

生物拌种剂防治大豆根腐病效果和机制

张淑梅,王玉霞,赵晓宇,张先成,孟利强,李晶

(黑龙江省科学院微生物研究所,黑龙江 哈尔滨 150010)

摘要:大豆根腐病是黑龙江大豆产区的主要根部病害,其病原菌主要为 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vedolens*。枯草芽孢杆菌 B29 对大豆根腐病菌具有较强的抑制作用,将枯草芽孢杆菌 B29 菌液和一些营养因子等复配成生物拌种剂,通过室内抑菌试验、田间小区试验和 PCR-DGGE 技术对生物拌种剂对大豆根腐病菌 *F. oxysporum* f. sp. *vedolens* 的抑菌活性和生防机理进行了研究。结果表明:生物拌种剂对大豆根腐病菌孢子萌发和菌丝生长具有较强的抑制作用,抑制率与拌种剂浓度呈正相关,原液和 10 倍稀释液抑制率均达 93% 以上,1000 倍稀释液的抑制率为 75%; 拌种剂处理大豆后大豆苗期体内与抗性反应相关的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性明显增强;拌种剂中的生防菌能够在大豆根际土壤中定殖,对根际土壤微生物种群数量未造成影响。田间小区试验显示生物拌种剂对大豆根腐病的苗期防效达 60% 以上。

关键词:大豆;生物拌种剂;镰刀菌根腐病;防治机制

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)05-0863-06

Efficacy and Mechanism of Biological Seed Coating Agent Against Soybean Root Rot Disease Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vedolens*

ZHANG Shu-mei, WANG Yu-xia, ZHAO Xiao-yu, ZHANG Xian-cheng, MENG Li-qiang, LI Jing

(Institute of Microbiology of Heilongjiang Academy of Science, Harbin 150010, Heilongjiang, China)

Abstract: The soybean root rot is a kind of main fungal disease in Heilongjiang province. It was mainly caused by *F. oxysporum* f. sp. *Vedolens*. *Bacillus subtilis* B29 could inhibit the growth of *F. oxysporum* f. sp. *vedolens*. In this study, we researched the efficacy and mechanism of biological seed coating agent against soybean root rot disease caused by *F. oxysporum* f. sp. *vedolens* by the method of mycelia growth, dual culture, spore germination, microscope inspection, field trail and PCR-DGGE. The results indicated that biological seed coating agent could inhibit the growth of *F. oxysporum* f. sp. *vedolens*, distort the mycelia and spore and enhance the enzyme activities of POD, PPO and PAL in soybean root. The biocontrol bacteria could reside in rhizosphere of soybean and did not effect on the population of soil microbes. The efficacy of seed coating agent against soybean root rot disease was over 60% in field trail.

Key words: Soybean; Biological seed coating agent; *F. oxysporum* f. sp. *vedolens*; Mechanism of antifungi

大豆根腐病是一种世界性土传真菌病害,发生普遍且难以根治^[1]。黑龙江省是我国大豆主产区,由于常年连作,大豆根腐病尤为严重,常年发病率 10%~30%,造成产量下降和经济损失^[2]。引起大豆根腐病的主要病原菌是 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vedolens*,其菌丝体和孢子可以在土壤中长期存活,由于连作障碍病菌逐年累积^[3-4]。目前生产上主要依靠化学种衣剂进行防治^[5],然而,化学药剂的病菌抗药性、毒性和环境污染问题日益突出,成为制约

农业可持续发展的主要障碍^[6-8],生防微生物具有环境兼容性好、无毒无害的优点,是化学药剂的理想替代品^[9-10]。因此,用生物防治的方法防治大豆根腐病对实现农业的可持续发展具有重要意义。前人对芽孢杆菌防治蔬菜和作物真菌病害的效果和机制进行过探索,如郭荣军等研究表明分离于大豆根际的芽孢杆菌 BH1 在温室和田间试验上表现出对由 *F. oxysporum* 引起的根腐病具有很好的防治效果,该菌株的发酵液对病菌菌丝生长和孢子萌发有抑制作

收稿日期:2009-04-09

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAD21B01-13);黑龙江省重点资助项目(GB04B717-04)。

作者简介:张淑梅(1969-),女,研究员,研究方向为农业微生物学。E-mail:zsmhlj@yahoo.com.cn。

通讯作者:李晶,研究员。E-mail:lj0706@sohu.com。

用,该菌株能够定植于大豆根系,主要通过营养和空间位点竞争和拮抗机制发挥防病作用^[11]。穆常青等研究表明枯草芽孢杆菌 B-322 能够抑制水稻稻瘟病菌孢子萌发,使孢子芽管和成熟菌丝呈球畸形^[12]。李德全等研究表明,枯草芽孢杆菌 Bs-916 能够提高水稻植株体内 POD、PPO 和 SOD 酶活性,对水稻具有诱导抗病性作用^[13]。迄今为止,将以生防细菌为主,复配大豆生长所需的营养物质制成药肥双效拌种剂,以包衣方式防治大豆根腐病并对其防病机制进行研究还鲜见报道。研究采用一系列生物学技术,旨在揭示生物拌种剂对大豆根腐病的离体和活体防效,生防菌在大豆植株根部定殖情况和能否诱导植株抗病性,为生物拌种剂的田间应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养基

枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* B29 和大豆根腐病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vedolens* 由黑龙江省科学院微生物研究所分离并保存。枯草芽孢杆菌用 NYD 培养基培养,冷冻菌种经斜面活化后,接种一环在内装 50mL NYD 培养液的 250 mL 三角瓶中,37℃,200 r·min⁻¹ 摇瓶过夜培养,按 3% 接种量转接于内装 150 mL NYD 培养液的 500 mL 三角瓶中,37℃,200 r·min⁻¹ 摇瓶培养 48 h 备用。

大豆根腐病菌用 PDA 培养基在 28℃ 培养 7 d,得到菌丝体,用 PD 液体培养基于 28℃ 培养 15 d,用灭菌纱布过滤除菌丝,得到孢子悬液。

1.2 生物拌种剂制备

将枯草芽孢杆菌发酵液复配微量元素、营养因子、成膜剂和警戒色等配制成液体悬浮剂,使枯草芽孢杆菌含量达到 2 亿·mL⁻¹ 活芽孢。

1.3 试剂

化学药品均为化学分析纯。

1.4 生物拌种剂对菌丝生长的影响

采用生长速率法,将生物拌种剂原液及其 10、50、100 和 1000 倍稀释液分别与 PDA 培养基混匀倒平板。以无菌水为对照,在平板中心接种直径 5 mm 的病原菌丝块,每个处理设 3 次重复。分别在 3、7、9 d 跟踪测量菌落直径,计算抑制效果。

1.5 生物拌种剂对孢子萌发的影响

将与前述同样稀释倍数的生物拌种剂 50 μL,分别与孢子悬液(2 × 10⁵ 孢子·mL) 50 μL 和 50 μL

PD 液体培养液加到 96 孔培养板中,每处理 3 次重复,以灭菌水为对照。28℃ 培养,在 12 h 时用显微镜观察孢子萌发和孢子畸变情况。

1.6 菌丝畸形测定

采用对峙培养方法,在发生抑制作用的病菌菌落边缘取样,镜检。

1.7 生物拌种剂对大豆根腐病苗期防治效果

大豆种子为合丰 25,试验地在生物工程中心实验田,采用大区对比方法,共设 4 个处理,(T1)用生物拌种剂以 1:70 拌种后播种,于第 1 片三出复叶期在植株根部接种病原菌孢子悬液(2 × 10⁵ 孢子·mL) 5 mL;(T2)用生物拌种剂以 1:70 拌种后播种;(T3)裸种播种,第 1 片三出复叶期在植株根部接种病原菌孢子悬液(2 × 10⁵ 孢子·mL) 5 mL;(T4)裸种播种,不接病原菌。接种病原菌后 1、3、7、14、21 d 分别取根部样品,放入塑料袋中置于 -70℃ 冰柜中保存,用于测定酶活;在出苗后 35 d 取样,测定根腐病发生情况。每个处理播种 200 粒种子,重复 3 次。

1.8 生物拌种剂对大豆部分防御酶活性的影响

参照刘邈洲等^[14]方法提取和测定苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性。

1.9 土壤微生物 DNA 提取

参照 Zhou 方法^[15]在大豆第 1 片三出复叶期提取生物拌种剂包衣组 and 对照组根系土壤微生物 DNA。

1.10 PCR-DGGE 分析

采用对大多数细菌的 16S rRNA 基因 V3 区具有特异性的引物对 F357GC 和 R518^[16]。参照 Zwart 等的方法^[17]采用降落 PCR 策略扩增细菌 V3 可变区基因,按照邢德峰等的方法^[18]进行 DGGE 电泳。

2 结果与分析

2.1 生物拌种剂对大豆根腐病菌菌丝生长和菌丝形态的影响

结果表明,生物拌种剂可以有效抑制大豆根腐病菌菌丝生长,抑制率随着稀释度增加而降低,原液和 10 倍稀释液的抑制率差异不显著;50 倍和 100 倍稀释液抑制率差异显著;100 倍和 1 000 倍稀释液抑制率差异不显著。拌种剂中起抗菌作用的主要活性成份是枯草芽孢杆菌,菌数含量与抑菌率成正比,原液中枯草芽孢杆菌数最多为 2 × 10⁸ cfu·mL⁻¹,因

此抑菌率最高,1 000 倍稀释液中枯草芽孢杆菌数最少为 2×10^5 cfu · mL⁻¹, 因此抑菌率最低。使用时,每粒大豆种子上包裹的菌数为 $10^6 \sim 10^7$ 个,该菌数对大豆根腐病菌菌丝生长抑制率达到 79% 以上(表 1)。显微镜检测可见,对照组菌丝饱满,粗细均匀,

细胞壁光滑,原生质均匀;处理组菌丝形态发生很大变化,菌丝扭曲变形,局部膨大,细胞壁不光滑,原生质收缩,内容物不均匀,细胞壁不规则,模糊不清,局部发生溶壁现象,内容物外渗(图 1、2)。

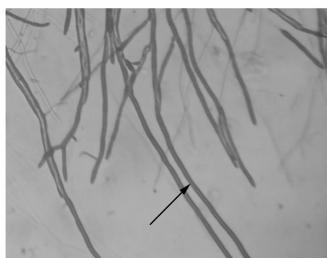
表 1 生物种衣剂对大豆根腐病菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Effect of biological seed coating agent on mycelia growth of *F. oxysporum* f. sp. *vedolens*

稀释倍数 Dilution times	菌落直径 Diameters of colony/mm			抑制率 Inhibitory rate/%		
	3 d	7 d	9 d	3 d	7 d	9 d
0	0.15 ± 0.05	0.34 ± 0.08	0.40 ± 0.09	96.45A	95.78A	95.42A
10	0.25 ± 0.02	0.56 ± 0.10	0.58 ± 0.07	94.12A	93.05A	93.05A
50	0.50 ± 0.11	0.98 ± 0.02	1.09 ± 0.07	88.32B	87.65B	87.54B
100	0.83 ± 0.06	1.32 ± 0.09	1.75 ± 0.11	80.43C	80.01C	79.96CD
1000	1.03 ± 0.06	1.95 ± 0.12	2.17 ± 0.06	75.67CD	75.42CD	74.96CD
ck	4.20 ± 0.02	7.92 ± 0.08	8.73 ± 0.05			

表中数据均为 3 次重复结果,采用 SPSS13.0 软件进行差异显著性分析, $P=0.05$ 。

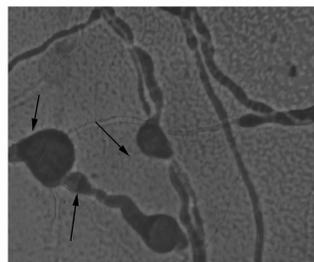
Data are the mean of three replicates. Significant difference were analyzed using SPSS13.0 statistical analysis software.



箭头所示为正常菌丝
Arrow: Normal hypha

图 1 正常 *F. oxysporum* f. sp. *vedolens* 菌丝(×100)

Fig. 1 Hypha of normal *F. oxysporum* f. sp. *vedolens* (×100)



箭头所示畸形菌丝
Arrow: Abnormal hypha

图 2 异常 *F. oxysporum* f. sp. *vedolens* 菌丝(×100)

Fig. 2 Hypha of abnormal *F. oxysporum* f. sp. *vedolens* (×100)

2.2 生物拌种剂对大豆根腐病菌孢子萌发的抑制作用

生物拌种剂可以抑制大豆根腐病菌孢子萌发,抑制率随稀释度增加而降低(图 3),显微镜检测可见生物拌种剂处理后,孢子萌发时芽管顶端成球畸形(图 4、5),不能形成正常菌丝体。生物拌种剂中的主

要活性成分是枯草芽孢杆菌 B29 发酵液,该发酵液中含有多肽类抗菌物质,该物质具有抑制孢子萌发和使孢子畸形的作用。抗菌物质浓度影响病菌孢子萌发率,原液中该物质浓度最大,孢子萌发率最低。

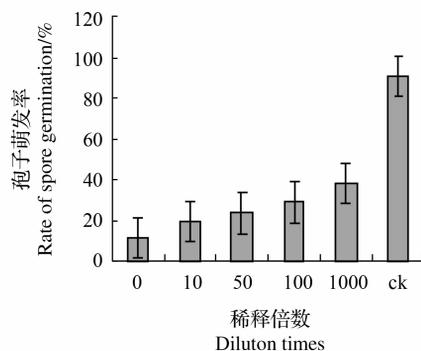


图 3 生物拌种剂对大豆根腐病菌孢子萌发的影响

Fig. 3 Effect of biological seed coating agent on spore germination of *F. oxysporum* f. sp. *vedolens*

正常萌发的孢子
Normal spore
F. oxysporum 孢子(×100)
Spore of *F. oxysporum* f. sp. *vedolens*(×100)



箭头所示为异常萌发孢子芽管顶端膨大

Arrow: Abnormal germinating spore

图5 异常 *F. oxysporum* f. sp. *vedolens* 孢子 ($\times 100$)

Fig. 5 Abnormal germinated spore of *F. oxysporum* f. sp. *vedolens* ($\times 100$)

2.3 生物拌种剂对大豆根腐病苗期防治效果

结果表明,对照组人工接种病原菌的发病率和病情指数均高于自然感病组;生物拌种剂处理组,人工接种病原菌的发病率和病情指数略高于自然感病组,两者对大豆根腐病的防效均达 60% 以上,差异不显著(表 2)。

2.4 生物拌种剂对大豆苗根部防御酶活性的影响

2.4.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性变化 人工接种病菌生物拌种剂处理组和人工接病菌对照组大豆苗期根系 PAL 活性变化规律相似,均在接种病菌第 3 天出现活性高峰,之后下降,第 21 天接近接种前水平,前者 PAL 活性始终高于后者,接种病原菌第 3 天前者是后者的 2.4 倍,是对照组的 5.5 倍;自然感病生物拌种剂处理组 PAL 活性变化平稳;对照组 PAL 活性几乎不变。生物拌种剂能提高大豆苗期根系 PAL 活性,接种病原菌能够在短期内刺激 PAL 活性增强,之后迅速下降到接种前水平(图 6)。

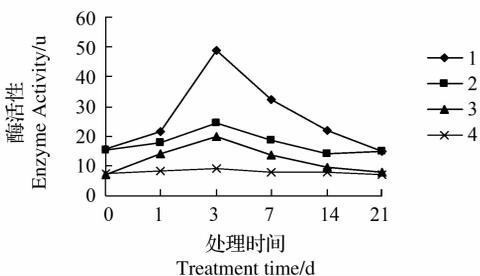


图6 生物拌种剂对大豆苗期根系 PAL 的影响

Fig. 6 Change of PAL activity in soybean seedling root

2.5.2 过氧化物酶活性变化 人工接种病菌生物拌种剂处理组和人工接种病菌对照组大豆苗期根系 POD 活性变化规律相似,均在接病菌第 3 天出现活性高峰,之后下降,第 21 天接近接种前水平,前者

表 2 生物拌种剂对大豆根腐病苗期防治效果

Table 2 Effect of biological seed coating on *F. oxysporum* f. sp. *vedolens* on soybean

处理 Treatment	调查株数 The number of plant				
	0 级 Grade0	1 级 Grade2	3 级 Grade3	5 级 Grade5	7 级 Grade
T1	86	0	1	4	9
T2	88	3	2	3	4
T3	48	1	8	11	22
T4	82	0	0	2	16

表中数据均为 3 次重复结果,采用 SPSS13.0 软件进行差异显著性分析, $P=0.05$

Data are the mean of three replicates. Significant difference were analyzed using SPSS13.0 statistical analysis software.

POD 活性始终高于后者,接种病原菌第 3 天前者是后者的 1.5 倍,是对照的 2.7 倍;自然感病生物拌种剂包衣组 POD 活性变化平稳,只是在接种病菌第 7 天有所提高;对照组 POD 活性几乎不变。生物拌种剂能提高大豆苗期根系 POD 活性,接种病原菌能够在短期内刺激 POD 活性增强,之后迅速下降到接种前水平(图 7)。

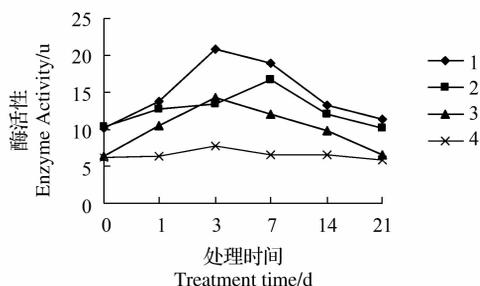


图7 生物拌种剂对大豆苗期根系 POD 的影响

Fig. 7 Change of POD activity in soybean seedling root

2.5.3 多酚氧化酶活性变化 人工接病菌生物拌种剂处理组和人工接病菌对照组大豆苗期根系 PPO 活性变化规律相似,均在接病菌第 3 天出现活性高峰,之后下降,第 14 天接近接种前水平,前者 PPO 活性始终高于后者,接种病原菌第 3 天前者是后者的 2.1 倍,是对照的 3.3 倍;自然感病生物拌种剂处理组 PPO 活性略有波动,在第 3 天和第 14 天略高;对照组 PPO 活性几乎不变。生物拌种剂能提高大豆苗期根系 PPO 活性,接种病原菌能够在短期内刺激 PPO 活性增强,之后迅速下降到接种前水平(图 8)。

2.5 生防菌在大豆根系土壤中的定殖

从包衣组和对照组大豆根系土壤中提取细菌 DNA,用细菌 V3 可变区引物进行 PCR 扩增,结果如

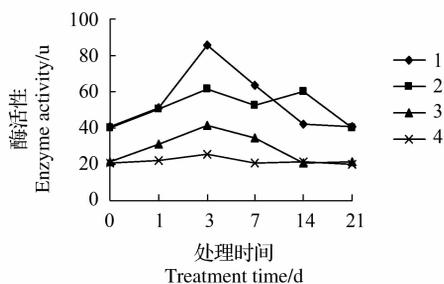
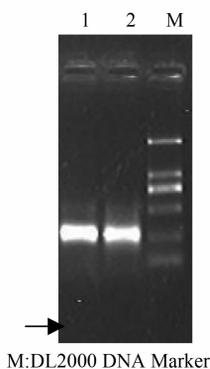


图8 生物拌种剂对大豆苗期根系 PPO 的影响

Fig. 8 Change of PPO activity in soybean seedling root

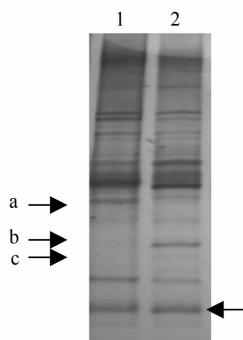
图10,在250 bp处均有明亮的DNA条带,用Agarose Gel DNA Fragment Recovery Kit Ver. 2.0(大连宝生物工程有有限公司)从凝胶中回收DNA,进行DGGE电泳分析,如图10所示,包衣组除了比对照组多一条DNA条带外,其余DNA条带数量与对照组相似,说明生防菌能够定殖于大豆根际,引入生防菌后未造成土壤微生物种群数量的明显变化,但对个别微生物的数量有一定影响,b和c所示的微生物数量在对照组多于包衣组,a所示的微生物数量在包衣组多于对照组。



1和2分别是包衣组和空白对照组大豆根系土壤
1: Rhizosphere soil of soybean root in treatment group
2: Rhizosphere soil of soybean root in control group

图9 16S rDNA V3区扩增结果

Fig. 9 Result of V3 region PCR amplification



1和2分别是空白对照组和包衣组大豆根系土壤

1: Rhizosphere soil of soybean root in control group

2: Rhizosphere soil of soybean root in treatment group

图10 大豆根际细菌菌群变化 DGGE 图谱

Fig. 10 DGGE pattern of bacteria in soybean rhizosphere

3 讨论

种子包衣处理是防治大豆苗期根腐病最有效和最方便的方法,用生物拌种剂逐步替代化学种衣剂是发展趋势。研究表明,在人工接种病原菌和自然感病状态下生物拌种剂对大豆根腐病的田间小区防效均达60%以上,该防治效果低于温广月的报道,高于王士强的报道。其原因主要是不同来源的生防菌株的生防活性存在差异。温广月等人从大豆根际获得6株生防菌,其中1株菌的田间小区试验表明对大豆根腐病的防效最高达65%^[19]。王士强等将芽孢杆菌、假单胞菌和木霉菌进行不同组合制成4种生物制剂,采用种子包衣方法对大豆根腐病的田间小区防效达50%^[2]。

利用生防细菌或其代谢产物调控寄主植物根际周围有害微生物的平衡从而达到控病保产的目的,是防治土传病害的重要途径。在生防菌株的筛选上,考虑到植物与微生物之间的相互作用关系,把生防菌株的来源重点放在植物根表面或根际土壤,这样筛选出的微生物接种后,在根表面具有很好的定殖能力^[20]。生物拌种剂中的枯草芽孢杆菌B29是从黄瓜根际土壤中获得的,该文采用PCR-DGGE技术验证该菌株在大豆根际是否能够有效定殖和引入生防菌后能否对大豆根际土壤微生物种群数量造成影响。DGGE条带数目近似体现细菌种群数量,条带的亮度和宽度反映该种细菌的多寡^[21],据此看来,生防菌可以在大豆根际土壤中定殖并占优势地位,引入生防菌未造成土壤菌群大量丢失,菌群构成仍较稳定。目前研究生防菌定殖最常用的方法是抗

生素标记法^[22],该方法虽然能够定量描述生防菌定殖数量,但不能描述生防菌对土壤微生态的影响,采用的 PCR-DGGE 技术可以同时完成生防菌的定殖和对土壤微生物种群数量影响的研究。

枯草芽孢杆菌生防机制主要包括营养和空间位点竞争、拮抗、分泌抗菌物质、溶菌作用和诱导植物抗病性^[23]。不同菌株的作用机理各不相同,有些菌株的防病作用仅依赖于一种机理,而有些菌株则通过多种作用方式协同作用达到防病效果。研究表明,生物拌种剂同时具有枯草芽孢杆菌的多种防病机制。对峙培养和孢子萌发试验表明生物拌种剂中含有细菌分泌的抗菌物质,起到溶解细胞壁,造成原生质泄漏使菌丝断裂或畸形和使孢子萌发畸形的作用;定殖试验表明包裹于大豆种子上的生防菌能够占据有利生态位,在大豆根部定殖。PAL、PPO 和 POD 是与植物抗病性相关的关键酶,PAL 是酚类物质、植霉素和木质素合成的关键酶,POD 和 PPO 能够催化酚类物质氧化,生物拌种剂可以增强大豆苗期根系内与植物抗病性有关的物质代谢,提高 PAL、PPO 和 POD 活性,使大豆根系细胞壁屏障作用增强,使病原菌入侵受阻。

4 结论

生物拌种剂具有药肥双效功能,起抗病作用的主要成分是枯草芽孢杆菌及其代谢产物,其它辅助成分具有营养、促生、缓释和保水等作用。可以为菌株定殖、繁殖和存活,为大豆植株健康生长提供充足养分。

生物拌种剂中的生防菌能够在大豆根部土壤中成功定殖,对土壤中微生物种群数量的影响不大;生物拌种剂能够显著提高根系中 PAL、POD 和 PPO 酶活性,具有间接诱导大豆抗病性作用。

生物拌种剂在离体和活体条件下均能有效抑制大豆根腐病菌,通过抑制病菌菌丝生长、使菌丝和孢子畸形、诱导植株抗病性和生防菌成功定殖于根系 4 种机制协同发挥生防作用,对大豆根腐病的田间小区防效达 60% 以上。

参考文献

[1] 付春旭. 大豆根腐病的发生及综合防治[J]. 大豆通报,2006, 5:13-15. (Fu C X. Occurrence of soybean root rot disease and its comprehensive control strategy [J]. Soybean Bulletin, 2006, 5: 13-15.)

[2] 王士强,洪音,王伟利,等. 不同生物制剂对大豆根腐病的防效及生理机制的研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2008,20(1):20-23. (Wang S Q, Hong Y, Wang W L, et al. Study of difference biological reagents on the antagonism of soybean root rot and the physiological mechanism [J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2008, 20(1): 20-23.)

[3] 李宝英,马淑梅. 大豆根腐病原菌种类及抗原筛选[J]. 植物保护学报,2000,27(1):91-92. (Li B Y, Ma S M. Pathogens of soybean root rot and screening of resistant sources [J]. Journal of Plant Protection, 2000, 27(1): 91-92.)

[4] 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. (Han Q X, Xin H P. A preliminary study on the pathogenicity of the main pathogens causing soybean seedling root rot [J]. Soybean Science, 1990, 9(2): 157-162.)

[5] 侯德安. 大豆根腐病重发原因及防治对策[J]. 种子世界, 2004, 5:45. (Hou D A. Occurrence of soybean root rot disease and its control strategy [J]. Seed World, 2004, 5: 45.)

[6] Cook R J, Bruckart W L, Coulson J R. Safety of microorganisms intended for pest and plant disease control: a framework for scientific evaluation [J]. Biological Control, 1996, 7: 333-351.

[7] Emmert A B E, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 171(1): 1-9.

[8] Khan M R, Fischer S, Egan D. Biological control of *Fusarium* seedling blight disease of wheat and barley [J]. Phytopathology, 2006, 96(4): 386-394.

[9] Brian B, Gardener M. Biological control of plant pathogens: Research, commercialization, and application in the USA. APSnet feature [M]. Biological Control of Plant Pathogens, 2002.

[10] Ei-Tarabily K A, Soliman M H, Nassar A H. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes [J]. Plant Pathology, 2000, 49: 573-583.

[11] 郭荣君,刘杏忠,杨怀文,等. 芽孢杆菌 BHI 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 BHI (*Bacillus* spp.) to suppress soybean root rot disease caused by *Fusarium* spp [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2003, 19(4): 180-184.)

[12] 穆常青,潘玮,陆庆光,等. 枯草芽孢杆菌对稻瘟病的防治效果评价及机制初探[J]. 中国生物防治,2006,22(2):158-160. (Mu C Q, Pan W, Lu Q G, et al. Inhibitory action *Bacillus subtilis* strain B-322 against *Magnaporthe grisea* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006, 22(2): 158-160.)

[13] 李德全,陈志谊,聂涯锋. 生防菌 BS-916 及突变菌株抗菌物质及其对水稻抗性诱导作用的研究[J]. 植物病理学报,2008, 38(2):192-198. (Li D Q, Chen Z Y, Nie Y F. Antifungal substances produced by a high-yielding mutant of Bs-916 and their effects inducing resistance on rice plant [J]. ACTA Phytopathologica Sinica, 2008, 38(2): 192-198.)

- [21] 陈立杰,梁文举,段玉玺,等.施用生防颗粒剂对大豆田土壤线虫群落结构和生物多样性的影响[J].大豆科学,2003,22(4):251-256. (Chen L J,Liang W J,Duan Y X,et al. Effects of bio-nematicide on community structure and bio-diversity of soil nematodes in soybean field [J]. Soybean Science,2003,22(4):251-256.)
- [22] 阮维斌,王敬国,张福锁.根际微生态系统中的大豆胞囊线虫[J].植物病理学报,2002,32(3):200-204. (Ruan W B,Wang J G,Zhang F S. The soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) in Rhizosphere micro-ecologic system[J]. Acta Phytopathologica Sinica,2002,32(3):200-204.)
- [23] 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. Research technology of plant nematode[M]. Shenyang:Liaoning Science and Technology Press,1995.)
- [24] Yin W Y. Pictorial keys to soil animals of China[M]. Beijing: Science Press,1998,51-59.
- [25] 孙志高,刘景双,李新华.三江平原不同土地利用方式下土壤氮库的变化特征[J].农业系统科学与综合研究,2008,24(3):270-274. (Sun Z G,Liu J S,Li X H. Changes of nitrogen storage in soil under different land uses in the Sanjiang Plain[J]. System Sciences and Comprehensive Studies In Agriculture,2008,24(3):270-274.)
- [26] 冯志新.植物线虫学[M].北京:中国农业出版社,2000. (Feng Z X. Plant nematology [M]. Beijing: China Agriculture Press,2000.)
- [27] 赵映霞,刘奇志,曹志平,等.培肥措施对植物线虫种群数量动态的影响[J].植物保护,2003,(6) 231-239. (Zhao Y X,Liu Q Z,Cao Z P,et al. Effect of fertilization on population dynamic of plant-parasite nematode [J]. Plant Protection, 2003, (6) 231-239.)
- [28] 宋春雨,张兴义,刘晓冰,等.土壤有机质对土壤肥力与作物生产力的影响[J].农业系统科学与综合研究,2008,24(3):357-362. (Song C Y,Zhang X Y,Liu X B,et al. Effect of soil organic matter on soil fertility and crop productivity[J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture, 2008, 24 (3) : 357-362.)
- [29] 韩新华,许艳丽.线虫对环境胁迫适应机制[J].农业系统科学与综合研究,2008,24(2):205-207. (Han X H,Xu Y L. Adaptation strategies of nematodes to environmental stresses[J]. System Sciences and Comprehensive Studies in Agriculture,2008,24(2):205-207.)

(上接第 868 页)

- [14] 刘卮洲,陈志谊,刘永峰,等.拮抗菌株 C8-8 控病促生作用机制初探[J].中国生物防治,2007,23(4):397-400. (Liu Y Z, Chen Z Y, Liu Y F, et al. Mechanisms of diseases control and growth promotion with biocontrol strain C8-8[J]. Chinese Journal of Biological Control,2007,23(4):397-400.)
- [15] Zhou J, Mary B. James M T. DNA recovery from soils of diverse composition [J]. Applied Environmental Microbiology, 1992, 62: 316-322.
- [16] Muyzer G, Ellen C W, Andre G U. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction genes coding for 16S rRNA[J]. Applied Environmental Microbiology, 1993, 59: 695-700.
- [17] Zwart G, Huisman R, Agterveld M P. Divergent members of the bacterial division *Verrucomicrobiales* in a temperate freshwater lake [J]. FEMS Microbiology Ecology, 1998, 25: 159-169.
- [18] 邢德峰,任南琪,宋佳秀,等.不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响[J].环境科学,2006,27(7):1424-1428. (Xing D F, Ren N Q, Song J X, et al. Community of activated sludge based on different targeted sequence of 16S rDNA by denaturing gradient gel electrophoresis [J]. Environment Science, 2006, 27(7): 1424-1428.)
- [19] 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 agents against soybean root rot[J]. Soybean Science, 2005, 24(2): 121-125.)
- [20] 刘海龙,李春杰,许艳丽.生防细菌的抑菌谱和对大豆根腐病的防治[J].大豆通报,2008,1:10-13. (Liu H L, Li C J, Xu Y L. Antagonistic spectrum of biocontrol bacteria and inhibition to soybean root rot[J]. Soybean Bulletin, 2008, 1: 10-13.)
- [21] Hu Y S, Wu K, Liu N, et al. Dynamics of microbial communities in bulk and developing cucumber rhizosphere soil [J]. Agricultural Sciences in China, 2004, 3(5): 376-383.
- [22] 张炳欣,张平.植物根围外来微生物定殖的检测方法[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(6):624-628. (Zhang B X, Zhang P. Detection of introduced microorganisms to rhizosphere[J]. Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2000, 26(6): 624-628.)
- [23] 黄海婵,裘娟萍.枯草芽孢杆菌防治植物病害的研究进展[J].浙江农业科学,2005,3:213-215. (Huang H C, Qiu J P. Advance on *Bacillus subtilis* controlling plant disease[J]. Zhejiang Agricultural Science, 2005, 3: 213-215.)