

一种野生大豆根际土壤细菌的分离及其防治大豆病害的研究

李 铁¹,刘昭军¹,刘丽艳¹,张莉莉¹,成 瑜¹,马启慧²

(¹黑龙江省农业科学院生物技术研究所,黑龙江 哈尔滨 150086;²黑龙江省农业科学院信息中心,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:为筛选拮抗大豆根腐病的土壤微生物,以邻苯二甲酸为唯一碳源培养基,从野生大豆根际土壤中分离获得 1 株细菌,命名为 HK26-21。通过平皿接种以及 16s rDNA 序列扩增,根据其生理生化特征和 16s rDNA (GenBank Accession No. EF032879)序列相似性分析,将该菌株鉴定为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。通过单因素试验法确定了最佳降解条件:温度为 25 ℃,pH 为 7.0,降解速率与接种量呈正相关。平皿微生物对峙试验表明菌株可拮抗大豆菌尖孢镰刀菌和立枯丝核菌。初步认为所分离野生大豆根际芽孢杆菌 HK26-21 可以缓解大豆连作障碍。

关键词:野生大豆;拮抗;大豆连作

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2008)06-1007-03

Isolation of a Bacteria from Wild Soybean Rhizosphere Soil and Its Function to Control Soybean Diseases

LI Tie¹,LIU Zhao-jun¹,LIU Li-yan¹,ZHANG Li-li¹,CHENG Yu¹,MA Qi-hui²

(¹Biotechnology Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences (HAAS), Harbin 150086, Heilongjiang;²Information Institute of HAAS, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract:Through screening edaphon resisting soybean root rot,one bacterial strain was isolated from wild soybean rhizosphere in medium with phthalate as only carbonaceous organic compound. It could digest phthalate and was named HK26-21. Through plate inoculation and 16s rDNA sequence amplification,it was showed that HK26-21 was *Bacillus* according to physiology-biochemistry characteristics and the similarity of 16s rDNA analysis. Through single factor test,the optimal digesting conditions were;temperature 25 ℃,pH 7.0. Digesting rate had positive correlation with the amount of inoculums. Test of colony standoff in plate proved the bacterium could resist soybean pathogenic fungi(*Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*). It was considered that the isolated bacterium from wild soybean rhizosphere could have biological control efficacy against pathogens of soybean root rot.

Key words:*Glycine soja*;Antagonism;Soybean continuous cropping

大豆是黑龙江省重要的粮食作物,种植面积占全国大豆面积的 30%,其中重迎茬面积已接近 50%。据调查研究,重茬减产幅度为 7.2%~38.6%,迎茬减产幅度 4.2%~23.4%^[1]。研究表明大豆连作障碍是由土壤有害微生物、化感物质、大豆胞囊线虫等多种因素综合作用的结果^[2-3]。在上述因素中,大豆根腐病和化感物质是大豆连作障碍的主要限制因子。众多学者从降解化感物质、拮抗病原菌两方面对缓解大豆连作障碍进行了研究,并起到了一定的缓解作用^[4-6]。在大豆根腐病生物防治方面,郭荣君等分离筛选出的芽孢杆菌 BH1 防治由尖孢镰刀菌引起大豆根腐病,在温室防效可达

56.1%^[7],温广月等也报道了生防细菌对大豆根腐病菌有较好的抑制作用和对大豆的促生作用^[8]。

以同连作栽培大豆土壤相似的野生大豆根际土壤为研究对象,从中分离微生物,利用连作大豆土壤中致病化合物(苯、二甲苯、邻苯二甲酸等)为唯一碳源筛选微生物,通过抗菌特性研究,初步确定防治大豆根腐病的效果,为大豆重迎茬病害的生物防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 培养基 基础盐培养基(mg·L⁻¹):NaCl

1.0, NH_4NO_3 1.0; K_2HPO_4 1.5; KH_2PO_4 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1; 水 1 000 mL; pH 值自然, 以邻苯二甲酸为唯一碳源, 浓度视需要添加, LB 培养基。

1.1.2 土样 黑龙江省克山县古北乡原生境的野生大豆苗期根际土和根外土, 采集的土样置无菌塑料袋中, 4℃冷藏备用。

1.2 方法

1.2.1 微生物的分离 将土样磨碎成小颗粒, 混匀, 称取 0.5 g 于富集培养基中(最初邻苯二甲酸的浓度分别为 $30\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 摇床培养 (30° , $150\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 3 d, 重复 3 次, 待培养液出现明显混浊后, 取 5 mL 转入新鲜富集培养基中(培养基中各化感物质浓度逐步提高到 $40\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $50\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $60\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 震荡培养 3 d, 连续驯化富集 4 次^[9-10]。

1.2.2 微生物的鉴定 采用微生物常规鉴定技术结合 16s rDNA 的基因分析对分离微生物进行初步鉴定。进行革兰氏染色, 观测菌体菌落形态, 测试其生理生化特征。扩增筛选菌株 16SrDNA 的保守序列 V3 区, 回收产物并与载体连接后测序, 将测序结果在 GenBank 中比对。

1.2.3 菌株的定植能力及降解条件测试 将筛选菌株分别施入自然土壤与灭菌土壤中, 在一定的温度和湿度条件下进行培养。在黑龙江省农业科学院多年重迎茬大豆田中取土, 过筛后转移到花盆中, 每盆 1 kg。接种筛选菌种, 浓度均为 $10^8\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。将灭菌处理过的大豆种子种植到上述接菌土壤中。在

种植后 7、14、21、28、35、42 d 分别进行平板活菌计数, 测定筛选菌株数量的动态变化^[11]。

在基础盐培养基中分别加入邻苯二甲酸, 接入筛选菌株, 温度设置为 20°C 、 25°C 、 30°C 、 35°C 、 40°C ; pH 值设置为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 定期测定各发酵液的吸光值 ($A_{600\text{nm}}$), 筛选适于邻苯二甲酸降解的最佳温度及 pH 值。

1.2.4 微生物拮抗试验 用无菌移液管吸取 1.0 mL 病原菌液于无菌培养皿中, 倒入溶化的 60°C 琼脂培养基, 轻轻混匀, 取灭菌钢圈 ($\Phi 0.6\text{ cm}$) 嵌入培养基中。其中分别加入 100 μL 筛选菌株发酵提取液于每个钢圈中, 每菌株重复 3 次。将培养皿置恒温培养箱中, 25°C 培养。每日适量添加发酵液, 并测定其抑菌半径, 分别以无菌蒸馏水作对照, 比较抑菌效果。

2 结果与分析

2.1 微生物的分离

筛选出了一株以邻苯二甲酸为唯一碳源的细菌, 命名为 HK26-21。该菌株平皿培养特征为菌落边缘整齐、乳白色, 菌落较平坦, 半透明, 有光泽, 较粘稠, 难挑取。细菌显微镜下观察为杆状。

2.2 菌种鉴定

2.2.1 生理生化特征的观察 通过细菌生理生化指标检测, 结果如表 1 所示。

表1 生理生化试验结果
Tab 1 Results of physiology and biochemistry experiment

菌株 Strain	淀粉水解 Amylohydrolysis	明胶液化 Fluidify glutin	甲基红试验 Methyl red test	革兰氏染色 Gram's staining	V. P. 试验 V. P. test	H ₂ S 产生 H ₂ S produce	硝酸盐还原 Nitrate reduction	好厌氧 Aerobiosis or anaerobic
HK26-22	+	+	-	-	+	-	+	兼性

2.2.2 16s rDNA 基因测序和比对 根据测定的保守序列同 GenBank 中不同细菌类型序列比对, 同时根据表 1 的生理生化特征, 依据《伯杰氏细菌鉴定手册》和《一般细菌常用鉴定方法》的鉴定原则, 结果认为: HK26-21 为芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。

2.3 定植能力测定

接种后前 35 d 菌的数量急剧减少, 后 21 d 基本保持平稳(图 1)。HK26-21 在接种 56 d 后检测数量为 $3.5 \times 10^6\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。HK26-21 接种 35 d 后能在大豆根际相对稳定存在, 保持在 $10^6\text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 的数量级。

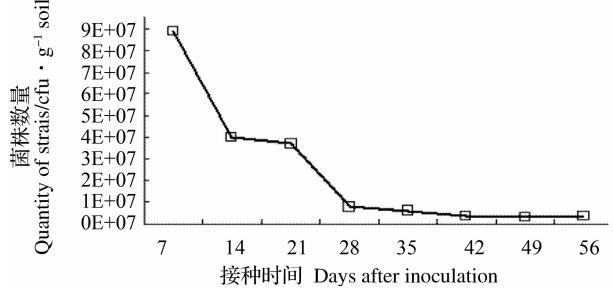


图1 筛选菌株在大豆根际定植能力测试
Fig. 1 Colonization ability assay of screened strains in rhizosphere of *Glycine max*

2.4 降解条件测试

2.4.1 温度对降解的影响 温度筛选结果表明,温度对细菌生长有较大影响。温度过高(35℃)或过低(20℃)基本不生长,最适生长范围为 25~30℃ 之间,其中以 25℃ 左右细菌生长量最大(图 2)。菌株的最适温度高于黑龙江省大豆播种时日平均气温,但接近于日最高气温。

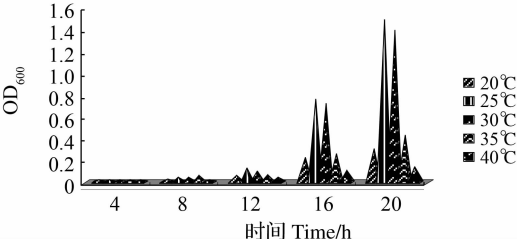


图 2 不同培养温度对 HK26-21 降解邻苯二甲酸的影响
Fig. 2 Effects of culture temperature on degradation of O-phthalic acid by HK26-21

2.4.2 pH 值对降解的影响 pH 值筛选结果表明,发酵液的起始 pH > 9 或 pH < 4 时细菌生长缓慢或不生长,6 < pH < 8 时生长迅速,其中 pH 值为 7 时增殖速度最快(图 3)。

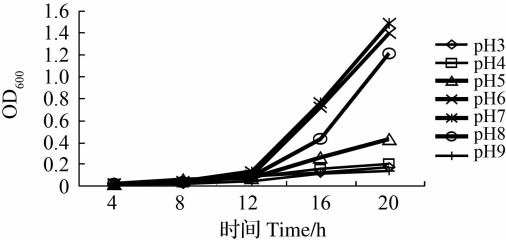


图 3 不同 pH 对 HK26-21 降解邻苯二甲酸的影响
Fig. 3 Effects of pH on degradation of O-phthalic acid by HK26-21

2.5 拮抗能力测试

如图 4 所示, HK26-21 对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 生长表现出明显的抑制效果,抑菌直径达到 Φ33 mm,对尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 具有强烈的拮抗作用,抑菌直径为 Φ42 mm。

3 讨论

根据野生大豆多年在一定区域生活生长,同栽培大豆重迎茬生长存在相似性特点,尝试从野生大豆根际筛选可以降解有害化感物质和拮抗大豆根腐病原菌的菌株,是大豆生物防治的一个新尝试,也是仿生学的很好应用。分离细菌 HK26-21 拮抗大豆根腐病原菌,包括拮抗立枯丝核菌、尖孢镰刀菌的

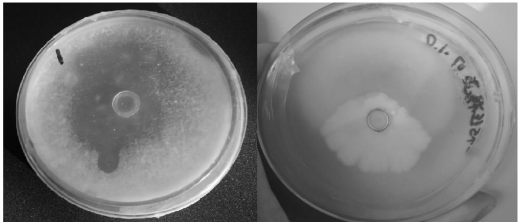


图 4 HK26-21 对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 和尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的拮抗
Fig 4 HK26-21 antagonise against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*

菌株。探索改善重茬大豆根际微生态平衡和抑制病原真菌的生长的新途径,尝试利用微生物降解有害化感物质和抑制根腐病原菌,从双重角度缓解重迎茬大豆的连作障碍。

虽然分离细菌 HK-21 在离体的情况下,可以降解大豆化感物质(邻苯二甲酸)、抑制大豆根腐病原菌,但是还需要采取一定措施使其在大田的环境下能更有效地发挥作用,缓解连作障碍。

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. (Liu P Y. A survey of continuous and every other cropping of soybean in Heilongjiang province[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 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. (Xue F H, Tang S D, Sun D M, et al. The effect of continous and one year intermittent cropping on rhizosphere microbe of soybean[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 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. (He Z H, Liu Z T, Xu Y L, et al. Study on the reason reducing production of soybeans planted continuously and the way to get more output—organic compound of rhizosphere soil[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2003(5): 1-5.)
[4] 王树起, 韩丽梅, 杨振明. 丙二酸和邻苯二甲酸对大豆生长发育的化感效应[J]. 吉林农业科学, 2001, 26(5): 15-19. (Wang S Q, Han L M, Yang Z M. Allelopathy of 1,2-benzennedicarboxylic acid and malonic acid on soybean growth [J]. Jilin Agricultural Sciences, 2001, 26(5): 15-19.)
[5] 湛晓曦, 陈卫良, 李德葆. 357 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. (Chen X X, Chen W L, Li D B. The antagonistic activities of both bacillus cereus 357 and its antagonistic substance against botyitis cinerea pers. and rhizoctonia solani[J]. Microbiology, 2003, 30(3): 67-71.)

高,分析原因大致有两种情况:第一种情况是独角莲球根茎中起触杀作用的活性物质极易溶于乙醇且浸提量较多或者是在乙醇中保持较好的稳定性;第二种情况是独角莲球根茎中含有多种具有触杀活性的不同物质,其各自的触杀作用机理不同,触杀活性物质表现的快慢不同,随着时间的延长均表现出的触杀作用。乙醚浸提液和水蒸汽蒸馏提取液对大豆蚜虫的触杀作用表现不明显,可能是具有触杀活性的物质在乙醚和水蒸汽蒸馏液中含量少导致现象不显著。也可能是乙醚浸提液和水蒸汽蒸馏液中的拒食活性物质较乙醇浸提液中的拒食活性物质易被大豆蚜虫产生抗药免疫力等原因。

在拒食试验中,仅水蒸汽蒸馏提取液有显著效果,说明独角莲球根茎中具有拒食作用的生物活性物质能通过水蒸汽蒸馏出来。从48 h的拒食活性分析和表2看出,水蒸汽蒸馏液仍然保持着显著的拒食效果。24 h和48 h的水蒸汽蒸馏液拒食中浓度 AFC_{50} 值分别为8.66、7.93 $mg \cdot mL^{-1}$,且48 h的拒食率都高于24 h,这可能是独角莲球茎根中含有多种具有拒食的活性物质,只是作用的快慢有差异而已。也可能是乙醇浸提液和乙醚浸提液中的拒食活性物质含量少导致不显著,还有可能是乙醇和乙醚浸提液中的拒食活性物质较水蒸汽蒸馏液中的拒食活性物质易被大豆蚜虫产生抗药免疫力等原因。同时,应用均匀设计法初步筛选了独角莲球根茎的乙醇浸提液和水蒸汽蒸馏液对大豆蚜虫触杀和拒食的活性浓度,结果表明,独角莲球根茎乙醇浸提液24.1545 $mg \cdot mL^{-1}$,水蒸汽蒸馏液23.014 $mg \cdot mL^{-1}$,对大豆蚜虫同时具有显著的触杀和拒食活

性,60 h的死亡率达100%。目前,国内外利用植物防治病虫害的研究和报道较多^[3-7],但犁头尖属植物对杀虫生物活性的研究未见报道。此研究结果为利用独角莲进一步研究和开发新型的植物源农药可能有一定的参考价值。

参考文献

[1] 方开泰. 均匀设计—数论方法在试验设计的应用[J]. 应用数学学报,1980,3(4):363-372. (Fang K T. Application of Uniform Design-number theoretic method in trial design[J]. Acta Mathematicae Applicatae Sinica,1980,3(4):363-372.)

[2] 王万能,全学军,陆天健. 均匀设计超声波提取豆粕异黄酮的研究[J]. 生物数学学报,2007,22(1):153-156. (Wang W N, Quan X J, Lu T J. Research on the extraction of isoflavones from soy residue with Uniform Design[J]. Journal of Biomathematics, 2007,22(1):153-156.)

[3] Kim S I, Roh J Y, Kim D H, et al. Insecticidal activities of aromatic plant extracts and essential oils against *Sitophilus oryzae* and *Callosobruchus chinensis* [J]. Journal of Stored Products Research, 2003,39:293-303.

[4] Broadway R M, Duffey S S. Plant proteinase inhibitors: Mechanism of action and effect on the growth and digestive physiology of Larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exiqua* [J]. Insect Physiology, 1986, 32(10):827-833.

[5] Klock J A, Hum Y, Chiu S F. Grayanoid diterpene insect antifeedants and insecticides from *Rhododendron molle* [J]. Phytochemistry, 1991,30(6):1797-1800.

[6] Miyazawa M, Tsukamoto T, Anzai J, et al. Insecticidal effect of phthalides and furanocoumarins from *Angelica acutiloba* against *Drosophila melanogaster* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004,52(14):4401-4405.

[7] Wu W J, Wang M A, Zhu J B, et al. Five new insecticidal sesquiterpenoid from *Celastrus angulatus* [J]. Journal of Natural Products, 2001,64(3):364-367.

(上接第1009页)

[6] 胡春江,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,2002,13(9):1095-1098. (Hu C J, Xue D L, Wang S J, et al. Obstacles of soybean continuous cropping Ⅲ. Mechanism of soybean yield increment by marine actinomycetes MB-97[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2002,13(9):1095-1098.)

[7] 郭荣君,刘杏忠,杨怀文,等. 芽孢杆菌BH1防治大豆根腐病的效果及机制[J]. 中国生物防治,2003,19(4):180-184. (Guo R J, Liu X Z, Yang H W, et al. Mechanism of rhizobacteria BH1 (*Bacillus* sp.) to suppress soybean root rot disease caused by fusarium spp[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2003, 19(4):180-184.)

[8] 温广月,许艳丽,李春杰,等. 6株生防细菌对大豆根腐病防治效果初步评价[J]. 大豆科学,2005,24(2):121-125. (Wen G Y, Xu Y L, Li C J, et al. Evaluation of six potential biocontrol against soybean root rot [J]. Soybean Science, 2005, 24(2):121-125.)

[9] 李淑彬,刘玉焕,刘芳,等. 降解甲胺磷农药高效菌株的筛选[J]. 湘潭师范学院学报,1998,19(3):60-64. (Li S B, Liu Y H, Liu F, et al. Screening of highly efficient bacteria of degrading methamidophos-pesticide[J]. Journal of Xiangtan Normal University, 1998,19(3):60-64.)

[10] 张忠辉,洪青,张国顺,等. 杀螟硫磷降解菌FDS-1的分离鉴定及其降解特性[J]. 中国环境科学,2005,25(1):52-56. (Zhang Z H, Hong Q, Zhang G S, et al. Identification and characterization of FDS-1 [J]. China Environmental Science, 2005, 25(1):52-56.)

[11] 李文鹏,吴颖运,张克勤. 一种简便的冻冻样芽孢杆菌(*Bacillus mucilaginosus*)定向驯育及保藏方法[J]. 土壤通报,2003,34(6):602-604. (Li W P, Wu Y Y, Zhang K Q. A simple and convenient method for directive breeding and preservation of *Bacillus mucilaginosus* [J]. Chinese Journal of Soil Science, 2003,34(6):602-604.)