

## 诱导大豆抗逆细菌的筛选及分子鉴定

黄姗姗<sup>1</sup>, 段玉玺<sup>1</sup>, 陈立杰<sup>1</sup>, 王媛媛<sup>2</sup>, 沈红秋<sup>1</sup>, 万传浩<sup>1</sup>, 陈井生<sup>3</sup>, 崔少斌<sup>4</sup>

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161; 3. 黑龙江省农业科学院 大庆分院, 黑龙江 大庆 163316; 4. 黑龙江省农业科学院 黑河分院, 黑龙江 黑河 164300)

**摘要:**为筛选出既能诱导大豆抗寒又能抗胞囊线虫的细菌,将室内初筛诱导大豆抗寒的14株细菌菌株发酵液对大豆进行种子包衣后播种于辽宁省和黑龙江省大豆胞囊线虫重病田,然后调查大豆苗期生长以及胞囊线虫发生情况,并对表现优秀的菌株进行分子鉴定。结果表明:Sneb69、Sneb82、Sneb179和Sneb218发酵液对大豆苗期生长有明显抗寒作用;从根上胞囊量、土中胞囊量、根内线虫量3个方面调查发现对大豆胞囊线虫有显著的抑制作用,且在不同地区不同重复中均保持稳定的抗病能力;Sneb82和Sneb218对根腐病有一定的抑制效果;从6个大豆生理指标上与对照进行比较,结果差异明显,证明菌株Sneb69、Sneb82、Sneb179、Sneb218为良好的抗逆菌;经16SrDNA序列同源性分析,初步判定菌株Sneb69、Sneb82、Sneb218为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),Sneb179为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。

**关键词:**细菌;大豆胞囊线虫;根腐病;诱导抗性;16SrDNA

**中图分类号:**S 565.1      **文献标识码:**A      **文章编号:**1000-9841(2011)02-0205-06

## Screening and Molecular Identification of Bacteria Induced Anti-adversity Effect in Soybean

HUANG Shan-shan<sup>1</sup>, DUAN Yu-xi<sup>1</sup>, CHEN Li-jie<sup>1</sup>, WANG Yuan-yuan<sup>2</sup>, SHEN Hong-qiu<sup>1</sup>, WAN Chuan-hao<sup>1</sup>, CHEN Jing-sheng<sup>3</sup>, CUI Shao-bin<sup>4</sup>

(1. Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning; 2. Department of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning; 3. Daqing Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing 163316, Heilongjiang; 4. Heihe Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heihe 164300, Heilongjiang, China)

**Abstract:** To provide theoretic base for screening of bacteria induced anti-adversity effect from bacteria induced cold resistance in soybean, soybean seeds coated by bacteria were grown on farmland where *Heterodera glycines* occurred seriously in Liaoning and Heilongjiang province with liquid nutrient medium treatment as control, and then investigated the growth of soybean seedlings and the cyst nematode occurrence, and performed molecular identification of outstanding strains. Sneb69, Sneb82, Sneb179 and Sneb218 showed significant cold resistant effect for soybean seedlings. It was also showed that bacteria could control soybean cyst effectively as the treatment of soybean coated by strain Sneb69, Sneb82, Sneb179 and Sneb218 showed soybean cyst control effect by analyzing the number of cyst on the root, the number of cyst in the soil and the number of soybean cyst nematodes in the root. In different district, bacteria treatments showed stable resistance to adverse environment, it proved Sneb69, Sneb82, Sneb179 and Sneb218 would become the potential agents to resist adverse environment. Sneb82 and Sneb218 showed inhibitory effect on root rot. Six physiological indicators of soybean under bacteria strain showed better performance compared with the control, indicating strain Sneb69, Sneb82, Sneb179 and Sneb218 had good adversity tolerance ability. 16SrDNA sequence analysis showed Sneb69, Sneb82 and Sneb218 were related to *Bacillus megaterium* and Sneb179 were related to *Pseudomonas aeruginosa*.

**Key words:** Bacteria; *Heterodera glycines*; Root rot; Induced resistance; 16SrDNA

东北是我国大豆主产区,高纬度地区全年大豆生长的有效积温少,适宜大豆生长的季节短。低温是限制大豆生产的主要因子<sup>[1]</sup>。多年以来,采用施放烟雾、地膜覆盖、抗寒力强的品种或晚熟品种适

时早播等措施可提高植物的抗寒力;大豆胞囊线虫病是制约大豆生产的重要病害之一。我国以东北和黄淮海大豆产区危害比较严重。据不完全统计,我国大豆胞囊线虫受害面积已达133万hm<sup>2</sup><sup>[2]</sup>。通

收稿日期:2010-11-11

基金项目:公益性行业(农业)科研专项资助项目(200903040-03);国家现代农业产业技术体系岗位科学家专项资助项目。

第一作者简介:黄姗姗(1986-),女,在读硕士,现从事有害生物与环境安全研究。E-mail:feihu6660103@sina.com。

通讯作者:段玉玺(1964-),男,教授,博士生导师,现从事生物防治研究。E-mail:duanyx6407@163.com。

过种植抗病品种,化学防治,改变耕作方式以及合理的管理方式对大豆胞囊线虫病都能起到一定的防治作用,但是都有一定的局限性<sup>[3-4]</sup>。诱导抗性具有广谱性、持续时间较长、抗性表达时间和空间的相对可控性、诱导物对环境无污染等特点决定了植物诱导抗性具有良好的应用前景。利用细菌作为生物防治因子防治植物病害已成为国内外生物防治研究中的一个热点。自从1978年Burr等首先在马铃薯上报导PGPR以来,国内外已发现包括荧光假单孢菌、芽孢杆菌、根瘤菌、沙雷氏属等20多个种属的根际微生物具有防病促生的潜能,最多的是假单孢菌属(*Pseudomonas*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*),其次为农杆菌属(*Agrobacterium*)、埃文氏菌属(*Eriwinia*)和黄杆菌属(*Flavobacterium*)<sup>[5]</sup>。试验利用已室内初步筛选的诱导大豆抗寒的细菌发酵液为诱导剂,研究在发生大豆胞囊线虫病土的情况下,诱导剂对大豆生长发育的影响,以期进一步筛选出既能诱导大豆抗寒又能抗胞囊线虫病的细菌。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

1.1.1 菌株 室内初筛诱导大豆抗寒细菌菌株 sneb56、sneb60、sneb69、sneb82、sneb179、sneb218、sneb226、sneb241、sneb243、sneb252、sneb274、sneb329、sneb372 和 sneb586。

1.1.2 大豆 黑河 51,合丰 50,辽豆 15 分别种植于黑龙江省黑河市和大庆市,辽宁省康平县。

### 1.2 试验方法

1.2.1 种子处理 将初筛诱导大豆抗寒的14株细菌菌株分别在牛肉膏蛋白胨(NA)液体培养基中发酵振荡培养2d,采用1%的种子量进行种子包衣处理,待干燥后装袋、编号备用<sup>[6]</sup>。

1.2.2 田间小区处理 分别在辽宁省康平县,黑龙江省大庆市和黑河市进行5次重复试验。以NA液体培养基处理为对照。试验田为重茬大豆田,土为田间自然发病土。

1.2.3 田间调查取样 在大豆播种后35d,待大豆胞囊线虫生长发育突破大豆根表后,每个处理随机取3株苗,方法是先去掉表土(0~5cm),将植株连根挖出,保持根系完整,先计数根上胞囊数量,然后放入取样袋中封存、写好标签带回实验室;收集根际土:在5~15cm深度挖取大约300g根围土装袋,封口,做好标签,带回实验室及时分离。

测定项目:单株大豆根系胞囊着生量,根内线虫量,土中胞囊量,大豆根腐病病情指数,根长,苗高,根干重,地上部干重,根冠比。

土中胞囊的分离与计数:每份土样称取200cc(即用1000mL烧杯盛水800mL,加土至1000mL),淘洗过筛收集胞囊<sup>[7]</sup>,在体视解剖镜下记录胞囊的数量。

根内线虫的染色与计数:将根系用流水清洗干净,称根鲜重,然后用次氯酸钠—酸性品红染色法进行根内线虫的染色<sup>[7]</sup>,在体视显微镜下观察记录根内线虫数量,并折成每克根鲜重线虫的数量。

苗期根腐病调查:按0~5的6级分类法<sup>[8]</sup>在大豆苗期进行调查,取样方法为每处理随机取5株,记录病株数并分级。

防治效果计算:

$$\text{胞囊抑制率}(\%) = \frac{\text{对照胞囊数} - \text{处理胞囊数}}{\text{对照胞囊数}} \times 100$$

$$\text{线虫抑制率}(\%) = \frac{\text{对照线虫数} - \text{处理线虫数}}{\text{对照线虫数}} \times 100$$

$$\text{病情指数}(\%) = \frac{\sum(\text{病情指数} \times \text{该级指数})}{\text{调查株数} \times \text{最高病级}} \times 100$$

$$\text{防效}(\%) = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100$$

1.2.4 数据分析 应用Excel和DPS软件对数据进行处理和分析。

1.2.5 16SrDNA基因序列测定与系统发育树分析 细菌基因组DNA的提取:采用TIANGEN公司细菌基因组DNA提取试剂盒法。

16SrDNA基因的PCR扩增:引物为通用保守引物27f(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')和1492r(5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')。

测序:PCR产物由宝生物工程(大连)有限公司纯化并测序。

序列的系统发育分析:将所得序列与GenBank数据库中已登录鉴定的序列进行BLAST分析,选取亲缘关系相近的序列的16S rDNA,采用DNAMAN 6.0.3.99进行比对,并通过ClustalX 1.83和MEGA 4.1软件构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 诱导抗寒细菌发酵液对大豆胞囊线虫的影响

2.1.1 根上大豆胞囊线虫 由图1可知,Sneb218、Sneb82、Sneb252和Sneb56对根上胞囊线虫有一定抑制作用。其中Sneb218的抑制效果最好,在大庆、黑河的胞囊抑制率分别达到91.91%和41.34%;Sneb82在康平、大庆胞囊抑制率分别达到65.69%和75.80%。室内复筛出的抗寒效果最为显著的2菌株Sneb179和Sneb69中,前者在康平抑制率为33.33%,后者在康平、大庆的胞囊抑制率分别达到43.14%和60.29%。

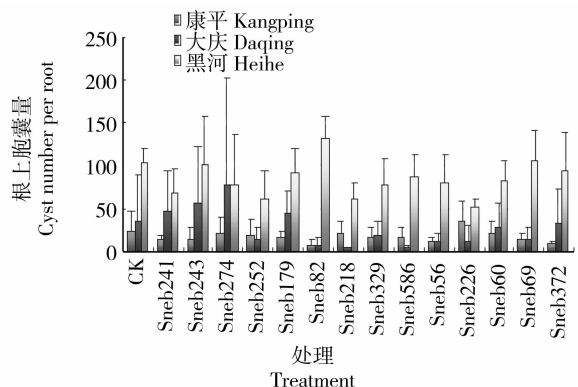


图 1 不同细菌菌株包衣处理大豆种子对大豆根系胞囊形成的影响

Fig. 1 Effect of different bacterial strains coating on formation of soybean root cyst numbers

2.1.2 土中大豆胞囊线虫 由图 2 可知,Sneb82、Sneb586、Sneb56、Sneb226 和 Sneb69 对土中胞囊线虫有一定的抑制作用。其中 Sneb82 效果最好,在康平、大庆、黑河胞囊抑制率分别达到 59.78%、62.24%、61.11%;而室内复筛出的抗寒效果最为显著的菌株 Sneb179 和 Sneb69 中前者在康平抑制率为 33.06%,后者在康平、大庆胞囊抑制率分别达到 60.90%、58.96%。

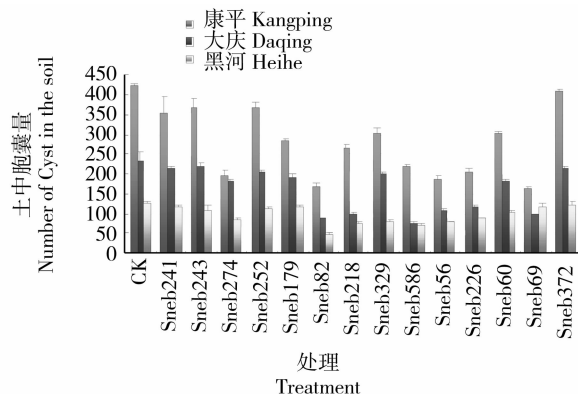


图 2 不同细菌菌株包衣处理大豆种子对大豆根系周围土中胞囊的影响

Fig. 2 Effect of different bacterial strains coating on soil cyst around soybean roots

2.1.3 根内大豆胞囊线虫 由图 3 可知,Sneb82、Sneb218、Sneb56、Sneb226 和 Sneb69 对根内胞囊线虫有一定抑制作用,其中 Sneb82、Sneb218 和 Sneb56 效果最好,Sneb82 在康平、大庆、黑河线虫抑制率分别达到 63.98%、70.22% 和 77.02%, Sneb218 在康平、大庆、黑河线虫抑制率分别达到 57.86%、66.14% 和 65.09%, Sneb56 在康平、大庆、黑河线虫抑制率分别达到 55.99%、63.46% 和 65.18%;而室内复筛出的抗寒效果最为显著的菌株 Sneb179 和

Sneb69 中,前者在康平抑制率为 27.33%,后者在康平、大庆、黑河胞囊抑制率分别达到 53.69%、66.24% 和 38.41%。

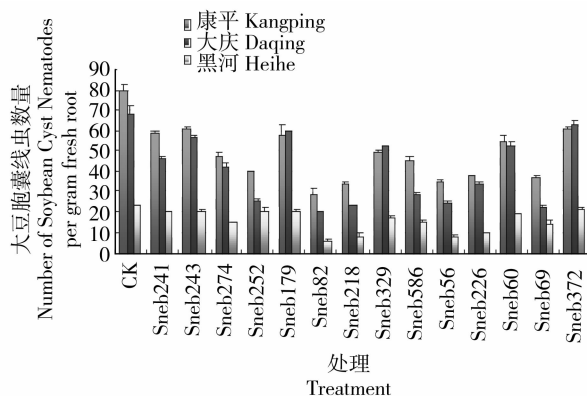


图 3 不同细菌菌株包衣处理大豆种子对大豆根内胞囊线虫的影响

Fig. 3 Effect of different bacterial strains coating on cyst in soybean roots

2.2 诱导抗寒细菌发酵液对大豆根腐病的田间防治效果

由表 1 可知,Sneb252、Sneb82、Sneb218 和 Sneb226 对大豆根腐病有一定抑制作用,Sneb82 在大庆、黑河防效分别达到 54.86% 和 27.85%, Sneb218 在康平、黑河防效分别达到 26.15% 和 47.06%。

表 1 采用不同细菌菌株包衣处理大豆种子对大豆根腐病的防治效果

Table 1 Effect of different bacterial strains coating on soybean root rot

处理 Treatment	辽宁康平 Kangping Liaoning		黑龙江大庆 Daqing Heilongjiang		黑龙江黑河 Heihe Heilongjiang	
	病情指数 Disease index/%	防效 Control effect/%	病情指数 Disease index/%	防效 Control effect/%	病情指数 Disease index/%	防效 Control effect/%
CK	86.67	—	80.00	—	68.00	—
Sneb241	42.67	50.77	66.67	16.67	60.00	13.33
Sneb243	70.67	18.46	81.67	—	60.00	11.76
Sneb274	52.00	40.00	81.67	—	51.67	24.02
Sneb252	76.67	11.54	44.44	44.44	45.33	33.33
Sneb179	56.00	35.38	80.56	—	48.00	29.41
Sneb82	80.00	7.69	36.11	54.86	49.33	27.45
Sneb218	64.00	26.15	66.67	16.67	36.00	47.06
Sneb329	68.00	21.54	80.00	—	58.33	14.22
Sneb586	73.33	15.38	81.33	—	61.33	9.80
Sneb56	75.00	13.46	50.00	37.50	49.33	27.45
Sneb226	69.33	20.00	42.22	47.22	43.33	36.27
Sneb60	78.67	9.23	61.67	22.92	58.33	14.22
Sneb69	62.67	27.69	50.00	37.50	65.00	4.41
Sneb372	64.00	26.15	36.67	54.17	63.33	6.86

表 2 采用不同细菌菌株包衣处理大豆种子对大豆苗期生长的影响  
Table 2 Effect of different strains on soybean seedling growth

处理 Treatment	根长 Root length/cm			苗高 Height/cm			须根数 Fibre number			根干重 Root dry weight/g			地上部干重 Plant dry weight/g			根冠比 Root shoot ratio		
	康平 Kangping	大庆 Daqing	黑河 Heihe	康平 Kangping	大庆 Daqing	黑河 Heihe	康平 Kangping	大庆 Daqing	黑河 Heihe	康平 Kangping	大庆 Daqing	黑河 Heihe	康平 Kangping	大庆 Daqing	黑河 Heihe	康平 Kangping	大庆 Daqing	黑河 Heihe
GK	12.43 aA	10.69deBCD	11.26abA	14.45 aA	18.06aA	18.69abA	32.07 aA	21.47gIcGH	40.07abA	0.297abA	0.203bBC	0.416abA	1.097aA	1.684aA	1.736aA	0.275aA	0.121dB	0.247aA
Shed241	12.52aA	11.26bcdeBCD	9.85bA	15.19 aA	16.76abcABC	18.27abA	34.47 aA	38.50abAB	40.67abA	0.312abA	0.176bcCD	0.417abA	1.341aA	0.688gE	1.473aA	0.239aA	0.256dB	0.323aA
Shed243	10.53 aA	12.47abcAB	11.15abA	14.72 aA	14.29efgDEFG	19.15abA	32.00 aA	33.27bcde BCDE	36.40abA	0.366aA	0.172bcCD	0.441abA	1.348aA	0.932efgCDE	1.899aA	0.286aA	0.207bcdB	0.239aA
Shed274	12.64 aA	11.28bcdeBCD	11.85abA	14.03 aA	13.15ghIcGH	19.98aA	31.27 aA	27.04efgEFG	41.07abA	0.264abA	0.141cD	0.490aA	1.071aA	0.678gE	1.994aA	0.247aA	0.204bcdB	0.267aA
Shed252	13.64 aA	12.72abAB	11.93abA	15.03 aA	11.74fjH	17.85abA	35.00 aA	23.50fghIcGH	35.80abA	0.293abA	0.142cD	0.380abA	1.225aA	0.835fgDE	1.424aA	0.260aA	0.210bcdB	0.307aA
Shed179	12.99 aA	13.86aA	11.28abA	14.29 aA	16.28bcdeABCD	18.71abA	27.70 aA	31.67cde BCDEF	38.93abA	0.255abA	0.173bcCD	0.436abA	1.133aA	1.475abcAB	1.568aA	0.235aA	0.120dB	0.285aA
Shed82	10.56 aA	11.83bcBC	10.51a	13.95 aA	14.71deFGCDEF	17.62abA	27.93 aA	29.42def CDEFG	36.53abA	0.2461a	0.284aA	0.408abA	1.017aA	1.201cdeBCD	1.471aA	0.264aA	0.238bcB	0.346aA
Shed218	13.94 aA	13.91aA	11.17abA	14.33 aA	17.12abAB	16.89abA	36.10 aA	36.50bcABC	38.67abA	0.280abA	0.156cdCD	0.349abA	1.089aA	1.246bcdBc	1.279aA	0.265aA	0.124dB	0.284aA
Shed329	13.87 aA	10.98cdeBCD	11.03abA	13.33 aA	12.49nijGH	19.33abA	33.87 aA	27.50efgDEFG	37.53abA	0.256abA	0.172bcCD	0.409abA	1.096aA	0.994defCDE	1.512aA	0.236aA	0.2081cdB	0.282aA
Shed586	12.74 aA	9.87cCD	13.21aA	13.66 aA	14.86defCDEF	19.68abA	32.40 aA	18.00hH	45.33aA	0.255abA	0.202bBC	0.450abA	1.123aA	1.404abcAB	1.829aA	0.231aA	0.144cdB	0.271aA
Shed56	11.33 aA	9.78eD	11.00abA	14.89 aA	13.33fghIcFGH	17.23abA	30.60 aA	31.00cde BCDEF	36.73abA	0.274abA	0.152cCD	0.351abA	1.187aA	1.193cdeBCD	1.313aA	0.235aA	0.127dB	0.333aA
Shed226	12.84 aA	11.33bcdeBCD	10.25bA	14.00 aA	14.96defCDEF	19.45abA	34.23 aA	29.07cCDEFc	35.60abA	0.286abA	0.149cCD	0.441abA	1.261aA	1.257bcdBc	1.808aA	0.231aA	0.122dB	0.266aA
Shed60	12.69 aA	11.851bcdBC	10.87abA	13.77 aA	15.39cdeBCDE	18.81abA	34.23 aA	42.80aA	38.20abA	0.262abA	0.249aAB	0.450abA	0.932aA	1.529abAB	1.712aA	0.280aA	0.1631cdB	0.276aA
Shed69	13.29 aA	12.46abcAB	10.69abA	13.54 aA	14.04efghIcFG	16.33bA	36.20 aA	27.50efgDEFG	38.20abA	0.253abA	0.139cD	0.320bA	1.114aA	1.212cdBCD	1.128aA	0.236aA	0.755aA	0.308aA
Shed372	10.98 aA	11.23bcdeBCD	10.33bA	15.29 aA	11.23jH	18.31abA	32.60 aA	35.60bcdeABCD	33.53bA	0.262abA	0.256aAB	0.377abA	1.110aA	1.401abcAB	1.694aA	0.242aA	0.1831cdB	0.233aA

同列数值后标以不同大小写字母者分别表示在 0.01 和 0.05 水平上差异显著。

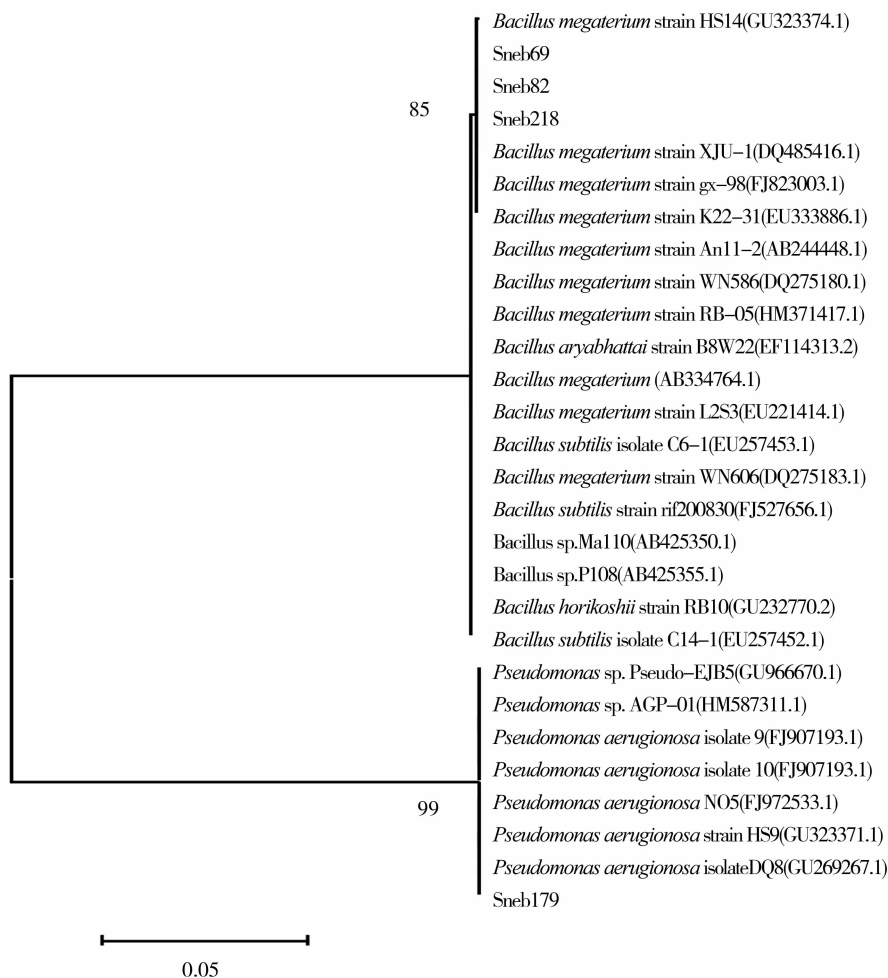
Values within a column followed by different lowercase and capital letters are significantly different at 0.05 and 0.01 probability levels, respectively.

### 2.3 诱导抗寒细菌发酵液对大豆的促生效果

由表 2 可知 Sneb179, Sneb218 对大豆根长有一定促生作用;大多数发酵液对大豆苗高没有促生作用,反而对大豆有矮化作用,矮化可以增加植株抗逆性<sup>[3]</sup>,其中 Sneb69, Sneb82 有明显矮化抗逆作用;Sneb60, Sneb241, Sneb218 促进大豆须根的生长;Sneb243, Sneb60, Sneb82 能够增加大豆的根干重;大多数发酵液对大豆地上部分干重没有增加作用,反而有减少作用,与诱导抗寒细菌发酵液对大豆苗高的影响一样,可提高抗逆性,其中 Sneb82, Sneb218, Sneb329, Sneb60 效果明显; Sneb82, Sneb241, Sneb69 可提高大豆的根冠比。综合以上抗寒和抗病结果得出 Sneb69, Sneb82, Sneb179, Sneb218 也具有一定的促生抗逆作用。

### 2.4 抗逆细菌 16S rDNA 基因序列和系统发育学分析

采用 DNAMAN6.0.3.99 对 4 株诱导大豆抗逆细菌的 16S rDNA 基因序列相似性的比较结果表明:菌株 Sneb69, Sneb82, Sneb218 序列同巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 序列相似性分别为 99.9%、99.9% 和 99.8%, 菌株 Sneb179 序列同铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 序列相似性为 99.9%。从图 4 系统发育树可见,筛选到的 4 株抗逆细菌分属于已报道生防细菌中占很大比例的芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。其中菌株 Sneb69, Sneb82, Sneb218 均属于芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*), 芽孢杆菌属 (*Bacillus*); 菌株 Sneb179 属于假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*), 假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。



结点处数字为 bootstrap 值,括号内为序列登录号

Bootstrap values are shown at the branch points, submission number of the relating genera is available as supplementary data in IJ SEM Online

图 4 株抗逆菌和相关菌株序列的 16S rDNA 基因序列的邻接法系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree showing the relationships of four stress tolerance strains of bacteria with the sequences of relating genera constructed by the neighbour-joining method and based on 16S rDNA gene sequences

### 3 结论与讨论

研究表明,细菌 Sneb69, Sneb82, Sneb179, Sneb218 发酵液包衣种子能提高大豆在逆境条件下的幼苗抗寒力及抗大豆胞囊线虫病能力。综合考虑康平、大庆、黑河三地初步判断菌株 Sneb82, Sneb218, Sneb69, Sneb56, Sneb226, Sneb252, Sneb586 对大豆胞囊线虫有一定的抑制作用,其中 Sneb82, Sneb218 对大豆胞囊线虫抑制效果较好,室内复筛出的抗寒效果最为显著的两株菌 Sneb179 和 Sneb69 对大豆胞囊线虫也有一定的抑制作用。部分菌株在辽宁康平、黑龙江大庆、黑龙江黑河三地处理的结果有一定差异,与 Tian 等<sup>[10]</sup>的结果相似。在测定指标中,幼苗株高矮化,根系长度增加,根冠比值提高,从而达到了壮苗的目的,增强了抗逆能力。用细菌 Sneb69, Sneb82, Sneb179, Sneb218 发酵液对诱导大豆抗寒及抗线有一定的潜力,其中 Sneb82, Sneb218 发酵液对大豆根腐病也具有一定的抑制作用。

经过 16S rDNA 鉴定得出这 4 株菌分属于芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 和假单胞菌属 (*Pseudomonas*)。虽然 16S rDNA/ RNA 基因序列广泛应用于细菌鉴定或构建细菌的系统进化关系,但在亲缘关系很近的分类类群间,由于序列间的相似度太高而失效<sup>[11]</sup>。近年来国内外研究发现为了弥补 16S rDNA/ RNA 基因的不足,以如 *gyrA* 基因、*gyrB* 基因、*ropD* 基因等编码蛋白的基因作为系统发育鉴定标记。可以通过多重 PCR 技术、DNA-DNA 杂交分析以及限制性酶切分析区分开来<sup>[12]</sup>。该研究是通过细菌发酵液诱导大豆的方法使其具有抗逆性,结合前期室内抗寒筛选和该试验康平、大庆、黑河三地田间进一步筛选,综合各指标优选出 3 株芽孢杆菌和 1 株假单胞菌。但是单一拮抗菌用于田间生物防治时,由于生防菌在田间条件下受不同地区生态条件包括温湿度、降雨量、土壤结构、pH、含水量、以及微生物区系等因素的影响,往往存在着不同年份、不同地点防治效果不够稳定的问题。生防菌株复合菌剂与单一菌株相比,更能适应不同土壤、多种病原物和环境变化,从而提高生防效果及其稳定性<sup>[13]</sup>。研究还需在各微生物的复配、定殖和后效研究上进行探讨,对细菌诱导剂发挥抗逆功效的机制还有待于进一步研究。

**致谢:**感谢黑龙江省农科院大庆分院李肖白研究员和黑河分院李红鹏研究员在试验过程中给予的支持和帮助。

### 参考文献

- [1] 单彩云. 大豆耐低温资源筛选及蛋白质组学研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2008. (Shan C Y. Screening and proteome research of soybean low temperature tolerance germplasm [D]. Harbin:Northeast Agricultural University,2008. )
- [2] 李永峰,赵云和,段玉玺,等. 防治大豆胞囊线虫病的土壤真菌的筛选[J]. 土壤通报,2006,37(4):772-775. (Li Y F,Zhao Y H,Duan Y X,et al. Screening of soil fungi inhibiting soybean cyst nematode[J]. Chinese Journal of Soil Science,2006,37(4):772-775. )
- [3] 周勋波,王根林,吴海燕,等. 大豆应用抗寒剂抗寒效应的研究[J]. 杂粮作物,2001(4):32-33. (Zhou X B,Wang G L,Wu H Y,et al. Studies on the effect of cold-resistant agent on soybean [J]. Rain Fed Crops,2001(4):32-33. )
- [4] 吴海燕. 大豆与大豆胞囊线虫相互关系研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2003. (Wu H Y. The interaction of resistant soybeans and heterodera glycines [D]. Shenyang:Shenyang Agricultural University,2003. )
- [5] 戴梅,宫象辉,丛蕾,等. PGPR 制剂研发现状与发展趋势[J]. 山东科学,2006,19(6):45-47. (Dai M,Gong X H,Cong L,et al. Recent advances and research trend of PGPR agents[J]. Shandong Science,2006,19(6):45-47. )
- [6] 孙华,段玉玺,焦石,等. 抗大豆胞囊线虫的根际促生菌的筛选及其鉴定[J]. 大豆科学,2009,28(3):507-510. (Sun H,Duan Y X,Jiao S,et al. Filtration and identification of plant growth promoting *Rhizobacteria* on resistance of soybean cyst nematode[J]. Soybean Science,2009,28(3):507-510. )
- [7] 刘维志. 植物线虫学研究技术[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,1995. (Liu W Z. Research techniques of plant nematology [M]. Shenyang:Liaoning Science and Technology Press,1995. )
- [8] 韩庆新,辛惠普. 大豆根腐病主要病原菌对大豆幼苗致病性的初步研究[J]. 大豆科学,1990,9(2):157-162. (Han Q X,Xin H P. A preliminary study on the pathogenicity of the main pathogens causing soybean seedling root rot[J]. Soybean Science,1990,9(2):157-162. )
- [9] Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. Current protocols in molecular biology[M]. New York :J Wiley & Sons, 1987.
- [10] Tian H L, Robert D R. Effects of rhizobacteria on soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 2000, 32(4):377-388.
- [11] Christensen H,Nordentoft S,Olsen J E. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequence[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998,48(2):605-6101.
- [12] 曹凤明,李俊,沈德龙,等. 多重 PCR 技术检测微生物肥料中巨大芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌的研究与应用[J]. 微生物学通报,2009,36(9):1436-1441. (Cao F M,Li J,Shen D L, et al. Multiplex-PCR approach to identify *Bacillus megaterium* and *Bacillus cereus* group applied in microbial fertilizers[J]. Microbiology,2009,36(9):1436-1441. )
- [13] 葛红莲,郭坚华,祁红英,等. 复合菌剂 AR99 防治辣椒青枯病[J]. 植物病理学报,2004,34(2):162-165. (Ge H L,Guo J H,Qi H Y,et al. Biological control of capsicum bacterial wilt by compound bacterial mixture AR99[J]. Acta Phytopathologica Sinica,2004,34(2):162-165. )