

大豆根瘤内生细菌对大豆胞囊线虫影响研究^{*}

李进荣 段玉玺^{*} 陈立杰 薛春生

(沈阳农业大学植保学院, 沈阳 110161)

摘要 从辽宁、吉林、山东等地采集的土样中分离获得 400 株大豆根瘤内生细菌, 通过测定细菌菌悬液对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响和对二龄幼虫(J2)的毒性作用, 筛选出 4 株对大豆胞囊线虫胞囊孵化有强烈抑制性的菌株, 1 株对 J2 有一定毒性的菌株。其中 r030060、r030121、r030260、r030398 对胞囊的孵化相对抑制性分别达 62.20%、67.50%、67.50%、58.75%。

关键词 大豆胞囊线虫; 内生细菌; 抑制

中图分类号 S 435.651 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)02-0154-03

大豆胞囊线虫病害(*Heterodera glycines*)是世界大豆产区的一种重要病害, 在美国、巴西、阿根廷和中国等大豆主产国, 大豆胞囊线虫病引起大豆损失(3,025,400t/年)比任何一种单一病害所造成的损失都大^[1]。近二十年来, 随着可持续农业和有机农业的发展, 人们已将该线虫防治的重点转向生物防治。其重点主要集中在生防真菌的研究上, 更多关注于大豆胞囊线虫寄生性细菌(*Pasteuria penetrans*)和大豆根际细菌。

本文对分离到的大豆根部内寄生细菌进行研究, 主要从对大豆胞囊线虫胞囊孵化的抑制作用和细菌菌悬液对 J2 的毒性方面开展研究, 以期获得具有生防价值的大豆胞囊线虫的生防细菌。

1 材料和方法

1.1 培养基

酵母汁甘露醇培养基(YMA)。

1.2 供试菌株

大豆根内生细菌的获得 从不同的地区采集土壤样品, 在温室内播种大豆(辽豆 11), 待大豆根部产生根瘤后(约 30 天), 将根瘤取下, 冲洗干净备用。将根瘤浸入 70%酒精中 5min, 再浸入 0.1%HgCl₂ 中 5min, 再用无菌水洗涤 5 次。放入灭菌的培养皿中, 用无菌玻璃棒压碎, 然后用无菌接种环将其中的

浆液分别接在酵母汁甘露醇培养基(YMA)上 48 小时, 取单菌落分别接入 YMA 培养基上培养, 长出菌落后保存备用^[2]。本试验中采用的菌株 r030260、r030365 和 r020398 采自辽宁沈阳, r030121 采自辽宁朝阳, r030060 采自辽宁丹东, r030048 采自吉林长春。

1.3 供试线虫

1.3.1 大豆胞囊线虫胞囊

大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)3 号生理小种, 采自沈阳农业大学线虫学研究室试验田土中。采用过筛法分离获得新鲜饱满胞囊。

1.3.2 大豆胞囊线虫二龄幼虫(J2)

取大豆胞囊线虫 3 号生理小种胞囊, 0.5% NaOCl 表面消毒 5min, 无菌水冲洗 3 次。在 25℃ 条件下孵化, 一周后收集孵化出的 J2。

1.4 细菌菌株对大豆胞囊线虫胞囊孵化的抑制

取新鲜饱满的胞囊, 无菌水浸泡过夜, 0.5% NaOCl 表面消毒 5min, 无菌水冲洗 3 次。放入孵化池。孵化池为双层套管, 在双层套管间夹入擦镜纸。将孵化池置于灭菌的培养皿中, 向培养皿内加入内生细菌菌悬液 1ml, 再加入无菌水 9ml, 3 次重复, 以未加细菌菌悬液的无菌水处理为对照, 25℃ 下孵化^[3]。9 天后观察计数孵化出的 J2 数量。

1.5 内生细菌菌悬液对 J2 的毒性作用

取灭菌的贝氏小皿, 分别加入 10 条新孵化的

^{*} 收稿日期: 2005-01-14

基金项目: 国家自然科学基金课题(20372064)资助

作者简介: 李进荣(1980—), 男, 硕士研究生, 主要从事大豆胞囊线虫生物防治研究, E-mail: sylijr@126.com

^{*} 通讯作者: Tel: 024-88454528, Fax: 024-88492630, E-mail: duanyx@syau.edu.cn

J2, 再向其中加入细菌菌悬液 1ml (109cfu/ml), 3 次重复, 以无菌水处理为对照。25℃下 72h 后镜检计数^[4]。采用 NaOH 刺激法判断线虫的死活^[5], 计算线虫死亡率。

2 结果与分析

2.1 大豆根内生细菌对大豆胞囊线虫胞囊孵化的

表 1 不同菌株对胞囊孵化的影响

Table 1 The effect of different strains on the hatching of cyst

处理菌株 Treat strains	孵化出的线虫数(条) The J2 number of hat ching				相对抑制率(%) Suppression ratio
	I	II	III	平均	
r030060	30	32	28	30.00b	62.20%
r030121	20	14	44	26.00b	67.50%
r030260	45	5	28	26.00b	67.50%
r030398	33	35	30	32.67b	58.75%
r030048	83	93	78	84.33a	—
r030365	96	80	75	83.67a	—
对照 CK	96	74	68	79.33a	—

注: 数字后字母为 Duncan's 新复极差测验结果, 不同小写英文字母分别表示差异极显著(P< 0.01)和差异显著(P< 0.05), 字母相同者为差异不显著。

2.2 大豆根内生细菌对大豆胞囊线虫 J2 的影响

对具有抑制胞囊孵化效果的菌株进一步进行了对大豆胞囊线虫 J2 的影响的研究。试验结果表明供试菌株中, 除 r030398 和 r030048 外, r030060、r030121、r030260、r030365 对 J2 均未表现出毒性, 与对照相比差异不显著(表 2)。r030398 和 r030048 对 J2 的校正死亡率分别为 13.33%、20.00%。在解

表 2 不同菌株对大豆胞囊线虫 J2 的影响

Table 2 The effect of different strains to J2 of SCN

处理菌株 Treat strains	死亡的线虫数(条) The deed number of J2				校正死亡率(%) Corrected mortality
	I	II	III	平均	
r030060	1	1	2	1.33bB*	—
r030121	3	1	2	2.00aB	6.70%
r030260	2	1	1	1.33bB	—
r030398	3	3	2	2.67aA	13.33%
r030048	3	4	3	3.33aA	20.00%
r030365	2	1	1	1.33bB	—
对照 CK	2	1	1	1.33bB	—

注: 数字后字母为 Duncan's 新复极差测验结果, 不同大、小写英文字母分别表示差异极显著(P< 0.01)和差异显著(P< 0.05), 字母相同者为差异不显著。

J2 的毒性却是最强, 校正死亡率最高。

3 讨论

大豆胞囊线虫是一种定居型内寄生线虫, 整个

影响

处理经 25℃条件下 9 天后, 解剖镜下对胞囊孵化线虫计数表明, 在 400 株大豆根瘤内生细菌的菌株中, r030060、r030121、r030260、r030398 对大豆胞囊线虫胞囊孵化具有强烈的抑制作用(表 1)。相对抑制率分别达 62.20%、67.50%、67.50%、58.75%。经 SPSS 分析, 与对照达极显著差异水平(表 1)。菌株 r030048 和 r030365 与对照差异不显著。

剖镜下观察还发现, 用 r030398 和 r030048 菌悬液处理过的线虫活力与对照相比明显变弱。在最开始观察的时候, 线虫都静止不动, 只有经过解剖镜光源照射加热几分钟后, 线虫才开始变得活跃起来。而在其它的处理中没有发现这种现象。此外, 在细菌菌悬液对胞囊孵化的影响的试验中, r030048 对胞囊的孵化未表现出任何抑制作用(见表 1), 在这里它对

生活史几乎绝大多数时间都在大豆根内寄生, 所以本试验以大豆根内生细菌为研究试材, 通过研究大豆内生细菌对大豆胞囊线虫胞囊孵化的抑制性和细菌菌悬液对 J2 的毒性作用, 从中筛选具有生防潜力

的菌株。

在大豆内生细菌对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响的试验中, r030060、r030121、r030260、r030398对胞囊的孵化都表现出了很好的抑制性, 对胞囊的孵化相对抑制率分别达 62. 20%、67. 50%、67. 50%、58. 75%。但是 r030060、r030121、r030260对J2作用不显著。r030048则相反, 对胞囊的孵化没有显著的抑制作用, 对J2活性却表现出了一定的毒性作用。

本试验中大豆内生细菌抑制大豆胞囊线虫胞囊孵化的机制还需要进一步的研究。目前报道的植物内生细菌作为生防因子的作用机制一般包括产生次生代谢物、空间和营养竞争、诱导植物产生ISR(induced systemic resistance)等。埃特里根瘤菌(*Rhizobium etli*)的G12菌株的脂多糖类可以诱导马铃薯对马铃薯白线虫(*Globodera pallida*)产生系统抗性, 从而明显降低*Globodera pallida*对马铃薯根茎的侵染^[6]。

由于这些菌株都来自于大豆根瘤内, 因此它们与大豆之间的相容关系具有天然优越性, 同时不受外界环境的影响, 易于定殖, 因而对大豆胞囊线虫病

害可能发挥更好的防治效果。关于这些菌株对线虫的生防机制还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- 1 Wrather, J. A., T. R. Anderson, D. M. Arsyad et al. Soybean disease loss estimates for the top 10 soybean producing countries in 1994[J]. Plant Disease, 1997, 81(1): 107—110.
- 2 李洪泉, 程玉鹏, 王继华, 等. 头序甘草(*Clycirrhiza pallidiflora* Maxim)根瘤菌的分离和鉴定[J]. 黑龙江大学自然科学学报, 2001, 18(3): 111—116.
- 3 孙漫红, 刘杏忠, 晋治波. 淡紫拟青霉对大豆胞囊线虫卵及2龄幼虫的影响[J]. 植物保护学报, 2002, 29(1): 136—141.
- 4 秦博. 线虫生防细菌的筛选鉴定及防效研究[C]. 沈阳农业大学硕士学位论文, 2004.
- 5 Chen, S. Y., D. W. Dickison. A Technique for Determining Live Second—stage Juveniles of *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 2000, 32(1): 117—121.
- 6 M. Reitz, K. Rudolph, I. Schroder et al. Lipopolysaccharides of *Rhizobium etli* strain G12 act in potato roots as an inducing agent of systemic resistance to infection by the cyst nematode *Globodera pallida*[J]. Applied Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3515—3518.

RESEARCH ON THE EFFECT OF ENDOGENOUS BACTERIA FROM NODULE OF SOYBEAN TO SOYBEAN CYST NEMATODE

Li Jinrong Duan Yuxi Chen Lijie Xue Chunsheng

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161)

Abstract Four hundred endogenous bacteria strains from the nodule of the soybean were isolated from the rhizosphere soil in Liaoning, Jilin and Shandong provinces. The effect of bacterial suspension on the hatching of cyst and the toxicity to J2, *Heterodera glycines* race 3, were determined, and the results showed that 4 strains intensively suppressed the hatching of cyst and 1 strain had toxicity to J2 from the strains. The suppression ratios to cyst—hatching of r030060, r030121, r030260 and r030398 were 62. 20%, 67. 50%, 67. 50% and 58. 75% separately.

Key words Soybean cyst nematode; Endogenous bacteria; Control