

王妍, 张福军, 孙卓, 等. 防风枯萎病拮抗真菌的筛选鉴定及防效评价 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(2): 263-269.
WANG Yan, ZHANG Fujun, SUN Zhuo, et al. Screening, identification and biological control effect of antagonistic fungus against fusarium wilt of *Saposhnikovia divaricata*[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(2): 263-269.

防风枯萎病拮抗真菌的筛选鉴定及防效评价

王妍¹, 张福军², 孙卓¹, 马锋敏³, 韩忠明¹,
赵淑杰¹, 王云贺¹, 韩梅¹, 杨利民¹

(1 吉林农业大学 中药材学院/省部共建生态恢复和生态系统管理国家重点实验室培育基地,
吉林 长春 130118; 2 集安市太王镇林业工作站, 吉林 集安 134200;
3 吉林查干湖国家级自然保护区管理局 吉林 松原 131111)

摘要:【目的】从防风根际土中分离筛选出对防风枯萎病具有较强防治效果的生防真菌。【方法】采用对峙培养法从根际土壤中筛选出 1 株可拮抗尖孢镰刀菌的真菌菌株 MR-97, 并测定其抑菌谱; 根据真菌菌落特征、显微特征, 结合 ITS 序列分析等方法对拮抗菌株进行鉴定; 通过显微观察 MR-97 对尖孢镰刀菌菌丝生长的影响; 采用抗生素标记法测定拮抗菌株在土壤中的定殖能力; 进行田间盆栽试验, 检验 MR-97 对防风枯萎病的防治效果。【结果】本研究筛选出 1 株对尖孢镰刀菌抑菌效果为 64.44% 的拮抗菌株 MR-97, 其对木贼镰刀菌、灰葡萄孢等 8 种常见病原菌具有较强的抑菌效果, 经鉴定菌株 MR-97 为土曲霉 *Aspergillus terreus*。MR-97 与尖孢镰刀菌对峙培养可使病原菌菌丝产生膨大、畸形、菌丝破损、内含物凝集等现象; 在土壤中具有有良好的定殖效果, 土壤含菌量最高为 9.8×10^6 CFU/g。盆栽试验中, MR-97 对防风枯萎病防效为 67.86%, 防治效果较好。【结论】土曲霉 MR-97 可有效抑制尖孢镰刀菌等多种病原菌菌丝生长, 可在土壤中较快定殖并发挥生防效力。作为优质的生防菌源, MR-97 具有一定的开发应用潜力。

关键词: 防风; 土曲霉; 尖孢镰刀菌; 生物防治; 促生作用

中图分类号: R282.2; S432.1

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)02-0263-07

Screening, identification and biological control effect of antagonistic fungus against fusarium wilt of *Saposhnikovia divaricata*

WANG Yan¹, ZHANG Fujun², SUN Zhuo¹, MA Fengmin³, HAN Zhongming¹,
ZHAO Shujie¹, WANG Yunhe¹, HAN Mei¹, YANG Limin¹

(1 College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University/Cultivation Base of Provincial Joint Construction of the State Key Laboratory for Ecological Restoration and Ecosystem Management, Changchun 130118, China; 2 Forestry Working Station of Taiwang Town in Ji'an, Ji'an 134200, China; 3 Chagan Lake National Nature Reserve Administration in Jilin, Songyuan 131111, China)

Abstract: 【Objective】The present study aimed to screen and isolate the antagonistic fungal strains with

收稿日期: 2022-03-19 网络首发时间: 2023-01-09 09:24:21

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20230105.1645.002.html>

作者简介: 王妍, 硕士研究生, 主要从事药用植物病害生物防治研究, E-mail: 2439273609@qq.com; 通信作者: 韩忠明, 教授, 博士, 主要从事中药资源生态学研究, E-mail: hanzm2008@126.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFC1710700, 2019YFC1710702); 吉林省科技发展计划 (20200404010YY, 20210204011YY, 20200402104NC); 中央财政林业科技推广示范项目 (JLT2020-22, JLT2021-03); 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-21)

strong control effect against fusarium wilt from rhizosphere soil of *Saposhnikovia divaricata*. 【Method】 The strain MR-97, which was antagonistic to *Fusarium oxysporum*, was isolated from the rhizosphere soil of *S. divaricata* by confrontation culture method, and its bacteriostatic spectrum was determined. The strain was identified by fungal colony characteristics, microscopic characteristics and ITS sequence analysis. The effect of strain MR-97 on hyphae growth of pathogenic fungus were recorded by microscopic examination. The colonization ability of strain MR-97 in the soil was evaluated by antibiotic marker method. The control effect of strain MR-97 on fusarium wilt of *S. divaricata* were evaluated by pot experiment in the field. 【Result】 The antagonistic strain MR-97 was screened with antibacterial rate of 64.44% against *F. oxysporum*. It also had strong antibacterial effect against eight common pathogens including *F. equiseti* and *Botrytis cinerea*, etc. The strain MR-97 was identified as *Aspergillus terreus*. The hyphal of pathogen enlargement, malformation, damage and agglutinated with inclusions, etc. when the strain MR-97 and *F. oxysporum* were cultured in confrontation. It had a good colonization effect in the soil, and the highest content of soil bacteria was 9.8×10^6 CFU/g. The biocontrol effect of MR-97 on fusarium wilt of *S. divaricata* was 67.86% in pot experiment, which had good control efficiency. 【Conclusion】 *Aspergillus terrestris* MR-97 can effectively inhibit the mycelia growth of *F. oxysporum* and other pathogens, can colonize quickly in soil and has strong biocontrol effect. MR-97 strain, as a good source of biocontrol bacteria, has certain potentials of development and utilization.

Key words: *Saposhnikovia divaricata*; *Aspergillus terreus*; *Fusarium oxysporum*; Biological control; Growth promotion

防风 *Saposhnikovia divaricata* 为伞形科防风属多年生草本植物，以未抽花茎植株的干燥根入药，味辛、微甘、性温，具有止痉、祛风解表、胜湿止痛的功效^[1]。防风是新型冠状病毒诊疗方案推荐中成药“防风通圣丸”等中成药的重要原料，同时也是我国传统的出口药材，具有广阔的应用前景和可观的经济价值。近年来，随着防风栽培面积的扩大，防风枯萎病的发病范围逐步增加、发病程度逐步上升，造成防风大面积减产。尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* 是引起防风枯萎病的主要病原菌，通过侵染防风根部导致防风叶片枯萎脱落、根部腐烂，已成为严重危害防风根茎类的病害之一^[2]。尖孢镰刀菌是一种具有很强致病能力的土传病原菌，寄主分布范围广，可导致上百种植物感染根部病害^[3]，如三七根腐病^[4]、辽五味根腐病^[5]、白术根腐病^[6]、黄精根腐病^[7]等。尖孢镰刀菌具有复杂的遗传多样性，依据不同寄主植物分化为不同专化型，目前已报道的专化型达 120 多种^[8]。而防治枯萎病的主要方法为及时拔出病株并撒施石灰粉消毒，以及施加化学药剂。然而长期使用农药不仅容易导致农药残留^[9]，还会导致病原菌产生抗药性^[10]、破坏生态平衡^[11]、造成环境污染并且对人类身体健康构成威胁^[12]。为减少因化学药剂的大量使用带来的农药残留及抗药性问题，农业农村部启动“双减”计划，

积极推进新型绿色农药研发^[13]，而生物防治具有绿色安全、无污染等特点^[14]，为此，生防菌的开发与应用成为防治植物病害的热点^[15]。

药用植物根际微生物作为宝贵的微生物资源，其在植物病害生物防治方面的应用越来越引起研究者的关注。近年来，利用根际微生物防治中药材土传病害研究取得一些进展，Daroodi 等^[16]通过室内盆栽试验研究 *Acrophialophora jodhpurensis* 对番茄根腐病的防治效果，结果表明 *A. jodhpurensis* 可将番茄根腐病病情指数降低 40% 以上，并诱导番茄体内 GPX、CAT、SOD、APX、酚类、木质素及铁离子等物质的积累。高芬等^[17]从黄芪根围土中分离出细菌菌株 138 株，经多重筛选后获得 1 株对黄芪根腐病拮抗效果较强的萎缩芽孢杆菌。目前，从防风分离得到的内生菌主要有防风壳针孢、独活白粉菌和旱芹叶点霉等^[18-20]，而关于防风根际土壤病原菌的分离和鉴定鲜有报道，因此从防风根际土壤中分离筛选对防风枯萎病具有较高防治效果的生防菌株，并用于防治防风枯萎病具有重要的理论和实际指导意义。本研究以防风根际土为材料，分离得到 1 株对防风枯萎病病原菌有良好拮抗效果的生防菌株，并对该菌株的形态、显微特征和 18S rDNA 基因序列进行鉴定，通过盆栽防效试验评价该生防真菌的生防

效果,本研究对防风枯萎病防治、降低防风真菌病害、提高防风产量具有指导意义,同时可为微生物农药的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

采用五点取样法,于2020年7月从吉林农业大学药用植物园(43°48'23"N, 125°24'57"E)采集健康的1年生防风植物的根际土壤,装于无菌自封袋中,阴干后过20目筛备用。

尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum*、木贼镰刀菌 *F. equiseti*、腐皮镰刀菌 *F. solani*、恶疫霉 *Phytophthora cactorum*、灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*、核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、细极链格孢 *Alternaria tenuissima*、鹅掌楸链格孢 *A. liriodendra* 和毁灭柱孢菌 *Cylindrocarpon destructans* 均由吉林农业大学中药材学院植物生理生态实验室提供。

多菌灵(沈阳经济开发区亚美花肥土厂)、枯草芽孢杆菌可湿性粉剂(山东鲁抗生物农药有限责任公司)、哈茨木霉可湿性粉剂(山东绿陇生物科技有限公司)、有效成分质量分数97%的利福平(Rifampicin)(上海麦克林生化科技有限公司)、DNA提取试剂盒 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction Kit Ver.5.0(TaKaRa 宝日医生物技术有限公司)。

Nikon eclipse 50i 三目显微镜(尼康仪器有限公司)、THZ-702B 全温度振荡培养箱(太仓市华美生化仪器厂)、PTC-300 光照培养箱(上海三腾仪器有限公司)、DYY-8C 电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、Applied Biosystems ProFlex PCR 仪(赛默飞世尔科技有限公司)、Multifug1 X1R 高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 拮抗真菌的分离纯化

称取防风根际土10 g,放入90 mL 无菌生理盐水中,充分震荡,静置后吸取上清液1 mL,以10倍为梯度进行稀释,依次获得10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 梯度稀释液,将各稀释液在PDA培养基中进行分离涂布,置于25℃ 恒温培养3 d后,挑取颜色、形态各异的单菌落进行纯化培养,置于4℃ 条件下保藏。

1.3 拮抗真菌的筛选

采用平板对峙法,利用打孔器将病原菌与待测菌株打取8 mm 菌饼,以尖孢镰刀菌为靶标菌,接种于直径为90 mm 的PDA 培养皿中央,将分离得到的菌株接种于距培养皿中心25 mm 处,以单接病原

菌为对照,3次重复,25℃ 恒温培养7 d,计算抑菌率。

抑菌率 = (D_{对照} - D_{处理})/D_{对照} × 100%,

式中,D_{对照}、D_{处理} 分别表示对照和处理菌株的直径,mm。

1.4 拮抗真菌的鉴定

将待测菌株打取8 mm 菌饼,接种于PDA 培养基中央,于25℃ 条件下恒温培养7 d,观察菌落颜色、形态、大小、分生孢子着生状态及大小,并参照《真菌鉴定手册》^[21] 及《中国真菌志》^[22] 对生防菌进行形态鉴定。

生防菌的分子鉴定:用试剂盒提取待测菌株基因组DNA,采用真菌通用引物ITS1 (5'-TCC GTAGGTGAACCTGCGG-3') 和ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 对待测菌株进行PCR 扩增。反应体系 Master mix 12.5 μL、ITS1 1 μL、ITS4 1 μL、rDNA 2 μL、ddH₂O 8.5 μL,扩增程序为94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30个循环; 72℃ 5 min^[23]。PCR 扩增产物经10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增的PCR 产物交由上海生工进行测序,测序结果在NCBI 中进行BLAST 比对,使用MEGA X 软件 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

1.5 拮抗真菌对尖孢镰刀菌菌丝生长的影响

将待测菌株与尖孢镰刀菌进行对峙培养,挑取对峙培养抑菌带处病原菌菌丝,制成临时玻片,于显微镜下观察病原菌菌丝状态,观察记录并拍照。

1.6 拮抗真菌的抑菌谱

用平板对峙法对拮抗菌株进行抑菌谱测定,测定待测菌株对木贼镰刀菌、腐皮镰刀菌、恶疫霉、灰葡萄孢、核盘菌、细极链格孢、鹅掌楸链格孢、毁灭柱孢菌等8种常见病原菌的抑制效果,并计算抑菌率。

1.7 拮抗真菌在土壤中的定殖

利用抗生素标记法,对待测菌株进行标记^[24]。将待测菌株相继在含有不同质量浓度利福平的PDB 中进行逐级诱导,使菌株可在利福平质量浓度达300 μg/mL 的PDB 中稳定生长。收集标记菌株MR_{Rif}-97 孢子悬液30 mL,浓度为1×10⁸ CFU/mL,在盆钵中均匀拌土,每盆300 g 土壤,3次重复,以未接种标记菌株的土壤为空白对照。拌土结束后,每隔7 d 进行1次标记菌株的分离。

标记菌株的分离:采用梯度稀释法,方法同“1.2”,取10⁻⁴ 稀释液,涂布于含有300 μg/mL 利福平的PDA 培养皿中,于25℃ 条件下培养3 d,统

计培养皿中菌落数量, 计算土壤中标记菌株的含菌量 (CFU/g)。

1.8 拮抗菌株的盆栽防效及促生效果

选取生长状况一致的 1 年生健康防风苗进行盆栽试验。采用伤根灌溉法将防风根部及茎基部划伤, 每株防风接种 1×10^7 CFU/mL 尖孢镰刀菌孢子悬液 10 mL。将防风设置为 5 种处理: 多菌灵 500 倍液 50 mL、 1×10^7 CFU/mL 枯草芽孢杆菌可湿性粉剂 50 mL、 1×10^7 CFU/mL 哈茨木霉可湿性粉剂 50 mL、 1×10^7 CFU/mL 待测菌株孢子悬液 10 mL 以及等量清水对照 (CK), 每种处理 8 株防风。

接种 30 d 后, 取出防风并将根部清洗干净, 统计防风叶片发病情况, 并计算防风病情指数及防效。对防风株高、根长、株鲜质量、根鲜质量、株干质量、根干质量等生物量进行测定, 评价待测菌株对防风的促生效果。

防风枯萎病病情分级标准^[25]: 0 级: 植株健康, 无枯萎症状; 1 级: 叶片表面有黄色病斑, $\leq 10\%$ 叶片发黄; 3 级: 发病区域颜色加深, (10%, 25%] 叶片萎蔫发黄, 开始下垂; 5 级: (25%, 50%] 叶片枯萎发黄, 出现坏死斑块, 叶片开始脱落; 7 级: 植株生长受到明显抑制, 茎秆瘦弱稀疏, (50%, 75%] 叶片黄褐色, 叶片大量脱落; 9 级: 全株萎蔫严重, 叶片褐色, 整体脱落, 严重的植株整株枯萎死亡。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{各级病株数} \times \text{各级代表值})}{(\text{调查总株数} \times \text{最高级代表值})} \times 100\%$$
$$\text{防治效果} = \frac{(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数})}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 拮抗真菌的分离筛选

通过稀释涂布法共分离得到 104 株根际真菌, 将分离得到的根际真菌与尖孢镰刀菌对峙培养后, 具有抑菌效果的真菌菌株为 5 株, 分别为 MR-39、MR-73、MR-84、MR-96 和 MR-97, 抑菌率分别为 58.89%、60.00%、57.78%、57.41% 和 64.44%, 其中菌株 MR-97 抑菌效果最好。

2.2 拮抗真菌的鉴定

2.2.1 形态学鉴定 菌落接种于 PDA 培养基在 25 ℃ 条件下培养 7 d, 菌落直径为 37~41 mm, 初期菌落为白色, 绒状, 7 d 后菌落生长为黄白色, 背面为中等橙黄色, 出现放射状皱纹, 有橙红色液滴

生产, 并形成可溶性黄色分泌物, 菌落边缘全缘。分生孢子头为球形, 直径为 9~20 μm, 小梗双层, 排列紧密呈放射状, 梗基尺寸为 5.5~8.5 μm×1.5~2.5 μm, 瓶梗尺寸为 6.5~10.5 μm×2.0~3.0 μm, 分生孢子为球形、近球形, 直径 2.0~4.5 μm (图 1)。根据其形态特征并结合《真菌鉴定手册》^[21], 鉴定为曲霉属。

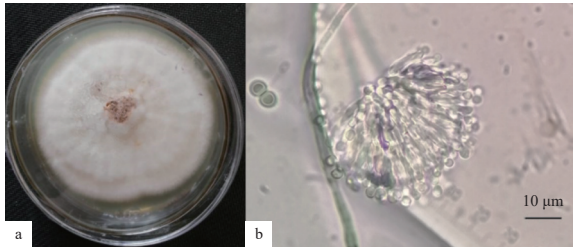


图 1 菌株 MR-97 菌落 (a) 及显微形态特征 (b)
Fig. 1 Colony (a) and micromorphological characteristics (b) of strain MR-97

2.2.2 分子鉴定 经生工测序后, 菌株 MR-97 的 ITS 序列为 532 bp, 提交至 GenBank 获得登录号 OK287153.1, 将该序列与 GenBank 数据库中的核酸序列进行相似性比对, 与土曲霉 *Aspergillus terreus*(MK952265.1)序列相似性达 99.62%。使用 MEGA X 软件 Neighbor-joining 法构建该菌株的 18S rDNA 系统发育树, 菌株 MR-97 与 *A. terreus* 聚为一支 (图 2)。根据菌株形态鉴定及系统发育树结果, 菌株 MR-97 鉴定为土曲霉。

2.3 拮抗真菌对尖孢镰刀菌菌丝生长的影响

在光学显微镜下, 正常生长的尖孢镰刀菌菌丝表面光滑, 粗细均匀, 透明 (图 3a); 经菌株 MR-97 作用后的尖孢镰刀菌生长状态见图 3b~3d, 其菌丝粗细不均, 表面粗糙, 部分菌丝表现为膨大畸形、干瘪、皱缩、扭曲、折叠等。

2.4 菌株 MR-97 的抑菌谱

以供试的 8 种病原真菌为靶标菌, 检测菌株 MR-97 的抑菌谱。结果表明, MR-97 的抑菌谱广, 对多种病原菌具有不同程度的抑制效果, 尤其对恶疫霉的拮抗能力最强, 抑菌率为 86.29%, 其次为对核盘菌、鹅掌楸链格孢、毁灭柱孢菌, 抑菌率分别为 82.59%、71.48% 和 68.51%。对细极链格孢、木贼镰刀菌、腐皮镰刀菌和灰葡萄孢的抑菌率分别为 67.03%、64.07%、64.81% 和 64.81%。

2.5 菌株 MR-97 在土壤中的定殖

经利福平诱导后, 待测菌株 MR-97 经传代培养 10 代, 仍可在含有 300 μg/mL 利福平的 PDA 平板稳定生长, 标号为 MR_{Rif}-97。土壤定殖试验周期

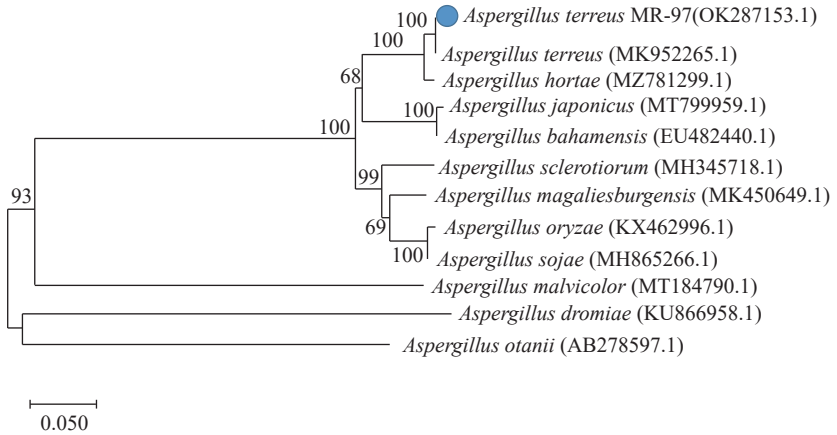
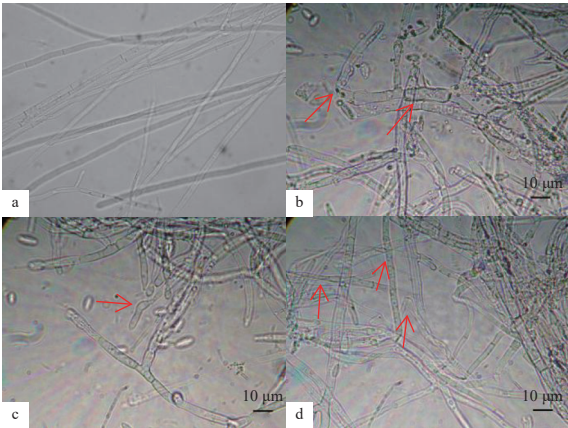


图 2 菌株 MR-97 基于 rDNA-ITS 建立系统发育树

Fig. 2 The phylogenetic tree of strain MR-47 based on rDNA-ITS sequence



a: 尖孢镰刀菌正常生长状态; b: 粗细不均, 表面粗糙; c: 膨大畸形; d: 干瘪、皱缩、扭曲、折叠

a: Normal growth state; b: Uneven thickness and rough surface; c: Swollen malformation; d: Wizened, shrunken, twisted and folded

图 3 菌株 MR-97 对尖孢镰刀菌菌丝生长的影响

Fig. 3 Antibacterial effect of strain MR-97 on mycelium growth of *Fusarium oxysporum*

为 35 d, 未接种标记菌株的供试土壤经检测, 其所含微生物无法在含有 300 μg/mL 利福平的 PDA 平板生长, 由此说明, 该质量浓度的抗生素选择培养

基可用于 MR_{Rif}-97 菌株的有效回收。土壤中菌株 MR_{Rif}-97 的含菌量呈现“先降后升再降”趋势。接种 7 d 时, MR_{Rif}-97 的土壤含菌量为 8.9×10⁶ CFU/g; 接种后 14 d, MR_{Rif}-97 菌株实现扩繁, 土壤含菌量上升至峰值, 为 9.8×10⁶ CFU/g; 随后菌株 MR_{Rif}-97 的土壤含菌量平缓下降, 接种后 35 d, 仍可达到 6.44×10⁶ CFU/g。结果表明, 菌株 MR-97 具有较好的土壤定殖能力。

2.6 菌株 MR-97 的盆栽防效及促生作用

田间盆栽栽培下, 检测菌株 MR-97 对防风枯萎病的防治效果(表 1), 菌株 MR-97 处理的病情指数为 16.25, 显著低于对照组的 50.59。菌株 MR-97 与农药多菌灵处理组防效较高, 分别为 67.86% 和 68.37%, 较施加枯草芽孢杆菌与哈茨木霉粉剂的防效略高。表 2 显示拮抗菌株 MR-97 对防风生长的影响, 施加 MR-97 菌液显著增加了防风的全株鲜质量、根鲜质量及根干质量, 根干质量达到了每株 1.55 g, 是 CK 的 3.4 倍, 促生效果显著。

表 1 菌株 MR-97 对盆栽防风枯萎病防病效果¹⁾

Table 1 Control effect of strain MR-97 on *Fusarium* wilt of potted *Saposhnikovia divaricata*

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防效/% Control effect
清水对照 Water control	50.59±4.29a	
多菌灵500倍液 Carbendazim 500× liquid	16.00±4.23b	68.37±8.36
枯草芽孢杆菌可湿性粉剂 <i>Bacillus subtilis</i> wettable powder	22.18±3.72b	56.15±7.35
哈茨木霉可湿性粉剂 <i>Trichoderma harzianum</i> wettable powder	19.59±2.28b	61.27±4.51
MR-97	16.25±4.47b	67.86±8.84

1)表中数据为平均值±标准差; 同列数据后不同小写字母表示差异显著(P<0.05, Duncan’s法)

1) Data are means ± standard deviations; Different lowercase letters in the same column indicate significant difference(P<0.05, Duncan’s method)

表 2 不同处理对盆栽防风的促生效果¹⁾

Table 2 Promotion effect of different treatments on growth of potted *Saposhnikovia divaricata*

处理 Treatment	株高/cm Plant height	根长/cm Root length	全株鲜质量/g Whole fresh biomass	根鲜质量/g Root fresh biomass	全株干质量/g Whole dry biomass	根干质量/g Root dry biomass
清水对照 Water control	51.86±2.24a	28.24±1.99a	7.52±0.72b	2.01±0.35b	2.24±0.63a	0.45±0.13b
多菌灵500倍液 Carbendazim 500× liquid	53.44±3.24a	30.93±3.8a	10.63±2.07b	3.86±0.83ab	2.73±0.08a	1.02±0.39ab
枯草芽孢杆菌可湿性粉剂 <i>Bacillus subtilis</i> wettable powder	50.63±2.33a	29±0.38a	7.67±1.03b	2.32±0.58b	1.94±0.78a	0.52±0.03b
哈茨木霉可湿性粉剂 <i>Trichoderma harzianum</i> wetable powder	48.95±1.92a	27.88±2.57a	7.43±1.87b	3.44±1.57b	2.09±0.53a	1.02±0.3ab
MR-97	55.21±10.95a	32.71±4.34a	18.11±2.5a	6.69±2.92a	4.55±2.8a	1.55±0.63a

1)表中数据为平均值±标准差; 同列数据后不同小写字母表示差异显著($P<0.05$, Duncan's法)

1) Data are means ± standard deviations; Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$, Duncan's method)

3 讨论与结论

中药材是农业发展的重要产业之一，目前我国大力支持以中药材为基础的中医药产业协同发展的振兴之路。随着中药材种植业的发展，农药残留问题受到广泛关注^[11]。土壤中微生物资源丰富，是拮抗菌筛选的重要来源。本研究从防风根际土中分离出真菌菌株 104 株，并从中筛选出 1 株对尖孢镰刀菌具有较高抑菌效果的菌株 MR-97。通过对 MR-97 菌落、显微形态的观察，及 ITS 序列分析，鉴定为土曲霉 *Aspergillus terreus*，获得 NCBI 登录号 OK287153.1。

真菌主要通过竞争、寄生、拮抗、促进植物生长及诱导抗病性等多种机制共同作用防治植物病害^[26]。杨志强^[27]从土曲霉 ZJ-7 中分离出对柑橘青霉菌、大肠埃希菌、溃疡菌、金黄色葡萄球菌具有拮抗作用的多种长链脂肪酸及其衍生物。本研究中发现菌株 MR-97 可在短期内产生大量孢子与病原菌进行竞争，同时还会使病原菌菌丝出现膨大、菌丝破损、内含物凝集等现象，影响病原菌菌丝的正常生长。有研究表明土曲霉 XWC21-10 菌株发酵液的 4 种萃取物对大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、假交替单胞菌属 SL-1、吉氏库特菌 SL-2、金黄色杆菌 SL-4 等指示菌均有明显的抑制活性；吕恒等^[28]研究发现土曲霉 JCL143 对黄瓜枯萎病、立枯病、菌核病 3 种病原菌均具有较强的抑制效果，应用于盆栽研究中，对 3 种病害的防效均在 74% 以上。本研究结果表明菌株 MR-97 具有良好的生防潜力，其分泌的次生代谢物具有广泛的杀菌能力，与前人研究一致，为进一步研究其在田间

的应用提供了理论基础。

国内外许多研究表明，生防菌的定殖能力是影响生防效果的重要因素^[29]。因此，生防菌在植物体内和根际土壤中的定殖能力成为评定其是否具有产业化前景的一个重要指标。张屹等^[30]采用绿色荧光标记棘孢木霉 M45a 浸种，发现其能有效定殖于水稻根系组织，与清水对照相比，M45a 浸种处理的水稻在生长 50 d 时其株高、地上部干质量、根际土壤总氮和硝态氮含量显著增加，分别增加 8.1%、10.0%、14.92% 和 22.34%。本研究结果表明土曲霉 MR-97 在土壤中具有良好的定殖能力，土壤含菌量最高为 9.8×10^6 CFU/g，定殖 35 d 后，土壤含菌量为 64.4×10^6 CFU/g。对防风枯萎病具有较强的防治效果，防效为 67.86%；同时还能显著促进防风生物量的增加，具有良好的促生效果。

本研究通过对防风根际土壤进行分离、筛选，鉴定出 1 株对防风枯萎病菌具有较强抑制作用，抑菌谱广，且能促进防风植株生长的土曲霉菌株 MR-97，具有极好的研究价值和生防应用潜力，为下一步的相关研究和生产应用工作的开展奠定了基础。

参考文献：

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部: 2020 年版[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 156-157.
[2] 高微微. 常用中草药病虫害防治手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004: 142-144.
[3] 董超, 方香玲. 植物病原真菌尖孢镰刀菌检测与定量研究进展[J]. 草地学报, 2021, 29(7): 1599-1604.
[4] 文增叶, 李定华, 代梦瑶, 等. 三七根腐病原菌尖孢镰刀菌的生物学特性分析[J]. 中药材, 2019, 42(9): 1978-1984.
[5] 沈宝宇, 刘坤, 张天静, 等. 辽五味根腐病的病原菌鉴定

与室内药剂筛选[J]. [中药材](#), 2021, 44(7): 1554-1558.

[6] 黄幸鸽, 李美芽, 杨蒋舜, 等. 白术根腐病病原菌的分离鉴定及特性研究[J]. [中华中医药杂志](#), 2021, 36(5): 2908-2911.

[7] 吴依婷, 姚传威, 邓波侠, 等. 黄精根腐病分离菌及其拮抗内生细菌的鉴定[J]. [浙江农业学报](#), 2018, 30(12): 2087-2093.

[8] 王泽华, 方香玲. 尖孢镰刀菌遗传多样性研究进展[J]. [中国草地学报](#), 2021, 43(5): 106-114.

[9] 雷艳宜, 韩文节, 欧志鹏, 等. QuEChERS 结合质谱法测定食用菌中 13 种农药残留[J]. [食品安全质量检测学报](#), 2021, 12(16): 6544-6551.

[10] 张余杰, 陈文龙, 杨琳, 等. 小贯小绿叶蝉的化防农药及其抗药性发展状况[J]. [农药](#), 2017, 56(4): 239-245.

[11] 陆涛, 李燕, 傅正伟, 等. 农药对根际微生物群落的影响及潜在风险[J]. [农药学报](#), 2019, 21(5): 865-870.

[12] UHEYAMA J, HARADA K, KOIZUMI A, et al. Temporal levels of urinary neonicotinoid and dialkylphosphate concentrations in Japanese women between 1994 and 2011[J]. [Environmental Science & Technology](#), 2015, 49(24): 14522-14528.

[13] 杨利民. 中药材生态种植理论与技术前沿[J]. [吉林农业大学学报](#), 2020, 42(4): 355-363.

[14] 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.

[15] SWEHLA A, PANDEY A K, NAIR R M. Bioactivity of *Trichoderma harzianum* isolates against the fungal root rot pathogens with special reference to *Macrophomina phaseolina* causing dry root rot of mungbean[J]. [Indian Phytopathology](#), 2020, 73(4): 787-792.

[16] DAROODI Z, TAHERI P, TARIGHI S. Direct antagonistic activity and tomato resistance induction of the endophytic fungus *Acrophialophora jodhpurensis* against *Rhizoctonia solani*[J]. [Biological Control](#), 2021, 160(2): 104696. doi: 10.1016/j.biocontrol.2021.104696.

[17] 高芬, 赵晓霞, 闫欢, 等. 黄芪根腐病拮抗芽孢杆菌的筛选鉴定及其对根围细菌群落的影响[J]. [中国中药杂志](#), 2019, 44(18): 3942-3947.

[18] 薛伟. 防风病害的病原鉴定及室内药剂筛选[D]. 长春: 吉林农业大学, 2008.

[19] 马静, 田义新, 王志清, 等. 防风内生拮抗细菌的分离与鉴定[J]. [吉林农业大学学报](#), 2022, 44(3): 323-328.

[20] 王梦奇, 刘丽玲, 李海洋, 等. 防风枯萎病的病原学及药剂敏感性[J]. [吉林农业大学学报](#), 2018, 40(1): 34-42.

[21] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 132-134.

[22] 齐祖同, 主编. 中国科学院中国孢子植物志编辑委员会. 中国真菌志: 第五卷: 曲霉属及其相关有性型[M]. 上海: 科学出版社, 1995: 61-62.

[23] LIU Q, CHEN S. Two novel species of *Calonectria* isolated from soil in a natural forest in China[J]. [MycKeys](#), 2017, 26: 25-60.

[24] 肖春萍. 人参根际土壤微生物多样性及其生防真菌资源开发研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2015.

[25] 庄园. 黄瓜和番茄枯萎病生防菌的筛选及鉴定[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.

[26] 佟昀铮. 玉米茎腐病生防菌鉴定及其绿色防控关键技术研究[D]. 长春: 吉林大学, 2021.

[27] 杨志强. 两种曲霉抗柑橘青霉菌活性化学成分研究[D]. 赣州: 赣南师范大学, 2020.

[28] 吕恒, 牛永春, 邓晖, 等. 根际真菌对黄瓜土传病害的抑制作用[J]. [应用生态学报](#), 2015, 26(12): 3759-3765.

[29] 祁超, 寸海春, 何鹏飞, 等. 生防菌 YN201490 在黄瓜植株体内的定殖能力及防病机制的初步研究[J]. [云南大学学报\(自然科学版\)](#), 2019, 41(1): 172-180.

[30] 张屹, 何英, 肖姬玲, 等. 棘孢木霉 M45a 的定殖能力及其对水稻促生作用研究[J]. [安徽农业大学学报](#), 2021, 48(2): 261-265.

【责任编辑 霍 欢】