

# 大豆根际细菌<sup>\*</sup>

## II 拮抗大豆孢囊线虫研究

郭荣君 刘杏忠 杨怀文

(中国农科院生物防治研究所 北京 100081)

### 摘 要

对 11 株根际细菌进行自然病土温室防治大豆孢囊线虫筛选试验,得到防效较高菌株 4 株,防效为: JN JQ<sub>1</sub>- P(1), 71. 8% ( $p=0.01$ ); JN JQ<sub>1</sub>- A<sub>5-1</sub>, 69. 3% ( $p=0.01$ ); SY- NS, 65. 85% ( $p=0.05$ ); Q SG- LD- 6, 57. 5% ( $p=0.05$ ),前 3 株菌的除菌发酵液对大豆孢囊线虫二龄幼虫致死率在 99. 6% 以上。

**关键词** 根际细菌;拮抗;大豆孢囊线虫病

大豆孢囊线虫 (Soybean cyst nematode) (简称 SCN) 病分布广、危害重,是防治困难的世界性病害。在我国东北和黄淮海大豆主产区,大豆孢囊线虫病危害严重,仅黑、吉、辽、晋、豫、皖六省 SCN 受害面积就达 150 万公顷,减产 10~ 20%,重者达 30~ 50%,甚至绝产<sup>[10-12]</sup>。随着大豆种植面积的增加,重迎茬面积也增加,使得孢囊线虫病进一步加重。

生产上对大豆孢囊线虫病的防治,一般是通过轮作,改进栽培措施,使用抗性品种和杀线剂等方法。这些措施都有较好的效果,但有其局限性。

国内外对用食线虫真菌和寄生性细菌防治线虫的研究较多<sup>[3-5,6,10]</sup>,防治 SCN 的真菌 *Verticillium chlamydosporum*, *Paecilomyces lilacinus* 已经在温室和田间小区实验<sup>[4,9]</sup>,但真菌在剂型、大量生产等方面尚未取得突破。用寄生性细菌,如 *Pasteuria penetrans* 防治线虫研究较多,但因其为专性寄生物,难于人工培养,不利于田间应用。

根际细菌能防治病原细菌和真菌,促进植物生长,这使人们受到启发,对用根际细菌防治植物寄生线虫进行了探索,成为当前研究的热点<sup>[7]</sup>。

本研究尝试用根际细菌来防治大豆孢囊线虫病,为大豆孢囊线虫病生物防治寻找新途径。

## 材料和方法

### 1 材料

#### 1.1 大豆

垦农 4 号,黑龙江省农垦科学院作物所提供

\* 收稿日期 1997- 05- 20 This paper was received on May 20, 1997.

1.2 大豆孢囊线虫病土 采自昌平基地

1.3 根际细菌 拮抗大豆根腐病的部分菌株

## 2 方法

### 2.1 抗大豆孢囊线虫病菌株筛选<sup>[1]</sup>

2.1.1 种子细菌化: 大豆种子用 1% NaClO 消毒 3 分钟, 无菌水漂洗 4 次, 晾干后, 用浓度为  $10^7$  cfu/ml 的根际细菌悬液进行种子处理 30 分钟

2.1.2 温室实验: 将细菌化的种子种于孢囊密度为 51 孢囊 /100g 土的自然病土中, 每塑料钵中 (13cm×13cm) 种 10 粒种子, 每处理 3 盆 24℃ 温室中培养 35 天后, 计孢囊数。

### 2.2 根际细菌对大豆孢囊线虫二龄幼虫作用

#### 2.2.1 二龄幼虫的准备

收集大豆根部孢囊, NaClO 表面消毒 2 分钟, 无菌水漂洗 5-6 次, 25℃ 孵化, 5-6 天后收集二龄幼虫

#### 2.2.2 检测根际细菌的作用:

取 0.2ml 大豆孢囊线虫二龄幼虫 (约 2000 条 /ml), 加到 2.8ml 菌液中。24 小时后, 观察线虫死亡率。

2.3 鉴定 依据《一般细菌常用鉴定方法》<sup>[11]</sup> 和《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)<sup>[12]</sup> 进行鉴定, 将根际细菌鉴定到属

## 结果与分析

### 1 拮抗大豆孢囊线虫病根际细菌筛选

选取对根腐病拮抗有效菌株 JN Jb- A1, JN SY- A1, JN SY- A, JN JQ1- A5, Bb- OD, QSG- LD- 6 及几丁质培养基上分离到菌株 SY- NS DZ- JZ- F1 和 KMB 培养基上分离到菌株 MCD- P(3), JN JQ1- P(1) 在温室直接进行防病筛选实验。

对防病试验结果 (表 1) 进行方差分析 (表 2), 由防治百分率和多重比较可以看出: JN JQ1- P(1), JN JQ1- A5, SY- NS QSG- LD- 6 与 CK 差异显著 ( $P=0.05$ ), JN JQ1- P(1) 和 JN JQ1- A5 与 CK 差异极显著 ( $P=0.01$ )。CK 与 JN SY- A1+ MC 之间也有差异, 但为负差异。即: JN JQ1- P(1) 防治效果最好, 为 71.8%。JN JQ1- A5 和 SY- NS 的防效次之, 分别为 69.3% 和 65.8%。在检查孢囊数时还发现 JN JQ1- A5 处理的大豆根瘤较多, 须根也比较丰富。表明它对大豆生长有一定的促进作用。

### 2 有效菌株对 SCN 二龄幼虫作用

有效菌株 SY- NS, JN JQ1- A5 和 JN JQ1- P(1) 发酵液对 SCN 二龄幼虫作用结果 (表 3) 表明: 三株菌的发酵液均可杀死 SCN 二龄幼虫, 致死率达到 93.3% 以上, 且观察到菌株 SY- NS 的发酵液使线虫崩解。三个菌株的菌液稀释 10 倍后, 对 SCN 二龄幼虫的致死率却并不成比例减小, JN JQ1- A5 和 JN JQ1- P(1) 的发酵液对 SCN 二龄虫致死率降低约 10%, 菌株 SY- NS 的 10 倍稀释液对 SCN 二龄幼虫的致死率却明显降低。

表 1 根际细菌拮抗大豆孢囊线虫病结果

Table 1 The biocontrol efficacy of rhizobacteria to soybean cyst nematode disease

处理	菌株编号	单株孢囊 (个)	防效 (%)	备注	处理	菌株编号	单株孢囊 (个)	防效 (%)	备注
1	CK	34.8	—		7	MCD- P(3)	22.2	36.2	
2	JN JJ <sub>3</sub> - A <sub>11</sub>	26.2	24.7	须根少	8	JN SY- A <sub>12</sub>	22.6	35.1	
3	JN SY- A <sub>12</sub> - MC	38.6	— 10.6	根瘤较多,须根多	9	Q SG- LD- 6	14.8a	57.5	
4	JNSY- A <sub>1</sub>	21.7	37.6		10	BH <sub>3</sub> - OD <sub>1</sub>	20.8	14.2	
5	DZ- JZ- F <sub>1</sub>	17.8	48.8		11	SY- NS	11.9a	65.8	
6	JN JQ- A <sub>5- 1</sub>	10.7A	69.3	根瘤较多,须根较丰富	12	JN JQ <sub>1</sub> - P(1)	9.8A	71.8	

注: Scheffe法,后面带有不同字母者为差异显著 A为 0.01水平, a为 0.05水平。

表 2 根际细菌对大豆孢囊线虫拮抗结果方差分析

Table 2 Analysis of variance of the antagonistic action of rhizobacteria to SCN

变异来源	自由度	平方和	均方	F值	变异来源	自由度	平方和	均方	F值
组间	11	2748.54	249.87	10.61	组内	24	565.51	23.56	

注: F<sub>0.05</sub>(10, 24)= 2.25, F<sub>0.05</sub>(12, 24)= 2.18; F<sub>0.01</sub>(10, 24)= 3.17, F<sub>0.01</sub>(12, 24)= 3.03

表 3 根际细菌发酵液对 SCN二龄幼虫作用

Table 3 Effect of fermentation solution of rhizobacteria to the second stage juveniles of SCN

菌株编号	死亡率%		校正死亡率%		菌株编号	死亡率%		校正死亡率%	
	原液	10倍稀释液	原液	10倍稀释液		原液	10倍稀释液	原液	10倍稀释液
SY- NS	100	65.9	93.7	59.6	JN JQ <sub>1</sub> - P(1)	99.6	89.3	93.3	83.0
JN JQ <sub>1</sub> - A <sub>5- 1</sub>	100	86.7	93.7	80.4	CK	6.3	6.3	0	0

表 4 有效根际细菌鉴定结果

Table 4 The identification of effective rhizobacteria

	菌株编号		
	JN JQ <sub>1</sub> - P(1)	JN JQ <sub>1</sub> - A <sub>5- 1</sub>	SY- NS
形状	极短,杆状	杆状	极短,近于卵圆,产红色色素
大小	0.2× 0.15- 0.7× 0.2	1.4× 0.3- 3.2× 0.4	0.5× 0.4- 1.5× 0.7
G染色	—	+	—
鞭毛染色	端生	周生	周生
芽胞染色	无	中间生	无
接触酶反应	+	—	+
氧化酶反应	+	—	—
葡萄糖氧化反应	+	—	+
化反应	—	—	+
乙醇氧化反应	+	+	+
结瘤试验	— *	— *	— *
鉴定结果	<i>Cluonobacter</i> sp.	<i>Sporolactobacillus</i> sp.	<i>Serratia</i> sp.

注: + : 阳性反应 positive reaction - : 阴性反应 negative reaction - \* : 不结瘤 no root nodule

### 3 有效根际细菌的鉴定

对菌株 JN JQ<sub>1</sub>- A<sub>5-1</sub>、JN JQ<sub>1</sub>- P(1)、SY- NS进行了鉴定,鉴定实验同对根腐病有效菌株鉴定内容<sup>[8]</sup>。鉴定结果(表 4)如下:

JN JQ<sub>1</sub>- A<sub>5-1</sub>: 杆状,革兰氏染色阳性,芽胞中间生,鞭毛周生,接触酶反应阴性,为芽胞乳酸杆菌属 (*Sporolactobacillus sp.* )

JN JQ<sub>1</sub>- P(1): 细胞极短杆状,革兰氏染色阴性,在大豆根部不能形成根瘤,能氧化葡萄糖和乙醇,具鞭毛,鞭毛极生,氧化酶阳性,在 pH4.5 生长良好,为葡萄糖细菌属 (*Gluconobacter sp.* )

SY- NS 极短杆状,产生红色素,革兰氏染色阴性,发酵葡萄糖,周生鞭毛,为沙雷氏菌属 (*Serratia sp.* )

## 讨 论

在所检测的 11 株细菌中,有三株细菌防效与对照 有极显著差异。SY- NS 为 *Serratia sp.*,文献报导,该属某些细菌可以产生几丁质酶,而对真菌细胞壁具分解作用。SY- NS 的发酵液经 10 倍稀释后对 SCN 二龄幼虫作用大幅度减小,而 JN JQ<sub>1</sub>- A<sub>1-5</sub>、JN JQ<sub>1</sub>- P(1)的发酵液稀释液对 SCN 二龄幼虫的作用只减少 10% 左右。推测在它的生防机制中,产生几丁质酶可能是其中一个作用方式。而 JN JQ<sub>1</sub>- A<sub>5-1</sub>、JN JQ<sub>1</sub>- P(1)则可能产生抗生素,对 SCN 二龄幼虫起毒害作用。用 JN JQ<sub>1</sub>- A<sub>5-1</sub>处理后,根瘤较多,须根较丰富,这不同于其它菌株处理,可能是该菌株与根瘤菌之间没有相互拮抗。对病原真菌有拮抗作用的菌株 QSG- LD- 6 对线虫具有 57.5% 的防效,是否可将其用于同时防治根腐病和线虫病还有待于进一步的研究。

根际细菌防治线虫可能还存在着其它机理,Sikora 等人认为根际细菌通过消耗和改变根分泌物而影响线虫向根的移动,与根的相互识别,在根内的发育等。我们发现具有拮抗作用的几个菌株在液体培养时繁殖速度很快,它们在根部的定殖,是否占据了根的线虫侵染点,及消耗了营养等需要进一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] Oostendorp, M. & Sikora, R. A., *Revue Nematol.*, 1989, 12(1): 77- 83
- [2] 布坎南, R. E. 和吉本斯, N. E. 等, 1984, 伯杰细菌鉴定手册 (第八版), P729, 科学出版社
- [3] 林茂松, 1990, 中国油料, 3 63
- [4] 林茂松, 1990, 生物防治通报, 6(1): 38- 41
- [5] 刘杏忠等, 1991, 北京农业大学学报, 17(3): 87- 91
- [6] 刘杏忠等, 1992, 真菌学报, 5 117- 126
- [7] 郭荣君等, 1996, 中国生物防治, 12(3): 134- 137
- [8] 郭荣君等, 1998, 大豆科学, 17(1): 53- 58
- [9] 张新德等, 1993, 生物防治通报, 9(2): 49- 53
- [10] 张磊, 1993 大豆通报, 2(3): 37- 41

- [11] 中国科学院微生物所细菌分类组编著, 1978, 一般细菌常用鉴定方法, 科学出版社
- [12] 朱洪德、张广骅, 1993, 中国农学通报, 9(4): 16- 20

## STUDIES ON CONTROL OF SOYBEAN CYST NEMATODE DISEASE BY RHIZOBACTERIA

Cuo Rongjun   Liu Xingzhong   Yang Huaiwen

(*Institute of Biological Control, CAAS, Beijing, China, 100081*)

### Abstract

Some rhizobacteria were chosen to test their ability to suppress soybean cyst nematode in natural soil which had been infested by SCN for several years (50 cysts/100g dry soil) in the greenhouse. Four of them, namely JN JQ<sub>1</sub>- P(1), JN JQ<sub>1</sub>- A<sub>5-1</sub>, SY- NS and QSG- LD- 6, showed promising control efficacy, the number of SCN on soybean roots was reduced over 71. 8% (p= 0. 01), 69. 3% (p= 0. 01), 65. 8% (p= 0. 05) and 57. 5% (p= 0. 05) by those 4 isolates. The second stage juveniles of SCN were killed when treated with fermentation solution of four bacteria above 93. 3% .

**Key words** Rhizobacteria; Antagonism; Soybean cyst nematode disease