

大豆根际土壤细菌对镰孢菌的影响

刘佳¹,张匀华¹,孟庆林¹,石凤梅¹,马立功¹,李易初¹,纪武鹏²,王军³

(1. 黑龙江省农业科学院 植物保护研究所,黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省农垦科学院 农作物开发研究所,黑龙江 佳木斯 154007; 3. 黑龙江垦丰种业有限公司,黑龙江 哈尔滨 150090)

摘要:采用室内生物学测定方法研究了大豆根际土壤细菌不同接菌量和接入时间对大豆根腐病原菌镰孢菌(*Fusarium*)菌丝生长和产孢量的影响。结果表明:土壤细菌对镰孢菌菌丝生长和产孢量具有一定的抑制作用,接入细菌量越大,抑制率越高,当接入细菌量为 5×10^6 cfu · mL⁻¹时,细菌对其菌丝生长及产孢抑制率分别达98.9%和98.3%;培养条件下细菌接入时间越早对尖镰孢菌和茄镰孢菌菌丝生长及产孢的抑制作用越明显。

关键词:土壤细菌;镰孢菌;菌丝生长;产孢量

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2011)05-0823-04

Effect of Soil Bacteria in Soybean Rhizosphere to *Fusarium*

LIU Jia¹,ZHANG Yun-hua¹,MENG Qing-lin¹,SHI Feng-mei¹,MA Li-gong¹,LI Yi-chu¹,JI Wu-peng²,WANG Jun³

(1. Institute of Plant Protection, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. Crop Research Institute of Heilongjiang Academy of Land Reclamation Sciences, Jiamusi 154007; 3. Heilongjiang Kenfeng Seed co., Ltd, Harbin 150090, Heilongjiang, China)

Abstract: In an indoor experiment, a biological determination was employed to compare the effect of bacteria, which was isolated from soybean rhizosphere soil, on mycelial growth and sporulation of *Fusarium* both with different inoculation amount and different access time. Results showed soil bacteria could depress mycelial growth and sporulation of *Fusarium* in a dose-dependent manner, when the bacteria amount was 5×10^6 cfu · mL⁻¹, the inhibitory rate of mycelial growth and sporulation reached 98.9% and 98.3%, respectively. The access time of bacteria also had significant influence on inhibitory of mycelial growth and sporulation of *Fusarium*, the earlier the access time, the obvious the inhibitory effect was.

Key words: Bacteria in soil; *Fusarium*; Growth of *Fusarium* mycelial; Sporulation

大豆根腐病是目前大豆生产上最为严重的病害之一,它是由多种病原真菌复合侵染造成的一种土传病害,其致病菌主要有镰刀菌(*Fusarium* spp.)、腐霉菌(*Pythium* spp.)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)^[1]。对于大豆根腐病的防治,目前实际生产中多采用化学药剂多克福种衣剂拌种的方法,虽然效果较好,但其毒性高,残留量大,对发展绿色食品十分不利。随着人们对食品安全性要求的提高,以及对化学药剂可能给生态环境带来潜在危机的考虑,利用可替代化学药剂的生防制剂成为迫切需要^[2]。黄珊珊等^[3]指出在大豆根际土壤中存在大豆根腐病菌,同时也存在抑制其生长的生防菌。自然条件下,生防菌抑制大豆根腐病菌的生长和繁殖,从而控制病害的发生,因此筛选大豆根际生防菌,对于根腐病的持续控制具有重要意义。

该试验主要研究了土壤细菌不同接菌量和接入时间对大豆根腐病主要病原菌的抑制作用;拟通过调控土壤细菌菌群数量来达到减少大豆根腐病

致病菌数量的目的,进而减轻大豆根部病害的危害,也为采取生态学措施防治大豆根腐病提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 尖镰孢菌(*Fusarium. oxysporum*),茄镰孢菌(*Fusarium. solani*)由黑龙江省农科院植保所实验室保存。细菌由黑龙江省农科院植保所提供,采自试验地大豆根际土壤中,菌种有待进一步鉴定。

1.1.2 培养基 PDA:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL;

PSC:蔗糖 30 g,蛋白胨 10 g,硝酸钠 3 g,磷酸二氢钾 1 g,氯化钾 0.5 g,硫酸镁 0.5 g,硫酸亚铁 0.01 g,水 1 000 mL;

NB:蛋白胨 10 g,牛肉浸膏 3 g,氯化钠 5 g,葡萄糖 10 g,水 1 000 mL;

收稿日期:2011-04-07

第一作者简介:刘佳(1986-),男,研究实习员,硕士,研究方向为植物土传病害。E-mail:liujia4218@163.com。

通讯作者:张匀华(1957-),男,研究员,从事植物病害流行病学研究。E-mail: yhzhang9603@126.com。

牛肉膏-蛋白胨培养基:牛肉膏 3.0 g,蛋白胨 5.0 g,水 1 000 mL;

镰孢属真菌培养基:磷酸二氢钾 1.0 g,蛋白胨 5.0 g,硫酸镁 0.5 g,琼脂 20 g,链霉素 0.3 g,五氯硝基苯(20%可湿性粉剂)3.0 g,水 1 000 mL,链霉素和五氯硝基苯都是在培养基灭菌冷却到 42 ~ 45℃后加入,它们的作用是抑制细菌、酵母菌的生长以及其它真菌的扩展。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌不同菌量对镰孢菌菌丝生长及产孢量的影响 将各供试尖孢菌、茄腐菌分别定量移接在 PDA 平板上于 25℃下培养 7 d 备用。然后将菌落打成直径为 5 mm 菌片,分别定量接入装有 80 mL PSC 培养液的 100 mL 三角瓶内,然后置于 25℃培养箱培养 15 d。5 种不同的细菌菌量($\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)分别为 0、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^6 、 5×10^6 ,4 次重复。

用血球板记数法测定培养液中镰孢菌产生的孢子数;将过滤所得的菌丝放入 60℃的烘干箱干燥 48 h 后称量菌丝干重。

1.2.2 细菌接入时期对镰孢菌菌丝生长及产孢量

的影响 将培养的镰孢菌落打成直径为 5 mm 菌片,分别定量接入装有 80 mL PSC 培养液的 100 mL 三角瓶内,分别在开始培养 0、3、6、9 和 12 d 后接入细菌,然后置于 25℃培养箱,培养 15 d。接菌量为 $1 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照不接细菌,4 次重复。

用血球板记数法测定培养液中镰孢菌产生的孢子数;将过滤所得的菌丝放入 60℃的烘干箱干燥 48 h 后称量菌丝干重。

1.3 数据分析

利用 Excel 2003 和 DPSv 7.0 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 细菌不同菌量对镰孢菌菌丝生长的影响

从表 1 可知,随着细菌菌量的增加,尖镰孢菌、茄镰孢菌菌丝干重随之明显下降。当细菌菌量达 $5 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,尖镰孢菌、茄镰孢菌菌丝干重分别比不接细菌对照减少了 99.1% 和 98.7%。不同细菌菌量处理下,尖镰孢菌、茄镰孢菌的菌丝干重差异显著。因此,细菌不同菌量对尖镰孢菌、茄镰孢菌的菌丝干重均有明显的抑制作用。

表 1 细菌不同菌量条件下的镰孢菌菌丝干重

Table 1 Dry weight of *Fusarium* in the condition with different amount of bacteria

细菌菌量 Amount of bacteria / $\text{cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$	镰孢菌菌丝干重 Dry weight of <i>Fusarium</i> /g		总量 Total weight/g	平均值 Average/g	平均抑制率 Average inhibition rate/%
	尖镰孢菌 <i>Fusarium. oxysporum</i>	茄镰孢菌 <i>Fusarium. solani</i>			
0	0.4775 ± 0.0084a	0.5456 ± 0.0025a	1.0232	0.5116	0
1×10^5	0.1561 ± 0.0029b	0.1087 ± 0.0031b	0.2648	0.1324	74.1
5×10^5	0.0543 ± 0.0048c	0.0737 ± 0.0017c	0.1280	0.0640	87.4
1×10^6	0.0152 ± 0.0065d	0.0238 ± 0.0017d	0.0390	0.0195	96.2
5×10^6	0.0044 ± 0.0010e	0.0073 ± 0.0009e	0.0118	0.0059	98.9

同一列标以不同字母的数值差异达 0.05 显著水平,下同。

Values followed by different letters within the same column are significantly different at 0.05 probability level, the same as below.

2.2 细菌不同菌量对镰孢菌产孢量的影响

从表 2 可知,随着细菌菌量的增加,尖镰孢菌、茄镰孢菌的产孢量明显降低。当细菌菌量达 $5 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,尖镰孢菌、茄镰孢菌的产孢量分别比不接细菌对照减少了 98.5% 和 98.1%,细菌不同菌量条件下,尖镰孢菌、茄镰孢菌的产孢量差异显著。因此,细菌不同菌量对尖镰孢菌、茄镰孢菌的产孢量均有明显的抑制作用。

2.3 细菌接入时期对镰孢菌菌丝的影响

2.3.1 对镰孢菌菌丝生长的影响

由表 3 可知,随

着细菌接入时期的延后,尖镰孢菌、茄镰孢菌菌丝干重均明显增加。镰孢菌培养同时接入细菌的处理,其尖镰孢菌、茄镰孢菌菌丝干重分别比对照减少了 64.3% 和 65.4%;在培养后第 12 天接菌时,与不接细菌的对照相比,茄镰孢菌菌丝干重差异不显著,而尖镰孢菌菌丝干重则显著低于对照。结果表明,细菌不同接入时期对尖镰孢菌、茄镰孢菌菌丝干重抑制作用差异显著。细菌接入越早对镰孢菌菌丝生长的抑制作用越明显。

表 2 细菌不同菌量条件下镰孢菌的产孢量
Table 2 Sporulation quantity of *Fusarium* in different amount of bacteria

细菌菌量 Bacteria amount /cfu · mL ⁻¹	镰孢菌产孢量 Sporulation quantity of <i>Fusarium</i> / × 10 ⁴ cfu · mL ⁻¹		总量 Total / × 10 ⁴ cfu · mL ⁻¹	平均值 Average / × 10 ⁴ cfu · mL ⁻¹	平均抑制率 Average inhibition rate/%
	尖镰孢菌 <i>Fusarium. oxysporum</i>	茄镰孢菌 <i>Fusarium. solani</i>			
0	288.0 ± 73a	347.0 ± 77a	635.0	317.50	0
1 × 10 ⁵	24.2 ± 8.5b	41.5 ± 13b	65.7	32.85	89.7
5 × 10 ⁵	15.3 ± 3.7c	20.4 ± 5.9c	35.7	17.85	94.4
1 × 10 ⁶	8.9 ± 3.3d	11.3 ± 3.9d	20.2	10.10	96.8
5 × 10 ⁶	4.3 ± 1.3e	6.7 ± 0.9e	11.0	5.50	98.3

表 3 细菌不同接入时期的镰孢菌菌丝干重
Table 3 Dry weight of *Fusarium* in different access time of bacteria

细菌接入时期 Access time of bacteria/d	镰孢菌菌丝干重 Dry weight of <i>Fusarium</i> /g		总量 Total/g	平均值 Average/g	平均抑制率 Average inhibition rate/%
	尖镰孢菌 <i>Fusarium. oxysporum</i>	茄镰孢菌 <i>Fusarium. solani</i>			
0	0.1575 ± 0.0071f	0.1860 ± 0.0067e	0.3435	0.1718	64.9
3	0.2197 ± 0.0023e	0.2548 ± 0.0042d	0.4745	0.2373	51.5
6	0.2791 ± 0.046d	0.3291 ± 0.0029c	0.6082	0.3041	37.8
9	0.3473 ± 0.0056c	0.4053 ± 0.0050b	0.7526	0.3763	23.1
12	0.4216 ± 0.0039b	0.5278 ± 0.0071a	0.9494	0.4747	2.98
CK	0.4417 ± 0.0092a	0.5369 ± 0.0088a	0.9786	0.4893	0

2.3.2 对镰孢菌产孢量的影响 由表 4 可知,随着细菌接入时期的延后,尖镰孢菌、茄镰孢菌的产孢量明显增加。当细菌接入时期为镰孢菌培养后第 12 天时,与不接细菌对照相比,尖镰孢菌产孢量差异不显著,茄镰孢菌产孢量的差异也不明显;相反,当镰孢菌培养后同时接入细菌的处理,尖镰孢菌、

茄镰孢菌的产孢量分别比不接细菌对照减少了 82.0%、79.7%。培养后同时接入细菌的处理对尖镰孢菌、茄镰孢菌的产孢量抑制作用最明显。结果表明,细菌接入时期越早,对尖镰孢菌、茄镰孢菌产孢的抑制作用越明显。

表 4 细菌不同接入时期镰孢菌的产孢量
Table 4 Sporulation quantity of *Fusarium* in different access time of bacteria

细菌接入时期 Access time of bacteria/d	镰孢菌产孢量 Sporulation quantity of <i>Fusarium</i> / × 10 ⁴ cfu · mL ⁻¹		总量 Total / × 10 ⁴ cfu · mL ⁻¹	平均值 Average / × 10 ⁴ cfu · mL ⁻¹	平均抑制率 Average inhibition rate/%
	尖镰孢菌 <i>Fusarium. oxysporum</i>	茄镰孢菌 <i>Fusarium. solani</i>			
0	25.8 ± 3.6e	42.8 ± 3.3f	68.6	34.3	80.7
3	53.5 ± 4.8d	61.7 ± 5.7e	115.2	57.6	67.5
6	100.4 ± 7.7c	145.6 ± 18.7d	246.0	123.0	30.7
9	123.5 ± 11.6b	172.7 ± 16.3c	296.2	148.1	16.5
12	138.4 ± 10.9ab	198.7 ± 32.0b	337.2	168.6	4.96
CK	143.7 ± 23.1a	211.2 ± 21.2a	354.8	177.4	0

3 结论与讨论

随着细菌菌量的增加,尖镰孢菌菌丝和茄镰孢菌菌丝干重明显减轻,产孢量明显降低。细菌对其菌丝生长和产孢的最大抑制率可达 98.7% 和 98.5%。说明细菌对尖镰孢菌、茄镰孢菌菌丝生长及产孢量具有明显的抑制作用,细菌菌量越大,抑制作用越明显。细菌不同接入时期对尖镰孢菌菌丝生长及产孢抑制作用不同,室内培养条件下细菌接入越早对尖镰孢菌、茄镰孢菌菌丝生长及产孢的抑制作用越明显。

大豆根腐病是大豆田普遍发生的根部病害,传统方法使用化学药剂防治大豆根腐病,虽然取得了一定效果,但随着人们对环境保护和绿色农业的重视,生物防治已逐渐成为人们研究和开发的热点。徐佳等^[4]指出生物制剂可不同程度地降低大豆的发病率,从而降低根腐病造成的减产程度。张淑梅等^[5]研究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(一定范围内)呈正相关。利用拮抗菌株抑制大豆根腐病病原菌表达的方法逐渐得到科研和生产人员的认可,徐诚蛟等^[6]将 3 种菌株混合接种,结果对病原菌抑制效果和土壤酶活力均超过单一菌株接种,16 d 时对尖孢镰刀菌和立枯丝核菌抑制率分别为 79.72% 和 81.30%,这说明拮抗菌株对根腐病病原菌具有较好的抑制作用;孙冬梅等^[7]指出黄绿木霉对大豆根腐病有较好的防治效果,防效可达 73.2%,处理后幼苗株高与干重均高于未处理的对照;陈立杰等^[8]指出部分菌株对尖孢镰刀菌抑制效果不明显;王媛媛等^[9]研究表明大豆根瘤内生芽孢杆菌 Snb2 对不同基因型大豆根系病原真菌表现不同程度的拮抗作用,对尖孢镰刀菌和茄腐镰刀菌的拮抗作用最明显。许艳丽等^[10]研究表明不同复配生防菌株对菌株生长速度、产孢量和孢子萌发率的影响存在差异,优秀的复配类型对大豆根腐病防治效果明显,并对大豆有促生作用。随着分子生物学在农学领域的渗透,对大豆根腐病的研究也逐步深入到分子水平,白剑宇等^[11]已经建立了大豆根腐病病原菌 PCR-RFLP 的鉴定体系,为从分子水平研究大豆根腐病奠定了基础

参考文献

[1] 马汇泉,辛惠普.大豆根腐病病原菌种类鉴定及其生态学研究[J].黑龙江八一农垦大学学报,1988(2):115-121. (Ma H Q, Xin H P. Identification and ecology of pathogenic fungi of soybean

root rot[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University,1988(2):115-121.)

- [2] 李春杰,许艳丽,赵志权,等.木霉颗粒剂对大豆根腐病的防治作用[J].大豆科学,2009,28(3):499-501. (Li C J, Xu Y L, Zhao Z Q, et al. Control effect of *Trichoderma* sp. granules on soybean root rot[J]. Soybean Science,2009,28(3):499-501.)
- [3] 黄珊珊,韩雪,李丽珺,等.大豆根腐病生防菌株的筛选及鉴定[J].东北农业大学学报,2008,39(10):6-10. (Huang S S, Han X, Li L J, et al. Screening and identification of biocontrol strains against soybean root rot pathogens[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2008,39(10):6-10.)
- [4] 徐佳,王士强,张兴梅.生物制剂拌种对盆栽大豆根腐病防效及土壤酶的影响[J].黑龙江八一农垦大学学报,2008,20(5):21-24. (Xu J, Wang S Q, Zhang X M. Effects of biological reagents in different seed dressing on the antagonism of soybean root rot and the mechanism[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University,2008,20(5):21-24.)
- [5] 张淑梅,王玉霞,赵晓宇,等.生物拌种剂防治大豆根腐病效果和机制[J].大豆科学,2009,28(15):864-868. (Zhang S M, Wang Y X, Zhao X Y, et al. Efficacy and mechanism of biological seed coating agent against soybean root rot disease caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *vedolensis*[J]. Soybean Science,2009,28(15):864-868.)
- [6] 徐诚蛟,徐凤花,万书明,等.拮抗菌株对田间大豆根腐病原菌抑制效果[J].大豆科学,2008,27(2):351-353. (Xu C J, Xu F H, Wan S M, et al. Inhibitory effect of antagonisms on pathogen of soybean root rot in field[J]. Soybean Science,2008,27(2):351-353.)
- [7] 孙冬梅,杨谦,宋金柱.黄绿木霉菌对大豆根腐病镰刀菌的拮抗作用[J].中国油料作物学报,2005,27(3):58-62. (Sun D M, Yang Q, Song J Z. Antagonism of *Trichoderma aureoviride* against *Fusarium* spp which causes soybean root rot[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences,2005,27(3):58-62.)
- [8] 陈立杰,段玉玺,王媛媛,等.不同细菌菌株对大豆根腐病菌及胞囊线虫病的影响[J].沈阳农业大学学报,2006,37(6):831-834. (Chen L J, Duan Y X, Wang Y Y, et al. Bio-effect of different bacterial strains on soybean root rot pathogens and *Heterodera glycines*[J]. Journal of Shenyang Agricultural University,2006,37(6):831-834.)
- [9] 王媛媛,段玉玺,陈立杰.不同细菌菌株对大豆根腐病菌及胞囊线虫病的影响[J].大豆科学,2007,26(2):213-217. (Wang Y Y, Duan Y X, Chen L J. Effect of endophytic bacteria from soybean root nodules on soybean cyst nematode and pathogens of soybean root rot[J]. Soybean Science,2007,26(2):213-217.)
- [10] 许艳丽,张红骥,张匀华,等.复配生防菌株防治大豆根腐病的研究[J].大豆科学,2008,27(2):270-274. (Xu Y L, Zhang H J, Zhang Y H, et al. Combining biocontrol strains against soybean root rot[J]. Soybean Science,2008,27(2):270-274.)
- [11] 白剑宇,白丽燕,王登元,等.大豆根腐病病原菌 PCR-RFLP 鉴定体系的建立[J].新疆农业大学学报,2010,33(2):151-154. (Bai J Y, Bai L Y, Wang D Y, et al. Establishment of PCR-RFLP identification system of soybean root rot pathogen[J]. Journal of Xinjiang Agricultural University,2010,33(2):151-154.)