



云南省不同森林土壤中三七促生拮抗细菌的分离筛选

邓琳梅, 杨 蕾, 张俊星, 字变仙, 龚加寿, 梅馨月, 刘屹湘, 朱书生, 杨 敏*

(云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室/云南生物资源保护与利用国家重点实验室, 昆明 650201)

摘要:【目的】明确云南省不同森林类型林下土壤是否适宜种植三七, 筛选森林土壤中对三七主要病原菌具有拮抗作用的生防细菌资源, 为三七林下种植及病害的生物防治提供理论依据。【方法】收集不同森林类型(杂木林、思茅松林、云南松林和桉树林)土壤浸提液, 比较过滤液(除去微生物)和未过滤液对三七种子出苗及生长的影响; 以连作土为对照, 分析添加10%林下土壤对连作土中三七种子萌发和幼苗单株鲜重的影响。利用LB平板分离法分离森林土壤中的可培养细菌, 通过对峙培养法筛选对三七病原菌具有拮抗活性的菌株, 并选取对三七主要病原菌均具有拮抗活性的菌株进行16S rDNA分类鉴定。【结果】与过滤液相比, 云南松林和思茅松林土壤浸提未过滤液可促进三七种子萌发和幼苗生长; 杂木林土壤浸提未过滤液可促进三七种子萌发, 但对幼苗生长有一定的抑制作用; 桉树林土壤浸提未过滤液对三七种子萌发和幼苗生长均具有一定的抑制作用。在连作土中添加10%松林土壤可有效缓解三七连作障碍; 添加杂木林和桉树林土壤对三七种子萌发有抑制作用, 但可在一定程度上促进三七幼苗生长。从森林土壤中共分离获得465株细菌, 其中分离自松林土壤中的14株细菌对供试三七主要病原菌均具有较强的拮抗活性, 包括6株芽孢杆菌属、5株链霉菌属、2株假单胞菌属和1株肠杆菌属, 抑菌活性在58.02%~98.61%。【结论】松树林尤其是思茅松林土壤中存在大量的有益微生物, 且这些有益微生物既能抑制根腐病菌, 减轻三七连作障碍, 又能促进三七种子萌发和幼苗生长。

关键词: 三七; 连作障碍; 促生细菌; 拮抗细菌; 林下种植; 云南省

中图分类号: S435.672

文献标志码: A

文章编号: 2095-1191(2020)01-0115-08

Isolation and selection of *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen growth-promoting antagonistic bacterial from different forest soils in Yunnan

DENG Lin-mei, YANG Lei, ZHANG Jun-xing, ZI Bian-xian, GONG Jia-shou, MEI Xin-yue, LIU Yi-xiang, ZHU Shu-sheng, YANG Min*

(Key Laboratory of Agrobiodiversity and Pest Management, Ministry of Education, Yunnan Agricultural University/ State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources in Yunnan, Kunming 650201, China)

Abstract: 【Objective】To explore whether different forest soils in Yunnan Province was suitable for planting *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen, and screen bacterial strains with growth-promoting and pathogen antagonistic effects on *P. notoginseng*, and provide theoretical basis for under forest planting of *P. notoginseng* and biological control of *P. notoginseng* disease. 【Method】The different forest soils extracts (miscellaneous wood forest, Simao pine forest, Yunnan pine forest and eucalyptus forest) were collected to compare the effects of forest soil filtrate (removed microbes) and non-filtrate on seed germination and seedling growth of *P. notoginseng*. The alleviation effects of 10% forest soil amendment on *P. notoginseng* seed germination and seedling fresh weight was analyzed using consecutively cultivated soil as control. The bacterial strains were isolated from soils by LB plate dilution method, the strains with inhibition activity against *P. notoginseng* pathogens were screened by confrontation culture method and the antagonistic isolates were identified by 16S rDNA. 【Result】The results showed that pine and miscellaneous forest water non-filtrated extracts could promote seed germination and seedling growth compared, the non filtrate of miscellaneous forest could promote the seed germination of *P. notoginseng*, but inhibited the growth of seedlings. The non filtrate of eucalyptus forest could inhibit the seed germination and seedling growth of *P. notoginseng*. 10% pine soil amendment obviously reduced the adverse effect of replant failure of

收稿日期: 2019-07-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31772404); 国家重点研发计划项目(2017YFC1702502); 云南省中青年后备人才项目(2017HB024)

作者简介: *为通讯作者, 杨敏(1981-), 博士, 副教授, 主要从事三七连作障碍研究工作, E-mail: yangminscnc@126.com。邓琳梅(1996-), 研究方向为三七连作障碍, E-mail: 2397478164@qq.com

P. notoginseng. The addition of miscellaneous forest soil and eucalyptus forest soil inhibited the germination of *P. notoginseng* seeds, but promoted the growth of *P. notoginseng* seedlings to a certain extent. A total of 465 bacterial strains were isolated from forest soils, and 14 strains isolated from pine soil showed strong antifungal activity against main pathogens of *P. notoginseng*, including six *Bacillus* isolates, five *Streptomyces* isolates, two *Pseudomonas* isolates and one *Lelliotia* isolate, the colony inhibition rate was 58.02%-98.61%. 【Conclusion】There may exist plenty of antagonistic and plant growth promoting bacteria resource in pine soil especially Simao pine soil. These beneficial microorganisms can not only inhibit the root rot pathogen and reduce the continuous cropping obstacle of *P. notoginseng*, but also promote the seed germination and seedling growth of *P. notoginseng*.

Key words: *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; replant obstacle; plant-growth promoting bacteria; antagonistic bacteria; under forest planting; Yunnan

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31772404); National Key Research Program (2017YFC1702502); Yunnan Middle-aged and Young Personnel Project (2017HB024)

0 引言

【研究意义】三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 为五加科人参属名贵中药材, 以干燥的根、根状茎入药, 具有活血化瘀、消肿定痛等功效(陈红艳等, 2019)。近年来, 由于连年大面积单一种植, 三七生产出现连作障碍问题, 已严重影响其产量和品质。目前, 生产上主要通过化学农药和轮作倒茬来缓解三七连作障碍, 但农药的大量使用不但未明显减轻连作障碍, 反而导致严重的农药残留问题。轮作能较好地克服连作障碍, 但三七轮作周期长, 一般种植后要经过10年以上的轮作才能再次种植(简在友等, 2009)。云南是三七的主产地和原产地, 随着市场对三七需求量的不断增加和新垦地的减少, 三七种植逐渐从道地产区向非道地产区转移, 严重影响三七药材的道地性和原产地保护。云南省森林资源丰富, 充分利用林地资源开展林下三七生态种植, 一方面可有效解决由于三七连作障碍带来的无农田地可种的困境, 另一方面有利于三七品质和药效的提升, 有利于实现三七产业的可持续发展。【前人研究进展】林下中药材种植是将适宜林下生长的药用植物引种到自然环境下进行野生化栽培, 在充分利用林地资源的同时节约了大量农田, 且保证中药材质量, 是一种科学合理的生态种植模式。目前人参林下种植技术已较成熟, 许多学者从不同人参种植基地的种植条件、林下人参种植品种及林地选择等方面入手, 结合多年的实践归纳总结出一套林下人参种植技术要点: 适宜的生长环境、优良的品种和种植区的合理规划(齐淑艳, 2006; 王婷婷等, 2014; 甄广韵, 2017)。三七的林下种植也有学者进行了积极探索。姜成厚等(2012)在广西梧州进行三七林下种植试验, 结果表明在梧州地区具有可行性, 可以推广种植。Gong等(2016)在湖南对不同林下三七栽培技术进行研究, 结果表明杉木林、核桃等林下环境适宜种植三七。云南省现有林业用地面积高达2500万ha,

而在思茅松林地、云南松林地、桉树林地及杂木林地等主要林地类型中是否适宜种植三七目前尚未见报道。焦如珍等(1997)研究表明, 土壤微生物、酶和养分是森林生态系统的重要组成部分, 土壤微生物通过分解植物残体而参与森林生态系统的能量流动和物质循环, 是土壤肥力的重要指标。森林土壤微生物积极参与氮、磷、钾等营养物质的地球化学循环, 将有机质分解为植物可吸收利用的形态, 土壤微生物还产生大量生物活性物质, 直接关系到植物的生长(王慧敏, 2009)。吴庆梅等(2009)研究表明, 森林类型会对林下土壤微生物的促生菌总量和比例造成一定影响。【本研究切入点】植物—土壤微生物间的相互作用很早就为人们所关注, 土壤微生物是陆地生态系统的主要活性组分, 在土壤有机质分解、养分循环和生态系统稳定中发挥着关键作用。土壤中细菌群落是土壤微生物中数量最多、分布最广且多样性最丰富的类群之一, 目前森林土壤中是否存在对三七生长具有促进作用且能抑制三七主要病害的细菌类群鲜见相关报道。【拟解决的关键问题】从云南省不同森林类型入手, 评价不同森林类型土壤浸提液对三七生长的影响及引入后对三七连作障碍的缓解作用, 在此基础上分离筛选对三七生长具有促进作用且能抑制三七主要病害的微生物资源, 以明确云南适宜种植三七的森林资源类型, 并进一步扩大生防菌种资源库, 为三七病害生防菌剂的开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 培养基 LB培养基(蛋白胨10.0 g、酵母浸粉5.0 g、氯化钠10.0 g、琼脂粉18.0 g, 用去离子水定容至1000 mL)用于土壤细菌分离; NA培养基(牛肉浸粉3.0 g、蛋白胨5.0 g、葡萄糖2.5 g、琼脂粉18.0 g, 用去离子水定容至1000 mL)用于土壤细菌保存; PDA培养基(马铃薯200.0 g、葡萄糖20.0 g、琼脂粉

18.0 g,用去离子水定容至1000 mL)用于病原真菌培养和拮抗菌筛选。

1.1.2 三七病原菌 恶疫霉菌(*Phytophthora cactorum*)D-1、人参链格孢菌(*Alternaria panax*)AP-2、毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)RS006和茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)F3均由云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室提供并经过致病性测定。

1.1.3 土样 分别采自云南省西双版纳的杂木林土(ZM);宁洱(S1)和澜沧(S2,S3)的思茅松林土;建水(Y1)、文山(Y2,Y3)、迪庆(Y4)和丽江(Y5)的云南松林土;澜沧的桉树林土(An);云南文山的三七连作土(L)。取土时以S形取样法分别选取5个样点,去除表面枯枝落叶等杂物后采集0~20 cm土壤样品,混合均匀后低温运回实验室,于4℃冰箱保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤理化性质测定 林下土壤有效养分采用常规农化分析方法测定(鲍士旦,2000)。土壤有机质含量采用高温外热重铬酸钾氧化—容量法测定,碱解氮含量采用碱解扩散法测定,速效钾含量采用乙酸铵浸提—火焰光度计法测定,有效磷采用碳酸氢钠浸提—钼锑抗比色法测定,电导率采用电导率仪(MP513型,上海三信仪表厂)测定,pH采用精密pH计(MP512型,上海三信仪表厂)测定。

1.2.2 森林土壤浸提液种植三七效果评价 取来自不同地点的林下土壤过0.84 mm(20目)筛后在体积500 mL的三角瓶中用无菌水(按林下土壤和无菌水体积比1:10的比例)浸泡,将三角瓶置于摇床上,25℃、150 r/min振荡24 h,经定性滤纸(20 μm)过滤收集土壤浸提液。将收集到的土壤浸提液分为两份,一份用0.22 μm滤膜过滤除去微生物(只含有养分),另一份不过滤处理(含有养分和微生物)。

为明确土壤微生物的作用,进行林下土壤浸提液对三七种子萌发和幼苗生长影响试验。选取饱满的三七种子,用1.5% NaClO表面消毒5 min,无菌水冲洗3次。石英砂经160℃高温干热灭菌3 h,称取100 g加入灭菌组培瓶(250 mL)内备用。添加石英砂的组培瓶分为两组,第一组加入未过滤的土壤浸提液;第二组加入过滤的土壤浸提液,每瓶加入浸提液20~25 mL,在每个组培瓶中放入15粒三七种子,盖好瓶盖。每处理4次重复,按随机区组摆放于昼夜温度24℃/16℃、光照强度2000 lx、12 h光暗交替的生长间中培养,60 d后调查出苗率,75 d后称量植株整株鲜重。

1.2.3 连作土掺入森林土壤种植三七效果评价 为明确土壤微生物是否具有缓解三七连作障碍的作用,于三七连作土中混合拌入10%的供试森林土壤,在引入土壤微生物的同时避免改变土壤理化性质(Weller et al.,2002)。将连作土和供试土样按9:1的比例混合均匀后装入组培瓶中,加入20 mL无菌水,在每个组培瓶中放入15粒三七种子并置于1.2.2的生长间进行培养。每处理6次重复,以未加入供试森林土壤的三七连作土为对照,60 d后调查出苗率,75 d后称量整株鲜重。

1.2.4 供试森林土壤中可培养细菌分离 采用稀释平板法对供试土壤中的细菌进行分离。取10 g土样加入100 mL无菌水,120 r/min振荡30 min后静置20 min,制成土壤菌悬液;用无菌水将土壤菌悬液稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} ,取100 μL加入到LB培养基表面,涂布均匀后置于28℃恒温培养箱中培养;待细菌菌落长出,挑取不同形态的单菌落进行纯培养,得到纯菌落后接种至NA培养基斜面上,4℃保存备用。

1.2.5 拮抗菌筛选 采用平板对峙法筛选拮抗细菌分离物。将供试三七病原菌用打孔器制成直径5 mm的菌饼接种于PDA培养基中央,在与其距离2.2 cm的位置对称接种4株相同的细菌分离物,于28℃恒温培养箱培养。每处理4次重复,以只接病原菌的PDA培养基为对照。待对照菌落长至培养皿的2/3时,观察是否出现抑菌圈,筛选对三七主要病原菌具有拮抗活性的细菌分离物,并采用交叉法测量菌落半径,计算抑菌率。

$$\text{抑菌率}(\%) = (\text{对照菌落半径} - \text{对峙培养菌落半径}) / \text{对照菌落半径} \times 100$$

1.2.6 拮抗菌鉴定 对1.2.5中筛选获得的对三七主要供试病原菌均具有拮抗活性的细菌进行16S rDNA鉴定。采用细菌DNA提取试剂盒(昆明硕阳科技有限公司)提取拮抗细菌的基因组DNA。利用细菌16S rDNA通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGA TCCTGGCTCAG-3'; 1492R: 5'-TACGGCTACCTTG TTACGACTT-3')进行PCR扩增。PCR反应体系(50.0 μL): 2×PCR Taq MasterMix 25.0 μL, DNA模板2.0 μL, 上、下游引物各2.0 μL, 无菌去离子水19.0 μL。扩增程序: 95℃预变性4 min; 94℃ 40 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 进行30个循环; 72℃延伸10 min。扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后送至昆明硕阳科技有限公司进行测序。利用BLAST将获得的16S rDNA序列在NCBI数据库中进行同源性比对,选取相似度高的种属确定分离菌株的分类地位。

1.3 统计分析

利用 Excel 2013 进行数据处理,并用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析(One-way ANOVA)。

2 结果与分析

2.1 不同森林类型土壤有效养分总体特征

供试土壤样品采自云南省海拔1310~3290 m的区域,其理化性质见表1。由表1可知,供试土壤样品电导率50.2~156.5 $\mu\text{S}/\text{cm}$ 、pH 5.1~6.8、有机质含量

8.9~107.5 g/kg、碱解氮含量109.4~497.9 mg/kg、有效磷含量3.7~63.3 mg/kg、速效钾含量92.1~404.7 mg/kg。土壤电导率和pH反映土壤的盐碱化程度,有机质含量和土壤有效磷含量分别与土壤肥力和土壤中磷循环密切相关,土壤碱解氮含量和速效钾含量反映土壤氮素和速效钾的供应状况。总体而言,种植三七的连作土由于施肥的原因,其有效磷、速效钾含量和电导率普遍高于森林土壤。

表 1 供试土壤样品理化性质特征

Table 1 Physical and chemical properties of tested soil samples

采样点 Sample site	海拔(m) Altitude	碱解氮(mg/kg) Available nitrogen	有效磷(mg/kg) Available phosphorus	速效钾(mg/kg) Available potassium	电导率($\mu\text{S}/\text{cm}$) Electronic conductivity	有机质(g/kg) Organic matter	pH phenyl group
宁洱(S1) Ninger	1630	175.7±8.9	3.7±1.2	122.0±4.0	87.4±24.0	34.6±6.1	6.0±0.1
澜沧(S2) Lancang	1510	334.1±17.4	8.0±2.6	114.1±1.2	50.2±2.3	72.8±9.3	5.8±0.2
澜沧(S3) Lancang	1890	320.4±8.8	7.7±1.7	114.0±1.9	72.3±17.8	68.2±8.4	5.1±0.1
建水(Y1) Jianshui	1730	109.4±29.9	3.7±0.9	92.1±2.0	55.9±1.5	8.9±3.2	5.9±0.2
文山(Y2) Wenshan	1560	224.5±11.8	3.7±2.3	397.9±25.3	68.5±1.9	49.7±7.4	5.8±0.1
文山(Y3) Wenshan	1310	226.1±7.4	3.7±1.7	244.9±3.3	82.2±0.8	60.4±8.6	6.7±0.1
迪庆(Y4) Diqing	3290	337.8±15.9	24.6±4.2	369.4±16.6	100.8±7.4	107.5±9.1	6.8±0.2
丽江(Y5) Lijiang	2080	350.7±52.7	6.1±0.7	404.7±31.5	75.5±1.3	45.6±3.2	6.6±0.1
澜沧(An) Lancang	1890	244.5±9.6	7.3±1.8	153.1±3.2	73.6±17.6	45.6±4.6	6.1±0.1
西双版纳(ZM) Xishuangbanna	1580	497.9±41.6	12.0±3.7	195.3±6.2	94.2±4.6	90.9±8.8	5.6±0.2
文山(L) Wenshan	1760	281.4±3.2	63.3±8.8	402.3±3.9	156.5±21.4	49.0±4.6	6.5±0.1

2.2 森林土壤浸提液种植三七的效果评价

由表2可看出,以云南松林和杂木林土壤浸提未过滤液处理三七种子后,其萌发率均高于过滤处理;思茅松林处理中除S3处理外,其他处理均高于过滤处理;桉树林处理中未过滤处理的种子萌发率略低于过滤处理。在单株鲜重方面,大多数区域的云南松林和思茅松土壤浸提未过滤液处理有利于增加三七幼苗的鲜重,而杂木林和桉树林土壤浸提未过滤处理对三七幼苗生长有一定的抑制作用。由此可看出,云南松林和思茅松林土壤中含有促进三七种子萌发和幼苗生长的微生物,桉树林土壤中的微生物

可能不适宜三七生长。杂木林由于采样点较少,其土壤微生物是否适宜三七生长还有待进一步探究。

2.3 连作土掺入森林土壤种植三七的效果评价

由表3可看出,在三七连作土中掺入10%森林土壤后,思茅松林的土壤微生物可明显促进连作土中三七种子萌发和幼苗生长,尤其是采自宁洱的森林土壤对三七种子萌发和单株鲜重具有显著的促进作用($P<0.05$)。云南松林土壤对三七连作障碍具有一定的缓解作用,2个采样点的土壤可促进三七种子萌发,4个采样点的土壤可明显促进三七幼苗生长,只有采自丽江的云南松林土壤对三七连作障碍无缓解

表 2 不同类型土壤浸提液对三七种子萌发和生长的影响

Table 2 Effects of different types of soil extracts on the germination and growth of *Panax notoginseng* seeds

森林类型 Forest type	编号 No.	萌发率(%) Germination rate		单株鲜重(g) Fresh weight per plant	
		未过滤 Unfiltered	过滤 Filtered	未过滤 Unfiltered	过滤 Filtered
云南松林 Yunnan pine forest	Y1	50.62±0.04	37.78±0.06	0.27±0.02	0.28±0.02
	Y2	38.30±0.04	38.02±0.01	0.33±0.03*	0.24±0.02
	Y3	37.82±0.03	28.34±0.05	0.28±0.01	0.25±0.01
	Y4	44.68±0.04	36.70±0.03	0.34±0.04	0.28±0.01
	Y5	40.04±0.02	32.82±0.02	0.27±0.01	0.28±0.02
思茅松林 Simao pine forest	S1	52.80±0.03	38.02±0.06	0.25±0.02	0.26±0.02
	S2	41.72±0.03	33.26±0.00	0.28±0.02	0.25±0.01
	S3	35.64±0.05	44.72±0.03	0.27±0.02	0.24±0.01
杂木林 Miscellaneous wood forest	ZM	47.78±0.05	35.3±0.02	0.28±0.02	0.31±0.03
桉树林 Eucalyptus forest	An	34.02±0.02	35.58±0.06	0.22±0.01	0.23±0.02

*表示过滤处理与未过滤处理差异显著($P<0.05$)

* represented significant difference between filtered and unfiltered treatments($P<0.05$)

作用,甚至还抑制了三七的出苗和生长。杂木林和桉树林土壤的引入具有类似效果,即对三七种子萌发有抑制作用,但可在一定程度上促进三七幼苗生长。表明思茅松和部分区域的云南松林土壤中含有

可缓解三七连作障碍的微生物。桉树林和杂木林由于采样点较少,其土壤微生物是否具有缓解三七连作障碍的效应还有待进一步探究。

表3 连作土中掺入森林土对三七种子萌发和幼苗单株鲜重的影响

Table 3 Effects of adding forest soil in consecutively cultivated soil on seed germination and seedling fresh weight of *P. notoginseng*

处理 Treatment	萌发率(%) Germination rate	单株鲜重(g) Fresh weight per plant
连作土(L) Consecutively cultivated soil	13.32±3.27	0.194±0.007
连作土+Y1 Consecutively cultivated soil+Y1	21.08±1.11	0.304±0.019*
连作土+Y2 Consecutively cultivated soil+Y2	12.62±0.74	0.234±0.013*
连作土+Y3 Consecutively cultivated soil+Y3	10.02±1.43	0.211±0.004
连作土+Y4 Consecutively cultivated soil+Y4	17.78±2.40	0.245±0.029
连作土+Y5 Consecutively cultivated soil+Y5	11.12±1.28	0.164±0.017
连作土+S1 Consecutively cultivated soil+S1	25.02±1.67*	0.254±0.019*
连作土+S2 Consecutively cultivated soil+S2	20.04±1.28	0.273±0.007*
连作土+S3 Consecutively cultivated soil+S3	18.26±2.46	0.203±0.005
连作土+ZM Consecutively cultivated soil+ZM	10.38±0.74	0.236±0.011*
连作土+An Consecutively cultivated soil+An	11.14±1.28	0.231±0.016

*表示添加森林土壤处理与纯连作土处理差异显著($P<0.05$)

* represented significant difference between the consecutively cultivated soil after the addition of the soil and pure consecutively cultivated soil ($P<0.05$)

2.4 拮抗细菌的分离及其对三七主要病原菌的拮抗作用

利用平板分离法从供试森林土壤中共分离获得465株细菌分离株。平板对峙结果(表4)显示,52株分离株对三七病原菌具有拮抗作用,其中16株分离株分离自云南松林土壤,36株分离自思茅松林土壤,供试杂木林和桉树林土壤中均未分离到拮抗菌株;分离获得的52株拮抗菌株中,40株分离株对恶疫霉菌(D-1)具有明显的拮抗活性,15株对茄腐镰刀菌(F3)具有明显的拮抗活性,19株对毁灭柱孢菌(RS006)具有明显的拮抗活性,38株对人参链格孢菌(AP-2)具有拮抗活性。有14株分离菌株对供试三七病原菌均表现抑制活性,抑制率在58.02%~98.61%,其中有3株分离自云南松林土壤,11株分离自思茅松林土壤。各分离菌株的抑菌活性差异明显,其中拮抗细菌S291和NE171对恶疫霉菌的抑制率最高,达98.61%;拮抗细菌9042对茄腐镰刀菌的抑制率最高,为79.63%;拮抗细菌9042对毁灭柱孢菌的抑制率最高,为87.35%;拮抗细菌10111对人参链格孢菌的抑制率最高,为95.52%。

2.5 拮抗细菌的分子鉴定结果

选取对三七主要病原菌均具有拮抗活性的14株分离菌株进行16S rDNA鉴定。将测序得到的14株拮抗菌株的16S rDNA序列输入GenBank数据库中进行BLAST比对分析,结果(表5)发现有6株为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)、5株链霉菌属(*Streptomyces* sp.)、2株假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)、1株肠杆菌

属(*Lelliottia* sp.)。云南松林土中分离鉴定的3株拮抗细菌分属于暹罗芽孢杆菌(*B. siamensis*)、铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)和肠杆菌属;思茅松林土壤中分离获得11株拮抗细菌,包括1株玫瑰色链霉菌(*Streptomyces roseus*)、2株龟裂链霉菌(*S. rimosus*)、1株生靛链霉菌(*S. indigoferus*)、1株津岛链霉菌(*S. tsukiyonensis*)、1株铜绿假单胞菌、1株蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)、3株枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和1株解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。由此可看出,思茅松林土壤中拮抗菌的比例更高,尤其是澜沧地区的思茅松林土壤中含有的拮抗微生物资源更丰富,且以芽孢杆菌居多,占45.5%。

3 讨论

本研究结果表明,森林土壤微生物群落可改良三七连作土,有效缓解三七连作障碍。对不同森林土壤微生物比较分析结果表明,与桉树林及杂木林相比,松林土壤中含有更多适宜三七种子萌发和幼苗生长的有益微生物,因此,松树林更适宜开展林下三七种植。但林下环境复杂,森林中温度和光照等自然条件对三七的影响还需进一步研究,才能构建完善的林下三七种植体系。

在植物根际界面上,植物、土壤和微生物是一个不可分割的整体,三者间具有很强的依赖性,所涉及的生物化学过程也非常复杂,然而,已有的大部分研究只针对单一对象进行分析,所得到的结论不能全面反映该对象在整个根际过程中的作用和地位(艾超等,2015)。土传病害的流行、连作障碍的出

表 4 不同森林土壤细菌分离株对三七主要病原菌的抑制活性

Table 4 Inhibitory activity of bacterial isolates from different forest soils against the main pathogens of *P. notoginseng*

菌株来源 Source of strain	菌株编号 Strain No.	抑制率(%) Inhibition rate			
		D-1	F3	RS006	AP-2
Y1	R14	89.92±0.73	58.02±0.24	70.06±0.44	91.98±0.24
Y1	R10	72.63±0.19	0	0	0
Y2	S291	98.61±0.78	61.73±2.25	71.91±1.20	94.44±0.24
Y2	S3	0	0	0	93.98±0.44
Y2	S29	0	0	0	77.31±0.37
Y2	S31	89.30±0.84	0	0	0
Y2	S37	93.62±0.39	0	0	0
Y3	U12	0	0	0	63.27±0.50
Y3	U121	88.73±0.66	60.03±1.37	0	92.75±0.82
Y3	U15	90.12±0.34	0	0	0
Y3	U28	93.42±0.51	0	0	0
Y3	U51	84.41±0.64	0	0	89.51±0.53
Y4	E101	91.82±0.99	0	65.43±0.88	95.22±0.37
Y4	E4	89.92±0.19	0	0	0
Y4	E8	90.74±0.34	0	70.52±0.60	78.70±0.50
Y5	H23	83.49±1.90	72.07±0.73	84.88±1.53	88.58±0.15
S1	NE171	98.61±0.78	64.04±0.24	79.17±1.20	94.60±0.44
S1	NE41	93.42±0.19	70.37±0.73	76.08±0.93	78.40±0.24
S1	NE50	94.29±0.51	62.04±1.13	78.40±2.61	94.60±0.14
S1	NE3	95.47±0.78	0	0	0
S1	N4	93.00±2.23	0	0	0
S1	N7	94.15±0.51	0	0	66.20±0.15
S1	NE8	87.04±0.84	0	0	81.48±1.13
S1	N10	86.01±1.27	0	0	69.14±1.32
S1	N11	82.51±0.39	0	0	0
S1	NE151	0	0	0	95.52±0.24
S1	NE17	0	0	0	78.55±0.44
S1	NE25	92.39±0.70	0	0	0
S1	NE35	93.62±0.19	0	0	0
S1	NE42	90.95±1.40	0	0	0
S2	10111	94.60±0.37	62.50±1.13	73.92±1.17	95.52±0.37
S2	101	83.18±1.07	0	0	69.60±0.60
S2	102	0	0	61.11±0.89	0
S2	LC6	87.35±1.36	0	0	89.81±0.44
S2	LC10	60.34±0.93	0	0	70.99±0.53
S2	1034	87.50±1.27	0	0	95.06±0.44
S2	10341	90.33±1.31	0	0	91.82±0.32
S2	LC22	0	0	0	83.02±0.78
S2	LC221	0	0	0	93.83±0.24
S2	10291	0	0	0	93.98±0.44
S3	904	93.21±0.09	73.61±0.34	84.57±1.53	82.87±0.28
S3	9011	78.86±1.90	72.99±0.64	84.26±1.53	86.88±0.37
S3	9022	84.41±1.46	69.29±1.08	79.78±0.44	79.01±0.34
S3	9037	73.66±1.46	70.06±1.07	79.78±1.10	86.88±0.28
S3	90372	65.84±2.23	66.05±0.17	67.75±2.61	84.98±0.24
S3	9042	83.02±1.46	79.63±0.28	87.35±2.61	87.81±0.15
S3	90421	81.48±1.27	61.42±0.17	60.96±1.10	87.65±0.09
S3	902	0	0	0	88.89±0.62
S3	9023	0	0	85.80±1.01	0
S3	9031	83.18±0.99	0	77.31±1.46	89.81±0.17
S3	90311	90.28±0.37	0	0	93.83±0.77
S3	9038	0	0	0	94.14±0.24

现,其主要原因在于土壤微生物群落结构失衡而导致微生态环境恶化(龚明福等,2007),目前国际上通过构建土壤微生物群落多样性来防治植物病害和提高土壤抑病性的研究已成为植物病害生物防治领域的研究热点(段永照等,2010)。本研究供试的10份

森林土壤理化性质良好,土壤浸提液试验结果表明,含有益微生物的土壤浸提液有利于促进三七种子萌发和幼苗生长;未过滤处理下,添加思茅松林土壤浸提液后三七种子萌发率整体高于云南松林土壤浸提液处理,而云南松林土壤浸提液处理更有利于三七

表 5 14株拮抗菌株的NCBI比对结果

Table 5 Comparison of 14 strains of antagonistic strains in NCBI

菌株来源 Source of strain	细菌编号 Bacterial No.	鉴定结果 Identification result	与遗传距离最近的登录号 The registration number closest to the genetic distance
Y1	R14	暹罗芽孢杆菌 <i>B. siamensis</i>	JX065212.1
Y2	S291	铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	MG786774.1
Y5	H23	肠杆菌属 <i>Lelliottia</i> sp.	MG916974.1
S1	NE171	玫瑰色链霉菌 <i>S. roseus</i>	AB184879.1
S1	NE41	龟裂链霉菌 <i>S. rimosus</i>	FJ799165.1
S1	NE50	蜡样芽孢杆菌 <i>B. cereus</i>	KX023368.1
S2	10111	铜绿假单胞菌 <i>P. aeruginosa</i>	KP862609.2
S3	904	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	MG937690.1
S3	9011	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	KJ538550.1
S3	9022	枯草芽孢杆菌 <i>B. subtilis</i>	KJ607888.1
S3	9037	生靛链霉菌 <i>S. indigoferus</i>	KY407747.1
S3	90372	津岛链霉菌 <i>S. tsukiyonensis</i>	KP825185.1
S3	9042	解淀粉芽孢杆菌 <i>B. amyloliquefaciens</i>	KR047105.1
S3	90421	龟裂链霉菌 <i>S. rimosus</i>	KY000096.1

幼苗生长,其鲜重整体高于思茅松林土壤浸提液处理。在石英砂中加入未过滤的桉树林土壤浸提液后,三七单株鲜重及萌发率明显低于其他森林土壤浸提液处理,可能是由于桉树林土壤中的化感物质会抑制三七生长(郝建等,2011)。将林下土壤掺入三七连作土后,桉树林和杂木林土壤对三七连作障碍无明显缓解作用,添加思茅松林土壤后三七的萌发率及单株鲜重整体高于云南松林处理,可能是由于思茅松林土壤中拮抗微生物更丰富,因此引入到连作土后可有效抑制三七主要病原菌,从而促进三七生长,有效缓解三七连作障碍。

本研究的森林土壤拮抗细菌分离结果显示,共获得52株拮抗细菌,其中36株分离自思茅松林土,16株分离自云南松林土,桉树林和杂木林中未分离到拮抗微生物,与引入森林土壤缓解三七连作障碍的结论一致。已有研究表明,通过添加0.1%~10.0%的林下土壤,可在不改变原有土壤理化性质的前提下将防病微生物转移到本底土壤中(Mendes et al., 2011),因此本课题组尝试将林下土壤中具有抑菌功能的不同微生物群落引入到三七连作土中,发现普遍可提高三七鲜重和萌发率,使连作土壤微生物区系得到改善(另文报道),为缓解三七连作障碍提供了新思路。

从松林土壤中分离获得的拮抗微生物可有效抑制三七主要病原菌的生长,抑制率在58.02%~98.61%,其主要种类为链霉菌属和芽孢杆菌属,占总数的78.57%,分离到的拮抗细菌均来源于云南省不同区域的松林土壤中,为后续在松林下进行三七种植提供了重要的依据。链霉菌属和芽孢杆菌属是广泛存在于自然界中重要的生物防治微生物资源,芽孢杆菌可通过产生低分子抗生素及蛋白或多肽类化

合物对许多病原真菌表现出较强的抑制活性(赵新林和赵思峰,2011;陈哲等,2015;赵昱榕等,2019);链霉菌主要通过拮抗作用、竞争作用、重寄生作用和诱导抗性作用等抗病机制防治植物土传病害,且链霉菌可通过多种方式联合发挥生防作用(毛良居和毛赫,2017)。但拮抗细菌的田间防治效果评价及不同生防菌间的菌群组合增效技术还需进一步研究。

4 结论

松树林土壤浸提液可促进三七种子萌发和生长,在松林尤其是思茅松林土壤中分离到大量的有益微生物,包括芽孢杆菌、链霉菌、假单胞菌和肠杆菌,这些微生物既能抑制根腐病菌,减轻三七连作障碍,又能促进三七种子萌发和幼苗生长。

参考文献:

- 艾超,孙静文,王秀斌,梁国庆,何萍,周卫. 2015. 植物根际沉积与土壤微生物关系研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 21(5): 1343-1351. [Ai C, Sun J W, Wang X B, Liang G Q, He P, Zhou W. 2015. Advances in the study of the relationship between plant rhizodeposition and soil microorganism[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 21(5): 1343-1351.]
- 鲍士旦. 2000. 土壤农化分析[M]. 北京: 中国农业出版社. [Bao S D. 2000. Agrochemical analysis of soil[M]. Beijing: China Agriculture Press.]
- 陈红艳,陈安,卢芳国,林检生,何倩,李智雄. 2019. 三七总皂苷的药理研究进展[J]. 湖南中医杂志, 35(1): 154-157. [Chen H Y, Chen A, Lu F G, Lin J S, He Q, Li Z X. 2019. Research progress in pharmacology of *Panax notoginseng* saponins[J]. Hunan Journal of Traditional Chinese Medicine, 35(1): 154-157.]
- 陈哲,黄静,赵佳,王长彪,梁宏. 2015. 解淀粉芽孢杆菌抑菌机制的研究进展[J]. 生物技术通报, 31(6): 37-41. [Chen Z, Huang J, Zhao J, Wang C B, Liang H. 2015. Research advances on antibacterial mechanism of *Bacil-*

- lus amyloliquefaciens*[J]. *Biotechnology Bulletin*, 31(6): 37-41.]
- 段永照, 刘歆, 潘竞军. 2010. 拮抗生防细菌对土传性病害的抑菌机理及应用现状[J]. *新疆农业科技*, (3): 50-56. [Duan Y Z, Liu X, Pan J J. 2010. Antibacterial mechanism and application status of antagonizing biocontrol bacteria to soil-borne diseases[J]. *Xinjiang Agricultural Science and Technology*, (3): 50-56.]
- 龚明福, 贺江舟, 孙晓棠, 张利莉. 2007. 土壤微生物与土壤致病性形成关系研究进展[J]. *新疆农业科学*, 44(6): 814-819. [Gong M F, He J Z, Sun X T, Zhang L L. 2007. Research on the relationship between soil microbes and soil disease suppression[J]. *Xinjiang Agricultural Science*, 44(6): 814-819.]
- 郝建, 陈厚荣, 王凌晖, 秦武明, 曾冀, 张明慧. 2011. 尾巨桉纯林土壤浸提液对4种作物的生理影响[J]. *浙江农林大学学报*, 28(5): 823-828. [Hao J, Chen H R, Wang L H, Qin W M, Zeng J, Zhang M H. 2011. Physiological responses of four crops in aqueous extracts of soil from *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* forest[J]. *Journal of Zhejiang A & F University*, 28(5): 823-828.]
- 简在友, 王文全, 游佩进. 2009. 三七连作土壤元素含量分析[J]. *中国现代中药*, 11(4): 10-11. [Jian Z Y, Wang W Q, You P J. 2009. Analysis of element contents in soil for continuous cropping *Panax notoginseng*[J]. *Modern Chinese Medicine*, 11(4): 10-11.]
- 姜成厚, 林伟国, 王金桥, 黄海连. 2012. 梧州低海拔林下三七种植试验[J]. *南方农业学报*, 43(3): 360-363. [Jiang C H, Lin W G, Wang J Q, Huang H L. 2012. Experiment on planting *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen in low elevation forests of Wuzhou[J]. *Journal of Southern Agricultural Sciences*, 43(3): 360-363.]
- 焦如珍, 杨承栋, 屠星南, 盛炜彤. 1997. 杉木人工林不同发育阶段林下植被、土壤微生物、酶活性及养分的变化[J]. *林业科学研究*, 10(4): 373-379. [Jiao R Z, Yang C D, Tu X N, Sheng W T. 1997. The change of undergrowth, soil microorganism, enzyme activity and nutrient in different developing stage of the chinese fir plantation[J]. *Forest Research*, 10(4): 373-379.]
- 毛良居, 毛赫. 2017. 链霉菌生物防治研究进展[J]. *安徽农业科学*, 45(1): 145-147. [Mao L J, Mao H. 2017. Advances on biological control of *Streptomyces*[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 45(1): 145-147.]
- 齐淑艳. 2006. 林下种植人参栽培技术[J]. *中国林副特产*, (3): 59. [Qi S Y. 2006. Techniques for ginseng cultivation under forests[J]. *Forest By-Product and Speciality in China*, (3): 59.]
- 王慧敏. 2005. 不同森林植被下土壤微生物与土壤生化性质的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学. [Wang H M. 2005. The study on soil microorganism, enzyme activity and nutrition under different forest vegetations [D]. Changsha: Hunan Agricultural University.]
- 王婷婷, 刘双, 赵洪颜. 2014. 农田栽参和伐林栽参土壤养分及酶活性比较分析[J]. *安徽农业科学*, 42(34): 12075-12077. [Wang T T, Liu S, Zhao H Y. 2014. Comparative analysis of soil nutrients and enzyme activity between cultivated ginseng in the farmland and cultivated ginseng in the cutting forests[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 42(34): 12075-12077.]
- 吴庆梅, 黄宝灵, 吕成群, 陆丽, 郭飞, 李校雨, 李莉. 2009. 不同松林根际促生菌的数量研究[J]. *广西农业科学*, 40(5): 521-526. [Wu Q M, Huang B L, Lü C Q, Lu L, Guo F, Li X Y, Li L. 2009. Population of growth-promoting rhizobacterial(GPR) in different pine forest[J]. *Guangxi Agricultural Science*, 40(5): 521-526.]
- 赵新林, 赵思峰. 2011. 枯草芽孢杆菌对植物病害生物防治的作用机理[J]. *湖北农业科学*, 50(15): 3025-3028. [Zhao X L, Zhao S F. 2011. Research advance in controlling plant diseases by *Bacillus subtilis*[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 50(15): 3025-3028.]
- 赵昱榕, 李磊, 谢学文, 石延霞, 柴阿丽, 孙广玉, 李宝聚. 2019. 贝莱斯芽孢杆菌Zf2对多主棒孢病菌防治效果[J]. *中国生物防治学报*, 35(2): 217-225. [Zhao Y R, Li L, Xie X W, Shi Y X, Chai A L, Sun G Y, Li B J. 2019. Biocontrol effect of *Bacillus velezensis* strain ZF2 against *Cornepora cassicola*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 35(2): 217-225.]
- 甄广韵. 2017. 辽东山区林下参栽植技术[J]. *吉林林业科技*, 46(1): 43-45. [Zhen G Y. 2017. Ginseng cultivation technology of eastern of Liaoning mountainous area[J]. *Journal of Jilin Forestry Science and Technology*, 46(1): 43-45.]
- Gong Z, Luo X Q, Peng J, Gong F W. 2016. Cultivation techniques of *Panax notoginseng* F. H. Chen under different forests[J]. *Agricultural Science & Technology*, 17(12): 2818-2822.
- Mendes R, Kruijt M, Bruijn I, Dekkers E, Van D V M, Schneider J H M, Piceno Y M, DeSantis T Z, Andersen G L, Bakker P A H M, Raaijmakers J M. 2011. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria[J]. *Science*, 332: 1907-1100.
- Weller D M, Raaijmakers J M, McSpadden B B, Tomashow L S. 2002. Microbial populations responsible for specific soil suppressiveness to plant pathogens[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 40(1): 309-348.

(责任编辑 麻小燕)