

野生大豆根际微生物的分离及其缓解大豆连作障碍的研究

刘昭军,王德国,李 铁,刘丽艳,雷勃钧,李柱刚

(1. 黑龙江省农业科学院生物技术研究中心,黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室,哈尔滨 150086)

摘要 利用唯一碳源培养基筛选野生大豆根际微生物,分离获得 5 株分别降解邻苯二甲酸、丙二酸、乙酸、丙酸、苯等大豆化感物质的微生物,分别命名为 HK14-2、HK26-2、HN31-1、HK46-2、HK53-1。通过单菌落培养、显微镜观察、革兰氏染色以及 PCR-DGGE 电泳试验证明,筛选的 5 种微生物均为细菌, HK26-2 为杆菌,其余为球菌,且均为纯系。菌落平皿对峙试验证明 5 种细菌均可拮抗大豆立枯丝核菌;不同菌剂的大豆盆栽试验证明 5 种细菌均可降低大豆根腐病发生率,其中 HN31-1 与 HK53-1 复配菌剂的防效高达 69.5%。统计根系的主根长以及根干重的数据表明:筛选菌剂的添加增加了大豆的主根长以及根干重,改善大豆根际微生态环境。初步认为所分离野生大豆根际细菌可以缓解大豆连作障碍。

关键词 野生大豆;微生物;大豆连作

中图分类号 S565.1;S154.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0176-05

ISOLATION OF BACTERIA IN WILD SOYBEAN RHIZOSPHERE AND STUDY ON ITS FUNCTION TO REDUCE DISADVANTAGE OF SOYBEAN CONTINUOUS CROPPING

LIU Zhao-jun, WANG De-guo, LI Tie, LIU Li-yan, LEI Bo-jun, LI Zhu-gang

(1. Biotechnology Research Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences; 2. Key Laboratory of Crop and Livestock Molecular Breeding of Heilongjiang, Harbin 150086)

Abstract Five bacterial strains were isolated from wild soybean rhizosphere soil in medium contained only one kind of carbonaceous organic compound. They could digest phthalate, malonic acid, acetic acid, propionic acid and benzene and were named HK14-2, HK26-2, HN31-1, HK46-2 and HK53-1, respectively. Through single colony culture, microscope observe, Gram's dying and PCR-DGGE electrophoresis, it was showed that all of the screened five microbe were bacteria, HK26-2 was bacillus and others were coccus, and the isolated bacteria strain was pure. Test of colony standoff in dish proved the five bacteria could resist soybean pathogenic fungi (*Rhizoctonia solani*). Potted soybean treated with different bacteria showed that the five bacteria could decrease the occurrence of soybean root rot, and the highest control effectiveness was 69.5% with compound bacteria of HN31-1 and HK53-1. Compared with the control, statistical data of taproot length and root dry weight showed that use of

收稿日期:2007-02-25

基金项目:黑龙江省农科院青年基金项目(2007 年)

作者简介:刘昭军(1974-),男,副研究员,博士,主要从事作物基因工程及分子育种研究。

通讯作者:李柱刚,博士, E-mail: lizhugang@163.com

screened bacteria increased the numerical value and improved the environment of soybean rhizosphere. It was considered that the isolated bacteria from wild soybean rhizosphere could have biological control efficacy against pathogens of soybean root rot.

Key words *Glycine soja*; Microbe; Soybean continuous cropping

大豆是黑龙江省重要的粮食作物,种植面积每年保持在 400 万 hm^2 左右,其中重迎茬面积已近 50%。据调查,大豆迎茬减产幅度约为 4.2% ~ 23.4%,连作减产幅度为 7.2% ~ 38.6%,危害严重的地块已经出现绝产^[1]。研究表明大豆连作障碍是由土壤有害微生物、化感物质、大豆孢囊线虫等多种因素综合作用的结果^[2,3]。目前对大豆重茬病害的生物防治主要集中在对大豆根腐病原菌的防治。众多学者从细菌、放线菌、真菌三个角度对大豆根腐病展开了研究,筛选出了具有不同拮抗机理的菌株^[4~6]。对大豆的连作障碍缓解起到了一定的作用。

野生大豆 (*Glycine soja*) 是栽培大豆 (*Glycine max*) 的近缘野生种、类型繁多。它常年在相对固定的一个区域内繁殖,这与连作栽培大豆生长方式有类似之处,但是未见野生大豆生长受到抑制的报道^[7]。因此,野生大豆根际可能存在降解化感物质和拮抗大豆根腐病原菌的微生物,通过野生大豆根际微生态的研究为解决栽培大豆连作障碍提供有益的借鉴和帮助,本研究从黑龙江省野生大豆根部土壤筛选拮抗大豆根腐病原菌的微生物,并研究其缓缓解栽培大豆连作障碍的初步机理,为保证和提高大豆产量提供一条新的途径。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 采自黑龙江省克山县古北乡三种不同湿度生境的野生大豆苗期根际土样中分离的细菌;大豆致病病原菌株:立枯丝核菌 (*Rhizoctonia. Solani*),由黑龙江省农科院植保所提供。供试品种:合丰 25。

1.1.2 培养基 唯一碳源培养基:基本成分为 K_2HPO_4 1.6 g、 KH_2PO_4 0.4 g、 NH_4Cl 1.0 g、 MgSO_4 0.06 g、 FeSO_4 3 mg、 CaCl_2 1 mg、 CuSO_4 0.05 mg、 ZnSO_4 0.05

mg、 HBO_3 0.03 mg,然后,在上述溶液中分别加入邻苯二甲酸、丙二酸、乙酸、丙酸、苯各 1 g,定容至 1 L, pH7.0。固体培养基则加入 20 g 琼脂。细菌基本培养基: NH_4NO_3 1 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5 g、 KH_2PO_4 0.5 g、 K_2HPO_4 1.5 g,定容至 1 L, pH7.0。固体培养基则加入 20 g 琼脂。

1.2 试验方法

1.2.1 野生大豆根际微生物的分离 土样采集:根际和根外土样采集分别参考左华清^[8]与罗海峰^[9]的方法。化感物质降解菌种的驯化与富集:将采集来的土样,磨碎成小颗粒,混匀,称取 0.5 g 于唯一碳源培养基中,摇床培养 (30 $^\circ\text{C}$, 150 r/min) 至培养液出现明显混浊后,取 5 mL 菌液转入新鲜富集培养基中,166 r/min 振荡培养 7 d,采用稀释倒皿法分析连续驯化富集 4 次。菌种的分离纯化:于最后一次驯化培养液中取 5 mL 菌液,按无菌操作稀释到 10^{-8} /mL,取稀释液 0.5 mL 分别涂布于 5 种唯一碳源选择固体培养基上 (唯一碳源邻苯二甲酸、丙二酸、乙酸、丙酸、苯的浓度分别为 1 g/L),于 30 $^\circ\text{C}$ 培养 2~5 d,待长出菌落后,选生长速度较快的菌落进一步纯化,保存备用^[10]。

1.2.2 菌种的形态观察及纯度鉴定 将分离纯化的菌株进行革兰氏染色,然后采用荧光显微镜进行观察。用 PCR-DGGE 技术鉴定菌种纯度,具体参照 Bernadette 的方法^[11]。

1.2.3 菌株对根腐病原菌拮抗能力的测定 对所筛选的 5 个菌株进行大豆根腐病原菌拮抗筛选,采用平板对峙法,将病原菌立枯丝核菌 (*R. solani*) 分别接种 1 mL 于培养皿中,同固体培养基混合倒平板,将灭菌塑料环插在固体培养基中间,其中接种分离得到的拮抗菌株、25 $^\circ\text{C}$ 恒温培养 3 d。每菌株重复 3 次,25 $^\circ\text{C}$ 恒温培养。同时以只接种病原菌的培养皿作为对照。当拮抗菌与病原菌出现拮抗现象后,每天测量病原菌指向拮抗菌的菌落半径 (L_p) 和对照的菌落半径 (L_c) ^[10]。

表1 筛选菌剂对大豆根腐病的抗病试验处理
Table 1 Experiment of screened bacteria on soybean root rot resistance

菌株名称 Strains	土壤类别 Soil	处理 Treatment	处理号 Number	菌株名称 Strains	土壤类别 Soil	处理 Treatment	处理号 Number
HK14-2	大豆连作土壤	喷施立枯丝核菌	1	HK53-1	大豆连作土壤	喷施立枯丝核菌	17
		对照	2			对照	18
	玉米根茬土壤	喷施立枯丝核菌	3		玉米根茬土壤	喷施立枯丝核菌	19
		对照	4			对照	20
HK26-2	大豆连作土壤	喷施立枯丝核菌	5	HK14-2 + HK26-2	大豆连作土壤	喷施立枯丝核菌	21
		对照	6			对照	22
	玉米根茬土壤	喷施立枯丝核菌	7		玉米根茬土壤	喷施立枯丝核菌	23
		对照	8			对照	24
HN31-1	大豆连作土壤	喷施立枯丝核菌	9	HN31-1 + HK53-1	大豆连作土壤	喷施立枯丝核菌	25
		对照	10			对照	26
	玉米根茬土壤	喷施立枯丝核菌	11		玉米根茬土壤	喷施立枯丝核菌	27
		对照	12			对照	28
HK46-2	大豆连作土壤	喷施立枯丝核菌	13	无菌剂	大豆连作土壤	不施致病菌	29
		对照	14			不施致病菌	30
	玉米根茬土壤	喷施立枯丝核菌	15		玉米根茬土壤	不施致病菌	30
		对照	16			不施致病菌	30

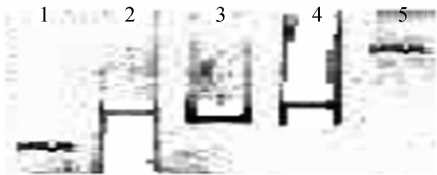
1.2.4 菌株对土壤 pH 值及大豆抗病性指标的影响 取大豆连作土壤以及玉米根茬土壤灭菌后待用。细菌菌剂为 5 个单一菌株 (HK14-2、HK26-2、HN31-1、HK46-2、HK53-1) 以及 2 个复配菌株 (HK14-2 + HK26-2 与 HN31-1 + HK53-1) 等 7 个菌剂, 分别在播种后每盆喷入浓度为 10^8 个/mL 的 50 mL 菌液; 每种菌剂的处理分别为连作土壤以及玉米根茬土壤, 每种土壤设置喷施 50 mL 的立枯丝核菌孢子悬液 (浓度为 10^8 个/mL), 并以不喷致病菌悬液为对照, 每处理 5 盆; 并分别以未喷施菌剂玉米根茬土壤和连作大豆土壤为总对照。试验共计 30 个处理, 详见表 1。在大豆的第二片复叶展开时测定大豆根系主根长度、根干重及土壤 pH 值, 并分别以未喷施菌剂玉米根茬土壤和连作土壤 pH 值为对照, 研究筛选菌剂对土壤 pH 值的影响。同时测定根腐病发生情况, 计算生防效果, 防治效果 = (对照发病率 - 处理发病率)/对照发病率。

2 结果与分析

2.1 野生大豆根际微生物的分离结果

通过唯一碳源法从野生大豆根部土壤筛选获得 5 个化感物质降解细菌, 分别命名为 HK14-2、HK26-2、HN31-1、HK46-2、HK53-1, 它们分别降解邻苯二甲酸、丙二酸、苯、丙酸、乙酸。五株细菌

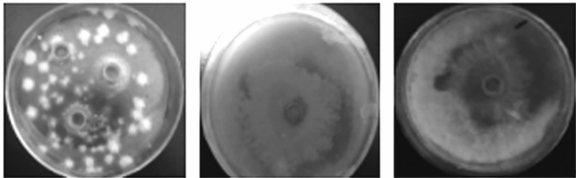
菌落的共同特征是菌落隆起、乳白色、比较湿润, 区别是 HK14-2 菌落较大, 其它菌株菌落较小; HK53-1 和 HK46-2 边缘有缺刻, HN31-1、HK26-2 和 HK14-2 边缘规则。HK14-2 革兰氏染色阳性, 其余阴性。经油镜观察 HK26-2 为杆菌, 其余为球菌通过 PCR-DGGE 电泳结果表明在每个菌的扩增泳道中未出现杂带, 证明所筛选的细菌为纯系, 没有感染杂菌 (图 1)。



1. HK53-1; 2. HK46-2; 3. HN31-1;
4. HK26-2; 5. HK14-2

图1 5株筛选细菌的DGGE检测

Fig. 1 DGGE analysis of five screened bacteria



1. HK53-1 2. HK46-2 3. HN31-1

图2 3个筛选细菌与立枯丝核菌的平皿对峙试验

Fig. 2 Colony standoff of 3 bacteria to *Fusarium oxysporum*

2.2 菌株对根腐病原菌拮抗能力的测定

通过平皿对峙试验结果表明 3 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 10 ~ 25 mm,其中菌 HN31 - 1 抑菌圈直

径最大,达到了 25 mm,菌株 HK53 - 1 抑菌圈直径最小,但也达到了 15 mm(图 2),其它 2 个菌株对立枯丝核菌也都有一定的抑制作用。

表 2 菌剂对连作大豆土壤 pH 的影响

Table 2 Influence of screened bacteria on soil pH of continuous cropping soybean									
处理 Treatment	HK14 - 2	HK26 - 2	HN31 - 1	HK46 - 2	HK53 - 1	HK14 - 2 + HK26 - 2	HN31 - 1 + HK53 - 1	玉米根茬土壤 (CK1)	连作土壤 (CK2)
pH	6.89	6.97	6.93	7.11	7.31	7.45	7.52	6.86	6.72

Notes: CK1: soil of maize; CK2: soil of continuous cropping soybean

2.3 喷施菌剂对连作大豆土壤 pH 的影响

由表 2 可以看出施用菌剂可以较大幅度提高土壤 pH,同多年连作大豆土壤对照相比,土壤 pH 最高可以提高 11.9%。同玉米根茬土壤相比,pH 也

有很大提高。pH 的提高在一定程度上大大降低大豆致病菌的生活力,从而改善土壤的生态环境,有利于土壤生态环境的重建,打破大豆致病菌的生物群落优势,对大豆根腐病等的防治是一个有利的探索。

表 3 待测菌株对大豆根腐病防治效果

Table 3 Control effectiveness of bacteria on soybean root rot									
处理 Number	主根长 (cm) Root length	根干重 (g) Dry root weight	病情指数 Disease index	防效 (%) Control effect	处理 Number	主根长 (cm) Root length	根干重 (g) Dry root weight	病情指数 Disease index	防效 (%) Control effect
1	6.70	0.65	22.6	30.9c	16	8.01	1.24	10.1	74.0a
2	6.98	0.73	18.5	48.5 c	17	7.46	0.98	19.6	44.0c
3	7.12	0.70	17.6	64.2a	18	7.66	0.99	16.8	66.4a
4	7.36	0.98	10.4	72.1a	19	7.89	1.10	14.9	62.4a
5	5.91	0.59	25.9	29.0c	20	7.95	1.15	11.2	70.2a
6	6.24	0.68	20.5	44.2c	21	6.91	0.86	13.0	64.2a
7	6.55	0.72	19.5	43.5c	22	7.04	1.05	11.2	70.5a
8	6.58	0.83	12.0	68.4a	23	7.18	1.21	10.9	73.0a
9	8.58	1.12	18.1	52.2 b	24	7.45	1.31	9.7	74.5a
10	9.25	1.43	13.5	64.8 a	25	7.99	1.45	12.6	69.5a
11	9.65	1.56	10.7	73.4 a	26	9.58	1.65	10.4	76.8a
12	10.68	1.80	8.51	79.7 a	27	11.50	2.31	7.64	83.0a
13	7.59	1.01	19.2	44.9c	28	12.65	2.54	6.95	85.9a
14	7.85	1.09	14.5	59.8b	29	5.51	0.56	62.9	
15	7.65	1.00	12.4	66.4a	30	6.21	0.61	28.9	

2.4. 分离细菌对大豆根腐病的防治作用

盆栽试验结果表明,不接种筛选细菌的连作大豆土壤中大豆苗根腐病发病的病情指数为 62.9%,而喷施 7 种菌剂后的连作大豆土壤中大豆苗根腐病发病的病情指数为 6.95% ~ 25.9%,说明喷施野生

大豆根际筛选细菌培养液可有效抑制连作大豆土壤大豆根腐病的发生,其中 HN31 - 1 和 HK53 - 1 复配菌剂的防效则最高达 69.5%,菌株 HK14 - 2 防效最低,但也达到了 30.9%(表 3)。菌剂在防治大豆根腐病方面同其在平皿中与立枯丝核菌的对峙试验

的结果是一致的,菌株 HN31-1 表现出的大豆根腐病防治效果最佳。通过对照试验表明,喷施菌剂的玉米根茬土壤中的大豆苗同喷施相应菌剂的连作大豆根茬土壤中的大豆苗相比,其大豆根腐病发病率均大大降低。说明土壤的轮作有利于改善土壤微生态环境,野生大豆根际筛选细菌的加入对改善连作大豆根茬土壤根际微生物群落十分有益。另外,从大豆根系的统计数据来看,经筛选细菌处理后土壤中的大豆幼苗在主根长度以及根干重等方面均明显高于未处理的对照,主根长度最高增加 1.03 倍,根干重最高增加 3.16 倍。说明大豆根系的生长状况改善与大豆根腐病的抗性提高密切相关。

3 讨论

从野生大豆根际土壤分离微生物用于大豆根腐病防治是大豆生物防治新的探索。利用大豆化感物质(邻苯二甲酸、丙二酸、乙酸、丙酸、苯)作为唯一碳源的筛选培养所获得的生防细菌,在离体的情况下,可不同程度的抑制大豆根腐病病原菌,培养滤液也对立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)有一定的抑制作用,其中菌株 HN31-1 表现尤为突出,在盆栽条件下这 5 株生防细菌及其复配菌剂可以明显地降低立枯丝核菌对大豆的致病性,这可能是由于其产生了大量的次生代谢物,其抑制了立枯丝核菌的生长,这也可能是其防病的机制之一。

虽然 7 种生防细菌菌剂减轻了立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)对大豆的危害程度,但是盆栽的结果同大田相比,会出现一些偏差。盆栽的致病菌接种强度远远大于大田的发病率,另外所用土壤均为无菌处理,其土壤微生态环境同大田不一致,可能病原菌对大豆苗根部的危害更严重,防治效果差^[12]。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^[5,6]。大田的根际土壤中微生态环境是否有利于所筛选野生大豆根际土壤分离微生物的生存是一个问题,必须采取一定的措施来提高其在连作大豆土壤中的定植能力,使其在大田的环境下能更有效地发挥作用。

尽管还需要采取一定的措施来提高野生大豆根际土壤分离细菌的防病效果,从试验结果可以看出,本试验所采用的生防细菌既可防治大豆根腐病,又有明显的改善大豆生长作用,因此利用野生大豆根际土壤分离生防细菌来防治大豆根腐病,改善大豆连作障碍是可行的。

参 考 文 献

- [1] 刘佩印. 黑龙江省大豆重迎茬问题的研究概况[J]. 黑龙江农业科学 2001, (3): 60-64.
- [2] 徐凤花, 汤树德, 孙冬梅, 等. 重迎茬对大豆根际微生物的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 1998, 10(1): 5-8.
- [3] 何志鸿, 刘忠堂, 许艳丽, 等. 大豆重迎茬减产的原因及农艺对策研究—重迎茬大豆的根际土壤有机化合物[J]. 黑龙江农业科学, 2003, (5): 1-5.
- [4] 湛晓曦, 陈卫良, 李德葆. 细菌及其拮抗物质对植物病原真菌的抑制[J]. 微生物学通报. 2003, 30(3): 67-71.
- [5] 韩丽梅, 沈其荣, 王树起, 等. 大豆根茬木霉腐解产物的鉴定及其化感作用的研究[J]. 应用生态学报, 2002, (10): 97-101.
- [6] 胡江春, 薛德林, 王书锦, 等. 大豆连作障碍研究Ⅲ、海洋放线菌 MB-97 促进大豆连作增产机理[J]. 应用生态学报, 2002: 1095-1098.
- [7] 王克晶, 李福山. 我国野生大豆(*G. soja*)种质资源及其种质创新利用[J]. 中国农业科技导报, 2000, 2(6): 69-72.
- [8] 左华清, 王子顺. 柑桔根际土壤微生物种群动态及根际效应的研究[J]. 生态农业研究, 1995, 3: 39-47.
- [9] 罗海峰, 齐鸿雁, 薛凯, 等. PCR-DGGE 技术在农田土壤微生物多样性研究中的应用[J]. 生态学报, 2003, 23(8): 1570-1575.
- [10] 李华荣, 肖建国, 颜思齐. 蜡质芽孢杆菌 R2 防治水稻纹枯病研究[J]. 植物病理学报, 1993, 23(2): 101-105.
- [11] Bernadetle M Duineveld, George A Kowalchuk, Anneke Keijzer, et al. Analysis of bacterial communities in the rhizosphere of chrysanthemum via denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rRNA as well as DNA fragments coding for rRNA[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67: 172-178.
- [12] Ching-hong Yang, Davide Crowle Y. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66: 345-351.