

## 细菌 SnebYK 发酵液诱导大豆抗阿特拉津的研究

罗在全<sup>1</sup>, 段玉玺<sup>1</sup>, 王媛媛<sup>2</sup>, 尹丽娜<sup>1</sup>, 陈立杰<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:**通过利用细菌 SnebYK 发酵液进行种子包衣的方法,研究了包衣后大豆种子的萌发情况及大豆在含有阿特拉津土壤中的生长情况。结果表明: $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> SnebYK 的发酵液对大豆种子萌发有一定促进作用, $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> SnebYK 的发酵液可以诱导大豆对阿特拉津产生一定的抗性,用该发酵液处理的大豆种子在阿特拉津标准施药量2倍条件下仍可以正常生长,且从株高、主茎节数、单株荚数、单株粒数、单株粒重、植株干重、百粒重等几个测产指标比较,未灭菌和灭菌的发酵液处理之间没有显著差异。

**关键词:**大豆;阿特拉津;细菌;抗性;诱导

**中图分类号:**S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2010)02-0284-04

## Fermentation Broth of Bacteria SnebYK Induced Anti-atrazine Effect in Soybean

LUO Zai-quan<sup>1</sup>, DUAN Yu-xi<sup>1</sup>, WANG Yuan-yuan<sup>2</sup>, YIN Li-na<sup>1</sup>, CHEN Li-jie<sup>1</sup>

(1. Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Department of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

**Abstract:**The soybean can not grow well in soil which is exposed to atrazine, and it can also result in a decrease in the yield of the soybean seriously. This investigation made a tentative research into the effect of the soybean seeds sprouting, which are treated by SnebYK fermentation broth. Moreover, the different physiological indexes of soybean that grew in atrazine exposed-soil were investigated. The results showed that  $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> concentration of SnebYK fermentation broth was propitious to soybean seed germination and the soybean coated with  $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> concentration of SnebYK fermentation broth could grow well in soil which was exposed to atrazine. The soybean could grow regularly in soil with doubled concentration of atrazine. Compared with the agronomic traits of plant height, nodes on main stem, pods per plant, seeds number, plant fresh weight, 100-seed weight, there was little difference between unpasteurized and pasteurized treatments.

**Key words:**Soybean; Atrazine; Bacteria; Resistance; Inducement

阿特拉津是一种广泛使用的三嗪类除草剂,主要应用于玉米、高粱、甘蔗、茶园和林地等防除一年生禾本科杂草和阔叶杂草,对多年生杂草也有抑制作用<sup>[1]</sup>。该除草剂在世界范围内使用已经40余年,由于阿特拉津分子中含有1个氯原子,所以具有生物毒性,而且它的矿化过程十分缓慢,在土壤中的半衰期长达4~57周,因此容易对某些对阿特拉津敏感的后茬作物如大豆等产生毒害,并造成严重减产<sup>[2-3]</sup>。关于转基因大豆抗阿特拉津和阿特拉津生物降解的研究报道很多,有许多属的细菌、放线菌和真菌均可以参与阿特拉津的生物降解<sup>[4-6]</sup>。但是对于利用细菌诱导大豆产生抗阿特拉津的报道较少。植物诱导抗性因具有广谱、持续时间较长、对环境无污染、抗性表达时间和空间的相对可控等优点而展现出良好的应用前景<sup>[7]</sup>。该试验利用细菌发酵液对大豆进行包衣,研究包衣后大豆

在阿特拉津土壤环境下生长情况,从而为研究大豆抗阿特拉津药剂提供参考。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

供试大豆品种为辽豆15;供试菌株为 SnebYK,由该研究室分离保存;供试药品为38%阿特拉津胶悬剂,由吉林金秋农药有限公司生产。

#### 1.2 试验方法

1.2.1 不同浓度菌株 SnebYK 发酵液对大豆种子萌发的影响 将菌株 SnebYK 在牛肉膏蛋白胨液体培养基中于25℃下摇瓶发酵培养2 d。将大豆种子用75%的酒精消毒1 min,用 $10^3$ 、 $10^6$ 、 $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> SnebYK 的发酵液浸泡大豆种子4 h,以无菌水为对照,3次重复。随后放入无菌培养皿中,上覆纱布。

收稿日期:2009-12-02

基金项目:大豆现代产业技术体系资助项目。

第一作者简介:罗在全(1984-),男,在读硕士,现从事有害生物与环境安全研究。E-mail:luozaiquan841016@yahoo.com。

通讯作者:段玉玺,教授,博士生导师。E-mail:duanyx6407@163.com。

28℃温箱催芽,观察种子萌发情况。

1.2.2 不同浓度菌株 SnebYK 发酵液对大豆在阿特拉津条件下生长的影响 将 SnebYK 发酵液配置成  $10^3$ 、 $10^6$ 、 $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> 3 个浓度,采用 1% 的种子量进行种子包衣处理,待干燥后播种到 15 × 15 cm 黑色塑料钵中,每钵种 5 粒,3 次重复。然后喷施 38% 阿特拉津,用量为  $0.6 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 。CK1: 无菌水处理并喷施阿特拉津,CK2: 无菌水处理不喷施阿特拉津。20 d 后,统计存活率,测量豆苗苗高、根长、干重等。

1.2.3 不同浓度阿特拉津对细菌 SnebYK 发酵液包衣大豆生长的影响 将 SnebYK 发酵液配制成为  $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup>,采用 1% 的种子量进行种子包衣处理,待干燥后播种到 10 × 13 cm 透明塑料钵中,每钵种 3 粒,3 次重复。然后喷施 38% 阿特拉津,分别为 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8  $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$ ,其中  $0.6 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  为阿特拉津标准用药量,CK: 无菌水处理。20 d 后,统计存活率,测量豆苗苗高、根长、干重等。

1.2.4 菌株 SnebYK 发酵液对大豆在阿特拉津条件下成熟期长势的影响 小区试验在辽宁省沈阳市汪家乡养竹村进行。3 行小区,行长 10 m,行距 65 cm,处理间隔 1 m,小区面积 68.25 m<sup>2</sup>。3 次重复。CK1: 不用发酵液包衣不施用阿特拉津的处理,CK2: 不用发酵液包衣但施用阿特拉津的处理,用未灭菌和灭菌的 SnebYK 发酵液包衣豆种,然后将上述 4 个处理播种到大田里,除 CK1 外,全部喷施 38% 阿特拉津,用药量为  $0.6 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ 。待大豆成熟后对株高、主茎节数、单株荚数、单株粒数、单株粒重、植株干重、百粒重等几个指标进行调查,用以判断在施用阿特拉津的大田里未灭菌和灭菌的 SnebYK 发酵液对大豆农艺性状和产量的影响。

表 2 SnebYK 发酵液对大豆苗期生长的影响

Table 2 Effect of SnebYK fermentation broth on the growth of soybean seedlings

处理 Treatment	浓度 Concentration/cfu · mL <sup>-1</sup>	苗高 Height/cm	根长 Root length/cm	地上部干重 Plant dry weight/g	根干重 Root dry weight/g
SnebYK	$10^3$	7.00bBC	9.67cC	0.31dD	0.06dD
	$10^6$	9.64aAB	21.67aAB	0.35cC	0.15cC
	$10^9$	10.50aA	22.33aA	0.39bB	0.25aA
CK1		5.14bC	5.17dC	0.23eE	0.05eE
CK2		10.50aA	16.83bB	0.47aA	0.21bB

2.3 不同浓度阿特拉津对细菌 SnebYK 发酵液包衣大豆生长的影响

豆苗各个生理指标值随阿特拉津用药量的增加而降低,用药量为  $0.3 \sim 1.2 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  时,豆苗各项

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 SnebYK 对大豆种子萌发的影响

用不同浓度菌株 SnebYK 的发酵液对大豆种子进行萌发处理,结果表明,浓度为  $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> 发酵液促进效果明显,与对照相比差异明显。各处理间出芽率无明显差异,但芽长和须根数在各处理间存在差异(表 1)。表明  $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> SnebYK 的发酵液对大豆种子萌发有一定的促进作用。

表 1 SnebYK 发酵液对大豆种子萌发的影响

Table 1 Effect of SnebYK fermentation broth on soybean seeds sprouting

处理 Treatment	出芽率 Germinationratio/%	芽长 Bud length/cm	须根数 Fibred number
SnebYK	$10^3$	86.67aA	5.04cB
	$10^6$	90.00aA	6.25bB
	$10^9$	100.00aA	8.00aA
CK	90.00aA	5.72bc	11.67bBC

数字后字母为 Duncan's 新复极差测验结果,不同大小写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 was the result of Duncan's test. Capital and small letters indicated  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively.

### 2.2 不同浓度菌株 SnebYK 对大豆在阿特拉津条件下生长的影响

在大豆出苗 20 d 后,对豆苗各个生理指标进行调查。其中浓度为  $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> SnebYK 发酵液诱导大豆对阿特拉津产生抗性的效果明显,与无菌水处理的对照 CK1 相比差异显著。从苗高、根长、地上部干重、根干重 4 个指标与对照进行比较发现,浓度为  $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> SnebYK 发酵液的处理均表现出明显效果,表明  $10^9$  cfu · mL<sup>-1</sup> 菌株 SnebYK 的发酵液对大豆抗阿特拉津有良好的效果(表 2)。

生理指标与 CK 无显著差异,当阿特拉津的用药量大于  $1.2 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$  时,豆苗的各项生理指标与 CK 差异极显著(表 3)。

表3 不同用量阿特拉津对大豆生长的影响

Table 3 Effect of different dosages of atrazine to the growth of soybean seedlings

处理 Treatment	阿特拉津用量 Dosage of Atrazine/ $\text{g} \cdot \text{m}^{-2}$	苗高 Height/cm	根长 Root length/cm	地上部干重 Plant dry weight/g	根干重 Root dry weight/g
SnebYK $10^9 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.3	25.67 aA	25.67 aA	0.35bAB	0.26abA
	0.6	24.33aA	28.33aA	0.36bAB	0.25abA
	0.9	23.67 aA	27.00 aA	0.34bB	0.26aA
	1.2	22.33 aA	28.33aA	0.33bB	0.24aB
	1.5	14.00bB	20.33bcB	0.26cC	0.14cB
	1.8	15.33bB	19.00bC	0.23cC	0.13cB
CK	0	26.33aA	26.33aA	0.41aA	0.26aA

#### 2.4 大豆成熟期长势调查

在大豆成熟期,对大豆主要生理指标进行调查分析。结果表明,用未灭菌和灭菌的 SnebYK 发酵液处理大豆种子,株高、节数、豆荚数、粒数、植株重

和百粒重与 CK1 无显著差异;与 CK2 相比,植株重和百粒重差异极显著,其它指标差异显著。未灭菌和灭菌处理之间无显著差异(表4)。

表4 SnebYK 发酵液对大豆成熟期长势的影响

Table 4 Effect of SnebYK fermentation broth to mature soybean

项目 Item	CK1	CK2	SnebYK 未灭菌 No destroy bacterium	SnebYK 灭菌 Destroy bacterium
株高 Height/cm	99.00aA	87.83bB	98.33 aA	96.33 aAB
主茎节数 Nodes number	18.67 aA	14.33bB	18.33 aAB	17.33 aAB
单株荚数 Pods per plant	35.33 aA	12.33bA	36.33 aA	31.33 aA
单株粒数 Seeds per plant	83.33 aA	16.00bA	74.66 aA	66.67 aA
植株重 Plant fresh weight/g	68.00 aA	13.33cB	55.33 abA	51.00 bA
百粒重 100-seed weight /g	24.67 aA	16.50bB	23.33 aA	22.33 aA

### 3 结论与讨论

阿特拉津性质稳定,残效期长,玉米田使用后,其残留极易对大豆等敏感后茬作物造成药害<sup>[8]</sup>。大豆受阿特拉津药害影响表现为受害大豆叶片失绿变黄,产生大面积锈色枯斑,生长受抑制,继而叶斑在叶脉扩展,边缘干枯至全叶枯死、脱落,严重者生长点死亡至全株枯死。极个别残存植株生长矮小,也能开花结果,但荚数少<sup>[9]</sup>。

用细菌 SnebYK 发酵液处理的大豆种子可以在施用阿特拉津的土壤中存活,并且其各项生理指标与对照相比无显著差异。 $10^9 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  SnebYK 的发酵液对大豆种子萌发有一定促进作用,同时  $10^9 \text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$  SnebYK 的发酵液可以诱导大豆对阿特拉津产生一定的抗性,其包衣处理后的大豆在含有阿特拉津的土壤中生长时叶片未出现失绿变黄,无锈色枯斑产生。用该发酵液处理的大豆种子可在 2

倍阿特拉津最大施用浓度的条件下正常生长,并且未灭菌和灭菌的发酵液处理之间无显著差异。细菌发酵液中代谢产物丰富,可能是某种代谢产物诱导大豆对阿特拉津产生了一定的抗性。以上结果表明用细菌 SnebYK 发酵液处理后的大豆在施用阿特拉津的土壤里生长良好,细菌 SnebYK 发酵液对诱导大豆抗阿特拉津有一定的潜力。

1995 年 Mandelbaum 等从被阿特拉津污染的土壤分离到 1 株能以阿特拉津为唯一氮源的细菌假单胞菌 ADP<sup>[10]</sup>。此后的研究表明微生物降解作用的实质是酶促反应。降解阿特拉津的反应需要 3 种酶,即氯水解酶(AtzA)、乙氨基水解酶(AtzB)、N-异丙基胍尿酸胺异丙基氨基水解酶(AtzC)<sup>[11-12]</sup>。以大豆为靶标作物,采用细菌 SnebYK 发酵液处理大豆种子,诱导其可在施用阿特拉津的土壤中生长的拮抗机理和菌株 SnebYK 的鉴定等方面仍有待于进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] 杨梅,林忠胜,姚子伟,等. 三嗪类除草剂莠去津的研究进展[J]. 农药科学与管理, 2006, 25(11): 31-36. (Yang M, Lin Z S, Yao Z W, et al. Process of study on the herbicide atrazine[J]. Pesticide Science and Administration, 2006, 25(11): 31-36.)
- [2] 化学工业出版社. 中国化工产品大全(下卷): 除草剂[M]. 北京: 化学工业出版社, 1994. (Chemical Industry Press. China chemical products (third volume): Pesticide [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1994.)
- [3] 王焕民, 张子明. 新编农药手册[M]. 北京: 农业出版社, 1989. (Wang H Z, Zhang Z M. New pesticide manual[M]. Beijing: Agricultural Press, 1989.)
- [4] 武小霞, 李文斌, 张淑珍. 我国大豆转基因研究进展[J]. 大豆科学, 2005, 24(2): 144-149. (Wu X X, Li W B, Zhang S Z, et al. The research advance on soybean transgene in China[J]. Soybean Science, 2005, 24(2): 144-149.)
- [5] Strong L C, Rosendahl C, Johnson G, et al. *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds[J]. Applied Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 5973-5980.
- [6] Topp E, Mulbry W M, Zhu H, et al. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. Isolated from agricultural soils [J]. Applied Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3134-3141.
- [7] 董汉松. 植物诱导抗性原理和研究[M]. 北京: 科学出版社, 1995. (Dong H S. Theory and research in plant induced resistance [M]. Beijing: Science Press, 1995.)
- [8] 范润珍. 莠去津的药害问题及药害防范技术研究概述[J]. 农药科学与管理, 2003, 24(1): 20-23. (Fan R Z. Summarization of phytotoxicity of Atrazine and method of elimination[J]. Pesticide Science and Administration, 2003, 24(1): 20-23.)
- [9] 黄春艳, 陈铁保, 王宇, 等. 28种除草剂对大豆的安全性及药害研究初报[J]. 植物保护, 2003, 29(1): 31-34. (Huang C Y, Chen T B, Wang Y, et al. Preliminary studies on safety and injury of 28 herbicides to soybean [J]. Plant Protection, 2003, 29(1): 31-34.)
- [10] 蔡宝立, 黄今勇. 除草剂阿特拉津生物降解研究进展[J]. 生物工程进展, 1999, 19(3): 7-11. (Cai B L, Huang J Y. Advance on the studies of biodegradation of herbicide atrazine[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1999, 19(3): 7-11.)
- [11] 董春香, 姜桂兰. 除草剂阿特拉津生物降解研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2001, 2(3): 1-6. (Dong C X, Jiang G L. Progress in study of biodegradation of the herbicide atrazine [J]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control, 2001, 2(3): 1-6.)
- [12] De Souza M L. The atrazine catabolism gene *atzABC* are widespread and highly conserved[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64: 178-184.

## 《大豆科学》第八届编委会

姓名	单位	研究方向	姓名	单位	研究方向
于佰双	黑龙江省农业科学院	病理	陈海涛	东北农业大学	机械化工程
马建新	美国普渡大学	植物基因组学	陈维元	黑龙江省农业科学院	遗传育种
王爱明	加拿大南部植物保护中心	病理	林汉明	香港中文大学	生物技术
王源超	南京农业大学	病理	周新安	中国农业科学院	遗传育种
王曙明	吉林省农业科学院	遗传育种	赵丽梅	吉林省农业科学院	杂种优势利用
卢为国	河南省农科院	病理	赵奎军	东北农业大学	虫害防治
邢 邯	南京农业大学	遗传育种	胡国华	黑龙江农垦科研育种中心	遗传育种
年 海	华南农业大学	营养生理	段玉玺	沈阳农业大学	植物病理
朱保葛	中科院遗传所	分子育种	秦贵信	吉林农业大学	动物营养
任长顺	黑龙江省农业科学院	农业信息	徐克章	吉林农业大学	生理生态
华欲飞	江南大学	蛋白功能	郭顺堂	中国农业大学	蛋白加工利用
刘丽君	黑龙江省农业科学院	遗传育种	盖钧镒	南京农业大学	遗传育种
刘学义	山西省农业科学院	遗传育种	董英山	吉林省农业科学院	生物技术
刘忠堂	黑龙江省农业科学院	育种栽培	韩天富	中国农业科学院	分子育种
刘晓冰	中国科学院东北地理所	产量生理	韩贵清	黑龙江省农业科学院	农业管理
江连洲	东北农业大学	工程技术	韩晓增	中国科学院东北地理所	营养生理
许艳丽	中国科学院东北地理所	病理	喻德跃	南京农业大学	分子遗传
李文滨	东北农业大学	生物技术	谢甫绶	沈阳农业大学	产量生理
苏 俊	黑龙江省农业科学院	育种	满为群	黑龙江省农业科学院	高光效育种
李柱刚	黑龙江省农业科学院	生物技术	廖 红	华南农业大学	营养生理
邱丽娟	中国农业科学院	分子育种	魏 丹	黑龙江省农业科学院	土壤肥料
杨文钰	四川农业大学	栽培生理	Allen G. Xue	加拿大东部谷物中心	大豆病理
肖志敏	黑龙江省农业科学院	育种	Andrew James	澳大利亚 CSIRO 植物产业中心	遗传育种
宋书宏	辽宁省农业科学院	遗传育种	B. A. ТИЛЬБА	俄罗斯全俄大豆研究所	遗传育种
宋启建	美国农业部	基因组学	Gary R. Ablett	加拿大圭尔夫大学	遗传育种
张 磊	安徽省农业科学院	遗传育种	Istvan Rajcan	加拿大圭尔夫大学	遗传育种
张劲松	中科院遗传所	基因组学	Jean Daydé	法国图卢兹大学	加工利用
张孟臣	河北省农林科学院	遗传育种	Reid G. Palmer	美国依阿华州立大学	遗传育种
张彩英	河北农业大学	遗传育种	Suk - Ha Lee	韩国首尔大学	植物基因组
陈受宜	中国科学院遗传所	基因组学			