

## 人参锈腐病拮抗细菌的筛选鉴定

孙卓 杨利民\*

(吉林农业大学 中药材学院/省部共建生态恢复与生态系统管理国家重点实验室,长春 130118)

**摘要** 为获取对毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans* (Zinss.) Scholtan)防治效果优良的菌株,从人参根际土壤中分离到113株细菌,采用平板对峙法筛选出13株拮抗性良好的拮抗细菌,生长速率法对经过滤和灭菌的菌株发酵液进行抑菌谱测定,采用盆栽试验研究其对人参锈腐病的防治效果及其人参植株促生效果。SZ-2菌悬液对毁灭柱孢菌的抑制率达88.80%,同时具有广谱抑菌能力。盆栽试验结果表明,菌株SZ-2对人参锈腐病的防治效果为68.50%;其对人参植株具有一定促生作用,经其处理后的人参平均植株高度、整株鲜质量、整株干质量、根长、根鲜质量和根干质量均有不同程度的增加,其中整株干质量、根干质量和根长增长量高达79.39%、131.51%和86.90%;与对照组相比具有显著差异( $P<0.05$ )。经形态学、生理生化特征、16S rDNA及*gyrB*基因测序等分析,确定菌株SZ-2为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*),在GenBank中序列登录号为KC511107。

**关键词** 人参;拮抗细菌;锈腐病;鉴定;防病;促生

**中图分类号** S 435; S 675; Q 938.1

**文章编号** 1007-4333(2016)02-0073-09

**文献标志码** A

## Screening and identification of bacterial antagonistic strains against *Cylindrocarpon destructans*

SUN Zhuo, YANG Li-min\*

(College of Herbal Medicine/Breeding Base of State Key Laboratory-KLUER, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

**Abstract** In order to obtain more effective antagonistic bacteria against *Cylindrocarpon destructans* (Zinss.) Scholtan, 113 bacterial strains isolated from ginseng rhizosphere soil were screened by flat confrontation culture method. Thirteen strains showed strong antifungal activity against *C. destructans*. Antibacterial spectrum tests were performed with bacteria fermentation broth, which was autoclaved and filtrated, by using mycelium growth rate method. A pot experiment was conducted to evaluate the efficiency of antagonistic bacteria on *C. destructans* and plant growth. Strain SZ-2 showed the strongest activity against *C. destructans* and the inhibition rate of SZ-2 was up to 88.80%. SZ-2 also displayed broad spectrum of antagonistic activity towards selected pathogenic fungi of ginseng. Pot experiment also showed that the control efficacy of SZ-2 fermentation broth to *C. destructans* reached 68.50% ( $P<0.05$ ). The average plant height, plant fresh weight, plant dry weight, root length, root fresh weight and root dry mass of SZ-2 treated plants were significant higher than that of CK. The plant dry weight, root dry mass and root length were increased by 79.39%, 131.51% and 86.9% respectively, which were significantly higher than that in water control ( $P<0.05$ ). According to morphology, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA and *gyrB* sequencing analysis, SZ-2 was identified as *Bacillus methylotrophicus* (GenBank accession number KC511107).

**Keywords** *Panax ginseng*; antagonistic bacteria; *Cylindrocarpon destructans*; identification; control effect; growth-promoting

收稿日期: 2015-05-17

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2011BAI03B01-02); 国家自然科学基金(31270371); 吉林省科技发展计划项目(20130305047YY)

第一作者: 孙卓, 博士研究生, E-mail: 329575068@163.com

通讯作者: 杨利民, 教授, 博士生导师, 主要从事中药资源生态及药材质量的形成与控制研究, E-mail: ylmh777@126.com

由毁灭柱孢菌 (*Cylindrocarpon destructans* (Zinss.) Scholtan) 引起的人参锈腐病是人参种植期的重要土传病害之一<sup>[1]</sup>, 该病在长白山等人参产区均有发生, 病情爆发时期发病率可达 70% 以上。该病原真菌以分生孢子侵染人参根各部位, 病斑呈锈色, 由浅入深, 从表皮至根髓扩散, 导致参根呈病态弱性生长; 严重时病斑扩散至全根, 最终地下参根部分仅残留烂皮腐根, 危害甚大<sup>[2]</sup>。目前, 防治人参锈腐病多采用化学防治, 通过施用菌核净、代森锰锌等控制病情蔓延<sup>[3]</sup>, 但大面积使用化学农药不仅促使抗药性病害的再度出现, 与此同时土壤农残、土壤微生态失衡等问题堪忧<sup>[4]</sup>, 人参的产量和商业化品质仍无法得到保证。

生物防治办法可减少或抑制人参病害的发生, 具有绿色安全、高效等特点, 是目前最为理想的防治途径之一<sup>[5]</sup>, 也是植物病害防治的主要研究方向<sup>[6]</sup>。孙卓等<sup>[7]</sup>从人参根际土壤细菌中分离筛选到的内生芽孢杆菌 *Bacillus endophyticus* 及解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 可显著抑制毁灭柱孢菌生长; 姜云等<sup>[8]</sup>研究认为 *B. methylotrophicus* 对人参锈腐病菌有抑制作用; Jang 等<sup>[9]</sup>发现 *B. subtilis* (I4) 和 *B. amyloliquefaciens* (yD16) 可用于防治毁灭柱孢菌引起的人参根部病害, 并阐述芽孢杆菌更具生防潜力。筛选高效的拮抗菌株是开展植物病害生物防治研究工作的前提<sup>[10]</sup>, 因此获取自然生境中具有生防潜力的微生物至关重要。研究发现, 作为植物和土壤间信息交流的重要桥梁, 植物根际 (Plant rhizosphere) 是最为活跃的微生态区域<sup>[11]</sup>, 其所包含的根际土壤细菌通过与植物根系进行物质交流而建立互作关系, 相关根际细菌还具有防病杀虫<sup>[12]</sup>、诱导抗性<sup>[13]</sup>等诸多重要生态作用。将植物根际土壤细菌应用于植物病害防治, 已然成为获取高效生防菌源的重要途径<sup>[7, 14]</sup>。

为此, 本研究拟从实验室已分离到的 113 株人参根际土壤细菌入手, 研究其对人参苗生长的影响及对人参锈腐病的防治效果, 并对优良拮抗细菌进行分类地位确定, 旨在为降低人参病害发生奠定基础并提供微生物资源。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

供试人参 3 年生人参苗, 取自吉林省抚松市松江河地区。

供试土壤 新林地土壤 (富含腐殖质), 取自吉林抚松。

供试病原真菌 人参毁灭柱孢菌由吉林农业大学植物病理室提供, 16 种植物病原菌由吉林省农科院提供, 4℃ 冷藏。

供试细菌 分离自人参根际土壤, 真空干燥法 (-80℃) 保藏。

供试培养基 牛肉膏蛋白胨 (NB) 固体培养基: 蛋白胨 10.0 g、牛肉膏 4.0 g、NaCl 5.0 g、水 1 000 mL、琼脂 17 g, pH 7.0~7.2; 马铃薯葡萄糖固体培养基 (Potato Dextrose Agar)<sup>[15]</sup>; BPY 发酵液 (Beef Prptone Yeast extract)<sup>[15]</sup>。

杀菌剂 50% 多菌灵可湿性粉剂, 长双农药公司。

供试仪器 HPG-320H 型人工气候箱, 哈尔滨东联电子科技有限公司。

### 1.2 细菌悬液制备

将供试细菌接种于无菌 BPY 发酵液中, 32℃、190 r/min 振荡培养 24 h 后, 菌株发酵液 4℃ 备用; 而后恒温离心 (10 000 r/min, 4℃) 10 min, 弃上清, 所得菌体用无菌去离子水冲洗 3 次, 调整含菌量至 10<sup>8</sup> CFU/mL 备用。

### 1.3 细菌拮抗活性检测

以人参毁灭柱孢菌为指示菌, 进行初筛和复筛。初筛采用滤纸片法<sup>[16]</sup>, 用直径 8 mm 的打孔器将活化好的病原菌制成菌饼, 无菌接种至 PDA 平板 (直径 90 mm) 的正中央, 同时将 4 片直径为 1 cm 的灭菌滤纸圆片粘于距平板中心 25 mm 处的 4 个角点上, 其中 3 片滤纸圆片上各点接 20 μL 供试细菌悬液, 对照为剩余滤纸圆片点接 20 μL 无菌水, 每组 3 次平行重复, 人工气候箱内倒置 28℃ 培养 6~7 d 后, 测量、记录被处理病原菌的菌落直径, 核算供试细菌的抑菌率。而后挑选抑菌效果显著者进行复筛。

复筛采用牛津杯法<sup>[17]</sup>, 在 4℃ 条件下, 将供试拮抗细菌的 BPY 菌株发酵液 12 000 r/min 离心 20 min 后, 上清液过 0.22 μm 规格的微孔滤膜后所得滤液 4℃ 条件下备用。在 PDA 平板中央接种直径为 8 mm 的病原菌菌饼, 28℃ 下培养 24 h 后再将 4 个无菌牛津杯放于距平板中心约 25 mm 的 4 个对称角点, 每杯加 100 μL 供试滤液, 以加入等体积无菌 BPY 培养液为对照, 每组 3 次重复, 人工气候箱内 28℃ 培养 5 d 后, 测量并记录被处理病原菌的菌落直径, 计算经复筛后所得拮抗菌株的抑菌率大小。

$$\text{抑菌率} = (A - B) / (A - 8) \times 100\%$$

式中:A为病原菌正常生长直径;B为被拮抗后病原菌直径,数字为病原菌菌饼直径。

#### 1.4 盆栽试验

##### 1.4.1 菌株促生长能力研究

取长势接近、根系发达的3年生人参苗,根表消毒洗净(次氯酸钠清洗表面后,50℃水中浸泡5 min)。育苗土为V(新林地土壤):V(蛭石)=2:1配比混匀基质。人参苗栽种于24 cm×16 cm花盆中,每盆3株,各盆钵装入等量基质,室外参棚下常规管理。待栽培人参定苗后,每盆分别灌注各供试拮抗菌株的菌悬液(含菌量约为 $2 \times 10^6$  CFU/mL)90 mL,对照组为灌注等量无菌去离子水。每处理3次重复,每重复包含10盆,室外参棚下常规管理。处理后45 d,随机选取3株人参苗,小心将参苗整株挖出,洗去根部泥土,测量其株高、整株鲜质量和根鲜质量等指标。然后180℃烘干至恒重,测整株干质量及根干质量。

##### 1.4.2 室外盆栽防病试验

取长势接近、根系发达的3年生人参苗,消毒方法同1.4.1;之后将其浸泡于SZ-2菌株悬液(含菌量约为 $10^8$  CFU/mL)中,25~30 min后取出移栽于同1.4.1花盆中。定苗后进行防病试验。采取伤根灌注法<sup>[18]</sup>,在人参苗一侧,用刀在距人参茎基1 cm处根部造成伤口,每株人参苗在伤根部位灌注5 mL毁灭柱孢菌孢子悬液(浓度为 $5 \times 10^4$  孢子/mL)。菌悬液灌注量为每盆15 mL(菌悬液分3组灌注,为原液(含菌量 $10^8$  CFU/mL)、5倍稀释原液(含菌量 $2 \times 10^7$  CFU/mL)、10倍稀释原液(含菌量 $10^7$  CFU/mL)),药剂对照为50%多菌灵可湿性粉剂1 000倍液,空白对照为清水。如上各处理,每盆3株,每10盆1个处理,设3次重复。接种病菌45 d后调查发病情况,计算病情指数和防治效果。

人参锈腐病发病程度参考刘炳仁等<sup>[19]</sup>的方法分为4级(表1)。

表1 人参锈腐病发病程度分级

Table 1 Disease degree of *Cylindrocarpon destructans*

病级 Grade of disease	代表值 Representative value	分级标准 Grading standard
*	0级	健康人参
**	1级	病斑占参根总面积25%以下
***	2级	病斑占参根总面积的26%~50%
****	3级	病斑占参根总面积的51%~75%,外观受严重影响
*****	4级	病斑占参根总面积的76%以上或完全腐烂

病情指数和防治效果分别按照下列公式计算<sup>[20]</sup>:

$$\text{病情指数} = \left( \frac{\sum(\text{病级株数} \times \text{代表值})}{\text{总株数} \times \text{最高病级代表值}} \right) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{防治效果}/\% = \left( \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \right) \times 100 \quad (2)$$

#### 1.5 生防菌株的鉴定

形态特征鉴定:参照东秀珠等<sup>[21]</sup>《常见细菌系统鉴定手册》方法。

生理生化特征测定<sup>[21]</sup>:采用碳水化合物利用试验、柠檬酸钠盐利用试验、硝酸盐还原试验、淀粉水解试验、接触酶反应和乙酰甲基甲醇试验(V-P反

应)等多项生理生化指标试验。

PCR扩增菌株的16S rDNA序列<sup>[22-23]</sup>,PCR扩增细菌通用引物<sup>[24]</sup>为16S1F和16S1R。PCR扩增反应体系(50 μL)为:基因组DNA 2 μL、dNTP(10 mmol/L) 2 μL、10×Buffer 5 μL、16S1F 2 μL、16S1R 2 μL、Taq酶(2.5 U/μL) 2 μL、双蒸水 35 μL。PCR扩增条件:94℃预变性5 min;94℃ 1 min,58℃ 30 s,70℃ 90 s,35个循环;72℃延伸10 min。纯化后的PCR产物送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。序列登陆GenBank获得登录号并通过NCBI数据库进行同源性比对分析。

*gyrB*基因扩增引物序列及PCR扩增条件参

照谢永丽等<sup>[25]</sup>的方法。将 *gyrB* 基因扩增产物纯化后测序,所测序列通过 NCBI 数据库进行同源性 BLAST 比对,应用 Clustal X<sup>[26]</sup> 进行多重比对后,利用 MEGA5.1Beta2 软件以邻位法构建系统发育树,进行系统进化分析。

### 1.6 抗菌谱试验

运用生长速率法<sup>[27]</sup>对复筛所得细菌菌株进行抗菌谱试验。(抑菌率计算方法同 1.3)

### 1.7 数据分析

应用 DPS 9.50 标准版处理原始数据,差异显著性分析采用 Duncan 氏新复极差法。

## 2 结果与分析

### 2.1 土壤细菌的分离及拮抗菌株的筛选

人参毁灭柱孢菌的拮抗活性测定试验结果表明,初筛获得 13 株拮抗细菌,其中 SZ-2、SZ-29 和 SZ-57 的抑菌率均达 70% 以上(表 2);复筛结果显示(表 3),有 10 株拮抗细菌的菌株发酵滤液具有抑制作用,其中 SZ-2、SZ-29 及 SZ-57 这 3 株细菌的抑菌带宽在 7.47~11.33 mm,抑菌效果依然显著,且多次验证其抑菌效果较为稳定。故菌株 SZ-2、SZ-29 和 SZ-57 可用于进一步研究。

表 2 13 株细菌对毁灭柱孢菌生长的影响

Table 2 Effect of 13 pathogenic bacteria against *Cylindrocarpon destructans*

序号 Number	抑制率/% Inhibition rate	序号 Number	抑制率/% Inhibition rate
SZ-2	88.80±0.66 a	SZ-31	50.13±1.10 fg
SZ-57	78.00±4.10 b	SZ-48	50.11±1.50 fg
SZ-29	70.00±3.89 c	SZ-14	47.69±1.96 g
SZ-26	64.63±0.73 d	SZ-8	46.00±1.89 g
SZ-55	64.40±0.60 d	SZ-61	39.80±1.11 gh
SZ-82	54.29±1.45 e	SZ-112	20.00±1.33 h
SZ-73	52.04±3.37 ef	—	—

注:表中数据为平均数±标准差。不同的字母则表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著( $P < 0.05$ )。表 3、4 和 7 同。

Note: Data in the table are mean ± SD. Different letters in the same row by Duncan's new multiple range test ( $P < 0.05$ ). The same as table 3, 4 and 7.

表 3 拮抗菌株对毁灭柱孢菌的拮抗活性

Table 3 Inhibition zone of tested bacteria against *Cylindrocarpon destructans*

序号 Number	抑制带/mm Inhibition zone	序号 Number	抑制带/mm Inhibition zone
SZ-2	11.33±0.47 a	SZ-112	4.47±0.81 e
SZ-29	9.21±0.89 a	SZ-14	4.34±0.68 e
SZ-57	7.47±0.56 c	SZ-61	3.73±0.44 f
SZ-8	6.09±1.10 d	SZ-31	—
SZ-26	5.94±0.28 d	SZ-48	—
SZ-73	5.33±1.31 ed	SZ-55	—
SZ-82	4.47±0.70 e	—	—

注:“—”表示抑菌带宽低于 2 mm。

Note: “—” indicates inhibition zone is lower than 2 mm.

## 2.2 菌株对人参苗期生长的影响

在盆栽试验中, 菌株 SZ-2、SZ-29 和 SZ-57 均表现出促生作用(表 4)。其中 SZ-2 的促生效果最为显著, 与对照组相比, 人参整株鲜重、整株干重、根鲜

质量和根干质量分别增长 46.87%、79.39%、53.50% 和 131.51%; 植物株高和根长可反映出人参植株的茁壮程度, 菌株 SZ-2 对人参株高和根长的促生效果仍然突出, 与对照相比分别增加 51.65% 和 86.9%。

表 4 拮抗菌株对人参的促生作用

Table 4 Growth promoting effect of antagonistic bacteria on *Panax ginseng*

处理 Treatment	株高/cm Height	整株鲜质量/g Plant fresh weight	整株干质量/g Plant dry weight	根鲜质量/g Root fresh weight	根干质量/g Root dry weight	根长质量/cm Root length
SZ-2	32.15±0.49 a	6.33±0.23 a	2.96±0.16 a	4.19±0.52 a	1.69±0.09 a	21.12±0.17 a
SZ-29	30.50±0.97 b	5.89±0.55 b	2.07±0.27 b	2.88±0.22 c	0.89±0.21 b	13.80±0.54 b
SZ-57	26.80±0.72 c	4.84±0.39 c	1.84±0.55 b	3.21±0.16 b	1.17±0.03 c	16.90±0.67 c
CK	21.20±0.56 d	4.31±0.09 d	1.65±0.02 c	2.73±0.04 c	0.73±0.02 d	11.30±0.20 d

## 2.3 菌株 SZ-2 对人参锈腐病的盆栽防治效果

盆栽防治效果试验结果表明, 菌株 SZ-2 菌悬液对人参锈腐病防治效果为 70.73%, 5 倍稀释液的防

治效果达到了 60.94%, 10 倍稀释液的防治效果依然能达到 53.66%; 各浓度菌株发酵液防治效果均高于农药(表 5)。

表 5 菌株 SZ-2 对人参锈腐病的防治效果

Table 5 Control efficiency of stain SZ-2 to *Cylindrocarpon destructans*

样品 Sample	稀释倍数 Dilution factor	病情指数 Disease severity index	防治效果/% Control efficacy
SZ-2	1	18.37	70.73
	5	24.52	60.94
	10	29.09	53.66
农药	1 000	30.46	51.47
清水	—	62.77	—

## 2.4 菌株 SZ-2 的形态学、理化特性

形态观察可知, SZ-2 菌落不规则、乳白色、中心隆起、表面湿润、半透明。镜检呈杆状, 大小为 0.3~0.4 μm×3.4~3.5 μm, G<sup>+</sup>, 芽孢椭圆处于菌体中央(表 6)。

菌株 SZ-2 的生长温度范围是 20~38 °C, 最佳生长温度为 32 °C。其生长 pH 范围为 7.0~7.6, 最适生长 pH 为 7.2。其他生理生化指标具体见表 6。结合形态学与生理生化特征, 菌株 SZ-2 与芽孢杆菌形态学以及生理生化特性相符合。

## 2.5 分子生物学鉴定

以菌株 SZ-2 的基因组 DNA 模板扩增 16S rDNA 片段, 序列长为 1 373 bp, 提交 GenBank 注

册(注册号: KC511107)并进行 BLAST 比对, 结果显示与 SZ-2 同源性最高的为芽孢杆菌属 *B. methylotrophicus*(登陆号: KM186185.1), 其序列同源性为 100%。

以菌株 SZ-2 的基因组 DNA 为模板扩增 *gyrB* 基因片段, 得到大小为 1 199 bp 的 PCR 特征性条带, 与芽孢杆菌 *gyrB* 基因的理论值基本相符。测序结果与 GenBank 中已知序列比较得到 SZ-2 与芽孢杆菌属 *B. methylotrophicus*(登陆号: JN896940.1) 的 *gyrB* 基因序列同源性为 99%; 用邻近法(NJ)构建的系统发育树(图 1), 菌株 SZ-2 与 *B. methylotrophicus*(登陆号: EU194897.1) 同属一个分支。

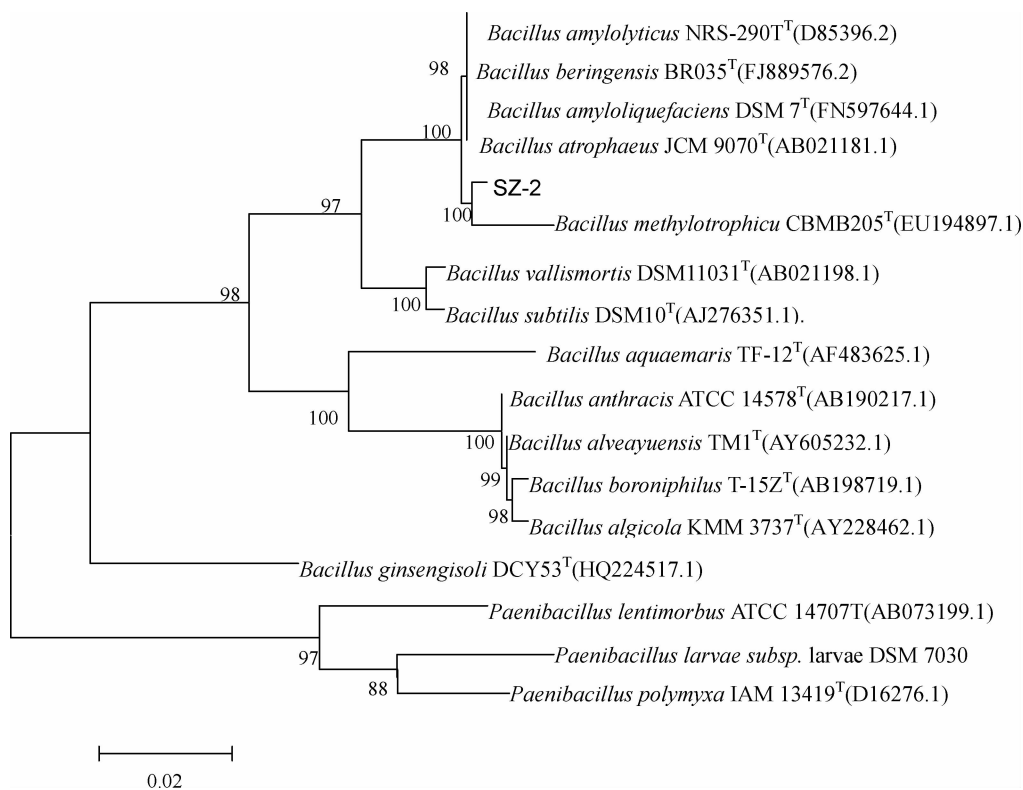
表6 生防菌理化特征

Table 6 Biochemical and physiological characteristics that differentiate strain

项目 Item	性状 Character	项目 Item	性状 Character
形状 Shape	杆状	细胞大小/ $\mu\text{m}^2$ Cell size	0.3~0.4 $\times$ 3.4~3.5
运动性 Kinesis	—	革兰氏染色 Gram staining	+
厌氧生长 Anaerobic growth	—	明胶水解 Hydrolyzed gelatin	+
L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+	酪蛋白水解 Hydrolyzed casein	—
D-木糖 D-xylose	—	酪氨酸水解 Tyrosine hydrolysis	—
D-葡萄糖 D-Glucose	—	接触酶 Catalase test	+
脂肪酶 Lipase	—	V-P 测试 Voges-Proskauer test	+
甘露醇 Mannitol	+	2%耐盐试验 2% salt resistance test	—
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	5%耐盐试验 5% salt resistance test	+
利用柠檬酸盐 Citrate utilization	—	7%耐盐试验 7% salt resistance test	±
淀粉水解 Starch hydrolyses	+	10%耐盐试验 10% salt resistance test	—

注：“+”为阳性反应；“—”为阴性反应；“±”为弱性或或有延迟现象。

Note: “+” positive (growth or reaction); “—” negative (no growth or no reaction); “±” weak or delay.

图1 基于 *gyrB* 基因序列构建的拮抗菌株与模式菌株系统发育树Fig. 1 Phylogenetic tree based on *gyrB* sequences of antagonistic bacteria and type bacteria

综合生理生化指标分析、16S rDNA 及 *gyrB* 基因序列比对结果及与模式菌株系统发育树分析,最终将菌株 SZ-2 鉴定为甲基营养型芽孢杆菌 (*B. methylotrophicus*)。

## 2.6 活性菌株 SZ-2 的抑菌谱

菌株 SZ-2 对 16 种供试病菌的抑制结果显

示, SZ-2 对棉花立枯病没有拮抗作用,对油菜菌核病菌等 6 种病原菌的拮抗作用小于 50%,对小麦赤霉病菌、辣椒疫霉病菌等 8 种病原菌的抑制作用为 50%~80%,对人参毁灭柱孢菌的抑制作用则为 88.80%,表明菌株 SZ-2 的抑菌谱较宽(表 7)。

表 7 菌株 SZ-2 对病原真菌的抑制作用

Table 7 Inhibiting effect of SZ-2 against fungal pathogens

病原真菌 Plant pathogen	抑制率/% Inhibition rate	病原真菌 Plant pathogen	抑制率/% Inhibition rate
人参毁灭柱孢菌 <i>C. destructans</i>	88.80±0.66 a	南瓜枯萎病菌 <i>F. bulbigenum</i>	50.06±0.62 f
辣椒疫霉病菌 <i>Phytophthora capsici</i>	80.13±0.71 b	油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	42.69±0.50 g
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	75.01±0.82 c	小麦纹枯病菌 <i>Rhizoctonia cerealis</i>	42.55±0.71 g
黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	68.82±0.33 d	玉米小斑病菌 <i>Bipolaris maydis</i>	35.47±1.22 h
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinema</i>	68.81±0.47 d	稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i>	34.92±0.84 h
草莓灰霉病菌 <i>B. cinema</i>	68.76±0.54 d	白菜黑斑病菌 <i>Alternaria brassicae</i>	25.65±0.45 i
棉花枯萎病菌 <i>F. oxyspotium</i>	57.69±0.31 e	小麦根腐病菌 <i>B. sorokiniana</i>	20.34±0.66 j
杨树溃疡病菌 <i>Dothiorella gregaria</i>	56.98±0.65 ef	棉花立枯病菌 <i>R. solani</i>	—

注：“—”表示抑菌率小于 10%。

Note: “—” indicates inhibition rate is lower than 10%.

## 3 讨论

植物生防细菌的菌源多分离自植物体内及其栽培土壤,但由于分离手段、培养条件等问题,菌源获取途径仍以土壤生境为主。相对于植物根围等区域,植物根际结构更为复杂,其与植物根系通过物质交流而建立更加紧密的互作关系,根际土壤内细菌为争夺有利生态位点具有更强的竞争力和生存能力,且有报道称根际土壤细菌具备防病促生能力<sup>[28]</sup>,符合现今生防菌株的筛选标准,表明植物根际土壤细菌是有更好的生防价值和应用潜力的。本研究通过较为系统的平板对峙手段,从人参根际土壤中筛选获得多株细菌,并证实菌株 SZ-2 对引起人参锈腐病的毁灭柱孢菌 *C. destructans* 具有显著抑制作用,其广谱拮抗能力也较为突出;盆栽试验结果表明, SZ-2 菌悬液不仅对人参锈腐病具有防治效果,且对人参植株具有较好的促生长作用,这预示了其在人参病害防治方面具有应用潜力。通过形态、生理生化和 16S rDNA 等技术手段综合鉴别,确定 SZ-2 为甲基营养型芽孢杆菌 *B. methylotrophicus*。

作为植物根际土壤中的优势微生物种群,芽孢杆菌具有很强的抗逆能力与防病能力,因此将其应用于植物病害防治已成国内外学者的研究热点之一<sup>[29-30]</sup>,但有关芽孢杆菌防治人参锈腐病的报道仍然较少。目前芽孢杆菌的防病机制被前人总结为竞争作用、拮抗作用和诱导植物抗病性<sup>[31]</sup>。姜云等<sup>[8]</sup>对 *B. methylotrophicus* 菌株分泌的抗菌蛋白进行分离纯化,发现抗菌蛋白可抑制人参锈腐病菌孢子萌发及菌丝体生长。而本研究通过平板对峙试验,证实 SZ-2 菌株的发酵滤液对人参锈腐病菌抑制效果显著,说明 *B. methylotrophicus* 的抗菌蛋白在防治人参病害方面确实可以发挥效力,但在自然生境中并不是根本防病因素。原因在于,本研究盆栽试验灌注的是 SZ-2 菌株悬液,而并非菌株发酵液,研究结果同样展现了 *B. methylotrophicus* 的防病及促生能力,故作者推测, *B. methylotrophicus* 菌株可能以“竞争为主,拮抗及诱导为辅”的生态作用为防病机制,其可有效占据植物及土壤有利生存位点,巩固与植物间的互作关系,间接提高与病原菌的竞争能力,使病原菌生存空间受限而衰退,同时拮抗物质

与诱导植物自身防病能力结合作用,进而达到防病目的。有关菌株 SZ-2 的大田防效等问题有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 白容霖. 我国人参锈腐病综合防治研究进展[J]. 植物保护, 1990, 16(2): 40-41  
Bai R L. Research progress of integrated control of *Cylindrocarpon destructans* in China[J]. *Plant Protection*, 1990, 16(2): 40-41 (in Chinese)
- [2] 白容霖, 王子权. 人参锈腐病菌潜伏侵染及其防治研究[J]. 植物病理学报, 1986, 16(1): 41-46  
Bai R L, Wang Z Q. Research of latent infection and control of *Cylindrocarpon destructans* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1986, 16(1): 41-46 (in Chinese)
- [3] 王士杰, 张爱华, 陈晓林, 雷凤杰, 许永华, 张连学. 人参锈腐病新型药剂筛选试验[J]. 农药, 2011, 50(6): 449-451, 460  
Wang S J, Zhang A H, Chen X L, Lei F J, Xu Y H, Zhang L X. Pesticides screening against ginseng root rust rot [J]. *Agrochemicals*, 2011, 50(6): 449-451, 460 (in Chinese)
- [4] Anu Kalia, S K Gosal. Effect of pesticide application on soil microorganisms[J]. *Archives of Agronomy and Soil Science*, 2011, 57(6): 569-596
- [5] 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  
Qiu D W. Current status and development strategy for biological control of plant diseases in China [J]. *Plant Protection*, 2010, 36(4): 15-18 (in Chinese)
- [6] R K S Wood, M Tveit. Control of plant diseases by use of antagonistic organisms[J]. *Tveit Botanical Review*, 1955, 1(8): 441-492
- [7] 孙卓, 杨利民. 人参病原菌拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J]. 植物保护学报, 2015, 42(1): 79-86  
Sun Z, Yang L M. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Panax ginseng* pathogeny fungus[J]. *Journal of Plant Protection*, 2015, 42(1): 79-86 (in Chinese)
- [8] 姜云, 许鹏, 陈长卿, 田磊, 李桐, 张冠军, 尹望, 陈光. *Bacillus methylotrophicus* 菌株产抗菌蛋白性质及对人参锈腐病菌抑菌作用[J]. 农药, 2013, 52(11): 835-838  
Jiang Y, Xu P, Chen C Q, Tian L, Li T, Zhang G J, Yin W, Chen G. Characterization and inhibition effects of antagonistic protein from *Bacillus methylotrophicus* on *Cylindrocarpon destructans* [J]. *Agrochemicals*, 2013, 52(11): 835-838 (in Chinese)
- [9] Jang Ye-Lim, Kim Sang-Gyu, Kim Young-Ho. Biocontrol efficacies of bacillus species against *Cylindrocarpon destructans* causing ginseng root rot[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2011, 27(4): 333-341
- [10] 张慧, 杨兴明, 冉炜, 徐阳春, 沈其荣. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应[J]. 土壤学报, 2008, 45(6): 1095-1101  
Zhang H, Yang X M, Ran W, Xu Y C, Shen Q R. Screening of bacteria antagonistic against soil-borne cotton verticillium with and their biological effect on the soil-cotton system[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(6): 1095-1101 (in Chinese)
- [11] Toal M E, Yeomans C, Killham K, Meharg A A. A review of rhizosphere carbon flow modeling[J]. *Plant and Soil*, 2000, 222(1/2): 263-281
- [12] Krzyzanowska D M, Potrykus M, Golanowska M, Polonis K, Gwizdek-Wisniewska A, Lojkowska E, Jafra S. Rhizosphere bacteria as potential bio-control agents against soft rot caused by various *Pectobacterium* and *Dickeya* spp strains[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2012, 94(2): 367-372
- [13] 席琳乔, 李德锋, 王静芳, 马金萍, 张利莉. 棉花根际促生菌固氮和分泌生长激素能力的测定[J]. 干旱区研究, 2008, 25(5): 690-694  
Xi L Q, Li D F, Wang J F, Ma J P, Zhang L L. Measurement of nitrogen fixation capability and excreted IAA capability of PGPB isolated from cotton rhizosphere in Salina[J]. *Arid zone Research*, 2008, 25(5): 690-694 (in Chinese)
- [14] 秦越, 马琨, 刘萍. 马铃薯连作栽培对土壤微生物多样性的影响[J]. 中国生态农业学报, 2015, 23(2): 225-232  
Qin Y, Ma K, Liu P. Effect of potato continuous cropping on genetic diversity of soil microorganisms[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2015, 23(2): 225-232 (in Chinese)
- [15] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1998  
Fang Z D. *Methodology for Plant Pathology* [M]. Beijing: China Agricultural Press, 1998 (in Chinese)
- [16] 单文荣, 李俊霞, 刘花粉. 滤纸片法筛选不同活性物对棉花黄萎病菌抑制效果研究[J]. 中国农学通报, 2010, 26(19): 285-289  
Shan W R, Li J X, Liu H F. Study on the inhibitory effects of different active materials screened by the filter paper on cotton verticillium wilt [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(19): 285-289 (in Chinese)
- [17] 贾凤安, 陈亮, 陈立, 陈五岭. 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  
Jia F A, Chen L, Chen L, Chen W L. Isolation and characterization of antagonistic bacteria against three major fungal pathogens of greenhouse melon[J]. *Journal of Plant Protection*, 2010, 37(6): 505-510 (in Chinese)
- [18] 朱志武, 姚元干, 刘志敏, 杨建国, 陈惠明. 茄子抗青枯病遗传规律研究[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 30(3): 288-289  
Zhu Z W, Yao Y G, Liu Z M, Yang J G, Chen H M. On Resistance to bacterial wilt in eggplant (*Solanum melongena*) [J]. *Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences*, 2004, 30(3): 288-289 (in Chinese)
- [19] 刘炳仁. 人参高效栽培新技术[M]. 北京: 科技文献出版社, 2008  
Liu B R. *New Technology of High-efficient and Ginseng Cultivation* [M]. Beijing: Science and Technology Literature



- Press, 2008 (in Chinese)
- [20] 杨信东, 高洁, 马贵龙, 张佳环. 植物病害疫情控制效果计算公式的改进[J]. 吉林农业大学学报, 1999, 21(3): 46-48  
Yang X D, Gao J, Ma G L, ZHANG J H. Improvement on the calculation formula of plant disease control effect[J]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 1999, 21(3): 46-48 (in Chinese)
- [21] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001  
Dong X Z, Cai M Y. *Common Bacteria Manual System Identification*[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [22] Marshall S M, Melito P L, Woodward D L, Johnson W M, Rodgers F G, Mulvey M R. Rapid identification of campylobacter, arcobacter, and helicobacter isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(12): 4158-4160
- [23] Lim C Y, Lee K H, Cho M J, Chang M W, Kim S Y, Myong N H, Lee W K, Rhee K H, Kook Y H. Detection of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa of patients with gastroduodenal diseases by PCR-restriction analysis using the RNA polymerase gene (rpoB) [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2003, 41(7): 3387-3391
- [24] 刘玮琦, 茆振川, 杨宇红, 谢丙炎. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性[J]. 微生物学报, 2008, 48(10): 1344-1350  
Liu W Q, Mao Z C, Yang Y H, Xie B Y. Analysis of soil bacterial diversity by using the 16S rRNA gene library[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2008, 48(10): 1344-1350 (in Chinese)
- [25] 谢永丽, 高学文. 高寒草甸根围拮抗芽孢杆菌筛选鉴定及脂肽化合物分析[J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(3): 367-374  
Xie Y L, Gao X W. Screening and identification of bio-control bacillus strains isolated from rhizosphere of Altiplano Meadow and its lipopeptide compounds [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012, 28(3): 367-374 (in Chinese)
- [26] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins D G. The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882
- [27] 王彩霞, 张清明, 李桂舫, 董向丽, 李保华. 苹果树腐烂病拮抗细菌菌株 BJ1 的鉴定及其抑菌作用[J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 431-437  
Wang C X, Zhang Q M, Li G F, Dong X L, Li B H. Identification of the antagonistic bacteria BJ1 and its antifungal activity against *Valsa ceratosperma* [J]. *Journal of Plant Protection*, 2012, 39(5): 431-437 (in Chinese)
- [28] 胡江春, 薛德林, 马成新, 王书锦. 植物根际促生菌(PGPR)的研究与应用前景[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1963-1966  
Hu J C, Xue D L, Ma C X, Wang S J. Research advances in plant growth-promoting rhizobacteria and its application prospects[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2004, 15(10): 1963-1966 (in Chinese)
- [29] 王静, 孔凡玉, 陈晓红, 田华. 短小芽孢杆菌 AR03 对烟草炭疽病的抑制作用[J]. 植物保护, 2015, 41(1): 104-107  
Wang J, Kong F Y, Chen X H, Tian H. The inhibitory effect of *Bacillus pumilus* AR03 against tobacco anthracnose[J]. *Plant Protection*, 2015, 41(1): 104-107 (in Chinese)
- [30] Balhara M, Ruhil S, Dhankhar S, Chhillar A K. Bioactive compounds hold up-bacillus amyloliquefaciens as a potent bio-control agent[J]. *The Natural Products Journal*, 2011, 1(1): 20-28
- [31] Ye J J, Cao N N, Zhang J F, Yin H, Wu J M, Hu Z Z. Research application progress on the bacillus sp in plant pathogenic fungi biocontrol[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2013, 14(5): 695-698

责任编辑: 袁文业