

# 6株生防细菌对大豆根腐病防治效果初步评价<sup>\*</sup>

温广月<sup>1, 2</sup> 许艳丽<sup>1 \* \*</sup> 李春杰<sup>1</sup> 陈冬<sup>1</sup>

(1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

**摘要** 从大豆根际分离出的1500多株细菌中筛选出6株生防细菌, 其在离体的条件下对大豆根腐病原菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)有很好的抑制作用, 其中菌株18BRR2-2、18BRR9-1和3BRR16-2在离体的条件下也对茄腐镰刀菌(*F. solani*)、半裸镰刀菌(*F. semitectum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)有抑制作用, 并且这6株生防细菌的发酵液可以抑制尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)的生长。通过温室盆栽和大田试验表明, 这些生防菌对大豆根腐病有很好的防治效果, 其中菌株18BRR2-2盆栽和大田的防效均最高, 分别达到了45.9%和65.00%。而且这些生防菌也表现出对大豆明显的促生作用。认为18BRR2-2号菌株有开发为防治大豆根腐病生防制剂的潜力。

**关键词** 大豆根腐病; 生防细菌; 拮抗; 防效

**中图分类号** S 476<sup>+</sup>. 19 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)02-0121-05

大豆根腐病是世界各大豆产区的重要病害之一, 一般能减产10%左右<sup>[1]</sup>。目前生产上对大豆根腐病的防治主要依赖于化学农药。近年来, 化学农药的残毒和对环境的污染问题越来越引起人们的关注, 所以土传病害的生物防治已经逐渐引起人们的重视<sup>[2]</sup>, 而细菌由于其自身的优势, 在生物防治中表现出很好的发展前景<sup>[3, 4]</sup>。因此, 生防细菌的研究和开发有着重要的现实意义。本文报道了6株生防细菌对大豆根腐病菌的作用效果的初步评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

生防细菌: 18BRR2-2、18PSE2-1、3BRR13-1、18BRR9-1、3BRR16-2和XP均分离自中国科学院海伦农业生态实验站长期定位区不同轮作体系下的大豆根际土壤, 目前都未鉴定。

大豆根腐病菌: 尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)、茄腐镰刀菌(*F. solani*)、半裸镰刀菌(*F. semitectum*)和立枯丝核菌(*R. solani*)由本实验室

保存。

大豆供试品种: 合丰25

供试培养基: PDA、NA、NB<sup>[5]</sup>

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 生防细菌平板拮抗作用

生防细菌在NA培养基上28℃活化48h后, 点接入PDA平板互相垂直的四个方向, 接入点与培养皿中心相距2.5cm, 然后PDA平板的中央同时接入尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)。随后按上述方法进行对茄腐镰刀菌(*F. solani*)、半裸镰刀菌(*F. semitectum*)和立枯丝核菌(*R. solani*)的拮抗性测定, 5天后测量抑菌圈直径。

#### 1.2.2 不同菌株发酵液抑菌活性的比较

生防细菌菌株在28℃震荡培养48h后, 经4℃10000 rpm离心15 min。取上清液经0.2μm的细菌滤膜过滤除菌, 然后取1 mL滤液加入灭菌的培养皿中, 倒入20 mL 40-50℃的PDA培养基, 待培养基冷却后在平板中央接入5 mm的尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)菌碟, 以无菌水处理为对照, 每个

\* 收稿日期: 2004-12-07

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA507A05-02); 中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-19-4-03); 黑龙江省重点项目(GB02B201)

作者简介: 温广月(1981-), 男, 在读硕士, 研究方向植物病害生物防治, E-mail: wgy1227@163.com

\* \* 通讯作者: E-mail: xuyi@yahoo.com

致谢: 感谢中国科学院东北地理与农业生态研究所提供资金支持。

处理 5 次重复, 28℃培养 5d 后测定镰刀菌菌落直径, 计算抑菌率。

1.2.3 盆栽防效试验

1.2.3.1 生防细菌的培养

生防细菌在 NB 培养基中, 28℃培养 48 h, 备用。

1.2.3.2 尖孢镰刀菌培养

取高粱 100g 放入 250mL 的三角瓶中, 用水浸泡 12h, 然后除去水分, 高压灭菌。每瓶中接入直径为 5mm 的尖孢镰刀菌( *F. oxysporum* )菌块 5 块, 28℃培养 7–10 d, 粉碎备用。

1.2.3.3 盆栽防效试验

每盆(直径 10cm×高 8cm)中放入粉碎后的 10 g 高粱粒培养的尖孢镰刀菌, 同时混入 250g 灭菌土, 充分混匀, 备用。

把经表面消毒后的大豆播于盆中, 每盆保苗 6 株, 每个处理 5 盆, 共计 30 株。同时, 浇入细菌粗制剂 25 mL, 使细菌浓度为 108CFU · g<sup>-1</sup> 干土。

以每盆浇入 500 倍液的多菌灵 100 mL 和 0.3% 多菌灵拌种为两个对照。以无菌水处理为空白对照。一个月后调查病情指数<sup>[5]</sup>。大豆根腐病的分级标准参照韩庆新、辛惠普的方法<sup>[6]</sup>。

1.2.4 生防细菌对大豆根际镰刀菌数量的影响

试验方法除对照外, 其他同 1.2.3, 以每盆浇入 500 倍液的多菌灵 100 mL 和无菌水处理为对照, 一个月后调查大豆根际每克干土中的镰刀菌数量。

表 1 生防细菌对大豆根腐病平板抑制作用(抑菌圈直径 mm)

Table 1 Diameter of inhibition circle in dual cultures between the plant pathogenic fungus of soybean root rot and biocontrol bacteria (mm)

菌株 Strains	尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	茄腐镰刀菌 <i>F. solani</i>	半裸镰刀菌 <i>F. semitectum</i>	立枯丝核菌 <i>R. solani</i>
18PSE2-1	19±2.49	19±1.31	—	—
XP	21±2.45	—	14±1.22	—
18BRR2-2	30±1.55	25±2.56	27±1.63	19±1.72
18BRR9-1	27±2.32	28±3.25	30±2.13	21±1.62
3BRR16-2	28±2.73	27±1.85	24±1.60	19±0.75
3BRR13-1	15±2.13	—	—	—

2.2 不同菌株发酵液抑菌活性的比较

6 株生防细菌的发酵液对尖孢镰刀菌( *F. oxysporum* )都有一定的拮抗作用。抑菌率 2.89%–23.78%, 尤其 18BRR2–2 号菌株其分泌物的抑菌率最高达到了 23.78%。其它, 18PSE2–1、3BRR13–1、18BRR9–1、3BRR16–2、XP 抑菌率

1.2.5 生防细菌对大豆的促生作用试验

把经表面消毒后的大豆种子播入装有 250g 灭菌土盆中, 每盆保苗 6 株, 每个处理 5 盆, 共计 30 株。同时, 浇入细菌制剂 25 mL, 使细菌浓度为 108CFU · g<sup>-1</sup> 干土。以无菌水处理为空白对照, 调查植株的烘干重、鲜重和株高。

1.2.6 生防细菌田间防效及促生作用

试验采用随机区组法, 小区面积 4m×3.5m, 小区之间设有田间道。每个处理 3 次重复。播种密度是 30 万株/hm<sup>2</sup>。把在 NB 培养基上 28℃培养 48 h 的 6 株生防细菌接入土壤中, 使用量是 108CFU/穴, 一个月后调查病情指数、干重、鲜重和株高。

1.2.7 数据统计与分析

本试验数据采用 SAS 6.12 版本进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 生防细菌对大豆根腐病平板抑制作用

试验结果表明(表 1), 6 株生防细菌在离体的条件下对尖孢镰刀菌有很好的抑制作用, 其抑菌圈直径达 15–30 mm, 其中菌 18BRR2–2 抑菌圈直径最大, 达到了 30mm, 菌株 3BRR13–1 抑菌圈直径最小, 但也达到了 15mm。而且菌株 18BRR2–2、18BRR9–1 和 3BRR16–2 对茄腐镰刀菌、半裸镰刀菌和立枯丝核菌也都有一定的抑制作用。

分别为 2.90%、7.18%、15.63%、20.83% 和 13.43%。

2.3 生防细菌对大豆根腐病的盆栽防治作用

6 株生防细菌可明显的减少大豆根腐病的病情指数, 经过方差分析与对照差异明显, 与多菌灵浇灌相比, 差异也达到了显著水平, 但与多菌灵拌种相比

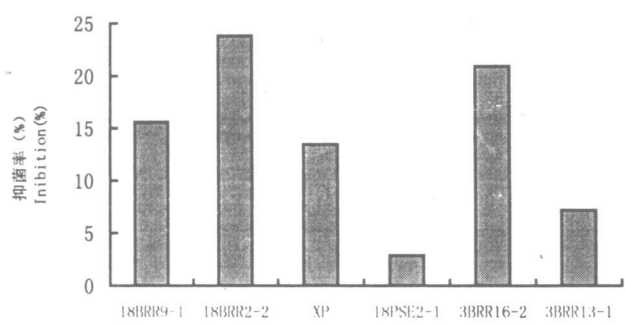


图 1 不同菌株发酵液抑菌活性的比较

Fig 1 Comparison of the inhibitional activity of secondary – metabolite secreted by different strains

差异不显著。18BRR2 – 2 防效最高达到了 45.90%，18PSE2 – 1 和 3BRR13 – 1 防效最低，但也都达到了 31.97%，与多菌灵拌种的防效差异不显著。

2.4 生防细菌对大豆根际镰刀菌数量的影响

从图 2 可以看出，6 株生防细菌可明显的减少土壤中的尖孢镰刀菌( *F. oxysporum* ) 的数量。可以减少 82.44%~91.71%的根际镰刀菌数量，与多菌灵的作用相比差异不显著，与空白对照相比差异达到了极显著水平。

表 2 生防细菌对大豆根腐病的盆栽防治作用

	18PSE 2 – 1	3BRR 13 – 1	18BRR 9 – 1	3BRR 16 – 2	XP	18BRR 2 – 2	多菌灵 拌种	多菌灵 浇灌	F
病情指数	50.63±	51.88±	48.13±	50.63±	51.88±	41.25±	49.38±	25.63±	76.25±
Disease index	12.65b	7.18b	12.14b	5.15b	7.18b	10.51bc	19.72b	4.27c	12.99a
防效(%)									
Controlling	33.61	31.97	36.89	33.61	31.97	45.90	35.25	66.39	
effect(%)									

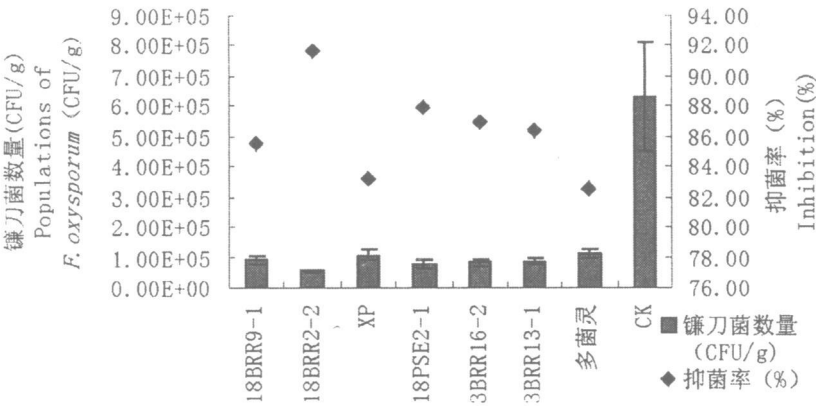


图 2 生防细菌对根际尖孢镰刀菌( *F. oxysporum* ) 数量的影响

Fig. 2 Effect of biocontrol bacterial on soybean rhizosphere populations of *F. oxysporum*

表 3 盆栽促生作用试验结果

菌株 Strains	株高( cm) Hight of seedling ( cm /plant)	增高( %) Increasing ( %)	干重 /株( g /株) Dry weight of seedling ( g /plant)	增干重( %) Increasing ( %)	鲜重 /株( g /株) Fresh weight of seedling( g /plant)	增鲜重( %) Increasing ( %)
18BRR2 – 2	16.14±1.95a	21.53	0.62±0.04a	40.91	3.95±1.21ab	35.27
3BRR13 – 1	14.39±2.17b	8.36	0.46±0.06b	4.55	3.04±0.93bc	4.11
3BRR16 – 2	14.36±1.62b	8.13	0.45±0.10b	2.27	3.05±1.02bc	4.45
18BRR9 – 1	14.01±1.33b	6.78	0.63±0.17a	43.18	4.33±2.13a	48.29
XP	13.43±1.64b	1.13	0.49±0.17b	11.36	3.30±1.66bc	13.01
18PSE2 – 1	13.36±2.41b	0.60	0.47±0.06b	6.82	3.54±1.44abc	21.23
ck	13.28±2.60b	–	0.44±0.04b	–	2.92±1.43c	–

2.5 生防细菌对大豆幼苗的促生作用

试验结果表明(表 3), 菌株 18BRR2-2 可以增大大豆株高 21.53%, 与对照相比差异显著; 其他菌株与对照相比差异不显著, 但都有一定的促长作用; 菌株 18BRR2-2 与 18BRR9-1 的干重与对照相比差异达到了显著水平, 分别增重 40.91%和43.18%, 其他菌株与对照相比差异不显著; 所有菌株的鲜重与对照相比差异都达到了显著水平, 其中 18BRR2-2 和 18BRR9-1 增鲜重最多, 分别为 35.27%和 48.29%。从上面的分析可以看出, 18BRR2-2 菌株促生作用明显。

2.6 田间防效试验

试验结果表明(表 4), 在田间的条件下, 这 6 株菌株都可减少大豆根腐病的发病程度, 防效 20% - 65%, 尤其 18BRR2-2 防效达到了 65%; 6 株生防细菌对株高影响较小, 但 18PSE2-1 与对照相比差异显著, 可促进株高 9%, 3BRR16-2 却明显抑制了大豆的株高; 除 3BRR16-2 外, 其它 5 株生防细菌可明显的促进大豆幼苗的干重和鲜重, 分别增重 24% - 31%和 22% - 35%。但菌株 3BRR13-1 和 3BRR16-2 对大豆的出苗率有明显影响。

表 4 田间防效及促生作用结果

Table 4 Efficacy of various bacterial biocontrol organisms for control of soybean root rot and promotion growth in field								
菌株 Strains	出苗率(%) Seeding emergence rate (%)	防效(%) Controlling effect (%)	株高(cm) Height of seedling (cm/plant)	增高(%) Increasing (%)	干重(g/株) Dry weight of seedling(g/plant)	增干重(%) Increasing (%)	鲜重(g/株) Fresh weight of seedling (g/plant)	增鲜重(%) Increasing (%)
18PSE2-1	92.00±2ab	40.00	10.55±1.17a	9	0.55±0.07a	31	3.78±0.55a	35
3BRR16-2	86.67±3.05c	60.00	8.86±1.16d	-9	0.44±0.03bc	5	2.97±0.49c	6
XP	89.33±1.15bc	61.30	9.97±0.83b	3	0.58±0.02a	38	3.64±0.48ab	30
3BRR13-1	87.33±4.16c	20.00	9.18±1.21cd	-6	0.54±0.03ab	29	3.51±0.96ab	26
18BRR9-1	95.33±1.15a	53.75	9.02±0.65cd	-7	0.52±0.08ab	24	3.53±0.63ab	27
18BRR2-2	93.33±1.15ab	65.00	9.48±0.91b	-2	0.53±0.08ab	26	3.41±0.55b	22
CK	93.33±1.15ab	-	9.72±0.75b	-	0.42±0.09c	-	2.79±0.53c	-

3 结论

- 3.1 6 株生防细菌在离体的条件下对尖孢镰刀菌 (F. oxysporum) 有一定的抑制作用。
- 3.2 6 株生防细菌在盆栽的条件下对尖孢镰刀菌 (F. oxysporum) 引起的大豆根腐病有很好的防效, 并且可以明显的减少根际土壤中的尖孢镰刀菌 (F. oxysporum) 的数量。
- 3.3 6 株生防细菌在盆栽和田间的条件下可以不同程度的促进大豆幼苗的鲜重和干重。

4 讨论

6 株生防细菌, 在离体的情况下, 可不同程度的抑制多种大豆根腐病病原菌, 培养滤液也对尖孢镰刀菌 (F. oxysporum) 有一定的抑制作用, 其中菌株 18BRR2-2 表现尤为突出。在盆栽条件下这 6 株生防细菌可以明显地减少根际尖孢镰刀菌 (F. oxysporum) 的数量, 这可能是由于其产生了大量的次生代谢物, 其抑制了尖孢镰刀菌的生长, 这也可能

是其防病的机制之一。

6 株生防细菌减轻了尖孢镰刀菌 (F. oxysporum) 对大豆的危害程度, 但是盆栽结果与大田结果有一些差异, 但基本趋势是一致的。6 株生防细菌防病效果在盆栽的情况下的防效普遍低于大田的防效, 可能因为这 6 株生防细菌来源于大田的根际土壤, 在大田的环境下, 更能有效地发挥其作用, 也可能因为盆栽的接种势能远远大于大田的接种势能, 造成病原菌对根部的危害更严重, 防治起来更困难。但是, 以往的研究通常是盆栽的防效好于大田防效, 所以此研究结果还有待进一步证明。6 株菌株在无菌土情况下和大田的情况下均表现一定的促生作用。但是在这两种条件下促生能力有一定的差别, 可能由于在盆栽和大田、有病原菌和无病原菌的情况下, 生防细菌、土壤和植株之间的互作有一定的差别, 造成了促生效果有一定的差别<sup>[9]</sup>。但是, 是否苗期的促生作用, 可以导致最终的产量增加, 还要进一步证明。在盆栽还是大田的条件下, 虽然菌株 3BRR13-1、3BRR16-2 对大豆株高产生一定的影响, 但可能由于其可以产生次生代谢物等抑制了病原菌的生长, 所以其无论在盆栽上还是在大田上都

有一定的防病效果。

综合以上的试验结果可以看出, 本试验所采用的 18BRR2-2 既可防治大豆根腐病, 又有明显的促生作用, 因此认为本菌株有一定的开发前景。

参 考 文 献

1 全赞华, 王学士. 大豆根腐病拮抗菌的室内筛选及温室测定[ J ]. 中国生物防治, 1997, 14 ( 1 ): 25 - 27.  
2 John M. Whipps. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere[ J ]. Journal of Experimental Botany. 2001, 52: 487 - 511.  
3 Elizabeth A. B. Emmert, Jo Handelsman. Biocontrol of plant disease a ( Gram - ) positive perspective[ J ]. FEMS Microbiology Letters. 1999, 171: 1 - 9.  
4 Favel, C. Olivain, C. Alabouvette. Fusarium oxysporum and its

biocontrol[ J ]. New Phytologist. 2003 157: 493 - 502  
5 方中达. 植病研究方法[ M ]. 北京: 农业出版社, 1977.  
6 A skew, D. J., Laing, M. D. An adaped selective medium for the quantitative isolation of Trichoderma species[ J ]. Plant Pathology . 1993, 42: 686 - 690  
7 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  
8 Jian Hua Guo, Hong Ying Qi, Ya Hui et al. Biocontrol of tomato wilt by plant growth - promoting rhizobacteria [ J ]. Biological Control. 2003,  
9 Maarten H. Ryder, Zhinong Yan, Teri E. Terrace. Use of strains of Bacillus isolated in China to suppress take - all and rhizoctonia root rot and promote seedling growth of glasshouse - grown wheat in Australian soils[ J ]. Soil Biology and Biochemistry. 1999, 31: 19 - 29.

EVALUATION OF SIX POTENTIAL BIOCONTROL AGENTS AGAINST SOYBEAN ROOT ROT

Wen Guangyue Xu Yanli Li Chunjie Chen Dong Xu Ling

( 1. Northeast Institute of Geography and Agricultural Ecology, CAS, Harbin 150040;  
2. Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

**Abstract** Six strains were screened from 1500 strains, which were isolated from the soybean rhizosphere soil. In vitro, they exhibited the antagonism toward the plant pathogenic *Fusarium oxysporum*. The strains 18BRR2-2, 18BRR9-1, 3BRR16-2 among the isolates had the antagonism activity toward *F. solani*, *F. xemitectum* and *Rhizoctonia solani*. And, the secondary-metabolite produced by these isolates had the inhibitional activity to *F. oxysporum*. These isolates significantly reduced the incidence of soybean root rot under controlled glasshouse conditions and the field from 31.97% to 45.90% and 20.00% to 65.00% respectively. And these strains may promote the growth of soybeans seedling. The strain, 18BRR2-2 has the potential to form production to control the soybean root rot.

**Key words** Soybean root rot; Biocontrol bacteria; Antagonism