

根瘤内生细菌对大豆胞囊线虫及根腐病菌的影响

王媛媛,段玉玺,陈立杰

(沈阳农业大学植物保护学院线虫学研究室,沈阳 110161)

摘要 为了明确大豆根瘤内生芽孢杆菌 Snb2 对大豆胞囊线虫的毒性和大豆根腐病菌的抑制作用,用菌悬液处理和对峙培养法分别测定了 Snb2 对两种病原微生物的作用效果。结果表明:Snb2 的菌悬液能够明显抑制大豆胞囊线虫孢囊的孵化,相对抑制率达到 94.9%;菌悬液处理 J2 96 h 时死亡率达到 66.7%;Snb2 菌株对 4 种大豆根系病原真菌表现不同程度的拮抗作用,对尖孢镰刀菌和茄腐镰刀菌的拮抗作用最明显,抑菌圈达到 10 mm 左右,抑制作用可持续 10 d;经细菌悬浮液浸种测定,处理后的大豆子叶节到根尖的距离为 9.1 ± 4.54 cm,较对照增加了 15.19%,对幼苗生长有明显的促进作用;通过温室盆栽防效试验,进一步表明 Snb2 菌悬液进行种子浸种对大豆胞囊线虫病有明显的抑制作用,防治效果达到 62.5%。

关键词 根瘤;内生芽孢杆菌;促生;大豆胞囊线虫;大豆根腐病菌;拮抗

中图分类号 S 565.110.417 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0213-05

EFFECT OF ENDOPHYTIC BACTERIA FROM SOYBEAN ROOT NODULES ON SOYBEAN CYST NEMATODE AND PATHOGENS OF SOYBEAN ROOT ROT

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

(Plant Nematology Laboratory, Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract In order to study the effect of endophytic bacteria Snb2, *Bacillus* sp., from soybean root on *Heterodera glycines* and soybean root rot pathogens, treatment J2 and cyst with bacterial suspension and Dual-culture tests to soybean root rot pathogens were developed. The result showed that the bacterial suspension had effect on the hatching of cyst and the rate of inhibition was 94.9%; after 96 h, the mortality of J2 was 66.7% treated with bacterial suspension; strain Snb2 had strong anti-fungal activity to 4 soybean root rot pathogens, especially to *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, the inhibition zone was 10 mm and lasted almost ten days; after treated with bacterial, it apparently promoted the growth of soybean seedling, the length between cotyledon and root tip was 9.1 ± 4.54 cm, 15.19% higher than that of CK; In potted trial, bacterial suspension showed obvious efficiency against soybean cyst nematode and control efficiency reached 62.5%.

Key words Root nodule; *Endophytic Bacillus* sp.; Plant-growth-promoting; Soybean cyst nematode; Pathogens of soybean root rot; Antagonism

收稿日期:2006-11-22

基金项目:国家自然科学基金(20372046,30300231);科技部成果转化基金(05EFN212100059)和农业部成果转化基金

作者简介:王媛媛(1978-),女,博士研究生,主要从事线虫生物防治,E-mail:wangyy@syau.edu.cn

通讯作者:段玉玺教授,博士生导师。Email:duanyx6407@163.com

大豆胞囊线虫病 (soybean cyst nematode, SCN), 是制约大豆生产的重要病害。该病害一般使大豆减产 10% ~ 30%, 严重地块可达 70% ~ 90%, 甚至造成绝产, 比任何一种单一病害所造成的危害都大^[1]。此病害在我国东北三省、内蒙古和黄淮海大豆主产区发生严重, 是一种极难防治的土传病害^[2]。从世界范围来看, SCN 的危害和蔓延有日益加重的趋势^[3]。对于大豆胞囊线虫的防治, 以轮作和化学药剂为主, 但化学杀线虫剂对环境污染严重, 对人畜也不安全, 很多高毒的化学杀线虫剂已被禁用。因缺少安全、有效的杀线虫剂, 大豆胞囊线虫的生物防治越来越受到人们的重视。

利用内生细菌防治植物病害已成为国内外生物防治研究中的一个热点^[4]。大量研究表明, 内生细菌在生长发育和代谢过程中产生多种具有拮抗性、竞争性的次级代谢产物或酶类物质^[5-8], 通过直接或间接作用, 抑制或杀死病原菌。同时由于内生细菌与植物之间建立了一种和谐的关系^[9], 接种后易于在植物体上定殖, 生防效果比较稳定。

作者在大豆根瘤内分离获得一株内生芽孢杆菌 Snb2。经测定表明, 该菌株不仅对大豆胞囊线虫具有一定生防活性, 而且对大豆根腐病菌也有较强的拮抗效果, 同时还能促进大豆幼苗期生长, 是一株具有良好应用前景的菌株。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆: 辽豆 10, 本研究室保存。

大豆胞囊线虫胞囊: 分离自沈阳农业大学线虫学研究室试验田土样, 用淘洗过筛法^[10]收集大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines*) 3 号生理小种胞囊。

大豆胞囊线虫二龄幼虫 (J2): 将大豆胞囊线虫 3 号生理小种胞囊在 0.5% NaClO 中消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次, 放在含有少量无菌水的培养皿里, 在 25 °C 的恒温箱中培养, 5 d 后收集孵化出的 J2。

大豆根腐病病原菌: 尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、腐霉菌 (*Pythium* sp.), 均由本研究室分离、保存。

1.2 试验方法

1.2.1 内生细菌 Snb2 的分离、纯化与形态观察

取大豆上的饱满根瘤, 用蒸馏水洗去表面浮土, 在

95% 酒精中浸泡 5 min, 再置于 0.1% HgCl₂ 中处理 3 ~ 5 min, 具体处理时间视根瘤大小的不同有变化, 用无菌水清洗 3 次, 用无菌滤纸吸干表面水分^[10], 用无菌解剖刀在无菌滤纸上切开, 取一半放在 NA 培养基上, 2 ~ 3 d 后, 从根瘤周围取少量菌体在培养基上接种, 28 °C 培养 48 h, 取单个菌落在 NA 培养基上划线培养, 直至得到纯培养, 用 15% 的甘油 - 牛肉蛋白胨培养液于 4 °C 冰箱中保存。参照《常用细菌系统鉴定手册》^[12]进行革兰氏染色、鞭毛染色、芽孢染色等。

1.2.2 Snb2 悬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, 用 1.1 描述的消毒方法消毒后, 放入由夹滤纸的双层套管制成的孵化池中^[13]。孵化池放在无菌的培养皿中, 培养皿内盛细菌悬液 (1.0×10^8 cfu/mL) 与无菌水 (1: 9), 设无菌水处理为对照, 3 次重复, 28 °C 下孵化。7 d 后镜检计算孵化出的 J2 数量。

1.2.3 菌悬液对 J2 的毒性作用 刮取在 NA 平板上培养的细菌制成浓度为 1.0×10^8 cfu/mL 的悬浮液。在含有 1 mL 菌悬液的小皿中放入 0.1 mL (约含 40 条 J2) 无菌水, 置于 28 °C 恒温箱中, 分别在 48、96 h 观察线虫的死亡情况, 以身体僵直, 触而不动者为死虫态, 计算线虫的死亡率。以无菌水作为对照, 3 次重复。

1.2.4 细菌对大豆根腐病病原菌的拮抗活性测定

采用对峙培养方法, 即将各种病原菌先活化 7 d, 用直径为 5 mm 的打孔器在菌落边缘处制成菌碟, 将菌碟转移至 PDA 平板中央, 在距菌碟 25 mm、靠近平板边缘处划线接种细菌, 放置在 25 °C 恒温箱中培养 4 ~ 5 d, 观察病原菌生长的变化、病菌菌落的半径、抑菌带的宽度及抑菌带宽度保持的时间。

1.2.5 细菌悬浮液对大豆萌发及发芽初期生长的影响

辽豆 10 种子用 75% 酒精表面消毒 5 min, 用无菌水冲洗 3 次, 在浓度为 1.0×10^8 cfu/mL 的菌悬液浸泡 15 min 后播种在灭过菌的细砂中。以无菌水浸泡处理为对照, 于 25 °C 温箱中催芽。3 d 后计数种子萌发数量, 10 天后观察生长情况, 测量子叶节到根尖的距离。

1.2.6 浸种盆栽试验防治胞囊线虫

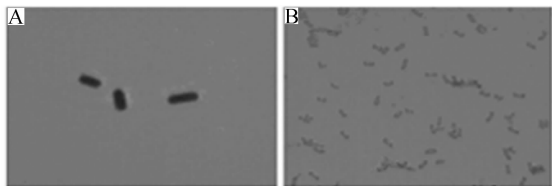
辽豆 10 大豆种子用 1.5% NaClO 溶液中消毒 3 min, 无菌水清洗残留 NaClO 3 次。在浓度为 1.0×10^8 cfu/mL 的菌悬液浸泡 15 min 后自然凉干, 播种于营养钵中, 每钵约含 30 个胞囊, 每钵 5 粒, 6 次重复, 以无

菌水浸泡为对照,大豆出苗后常规管理,不施用任何肥料和其它农药。出苗期检查出苗率和生长情况,在 30~35 d 期间,每天监测对照中白色雌虫发育情况,到达最适宜时期,将苗从营养钵中扣出,检测根系胞囊数量。

2 结果与分析

2.1 Snb2 菌株的培养性状及初步鉴定

分离纯化后获得的细菌菌株在 NA 上生长良好,菌落大,初期白色,后期灰白色,边缘不规则形,粘稠,中间凹陷,不产色素。在 28 °C 下培养 4 d 菌落直径达 4~5 mm。菌体杆状,大小为 0.35~0.9 μm × 1.2~2.3 μm ,革兰氏染色反应为阳性,周生多鞭毛,芽孢椭圆形,间生,偶有端生,孢囊不膨大。根据以上性状分析,初步鉴定该菌为芽孢杆菌(*Bacillus* sp.) (图 1)。



注:A. 革兰氏染色 B. 芽孢染色
Note: A. Gram stain B. Spore stain

图 1 Snb2 菌株的鉴定

Fig. 1 Gram stain and Spore stain of Snb2

2.2 菌悬液对胞囊孵化的影响

7 d 后观察菌悬液对胞囊孵化的作用,发现在胞囊表面包被一层细菌菌体形成的包被膜(图 2),孵化出的 J2 数量明显少于对照中孵化出的 J2 数量。结果表明,菌株 Snb2 的菌悬液能够明显抑制大豆胞囊线虫胞囊的孵化,相对抑制率达到 94.9%。推测菌悬液抑制胞囊孵化的原因是细菌在胞囊表面形成包被膜,影响外界水分、气体、营养物质等的交换或分泌某些有毒物质,从而对大豆胞囊线虫的孵化起到一定的抑制作用。

2.3 菌悬液对 J2 的毒性作用

结果表明,Snb2 菌悬液不仅对大豆胞囊线虫胞囊孵化有明显的抑制作用,对 J2 也有毒性作用。48 h 后 J2 的校正死亡率为 17.5%。随着处理时间的延长,对线虫的毒性越加明显,96 h 的致死率达到 66.7%。

2.4 Snb2 对病原菌的拮抗作用

对峙培养结果表明,Snb2 菌株对 4 种病原菌表

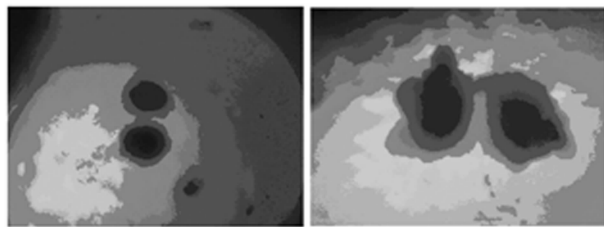
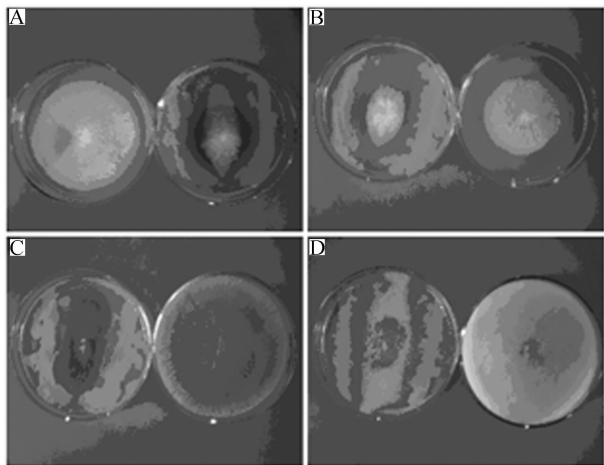


图 2 Snb2 在大豆胞囊线虫胞囊表面形成的细菌膜

Fig. 2 Bacteria membrane covered on the cyst surface of *Heterodera glycines*

现出较强的拮抗作用,抑菌圈明显(图 3)。随着培养时间的延长,与抑菌圈接触的真菌菌落边缘部位的菌丝颜色发生一定的变化,如尖孢镰刀菌变红并逐渐转为黑色。腐霉与抑菌圈接触的部分出现了溶菌现象。该菌对不同的致病菌表现不同的拮抗效果,对尖孢镰刀菌和茄腐镰刀菌的拮抗作用最为明显,抑菌圈达到 10 mm 左右。继代培养多代后,仍能保持较强的拮抗性,并且对峙培养 10 d 后拮抗作用不减退,病菌菌丝不再生长。



注:A. 对尖孢镰刀菌的作用 B. 对茄腐镰刀菌的作用

C. 对立枯丝核菌的作用 D. 对腐霉菌的作用

Note: A. antagonistic effect on *Fusarium oxysporum*

B. antagonistic effect on *Fusarium solani*

C. antagonistic effect on *Rhizoctonia solani*

D. antagonistic effect on *Pythium* sp.

图 3 Snb2 对 4 种大豆根腐病菌的拮抗作用

Fig. 3 The antagonistic effect of Snb2 to 4 pathogens of soybean root rot

2.5 对大豆的促生作用

室内砂培结果表明, Snb2 菌株处理未发现对大豆种子的萌发率有影响, 但能有效地促进大豆幼苗的生长, 处理后的大豆子叶节到根尖的距离为 9.1 ± 4.54 cm, 较对照增加了 15.19%, 并且同样的生长时间和生长条件, 经处理的大豆长出小真叶, 而对照仅表现为子叶略微张开。

2.6 浸种盆栽试验防治胞囊线虫

在盆栽试验中, 菌悬液处理对大豆种子萌发率影响不大, 出苗比较整齐。与对照相比较, 大豆苗期株高、根重等指标差异均不显著, 没有表现出促进幼苗及根系生长的作用。对胞囊有明显的抑制作用, 对照根部平均胞囊量为 36 个, 最多达 57 个, 而经过菌悬液浸种处理的大豆根部平均胞囊量为 13.5 个, 防治效果达到 62.5%。

3 讨论

大豆胞囊线虫是一类重要的植物根内寄生线虫, 除胞囊和卵的发育时期外, 其他龄期虫态均在植物体内危害^[14]。植物内生细菌存在于植物体内, 拥有其他微生物不具备的优点, 即占据有利的生态位、能经受住植物的防御反应、与病原微生物直接作用及促生作用等^[15]。因此, 从内生细菌中筛选对大豆胞囊线虫有抑制作用的菌株具有重要的研究价值和广阔的开发应用前景。本研究中的 Snb2 是从大豆根内筛选获得的一株内生芽孢杆菌, 对大豆胞囊线虫及大豆根部病原真菌有一定的生防潜力。

室内测定发现, 菌株 Snb2 能明显地抑制大豆胞囊线虫胞囊的孵化, 能在胞囊表面形成一层细菌包被膜, 很可能是导致孵化率较低的原因之一, 阻止胞囊内的卵与外界环境的各种物质交换或产生具有毒性的次生代谢物, 通过胞囊表皮渗入到胞囊内部, 对其卵的结构和发育有破坏作用, 但其确切作用方式有待于进一步研究证明; 对 J2 的毒性作用在 96 h 较为明显, 线虫的致死率为 66.7%。同时对大豆根腐病部优势病原菌镰刀菌表现较强的抑制作用, 抑菌圈达 10 mm, 且持续时间长。

有报道认为, 生防细菌可以通过多种作用方式作用于线虫, 其中通过产生特殊的酶或代谢物从而干扰线虫的生活史, 例如影响线虫卵的孵化等^[16], 这与本研究的推测有相似之处。Hallmann 等^[17]研究发现, 在观察棉花内生细菌与线虫的相互作用过

程中, 一种内生细菌在线虫侵染部位的种群数量明显增加。大量研究表明, 许多芽孢杆菌在活体或离体条件下对多种病原微生物具有拮抗作用。研究结果还认为, 芽孢杆菌产生的抗菌物质主要为多肽或蛋白类物质^[4, 18]。Bai Yuming 等^[11]从大豆根瘤中分离出三株对大豆生长有明显促进作用的芽孢杆菌。内生细菌与根际细菌促生的机制基本相似, 如抑制病原物的生长、产生激素类物质、提高吸收利用矿物质能力等^[15]。

Snb2 是一株大豆根瘤内生芽孢杆菌。内生性使之具备与大豆和谐共处、与病原微生物直接接触的优势; 而芽孢杆菌以其独特的芽孢结构, 使其易于产业化、延长货架期和田间施用等^[19]。本研究为对 Snb2 的初期研究, 对于 Snb2 抑制胞囊线虫、病原真菌和促生作用的机制、在植物体内的定殖、分布及活性物质的纯化、组成结构等还有待于深入研究。

参 考 文 献

- [1] Wrather J A, Stienstra W, Koenning S R. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1998 [J]. *Canadian Journal Plant Pathology*, 2001, 23(2): 122 - 131.
- [2] 段玉玺, 吴刚. 植物线虫病防治 [M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2002, 1 - 177.
- [3] 陈立杰, 段玉玺, 范圣长, 等. 大豆胞囊线虫的生物防治研究进展 [J]. *西北农林科技大学学报*, 2005, 33(增刊): 190 - 194.
- [4] 王光华, 周克琴, 张秋英, 等. 拮抗细菌 BRF-1 对几种植物病原真菌的抗生效果 [J]. *中国生物防治*, 2003, 19(2): 73 - 77.
- [5] 陈双雅, 张永祥, 蔡向群. 三株拮抗细菌对水仙叶大褐斑病的拮抗机理 [J]. *中国生物防治*, 2003, 19(1): 11 - 15.
- [6] 傅正擎, 夏正俊, 吴嵩民, 等. 内生菌对棉花黄萎病菌及毒素的抑制作用和对棉花的促生作用 [J]. *植物病理学报*, 1999, 29(4): 374 - 375.
- [7] Chakraborty U, Purkayastha R P. Role of rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1984, 30(3): 285 - 289.
- [8] Velazhahan R, Samiyappan R, Vidhyasekaran P. Relationship between antagonistic activities of *Pseudomonas fluorescens* isolates against *Rhizoctonia solani* and their production of lytic enzymes [J]. *Plant Disease and Protection*, 1999, 106(3): 244 - 250.
- [9] 孔庆科, 丁爱云. 内生细菌作为生防因子的研究进展 [J]. *山东农业大学学报*, 2001, 32(2): 256 - 260.
- [10] 刘维志, 刘晔, 段玉玺, 等. 植物线虫学研究技术 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1995, 32 - 49.
- [11] Bai Yuming, D' Aoust F, Smith D L, et al. Isolation of plant-

- growth-promoting *Bacillus* strains from soybean root nodules [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48 (3): 230 - 238.
- [12] 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: 43 - 65, 353 - 357.
- [13] 李进荣, 段玉玺, 陈立杰, 等. 大豆根瘤内生细菌对大豆胞囊线虫影响研究 [J]. *大豆科学*, 2005, 24 (2): 154 - 156.
- [14] 刘维志, 段玉玺, 陈立杰, 等. 植物病原线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 281 - 294.
- [15] 何红, 邱思鑫, 胡方平, 等. 植物内生细菌生物作用研究进展 [J]. *微生物学杂志*, 2004, 24 (3): 40 - 45.
- [16] Tian Hong lin, Riggs R D. Effects of rhizobacteria on soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* [J]. *Journal of Nematology*, 2000, 32 (4): 377 - 388.
- [17] Hallmann J, Quadt Hallmann A, Rodriguez Kabana R, et al. Interactions between meloidogyne incognita and endophytic bacteria in cotton and cucumber [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30 (7): 925 - 937.
- [18] 林东, 徐庆, 刘忆舟, 等. 枯草芽孢杆菌 S0113 分泌蛋白的抑菌作用及抗菌蛋白的分离纯化 [J]. *农业生物技术学报*, 2001, 9 (1): 77 - 80.
- [19] Liu Z L, Sinclair J B. Colonization of soybean roots by *Bacillus megaterium* B153 - 2 - 2 [J]. *Soil Biology & Biochemistry*, 1993, 25 (7): 849 - 855.

《北方园艺》征订启事

《北方园艺》期刊是以科学研究与技术普及相结合的大型综合性农业技术期刊,是全国自然科学(中文)核心期刊、中国农业核心期刊、全国优秀农业期刊和黑龙江省优秀科技期刊。本刊坚持以汇集园艺科技最新技术成果为责任、荟萃园艺科技最好的新篇佳作作为义务、传播园艺科技最快的致富信息为宗旨,以知识性、先进性、实用性为办刊特色。本刊内容丰富、栏目新颖、技术实用、信息全面。主要栏目:试验研究、专题综述、设施园艺、栽培技术(菜园、果园、瓜园)、园林花卉、贮藏研究、植物保护、生物技术、食用菌族、经验之谈、农资信息等。信息涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉、植保等研究的新技术、新品种、新经验。

2007年1月起本刊改为月刊,每月15日出版,大16开本,160页内文,平订,彩四封及内插彩页印刷,每期6.00元,全年72.00元。全国各地邮局均可订阅,邮发代号14-150,或直接向编辑部汇款订阅,竭诚欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生,各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅,订阅者请在汇款单附言栏内写清定购份数,收件人姓名及详细地址、邮编。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路368号,黑龙江省农业科学院《北方园艺》编辑部
 邮编:150086 电话:0451-86674276 E-mail:bfybjb@163.com