16S rRNA基因测序表明，序列全长1509 bp，与美国国立生物技术信息中心（NCBI）上相似序列经基于局部比对算法的搜索工具（Blast）比对，其与胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* Nkyhuaya菌株（HM622348.1）、Ecc131-1菌株（FJ593031.1）、301480菌株（FJ593025.1）报告的序列相同点均为99%，半夏软腐病原菌初步鉴定为胡萝卜软腐果胶杆菌 *Pectobacterium carotovorum*。

3.2 生防菌株室内筛选及赋值

为了比较15种备选的生防菌对病原菌的拮抗效果，进而从中筛选出效果最佳的生防菌进行田间试验，笔者进行平板抑制活性检测和水解酶活性检测，并根据抑菌圈和水解透明圈直径对不同生防菌进行赋值评价。如表1所示，生防菌株AR156、SM21、XY21具有较高的赋值。对这3种菌株设计不同的组合，分别进行赋值评估，结果证明AR156+SM21+XY21，即BBS组合菌剂具有最高赋值得分。

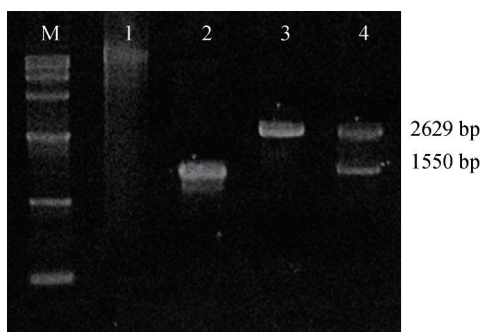
3.3 生防菌株田间小区试验筛选结果

本研究于2014年在湖北汉川通过小区试验来筛选对半夏软腐病具有防治效果的生防菌，采取五点取样法采集半夏地下块茎，每重复各取面积为0.2 m²的5点；各点半夏球茎挖出后集中在一起，清理泥土



注：A. 半夏植株生长 20 d 形态；B. 科赫法则回接验证实验：上图为健康半夏块茎，左下为自然条件下发病块茎，右下为回接分离纯化菌株后发病块茎；C. 半夏软腐病田间发病症状。

图 1 半夏生长形态及软腐病发病症状



注：M. Marker (15 000 bp)；1. BX23 基因组 DNA；2. BX23 16S rRNA PCR 扩增产物；3. 重组载体 pMD-16S rRNA；4. 重组载体 pMD-16S rRNA 经 Hind III 和 Xba I 双酶切产物。

图 2 半夏软腐病病原菌 16S rRNA PCR 片段扩增结果

杂物后测定数据；由于田中几乎不见发病球茎，推断发病球茎前期已完全腐烂，在此以直径 ≥ 1 cm 球茎的数量作为半夏细菌性软腐病防治效果的参考数据。如表 2 所示，备选生防菌中，JC03 菌株和 AG11 菌株对软腐病防效较好，防治效率分别为 58.51% 和

55.71%，但在相同浓度下 BBS 菌剂使用效果最佳，防治效率和增产率分别为 84.30% 和 35.70%。BBS 中 3 种有效菌株两两组合的效果次于三菌合剂的效果。因此，选择 BBS（其间获得微生物肥登记，商品名为“宁盾”）用于后期试验中。

3.4 “宁盾”最佳浓度和用法用量的确定

为探究在节约成本的前提下哪种浓度的使用效果最佳，本研究于 2016 年在湖北汉川设置了最佳施用浓度筛选试验。试验结果显示，“宁盾”菌剂在浓度为 1×10^7 、 1×10^8 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 的条件下使用效果均较好，对软腐病的防治效率分别为 76%、77.67%，增产率分别为 25.58%、25.00%（表 3）。从节约成本的角度考虑，建议选择 1×10^7 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 为施用浓度，即原液稀释约 200 倍。

为了确定“宁盾”最佳使用方案，于 2018 年在湖北英山开展最佳用法用量筛选小区试验，设计了 4 种处理方法。试验结果表明在相同的用量下，以方法 4 为最佳用法，即“宁盾”菌剂以 1×10^7 CFU $\cdot$ mL $^{-1}$ 的浓度对半夏浸种后浇灌，并在出苗后的不同时期进行灌根和叶面喷雾处理，防治半夏软腐病效果达到 83.2%、增产 29.89%（表 4）。说明半夏软腐病菌在种植全程均可侵染，将微生物菌剂分成多次施用可取得更好的防病、促生效果。

3.5 大田试验中“宁盾”对半夏软腐病的防治效果

2013 年，BBS 登记为微生物肥 [登记证号：微生物肥 [2013] 准字 (1096) 号]，商品名为“宁盾”。在 2019 年于河北邯郸开展半夏全程绿色种植试验时，“宁盾”能显著降低半夏软腐病的发生。“宁盾”处理组的软腐病发病率和病害严重度分别为 6.7%、3.0%，而 CK 为 46.7% 和 26.7%， “宁盾”处理对半夏软腐病的防治效率为 88.7%，该结果与上述筛选试验结果一致。总体来看，处理组的防治效果明显高于 CK，证明生防菌剂“宁盾”能有效防治半夏软腐病。

3.6 田间试验中“宁盾”对半夏的促生效果

田间试验结果证明，“宁盾”对半夏具有良好的促进生长效果。如图 3 所示，与 CK 相比，“宁盾”处理后 98 d 植株出苗率和存活率更高，地上部生长也更茂密，叶片更大更绿，株高较高。移栽后 98 d 通过五点取样法，测量各处理中半夏各项生长指标。如表 5 所示，与 CK 相比，“宁盾”处理组的半夏在

表 1 参试生防菌株对半夏软腐病病原物 BX23 的拮抗活性

处理	菌种	对不同病原物的拮抗活性		产水解酶活性检测			产嗜铁素活性	赋值
		<i>Pectobacterium carotovorum</i>	<i>Fusarium</i> sp.	几丁质酶	纤维素酶	蛋白酶		
2Re17	<i>Bacillus pumilus</i>	-	-	-	-	+	-	1
1Re36	<i>B. pumilus</i>	++	-	-	-	+	-	3
2Re8	<i>B. pumilus</i>	+	-	-	-	+	-	2
2Re3	<i>B. pumilus</i>	-	-	-	-	+	-	1
2R100	<i>Paenibacillus favisporus</i>	+	-	-	+	+	-	3
JC03	<i>B. subtilis</i>	+	+	-	+	+	-	4
2Re31	<i>B. pumilus</i>	+	-	-	-	+	-	2
3Re62	<i>B. pumilus</i>	+	-	-	+	+	-	3
1Re3	<i>B. sp. WL-3</i>	-	++	-	+	+	-	4
AG11	<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	-	-	+	+	-	3
1R87	<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	-	-	+	+	-	3
1R80	<i>B. amyloliquefaciens</i>	+	-	-	+	+	-	3
AR156	<i>B. cereus</i>	++	+	-	++	+	-	6
SM21	<i>B. subtilis</i>	++	+	-	+	+	-	5
XY21	<i>Serratia</i> sp.	+	+	+	-	-	-	3
AR156+SM21	<i>B. cereus</i> 、 <i>B. subtilis</i>	++	++	-	++	+	-	7
AR156+XY21	<i>B. cereus</i> 、 <i>S. sp.</i>	+	+	+	+	+	-	5
SM21+XY21	<i>B. subtilis</i> 、 <i>S. sp.</i>	+	+	+	+	+	-	5
AR156+SM21+XY21 (BBS)	<i>B. cereus</i> 、 <i>B. subtilis</i> 、 <i>S. sp.</i>	+++	++	+	++	+	-	9
对照组		-	-	-	-	-	-	0

注：+表示抑菌圈或透明圈半径 0~3 mm；++表示抑菌圈或透明圈半径 3~6 mm；+++表示抑菌圈或透明圈半径 > 6 mm；-表示不产生抑菌圈或透明圈。

表 2 田间小区试验中各处理对半夏对防病促生效果 (n=5)

处理	每平方米直径≥1 cm 球茎的数量 ($\bar{x}\pm s$) /个	防治效率/%	产量 ($\bar{x}\pm s$) /g·m ⁻²	增产率/%
BBS	129±43a	84.30	308.17±90.72a	35.70
JC03	110±34a	58.51	296.77±43.21a	30.68
AG11	109±28a	55.71	285.74±50.62a	25.82
AR156+SM21	114±21a	62.86	270.64±42.33a	19.17
AR156+XY21	107±18a	53.45	265.38±53.33a	16.85
E	108±31a	54.29	239.134±76.16 a	5.30
SM21+XY21	100±12a	42.81	238.57±46.23ab	5.05
7Ze23	93±14a	34.29	227.98±31.20ab	0.39
AR156	85±11a	21.43	221.33±29.45ab	- 2.54
1R80	88±16a	25.71	213.63±40.43ab	- 5.93
SM21	66±8b	- 5.71	173.83±31.43b	- 23.46
2R100	78±9b	11.43	171.95±25.63b	- 24.29
3Re62	78±11b	11.43	169.86±30.66b	- 25.21
7Ze5	69±7b	- 1.43	162.68±23.82b	- 28.37
CK	70±15b		227.10±50.55ab	

注：同列不同字母表示 $P < 0.05$ ；表 3~5 同。

表 3 2016 年各浓度 BBS 菌剂处理对半夏防病效果和增产效果 (n=5)

处理	浓度/CFU·mL ⁻¹	每平方米直径≥1 cm 球茎的数量 ($\bar{x}\pm s$) /个	防治效率/%	产量 ($\bar{x}\pm s$) /g·m ⁻²	增产率/%
BBS	1×10 ⁶	112±18a	49.33	269.74±38.69a	15.03
	1×10 ⁷	132±34a	76.00	294.49±21.87a	25.58
	1×10 ⁸	130±31a	76.67	293.13±20.64a	25.00
CK		75±15b		234.50±22.70b	

表 4 不同处理对半夏的防病促生效果 ($n=5$)

处理	病害严重度/%	防治效率/%	产量 ($\bar{x}\pm s$) / $\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$	增产率/%
方法 1	19.90	44.26	247.60 $\pm$ 43.60a	9.80
方法 2	14.88	58.33	255.99 $\pm$ 38.67a	13.52
方法 3	12.30	65.54	274.37 $\pm$ 41.99a	21.67
方法 4	6.00	83.20	292.90 $\pm$ 52.43a	29.89
常规	15.23	57.33	258.08 $\pm$ 37.20a	14.45
CK	35.70		225.50 $\pm$ 34.52a	

株高、叶片长和珠芽分化率上均有不同程度提高。其中, 出苗率、珠芽分化率和分蘖数分别增加 52.8%、65.7% 和 19.2%, 表明施用“宁盾”能促进半夏地上部生长, 特别是对珠芽的分化的促进作用显著。珠芽作为半夏主要繁殖器官, 因此推测“宁盾”处理可以加大半夏繁殖基数, 在生产实践中提高半夏产量。

从邯鄲试验点的产量统计结果来看, “宁盾”处理 240 d 后半夏块茎平均直径为 1.61 cm, 产量达 7650 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$; 而 CK 平均直径为 1.49 cm, 产量为 6300 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。在相同投量下, “宁盾”处理使产量提高 21.43%。综合上述试验结果, “宁盾”确实能够促进光合作用和光合产物积累、增加繁殖体数量, 进而提高半夏的产量。

4 讨论

半夏软腐病主要为害叶、茎和块茎。症状表现为患病叶片, 初期出现水烫状软腐并死亡, 病茎呈软腐烂状; 患病块茎迅速部分或全部腐烂且有臭味。

高温高湿和通风不良是发病的主要条件, 因此做好排水工作十分重要。在常规种植体系中, 防治软腐病的药剂有: 50% 氯溴异氰尿酸 WP (消菌灵)、0.3% 四霉素 AS、3% 中生霉素 WP (横扫歼菌)、20% 噻森铜 SC、青枯立克、25% 大蒜素 WP 等, 但化学药剂之间不宜随意混用, 使用不当容易造成药害。另外, 广谱杀菌剂不仅对病原菌起作用, 还可能影响其他有益微生物, 破坏土壤微生物群落结构。因此, 急需有效、安全、可靠的生物防治方式来控制这一病害。

据中国农药信息网数据显示, 我国国内登记用于防治软腐病的产品共 18 种, 其中生物农药有 4 种, 均为防治大白菜软腐病的枯草芽孢杆菌 *B. subtilis*。根据美国国家农药通讯网 (National Pesticide Information Center) 产品在线搜索网站 (<http://npic.orst.edu/NPRO/#>) 记录, 目前投入使用的防治细菌性软腐病的产品共 200 种, 其中生防菌产品有 21 种, 为解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 和枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* 产品, 但防治草药病害的生防产品寥寥无几。由此可见, 目前国内外已产业化防治软腐病的生防产品组成单一, 具有田间防效不稳定的风险, 尤其是中药材软腐病及其生物防治产品仍有巨大发展空间。

细菌性软腐病可由多种革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌引起, 其中 *Dickeya* spp. 和 *Pectobacterium* spp. 是研究最为广泛的软腐病病原菌^[8]。*D. zeae* 在香蕉上引起香蕉细菌性软腐病, 造成叶片萎蔫、假



“宁盾”处理



CK

图 3 “宁盾”处理 98 d 后半夏的田间促生效果

表 5 “宁盾”处理 98 d 对半夏的促生效果 ($n=100$)

处理	株高 ($\bar{x}\pm s$) /cm	叶片长度 ($\bar{x}\pm s$) /cm	叶绿素 SPAD 值 ($\bar{x}\pm s$)	珠芽分化率 ($\bar{x}\pm s$) /%	分蘖数 ($\bar{x}\pm s$)	出苗率/%
“宁盾”	7.56 $\pm$ 0.18a	3.51 $\pm$ 0.08a	51.6 $\pm$ 0.81a	30.0 $\pm$ 1.51a	4.09 $\pm$ 0.16a	79.9
CK	6.79 $\pm$ 0.11b	3.18 $\pm$ 0.06b	50.7 $\pm$ 0.61a	18.1 $\pm$ 1.21a	3.43 $\pm$ 0.14b	52.3

茎塌陷和异味^[9]。*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (*Pcc*) 可以造成大白菜、马铃薯及天南星科中药材大角莲 *Typhonium giganteum* 软腐病^[10-12]。有报道, 研究人员鉴定了浙江萧山和湖北京山县发病半夏中病原物为 *Pcc*^[13-14], 本研究证明了引起湖北汉川地区半夏软腐病的病原菌为 *Pectobacterium carotovorum*。在生物防治方面, 研究表明解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 菌株对马铃薯软腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* 菌株 II 16 具有拮抗作用^[15], *B. amyloliquefaciens* KC-1 能有效防治 *Pcc* 引起的大白菜软腐病^[10]。Maciag 等^[16]开发了由 5 种生防菌株 (*S. plymuthica* A294、*Enterobacter amnigenus* A167、*Rahnella aquatilis* H145、*S. rubidaea* H440 和 *S. rubidaea* H469) 制成的粉剂配方可显著降低马铃薯块茎的软腐病严重度和发病率。这些结果表明, 生防菌株组合可作为一种软腐病防治策略。

通过多角度赋值和小区筛选试验, 本研究比较了 15 种备选生防菌的生防效果, 筛选获得由蜡质芽孢杆菌 *B. cereus* AR156、枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* SM21、沙雷氏菌 *S. sp.* XY21 组成的“宁盾”。本课题组前期在湖北省孝感市开展的中药材茅苍术生防试验中筛选出“宁盾”对茅苍术软腐病防效最佳灌根浓度为 $75 \text{ L} \cdot \text{hm}^{-2}$ ^[17], 并发现在该浓度使用“宁盾”对扁豆进行灌根有增产作用和作物品质改良作用^[18]。沈建华等^[19]研究结果表明, 微生物菌剂“菌刀”通过灌根处理加叶面喷施处理的施用方法在“阳光玫瑰”葡萄上效果最好; 另有研究表明, 土壤消毒与块茎处理结合的方法防治半夏块茎腐烂病效果显著^[20]。根据半夏软腐病多发生在高温多湿季节和越夏种茎储藏期间, 首先半夏块茎发生腐烂, 后蔓延到地上部分, 最后黄倒苗而死亡的特点^[21]。本研究确定了“宁盾”最佳使用方法为“浸种+灌根+喷淋+喷雾”及其最佳使用浓度为 $1 \times 10^7 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。半夏软腐病菌可在土壤和病残体中越冬, 环境条件适宜时可随雨水、灌溉水、昆虫、肥料、土壤等多种途径传播蔓延, 因此半夏软腐病可在生长周期内全程侵染, 7月下旬至8月上旬高温多雨, 是病害高发时期^[21]; 半夏种植土壤沙性较强, 便于采收挖掘块茎, 但不利于微生物的快速定殖, 这也许可以解释为什么微生物菌剂分成多次施用效果更佳。

与 CK 相比, “宁盾”处理组的半夏在株高、叶片长、分蘖数和珠芽分化率上均有提高。珠芽多着

生于叶腋, 可用来繁殖或入药, 多认为是腋芽形成的地上变态茎或腋芽变态, 也称为“小块茎”“珠芽”“地上块茎”^[22]。因此, 推测“宁盾”处理可以促进地上部块茎的分化, 从而提高半夏繁殖用种量, 在生产实践中提高半夏的种植产量。实验过程中还发现, “宁盾”处理组的半夏倒苗期相对推迟的现象, 地下部块茎的生长期延长亦可增加半夏产量。而收获期测产结果表明, “宁盾”处理组收获半夏块茎直径和产量均显著高于 CK, 证实了“宁盾”能够增加繁殖体数量, 促进光合作用和光合产物积累, 从而达到提高产量的效果。本研究鉴定了半夏软腐病菌为 *Pectobacterium carotovorum*, 发现“宁盾”对半夏软腐病具有良好的防治效果并能提高半夏品相与产量, 为软腐病的生物防治和该生防菌剂的产业化可行性提供依据。

参考文献

- [1] 李恒. 从生态地理探索天南星科的起源[J]. 云南植物研究, 1996, 18(1): 14-42.
- [2] MAYO S J, BOGNER J, BOYCE P C. The genera of Araceae[M]. Kew: Royal Botanic Gardens, 1997: 268-270.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 123-124.
- [4] 潘炳文. 半夏珠芽生态观察[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(9): 526-527.
- [5] 顾德兴, 郭巧生. 半夏群体生物学特性的研究[J]. 南京农业大学学报, 1990, 13(2): 11-16.
- [6] 何煜波, 胡秀芳, 陈海敏, 等. 半夏细菌性软腐病原菌的分离及鉴定[J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 337-342.
- [7] 谢永丽, 徐志伟, 马莉贞. 两株生防芽孢杆菌的分子鉴定及拮抗活性测定[J]. 西北农业学报, 2012, 21(8): 32-37.
- [8] CHARKOWSKI A O. The changing face of bacterial soft-rot diseases [J]. Annu Rev Phytopathol, 2018, 56: 269-288.
- [9] ZHANG J X, SHEN H F, PU X M, et al. Identification of *Dickeya zeae* as a causal agent of bacterial soft rot in banana in China[J]. Plant Dis, 2014, 98(4): 436-442.
- [10] CUI W Y, HE P J, MUNIR S, et al. Biocontrol of soft rot of Chinese cabbage using an endophytic bacterial strain[J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1471.
- [11] ZHANG J X, LIN B R, SHEN H F, et al. First report of bacterial soft rot of potato caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Guangdong province of China[J]. Plant Dis, 2012, 96(12): 1819.

- [12] GAO J, NAN N, LIU Y N, et al. First report of bacterial soft rot of horn Lian (*Typhonium giganteum*) caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Jilin province of China[J]. Plant Dis, 2014, 98(9): 1268.
- [13] YING F X, HU X F, CHEN J S. First report of soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* on *Pinellia ternata* in China[J]. Plant Dis, 2007, 91(10): 1359.
- [14] 黄旭. 半夏软腐病菌的分离鉴定及致病性研究[D]. 武汉:华中农业大学,2012.
- [15] AZAIEZ S, SLIMENE I, KARKOUCH I, et al. Biological control of the soft rot bacterium *Pectobacterium carotovorum* by *Bacillus amyloliquefaciens* strain Ar10 producing glycolipid-like compounds[J]. Microbiol Res, 2018, 217: 23-33.
- [16] MACIAG T, KRZYŻANOWSKA D M, JAFRA S, et al. The Great Five-an artificial bacterial consortium with antagonistic activity towards *Pectobacterium* spp. and *Dickeya* spp. : Formulation, shelf life, and the ability to prevent soft rot of potato in storage [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(10): 4547-4561.
- [17] 郑丽,桂颖,王路遥,等. 生防菌剂“宁盾”对中药材茅苍术防病促生的大田剂量研究[J]. 江苏农业科学, 2020,48(12):80-84.
- [18] 王宁,戴相群,胡强,等. 微生物肥料“宁盾”对扁豆的促生效果研究[J]. 园艺与种苗,2017,44(2): 195-203.
- [19] 沈建华,宋献策,蔡红玲,等. 微生物菌剂“菌刀”在“阳光玫瑰”葡萄上的施用方法初探[J]. 上海农业科技, 2020(4):113-114.
- [20] 张小斌,唐养璇. 商洛半夏块茎腐烂病的原因初探及防治对策[J]. 商洛师范专科学校学报,2006,20(2):37-39.
- [21] 曾令祥,陈娅娅,杨琳,等. 半夏细菌性软腐病的防治[J]. 农技服务,2010,27(11):1429-1438.
- [22] 龙雯虹,郭华春. 薯蓣零余子的研究进展[J]. 云南农业大学学报,2006,21(4):486-489.

(收稿日期: 2021-10-26 编辑: 戴玮)