

防治大豆胞囊线虫芽孢杆菌初步筛选

段玉玺,于海峰,陈立杰,王胜君

(沈阳农业大学植物保护学院,北方线虫研究所,辽宁 沈阳 110161)

摘 要:大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe)是大豆根部的重要寄生线虫,严重威胁大豆生产,而且防治困难。目前人们试图利用生物防治的方法来控制大豆胞囊线虫病害,以达到农业可持续发展的目的。芽孢杆菌是一类重要的微生物资源,该类微生物具有良好的抗逆性,在线虫病害的生物防治方面具有一定的发展前途。采用稀释分离法,从东北和华北等地区采集土样分离获得 295 株芽孢杆菌,通过筛选获得 6 株对大豆胞囊线虫有明显抑制作用的菌株,分别是 B12、B28、B49、B65、B76 和 B108。其中 B12 菌株的菌悬液对大豆胞囊线虫有较强的杀死作用,校正死亡率达到 74.03%;B65 发酵液,处理 48 h 后校正死亡率达到 85.90%;B12、B65、B49 对大豆胞囊线虫抑制率分别达 89.50%、89.50%、88.00%,均与对照差异显著。这些菌株对大豆胞囊线虫的形成表现出明显的抑制作用,有可能成为非常有应用前景的生防菌株。

关键词:大豆胞囊线虫;芽孢杆菌;发酵液;校正死亡率

中图分类号:S432.4⁺5

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2008)05-0811-03

Screening of *Bacillus* sp. Against Soybean Cyst Nematode(*Heterodera glycines*)

DUAN Yu-xi, YU Hai-feng, CHEN Li-jie, WANG Sheng-jun

(Nematology Institute of Northern China, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

Abstract: The Soybean Cyst Nematode(*Heterodera glycines*), causes economically significant damage to soybean in China. Some bacteria *Bacillus*, are both resistant to adverse environment and against pathogens. 295 *Bacillus* sp. were isolated from soil samples by diluted separation in Northeast and North China. B12, B28, B49, B65, B76 and B108 strains could suppress *Heterodera glycines* and strain suspensions of B12 was effective significantly. The corrected mortality rate of nematodes of strain suspensions with B12 were 74.03% after 48 h. The corrected mortality rate of nematodes of fermentation filtrate with B65 were 85.90% after 48 h. The suppressive percentages of cysts hatching of B12, B65 and B49 were 89.50, 89.50 and 88.00. The bacterial strains which had effect on the nematode would be used as the bio-control agents on the soybean root rot pathogen and soybean cyst nematode.

Key words: *Heterodera glycines*; *Bacillus* sp.; Fermentation broth; Correct mortality rate

大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines* Ichinohe),是大豆生产中一种常见的病害。它危害大豆根部,造成植株生长迟缓、根系萎缩、结瘤数量减少、结荚率低、豆粒干瘪,从而严重影响大豆的产量和品质,且感染后的大豆植株很容易被土壤中病原菌侵害,引发或加重其它病害。大豆胞囊线虫病的流行一般造成大豆减产 10%~20%,重者达 50%,甚至绝产^[1]。对大豆胞囊线虫病的防治可以通过种植抗性品种、改进耕作方式等,但这些措施也存在较大的局限。目前,应用最多的还是化学药剂,美国在 20 世纪 60~70 年代曾采用了 20 多种化学农药防治大豆胞囊

线虫病。但由于污染重、苗期药害大,正式注册登记的只有少数几种^[2],而其中一些毒性很高的农药,如二溴氯丙烷、二溴乙烷也相继被禁用^[3-4]。

近年来,随着人们环保意识的增强,植物病虫害的生物防治越来越受到关注,生物防治也正在成为控制大豆胞囊线虫病的一条重要而有效的途径。芽孢杆菌是一类重要的微生物资源,过去广泛被用于叶部病害的生物防治上。其中穿刺芽孢杆菌(*Bacillus penetrans*)在线虫病害防治上发挥了重要作用^[5-6],但由于该芽孢杆菌的人工培养成为产业化的重大障碍^[7],因此,到目前为止,该菌还没有在生

收稿日期:2008-02-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30673199);科技部成果转化基金资助项目(05EFN212100059)。

作者简介:段玉玺(1964-),男,博士,教授,主要从事线虫学研究。E-mail:duanyx6407@163.com。

产上被广泛应用。研究和开发土壤中其他易于培养的芽孢杆菌对于线虫病害防治具有重要意义^[8]。研究利用我国丰富的细菌资源来筛选对大豆胞囊线虫有毒杀活性的芽孢杆菌,以期获得高活性菌株,为生产中胞囊线虫病害的防治提供新的生防因子来源。

1 材料与方法

1.1 芽孢杆菌菌株的分离和保存

2006~2007年,从东北和华北地区采集到130份土样,采用稀释分离法^[9],用无菌水稀释 10^{-4} 倍,在80℃下加热15 min,用无菌移液枪吸取0.3 mL涂布于肉汁胨培养基(NA)平板上,摇动培养皿使水分分布均匀,倒置培养皿在28℃下培养2~3 d,长出的细菌即认为是芽孢杆菌,并及时挑取单菌落在NA培养基上划线培养,直到得到纯培养,挑取单菌落编号,用15%的甘油-NA培养液保存备用。

1.2 大豆胞囊线虫的获得

大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*),采自沈阳农业大学大豆试验田土中。采用改良的淘洗-过筛法^[10]从土壤中分离胞囊:将土壤放入适量水中,搅拌均匀,静置2~3 min后,上层悬液过筛(40目和60目),重复3次。弃去上层40目筛上的残余物,收集60目网筛上的剩余物于烧杯中。烧杯中的水悬物分多次用漏斗过滤,过滤后的剩余物转入干净的大培养皿中,体视解剖镜下用挑针和毛刷从中挑出新鲜饱满的褐色胞囊,备用。

大豆胞囊线虫2龄幼虫(J2)的获得:将保存备用的胞囊,用0.5% NaClO表面消毒5 min,无菌水冲洗3次。在25℃温箱内孵化,一周后开始收集孵化出的大豆胞囊线虫二龄幼虫J2。

1.3 细菌菌悬液对大豆胞囊线虫的作用

将纯化的细菌菌落挑在1 mL无菌水中,保证细菌菌悬液的浓度大于 10^9 cfu·mL⁻¹,再加入0.1 mL(内含约40条线虫)无菌水,在25℃恒温培养箱中培养,48 h后观察线虫的死亡情况,记录线虫死亡率,计算校正死亡率。以无菌水为对照,3次重复。

1.4 发酵液对大豆胞囊线虫的作用

1.4.1 细菌菌株发酵液的制备 将浓度为 10^9 cfu

·mL⁻¹的细菌菌悬液取2 mL放到装有50 mLNA培养液的100 mL三角瓶中,28℃,110 r·min⁻¹下发酵3 d,将发酵液在4℃,10 000 r·min⁻¹下离心10 min,取上清液,即为细菌发酵液。

1.4.2 细菌菌株发酵液对大豆胞囊线虫的作用

在灭菌的贝氏小皿中加入0.2 mL细菌发酵液,再加入0.1 mL(内含约40条线虫)无菌水,在25℃恒温培养箱中培养,48 h后记录线虫死亡率,计算校正死亡率。以无菌水为对照,3次重复。

1.5 发酵液对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

取新鲜饱满的胞囊,无菌水浸泡过夜,0.5% NaClO表面消毒5 min,无菌水冲洗3次,放入孵化池。孵化池为双层玻璃套管,在双层玻璃套管间夹入擦镜纸,121℃下灭菌5 min。将孵化池置于无菌培养皿中,向培养皿内加入细菌发酵液1 mL,再向其中加入无菌水9 mL,以未加细菌菌悬液的无菌水处理为空白对照,3次重复,25℃下孵化。9 d后观察计数孵化出的J2数量。

1.6 计算方法

$$\text{线虫死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{供试线虫数}} \times 100$$

$$\text{校正死亡率}(\%) =$$

$$\frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100$$

所得数据经DPS2000软件进行方差分析,新复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 细菌菌株筛选结果

从130份土样中分离得到295株芽孢杆菌,其中6株对大豆胞囊线虫有较强的致死作用。采用的菌株B12分离自黑龙江省巴彦县福乡屯,B28和B65分离自辽宁省大连金州,B49分离自辽宁省本溪市桓仁县,B76和B108分离自辽宁省丹东市凤凰山。

2.2 细菌菌悬液对大豆胞囊线虫的作用

结果表明,芽孢杆菌的菌悬液对大豆胞囊线虫J2的校正死亡率差异较大,B12菌悬液处理48 h后大豆胞囊线虫J2的校正死亡率最高,达到74.03%,说明B12的菌悬液活性最高,与对照相比差异显著($P < 0.01$)。B108对二龄幼虫有一定的毒杀作用,但与对照比差异不显著(表1)。

表1 芽孢杆菌菌悬液对大豆胞囊线虫二龄幼虫活性的影响

Table 1 Effect of different strain suspensions of the genus <i>Bacillus</i> sp. on <i>H. glycines</i> J2		
菌株 Strains	二龄幼虫死亡率 Mortality of J2/%	校正死亡率 Revised mortality/%
B12	76.72aA	74.03
B28	65.80abAB	61.85
B49	65.89bcAB	61.95
B65	57.16cBC	52.21
B76	46.87dCD	40.73
B108	33.31deCD	25.61
CK	10.35eD	-

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 $P<0.05$ 。

The letters in table were the results of Duncan's test. Capital and lowercase letter indicated $P<0.01$ and $P<0.05$, separately.

2.3 发酵液对大豆胞囊线虫二龄幼虫活性的影响

结果表明,B65 处理的二龄幼虫校正死亡率达到 85.90%,活性最高,与其他几株相比差异均显著。B49 效果略差,校正死亡率仅为 33.87% (表 2)。

表2 发酵液对大豆胞囊线虫二龄幼虫活性的影响
Table 2 Effect of the 6 effective bacterial culture filtrates on *H. glycines* J2

菌株 Strains	二龄幼虫死亡率 Mortality of J2/%	校正死亡率 Revised mortality/%
B12	72.59bB	71.87
B28	65.80bB	64.90
B65	86.26aA	85.90
B76	64.80bB	63.88
B108	67.95bB	67.11
CK	2.56dD	-

2.4 发酵液对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

胞囊可以保护卵渡过不良环境条件,具有强烈的休眠现象,胞囊孵化需要在适应的环境条件和一定的外源刺激才能完成。研究发现,与对照相比,在 25℃ 条件下发酵液处理 9 d 后,大部分胞囊孵化受抑制。解剖镜下对胞囊孵化线虫计数表明,6 株菌对大豆胞囊线虫胞囊孵化的相对抑制率均达 60% 以上,其中 B12、B49 和 B65 抑制效果强烈。B12 和 B65 对胞囊孵化的相对抑制率最高达到 89.50%, B49 相对抑制率为 88.00%,与对照相比达极显著差异水平(表 3)。

表3 不同菌株对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

Table 3 Effect of different strains of bacteria on the hatching of cyst		
菌株 strains	孵化出的线虫数 Numbers of nematodes	相对抑制率 Relative restrained rates/%
B12	7.00cB	89.50
B28	19.00bcB	71.50
B49	8.00cB	88.00
B65	7.00cB	89.50
B76	13.33bcB	80.01
B108	24.67bB	63.00
CK	66.67aA	-

3 结论与讨论

从土壤中筛选获得大量芽孢杆菌,利用菌悬液和发酵液研究对大豆胞囊线虫二龄幼虫的毒性作用以及发酵液对胞囊孵化的抑制性,获得 6 株防治大豆胞囊线虫的生防芽孢杆菌菌株。其中 B65 的发酵液代谢产物对大豆胞囊线虫的胞囊孵化和二龄幼虫都有很高的活性;B12 的菌悬液和代谢物对大豆胞囊线虫的胞囊和 J2 都具有较高活性;不同菌株对线虫的活性位点不同,菌悬液和发酵液的代谢产物对线虫的活性也有很大差别。

以大豆胞囊线虫二龄幼虫作为靶标线虫,采用芽孢杆菌的菌悬液和发酵液,筛选出 6 株对大豆胞囊线虫具有较强活性的生防菌,但在菌株产生的活性物质的结构以及对线虫的拮抗机理和田间防治效果等方面仍有待于进一步深入研究。

植物寄生线虫病害的防治研究正处于一个转变时期,许多线虫学家正在研究利用真菌、细菌及捕食性真菌等生物农药来替代化学农药,有些微生物能分泌产生有毒的代谢产物对植物寄生线虫表现出毒杀作用,这是杀线剂研发方向开拓出的新思路。但是需要引起注意的是应该主要针对在生产中造成严重损失的病原线虫,并结合这些线虫的生理生化等方面的特征,开展杀线剂的筛选和研制工作,加快我国筛选杀线剂的步伐,准确、快速、高效的获得对植物寄生线虫具有毒杀作用的物质,丰富杀线剂种类。

参考文献

[1] Liu X Z, Li J Q, Zhang D S. History and status of soybean cyst nematode in China[J]. International Journal of Nematology, 1997, 7(1):18-25.

- [4] 董钻,谢甫缙.大豆氮磷钾吸收动态及模式的研究[J].作物学报,1996,22(1):89-95. (Dong Z, Xie F T. Studies on dynamics and models of N, P, K absorption in soybeans[J]. Acta Agronomica Sinica, 1996, 22(1): 89-95.)
- [5] 戴建军,程岩.黑龙江省南部黑土施氮对大豆氮肥利用率的影响[J].东北农业大学学报,2000,31(2):125-128. (Dai J J, Cheng Y. The effect of nitrogen fertilizer rates on NFUE and NUE of 3 soybean cultivars[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2000, 31(2): 125-128.)
- [6] 徐本生,籍玉尘,杨建堂.夏大豆的干物质积累和氮磷钾吸收分配动态的研究[J].大豆科学,1989,8(1):47-53. (Xu B S, Ji Y C, Yang J T. Studies on the rules of dry matter accumulation and the absorption distribution of Nitrogen, Phosphorus and Potassium for summer soybean[J]. Soybean Science, 1989, 8(1): 47-53.)
- [7] 苗以农,姜艳秋,朱长甫,等.大豆光合生理生态研究第9报大豆不同节位叶片全氮含量的变异性[J].大豆科学,1988,7(2):113-118. (Miao Y N, Jiang, Y Q, Zhu C F, et al. Study on physio-ecology of photosynthesis in soybean 9. The N percentage in soybean leaves at different nodes^[1]. Soybean Science, 1988, 7(2): 113-118.)
- [8] 冯春生,沈银保,张庆海,等.应用¹⁴C示踪技术测定大豆光合速率[J].大豆科学,1989,8(4):351-356. (Feng C S, Shen Y B, Zhang Q H, et al. Measuring photosynthetic rate of soybean by applying ¹⁴C tracking technique [J]. Soybean Science, 1989, 8(4): 351-356.)
- [9] 章建新,倪丽,翟云龙.施氮对高产春大豆氮素吸收分配的影响[J].大豆科学,2005,24(1):38-42. (Zhang J X, Ni L, Zhai Y L. Effect on nitrogen fertilizer application to the absorption and distribution of nitrogen in spring soybean [J]. Soybean Science, 2005, 24(1): 38-42.)
- [10] 甘银波,陈静,邱正明.不同阶段施用氮肥对大豆氮吸收及固氮的影响[J].中国油料,1996,18(4):45-48. (Gan Y B, Chen J, Qiu Z M. Effect of N fertilizer application at different growth stages on N uptake and N-fixation of soybeans[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1996, 18(4): 45-48.)

(上接第813页)

- [2] Riggs R D, Wrathel J A. The American phytopathological society [M] // Biology and management of the soybean cyst nematode. USA, Minnesota: APS Press, 1992: 186.
- [3] 张磊.大豆胞囊线虫概述[J].大豆通报,1993,2(3):37-41. (Zhang L. The summary of soybean cyst nematode[J]. Soybean Bulletin, 1993, 2(3): 37-41.)
- [4] 段玉玺,吴刚.植物线虫病防治[M].北京:中国农业科技出版社,2002. (Duan Y X, Wu G. Plant nematode disease control[M]. Beijing: China Agricultural Science & Technology Press, 2002.)
- [5] Sayre R M, Starr M P. Genus pasteuria metchnikoff [M] // Williams S T, Sharpe M E, Holt J G. Bergeys manual of systematic bacteriology[M]. Baltimore, MD: Williams and Wilkins, 1989.
- [6] Sturhan D, Winkelheide R, Sayre R M, et al. Light and electron microscopical studies of the life cycle and developmental stages of a Pasteuria isolate parasitizing the pea cyst nematode, *Heterodera goettingiana* [J]. Fundamental and Applied Nematology, 1994, 17: 29-42.
- [7] Bishop A H, Ellar D J. Attempts to culture Pasteuria penetrans in vitro[J]. Biocontrol Science and Technology, 1991, 1: 101-114.
- [8] 郭荣君,刘杏忠,杨怀文.应用根际细菌防治植物寄生线虫的研究[J].中国生物防治,1996,12(3):134-137. (Guo R J, Liu X Z, Yang H Y. Bio-effect of different bacterial strains on root rot pathogens plant-parasitic nematodes [J]. Chinese Journal of Biological Control, 1996, 12(3): 134-137.)
- [9] 方中达.植病研究法[M].北京:农业出版社,1979. (Fang Z D. Method of plant pathology [M]. Beijing: Agricultural Press, 1979.)
- [10] 刘维志.植物线虫学研究技术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1995. (Liu W Z. Method of plant-parasitic nematodes research [M]. Shenyang: Liaoning Science & Technology Press, 1995.)