

大豆根际促生菌 Sneb207 对不同种类线虫毒性的研究

孙 华,段玉玺,陈立杰,王媛媛

(沈阳农业大学植物保护学院植物线虫学研究室,辽宁 沈阳 110161)

摘要:从大豆根瘤中分离到 1 株根际促生菌 Sneb207,经鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。室内测定结果表明:其发酵产物对豆苗生长促生效果显著,发酵液灭菌后仍具有促生活性,具有广泛的应用价值。用该菌发酵液测定了对各种线虫的作用,结果表明毒力作用具有差异,大小顺序分别为大豆胞囊线虫、北方根结线虫、水稻干尖线虫和腐烂茎线虫。不同浓度发酵液对大豆胞囊线虫均有较好的防治作用,与无菌水对照处理有显著差异。说明细菌菌株 Sneb207 是控制大豆胞囊线虫病且促进大豆生长的有效因子。

关键词:根际促生菌;巨大芽孢杆菌;大豆胞囊线虫;北方根结线虫;水稻干尖线虫;腐烂茎线虫

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)04-0683-04

Virulence Difference of Plant Growth Promoting Rhizobacteria Sneb207 to Different Nematodes

SUN Hua, DUAN Yu-xi, CHEN Li-jie, WANG Yuan-yuan

(Plant Nematology Laboratory, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: Strain Sneb207 was isolated from soybean nodule and identified as *Bacillus megaterium*. It is proved the fermentation filtrate, even the sterilized fermentation filtrate of Sneb207 could promote soybean seedlings growth significantly. The virulence effect of Sneb207 fermentation filtrate to different nematodes was tested. The result indicated Sneb207 had poisonous effect to nematodes. And significant virulence to different nematodes was detected, the sequence of virulence from high to lower was *Heterodera glycines*, *Meloidogyne hapla*, *Aphelenchoides besseyi*, *Ditylenchus destructor*. The virulence of different concentrations of Sneb207 fermentation filtrate to *Heterodera glycines* was also tested. It proved bacteria Sneb207 was an effective biological agent to control soybean cyst nematode (SCN) and promote soybean growth.

Key words: PGPR; *Bacillus megaterium*; *Heterodera glycines*; *Meloidogyne hapla*; *Aphelenchoides besseyi*; *Ditylenchus destructor*

植物寄生线虫是一类重要的病原微生物,分布广、种类多,全世界已报道的植物线虫有 200 多属 5 000 余种,给农林业生产造成严重危害^[1]。据世界粮农组织(FAO)保守估计,全世界因线虫危害给粮食和纤维作物造成的损失约为 12%,对蔬菜、花生、烟草和某些果树造成的损失要超过 20%。大豆胞囊线虫、根结线虫、水稻干尖线虫和腐烂茎线虫是农业生产中重要的植物病原线虫,在生产上为害十分严重,已成为农林生产上的重要问题^[2]。近年来,随着国家大力倡导农业生产的可持续发展,生物防治越来越受到重视,特别是利用根际促生菌控制线

虫病害在国外已取得了显著的成果^[3]。

PGPR 是指自由生活在土壤或附生于植物根的一类可促进植物生长及其矿质营养的吸收和利用,并能抑制有害微生物的有益菌类^[4]。PGPR 的促生防病研究已成为热点方向之一,其研究主要集中在假单胞菌和芽孢杆菌类,该类群能够抑制多种植物病害特别是土传病害^[5]。作用机理主要包括有效根部定殖、抗生作用、根围营养竞争、分泌降解病原物微生物的酶等。因此,PGPR 制剂在农林牧业、环境保护等方面具有重大应用潜力和价值。

收稿日期:2009-01-07

基金项目:科技部成果转化基金资助项目(05EFN212100059);国家自然科学基金资助项目(30673199)。

作者简介:孙华(1982-),女,在读博士,研究方向为植物线虫学。E-mail:sunhua1982@hotmail.com。

通讯作者:段玉玺,教授,博士生导师。E-mail:Duanyx6407@163.com。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

菌株 Sneb207 由本实验室从大豆根瘤中分离获得。经鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。

大豆品种辽 15 由辽宁省农科院提供。

1.2 发酵液的制备

细菌菌株 Sneb207 接种于牛肉蛋白胨液体培养基上,25℃,120 r·min⁻¹下液体摇瓶发酵 2 d。将一部分发酵液在 10 000 r·min⁻¹下离心 10 min,取其上清液置于 4℃ 冰箱中保存。另一部分发酵液于 121℃ 高温灭菌 30 min 后备用。

1.3 靶标线虫体系的构建

大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*):3 号生理小种采自本实验室的试验地。通过淘洗过筛法收集胞囊,将胞囊放在 0.5% 次氯酸钠中消毒 3 min,用无菌水冲洗 3 次,放在含有少量无菌水的培养皿里,在 25℃ 恒温箱中培养 7 d 后,每隔 24 h 收集 1 次新孵化的二龄幼虫(J2)。

北方根结线虫(*Meloidogyne hapla*):用感病番茄品种室内盆栽方式保存。当番茄根系上有大量卵囊出现时,取出根系,用水轻轻冲洗,小心取出卵囊,放在 1% 的次氯酸钠中消毒 3 min,用无菌水冲洗 3 次,放在含有少量无菌水的培养皿里,在 25℃ 恒温箱中培养,每隔 24 h 收集 1 次新孵化的北方根结线虫 J2。

水稻干尖线虫(*Aphelenchoides besseyi*):由本实验室室保存。25℃ 下在 PDA 培养基上培养链格孢菌,待菌落长满全皿后接入经 1% 硫酸链霉素消毒的 20 条水稻干尖线虫,25℃ 下培养,20 d 左右可以繁殖出大量的水稻干尖线虫,取出培养基用刀切碎,放在盛有少量无菌水的贝曼漏斗中,8 h 后可以收集大量水稻干尖线虫。

腐烂茎线虫(*Ditylenchus destructor*):采自辽宁省大连市瓦房店受茎线虫侵染的甘薯。将发病薯块放在盛有少量无菌水的培养皿里,在 25℃ 下,24 h 茎线虫会从薯块中游出,采用贝曼漏斗法收集活的茎线虫。

1.4 菌株 Sneb207 对豆苗的促生作用

将催芽基本一致的豆种放于细菌发酵液和灭菌发酵液中浸泡 2 h 后播到灭菌的沙钵中,置于光照培养箱中,25℃ 光照 14 h,黑暗 10 h 培养。待豆苗长至两子叶张开时每周补充一次 Hoagland 营养液。

以液体 NA 培养基为对照,每 3 株豆苗为 1 个处理。发酵液用无菌水稀释,设置 3 个浓度梯度,共 6 个处理。每处理重复 3 次。20 d 后,测量豆苗苗高、根长、干重。

1.5 发酵液对各种靶标线虫的毒力测定

将灭菌发酵液用无菌水稀释为不同的倍数,0 (原液)、2、5、8、10 倍,在贝氏小皿中加入 1 mL 不同稀释倍数的细菌发酵液,分别加入各种线虫的悬浮液 0.1 mL,内含约 50 条线虫,放在 25℃ 恒温箱中培养,设置 3 次重复,以无菌水作为对照。分别在 24、48 h 观察线虫的死亡情况,根据以下公式计算线虫的校正死亡率。

校正死亡率/% =

$$\frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100\%$$

1.6 5 倍稀释发酵液对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

取新鲜、成熟度一致的胞囊,消毒后放入自制的孵化池中。孵化池置于无菌的培养皿中,培养皿内盛 Sneb207 灭菌发酵液的 5 倍稀释液。设无菌水处理为对照,每个处理 3 次重复,28℃ 下孵化。10 d 后镜检,计算孵化出的 J2 数量。

1.7 统计分析

采用 DPS 软件进行方差分析,Duncan's 新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 细菌发酵液对大豆的促生作用

结果表明,各处理的豆苗与对照从苗高、根长、干重三指标上差异均极显著(表 1)。未灭菌发酵液随稀释倍数增加,促生结果越好,作用方式可能是发酵过程中产生植物激素^[6-7]。10 倍稀释液促生作用最为明显,豆苗平均株高增加 95.08%,根长增加 39.53%,干重增加 83.89%。灭菌发酵液促生结果较未灭菌发酵液差,可能由于高温条件下某些活性物质失活,但仍表现出促生效果,与对照相比差别仍极显著。可在田间应用时考虑采用灭菌发酵液,以避免 PGPR 因定殖能力不同而产生的不稳定性。故认为细菌菌株 Sneb207 具有大豆促生活性。

2.2 灭菌发酵液对不同种类线虫毒性差异

测定了不同时间发酵液原液对各种线虫的毒力作用(见表 2),结果表明,发酵液原液对不同线虫有不同的作用效果,且随着时间增长,线虫死亡数增

表 1 Sneb207 发酵液在大豆苗期的促生作用

Table 1 The effects of Sneb207 fermentation filtrate to promote the growth of soybean seedlings

处理 Treatment	株高 Height /cm	根长 Root length /cm	干重 Dry weight/g
发酵液原液 Fermentation filtrate	18.3bB	16.7eE	0.293eD
发酵液 5 倍稀释 5 times dilution of fermentation filtrate	18.2bB	17.1dD	0.313cC
发酵液 10 倍稀释 10 times dilution of fermentation filtrate	23.8aA	18.0aA	0.388aA
灭菌发酵液 Sterilizing fermentation filtrates	18.2bB	17.9bB	0.322bB
灭菌 5 倍稀释液 5 times dilution of sterilizing fermentation filtrate	17.1cC	15.9fF	0.295dD
灭菌 10 倍稀释液 10 times dilution of sterilizing fermentation filtrate	16.8dD	17.8cC	0.231fE
对照(液体培养基) CK(NA)	12.2eE	12.9gG	0.211gF

加。48 h 时,大豆胞囊线虫、北方根结线虫的校正死亡率分别高达 100%、99.17%。对水稻干尖线虫校正死亡率达 80.93%。不同时间下对腐烂茎线虫的校正死亡率均较其它线虫低,48 h 仅为 51.10%。主要因腐烂茎线虫抵抗力强,不易被杀死。说明 Sneb207 灭菌发酵液对大豆胞囊线虫、北方根结线虫、水稻干尖线虫 J2 具有高效毒杀作用,而对腐烂

表 3 不同稀释倍数发酵液在不同时间对大豆胞囊线虫 J2 的毒性差异

Table 3 The bio-activity of dilution of sterilizing fermentation filtrate to *Heterodera glycines*(J2) in different time

发酵液稀释倍数 Dilution of sterilizing fermentation filtrate	24 h		48 h	
	平均死亡率 Average mortality rate/%	校正死亡率 Corrected mortality rate/%	平均死亡率 Average mortality rate/%	校正死亡率 Corrected mortality rate/%
0	98.67aA	98.46	100.00aA	100.00
2	97.67abA	97.31	100.00aA	100.00
5	85.00bAB	82.66	94.33aA	92.47
8	70.00cB	65.32	83.33abAB	77.87
10	68.00cB	63.01	69.00bB	58.85
无菌水 Sterilizing water	13.50dC	-	24.67cC	-

2.4 5 倍发酵液稀释液对大豆胞囊孵化的影响

10 d 后观察 5 倍稀释液对大豆胞囊孵化的作用,处理中胞囊未孵化,而对照无菌水中胞囊正常孵化出 J2。结果表明,细菌 Sneb207 发酵液能明显抑制大豆胞囊线虫胞囊的孵化,相对抑制率为 100%。

茎线虫 J2 有一定作用。

表 2 Sneb207 发酵原液在不同时间对不同种类线虫的毒力作用

Table 2 The bio-activity of sterilizing fermentation filtrate of strain Sneb207 to different species of nematodes in different time

不同时间 Time/h	不同种类线虫校正死亡率 The corrected mortality rate of different nematodes/%			
	大豆胞囊线虫 <i>Heterodera glycines</i>	北方根结线虫 <i>Meloidogyne hapla</i>	水稻干尖线虫 <i>Aphelenchoides besseyi</i>	腐烂茎线虫 <i>Ditylenchus destructor</i>
12 h	98.46aA	94.29aA	72.40bA	14.82bB
24 h	100.00aA	99.17aA	80.93aA	51.10aA

2.3 不同浓度倍数灭菌发酵液对大豆胞囊线虫 J2 的毒性差异

通过测定不同稀释倍数灭菌发酵液 24 h、48 h 对大豆胞囊线虫 J2 的毒性差异(见表 3),结果表明,不同稀释倍数发酵液对大豆胞囊线虫 J2 有不同的作用效果。且随着时间增长,线虫死亡率有一定提高,但不十分显著。可见发酵液 Sneb207 对大豆胞囊线虫 J2 作用时间短,效果明显。随着稀释倍数的增加,对大豆胞囊线虫的毒力下降。发酵原液和 2 倍稀释液在 48 h 时对大豆胞囊线虫 J2 的校正死亡率均为 100%,在稀释倍数为 10 时,大豆胞囊线虫的校正死亡率也可达 50% 以上。结果还表明,5 倍发酵液稀释液对大豆胞囊线虫的作用效果与原液的作用效果无明显差异,说明 Sneb207 发酵液 5 倍稀释液是较合理的稀释倍数。

3 结论与讨论

测定 Sneb207 细菌发酵液对 4 种线虫(大豆胞囊线虫、北方根结线虫、水稻干尖线虫、腐烂茎线虫)的毒力作用。结果表明:对 4 种线虫均有不同程度的毒杀作用,且对大豆胞囊线虫毒力影响最强。

各倍数稀释液 48 h 对大豆胞囊线虫 J2 的校正死亡率均高于 50%，以 5 倍稀释液最为合理，同时对大豆胞囊线虫胞囊孵化抑制率高达 100%。室内盆栽试验表明，发酵液 Sneb207 对豆苗生长具有促进作用，发酵液灭菌后活性仍能保留。这解决了根际促生菌因定殖能力不同而带来的不稳定性。说明菌株 Sneb207 有促生、抗病和生防多种功能，具有优良的应用潜能。

近年来 PGPR 的促生防病研究成为热点方向之一，PGPR 制剂不断被开发应用。研究发现，PGPR 在植物根围的聚集，它们旺盛的代谢作用加强了土壤中有机的分解，促进了植物营养元素的矿化，增强了对作物营养的供应^[8]。某些 PGPR 菌株产生的植物激素可促进植物根系生长，增强根系吸收矿物营养和水分的能力，从而促进植物生长。同时 PGPR 在根围的定殖能在一定程度上抑制病原物的定殖和传播^[9]。

研究了根际促生菌——巨大芽孢杆菌对不同种类线虫的毒力作用，尤其是对大豆胞囊线虫病害的防治作用。在体外环境条件下，Sneb207 发酵液能够很明显抑制胞囊孵化，并对二龄幼虫具有毒杀作用。且菌株 Sneb207 具有促生作用，更能有效的控制大豆胞囊线虫带来的危害。

随着生物技术的不断发展，微生物制剂由单一功能向多功能发展，如何使 PGPR 产品更好的适应环境，发挥其生防功效也成为研究者们热衷的问题。多功能菌株 Sneb207 的发现，为控制植物病害提供了新的解决思路。但其应用还尚需时日，尤其在复杂的田间环境中，如何使其促生、防病和生防功能更好的发挥是目前急需解决的问题。

参考文献

- [1] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004, 3: 1-4. (Liu W Z. Description of the species of plant parasitic nematodes [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2004, 3: 1-4.)
- [2] 段玉玺, 吴刚. 植物病虫害防治[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2002, 1: 2-3. (Duan Y X, Wu G. The control of plant pest and disease [M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2002, 1: 2-3.)
- [3] Backer J O, Cook R J. Role of siderophores in suppression of *Pythium* species and production of increased growth response of wheat by *Fluorescent Pseudomonads*[J]. *Phytopathology*, 1988, 78: 778-782.
- [4] Malik K A, Rakhshand A B. Association of nitrogen fixing Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) with Kallar Grass and Rice [J]. *Plant and Soil*, 1997, 194: 37-44.
- [5] Weller D M. Biological control of soil borne pathogens in the rhizosphere with bacteria[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1988, 26: 379-407.
- [6] Joo G J, Kim Y M, Lee I J, et al. Growth promotion of red pepper plug seedlings and the production of gibberellins by *Bacillus cereus*, *Bacillus macroides* and *Bacillus pumilus*[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(6): 487-491.
- [7] Macmillan J. Occurrence of gibberellins in vascular plants fungi and bacteria[J]. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2002, 20(4): 387-442.
- [8] 宋志伟, 杨首乐, 王庆安, 等. 复合微生物肥料在茄果类蔬菜上应用效果研究[J]. 河南职业师范学院学报, 2002, 30(4): 33-35. (Song Z W, Yang S L, Wang Q A, et al. An applied effect test of compound microbial fertilizer on egg plants and other vegetables[J]. *Journal of Henan Vocation- Technical Teachers College*, 2002, 30(4): 33-35.)
- [9] 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): 45-48. (Dai M, Gong X H, Cong L, et al. Recent advances and research trend of PGPR agents[J]. *Shandong Science*, 2006, 19(6): 45-48.)

欢迎订阅 2010 年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学方面的学术期刊。主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科具基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。办刊宗旨是报道本领域最新研究动态和成果，为繁荣我国作物科学研究、促进国内外学术交流、加速中国农业现代化建设服务。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》为月刊，2009 年 208 页/期，定价：50 元/册，全年 600 元。可通过全国各地邮局订阅，刊号：ISSN 0496-3490，CN 11-1809/S，邮发代号：82-336。也可向编辑部直接订购。

编辑部地址：北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农科院作物所《作物学报》编辑部（邮编 100081）

联系电话：010-82108548；传真：010-82105793；E-mail：xbzw@chinajournal.net.cn

网址：<http://www.chinacrops.org/zwx/>（向读者免费提供最新录用、下期、当期及过刊全文，有在线投稿、在线审稿、在线查询等功能。）