

大豆根腐病生防细菌优势菌株的筛选、鉴定及生防效果验证

高同国¹,李术娜¹,张冬冬¹,王灵敏²,郭晓军¹,朱宝成¹

(1. 河北农业大学 生命科学院,河北 保定 071001; 2. 木美华鼎生物肥料有限公司,河北 唐山 063000)

摘要:根腐病是影响大豆产量的主要病害之一,镰刀菌(*Fusarium* sp.)是引起我国大豆根腐病的主要病原菌。以致病尖孢镰刀菌为研究对象,通过平板对峙法从实验室保存的237株芽孢杆菌筛选到一株对该尖孢镰刀菌具有明显抑菌活性的芽孢杆菌8-32。对芽孢杆菌8-32经菌落、菌体形态,16S rRNA基因序列及生理生化性质鉴定,该菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。温室盆栽结果表明:该生防菌对大豆根腐病具有很好的防治效果,其病情指数减少32.08%。

关键词:大豆根腐病;尖孢镰刀菌;枯草芽孢杆菌;生防细菌

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2015.04.0661

Screening and Identification of Biocontrol Dominant Bacterium against to Soybean Root Rot

GAO Tong-guo¹, LI Shu-na¹, ZHANG Dong-dong¹, WANG Ling-min², GUO Xiao-jun¹, ZHU Bao-cheng¹

(1. College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Mumeihuading Biological Fertilizer Co. Ltd., Tangshan 063000, China)

Abstract: Root rot is one of the most serious diseases which caused reduction of soybean yield, and *Fusarium* sp. is considered as the main pathogen fungi caused this disease in China. In this study, *Fusarium oxysporum* was taken as indicative fungus, we screened one strain 8-32 against to *Fusarium oxysporum* from 237 strains saved in our laboratory using the method of dual culture on agar plate. According to colony morphology, 16S rRNA gene sequence, physiological and biochemical characters, we identified this strain as *Bacillus subtilis*. Results showed that the strain 8-32 reduced the incidence of soybean root rot disease index under controlled glasshouse conditions, which up to 32.08%. This strain, 8-32, has the potential to form production to control the soybean root rot.

Keywords: Soybean root rot; *Fusarium oxysporum*; *Bacillus subtilis*; Biocontrol bacterium

大豆根腐病分布广、危害重,是防治较为困难的世界性病害。在我国该病主要集中在东北和黄淮海大豆产区,根腐病造成的产量损失一般在10%~30%,严重的可达50%~60%,甚至绝产^[1],大豆根腐病每年造成数亿元的经济损失。

在我国,引起大豆根腐病的病原菌有4种,分别为镰刀菌、丝核菌、腐霉和疫霉,其中镰刀菌和丝核菌是真菌,腐霉和疫霉是卵菌。目前研究认为镰孢菌(*Fusarium* sp.)是引起我国大豆根腐病的主要病原菌^[2],并且近年来镰刀菌引起的根腐病愈演愈烈,直接影响到大豆的产量及品质^[3,4]。

自20世纪80年代来我国相继开展了大豆根腐病防治研究,至今依然主要依靠化学农药进行防治。化学防治在病害防治中起到重要作用,但长期、反复和大量使用化学农药会对土壤、水体和大气产生污染,威胁食品安全,直接危害人类的健康^[5]。生物防治避免了化学农药带来的一系列环境问题,而且安全、有效和持久,已经发展成为植物防治中十分重要且日益得到重视的有效措施。生

物防治是利用自然界中一些微生物对病原菌的抗生作用、营养和空间竞争、重寄生作用以及微生物诱导植物产生系统抗性等作用,从而降低病原菌数量或减弱病原菌致病活力,减少病原菌所致病害的发生^[6]。目前用于生物防治的菌株涉及到放线菌、细菌和真菌,其中研究最多的是芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)。虽然芽孢杆菌可以产生耐热、耐压、抗化学试剂等高抗逆性的芽孢,并且芽孢杆菌易培养、易储存而受到市场的青睐,但至今没有大规模应用于防治大豆根腐病的商用微生物菌剂。

本实验室从事多年植物病害生物防治方面的工作,分离保存了大量的细菌及真菌种质资源。本研究拟从实验室已保存的237株细菌中筛选到对尖孢镰刀菌具有较强拮抗能力的菌株,并通过菌落菌体形态,16S rRNA基因序列及生理生化性质等对筛选出的菌株进行鉴定,并采用温室栽培的方法验证了该芽孢杆菌的防治效果,为大豆根腐病的生物防治提供种质资源和试验基础。

收稿日期:2014-09-30
基金项目:保定市科学技术研究与发展指导计划(13ZN023)。
第一作者简介:高同国(1984-),男,博士,讲师,主要从事植物真菌病害的生物防治。E-mail:gtgrxf@163.com。
通讯作者:朱宝成(1962-),男,博士,教授,主要从事农牧微生物学研究。E-mail:zhu2222@126.com。

1 材料与方法

1.1 材料

指示菌:尖孢镰刀菌,由中国科学院东北地理与农业生态研究院王光华教授提供。

细菌:本实验分离保存的237株细菌。

大豆:冀豆12,购买于种子市场。

PDA培养基:土豆200 g,葡萄糖或蔗糖20 g,水1 000 mL,pH7.0~7.2,琼脂15~18 g。

NB培养基:牛肉膏5 g,蛋白胨10 g,NaCl 5 g,水1 L,pH7.0~7.2;每1 L NB培养基中加入琼脂15~18 g为NA培养基。

1.2 方法

1.2.1 微生物活化 尖孢镰刀菌的活化采用PDA培养基,用打孔器取直径6 mm的指示菌(尖孢镰刀菌)菌块,置于PDA培养基中央,28℃倒置培养3~4 d,待用。细菌的活化采用NA培养基,将4℃保存的细菌接种在NA培养基中进行活化,37℃培养24 h后待用。

1.2.2 初筛 取5 mL无菌水倒入培养好的病原菌平板中,用接种针刮取菌丝及孢子,制备悬液。将悬液倒入到冷却后的灭菌PDA培养基,混匀。病原菌平板的制备采用双层培养基,先在直径为9 cm的平板底部平铺约10 mL PDA培养基,上层倒入约5 mL含有病原菌的PDA培养基。待病原菌平板冷却后,挑取活化好的细菌单菌落在尖孢镰刀菌病原菌平板上划十字,该平板倒置于28℃培养箱中培养3~5 d,观察该细菌的抑菌效果。筛选具有较强拮抗能力的菌株进行复筛。

1.2.3 复筛 将NA斜面培养基上活化好的细菌接入NB液体培养基中,37℃、200 r·min⁻¹发酵72 h后,4℃、10 000 r·min⁻¹离心10 min,收集上清液,并经细菌滤器(孔径0.22 μm)过滤,即得无菌发酵液。

在上述双层病原菌平板上用直径为6 mm的打孔器选择合适的间距打孔。取70 μL的上述无菌发酵液注入小孔内。平板放置在28℃培养箱中,培养3~5 d后,测量抑菌圈直径并记录试验结果。

1.2.4 拮抗菌形态特征及生理生化性质鉴定 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[7]和《微生物学实验》中的方法观察菌落的形态、大小、边缘、表面、凹凸度、透明度等形态特征和经结晶紫染色后的显微镜下的菌体特征。

按照《常见细菌的鉴定方法》进行细菌的生理生化鉴定,包括细菌的运动性,厌氧性实验,接触酶实验,丙二酸利用,柠檬酸利用,耐盐性检测,糖醇发酵实验,甲基红实验,V-P测定,淀粉水解,产氨实验,荧光色素,吡啶实验,硝酸盐还原,明胶液化,卵磷脂实验。

1.2.5 DNA提取 拮抗细菌DNA的提取采用

CTAB法。取1 mL细菌培养液于1.5 mL灭菌的离心管中,10 000 r·min⁻¹离心10 min,弃上清。加600 μL TE(1 mL 1 mol·L⁻¹ Tris-Cl,0.2 mL 0.5 mol·L⁻¹ EDTA-Na₂,pH8.0,98.8 mL双蒸水)悬浮沉淀,37℃水浴1 h,其间每隔5 min摇1次。加10 μL的proteinase K(20 mg·mL⁻¹)、溶菌酶(10 mg·mL⁻¹)和30 μL10% SDS,37℃水浴20 min。加80 μL的CTAB提取液(65℃预热,20 mL 0.5 mol·L⁻¹ EDTA-Na₂,10 mL 1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液,10 mL 1 mol·L⁻¹ Tris-Cl,8.755 g NaCl,1 g CTAB,2 g CaCl₂,60 mL双蒸水,灭菌后,加入0.1 mg BSA)和100 μL超饱和NaCl,65℃水浴20 min。加400 μL氯仿:异戊醇(24:1)于离心管中,剧烈混匀。13 000 r·min⁻¹离心,10 min。吸取上清液,加入200 μL的异丙醇沉淀,轻轻混匀。12 000 r·min⁻¹离心,10 min。倒上清,0.5 mL乙醇沉淀,12 000 r·min⁻¹离心10 min,重复2次,沉淀物用50 μL的TE溶解,待用。

1.2.6 16S rRNA基因扩增 引物为通用引物,正向引物为27F:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物为1495R:5'-CTACGGCTACCTTGT-TACGA-3'。分别位于16S rRNA基因的27~46和1 476~1 495位的碱基片段(以*Escherichia coli*的16S rRNA基因碱基位置为准)。

PCR反应体系:DNA模板1 μL,dNTP Mixture(25 mmol·L⁻¹) 1.6 μL,27F(10 μmol·L⁻¹) 1 μL,1495R(10 μmol·L⁻¹) 1 μL,10×ExTaq Buffer(含Mg²⁺) 2 μL,ExTaq DNA聚合酶0.2 μL,补ddH₂O至20 μL。

PCR反应条件:95℃(5 min)-[95℃(1 min)-56℃(1 min)-72℃(1 min 30 s)](29个循环)-72℃(10 min)。电泳检测PCR产物:用1×TAE缓冲液配制1.0%琼脂糖凝胶溶液(不含EB),铺板。取PCR产物3 μL分别与适量上样缓冲液混匀,上样,使用DNA Marker作为参照,在1×TAE缓冲液中80 V恒压电泳。电泳结束后,进行EB染色,用紫外凝胶扫描仪扫描、照相,记录结果。PCR产物经试剂盒纯化后,送华大基因有限公司测序。

1.2.7 测序及系统发育树分析 将所测得的16S rRNA基因序列用BLAST软件与GenBank数据库进行相似性分析,并与GenBank中的相近序列在Clustal X(1.8)程序包中进行多重序列匹配排列(Multiple alignments)分析,最后形成一个多重序列匹配排列阵,其中形成的缺口用横杠“-”填补,利用MEGA 5软件构建Neighbour-joining系统发育树。

1.2.8 盆栽防效实验 采集农田土,风干后过10目筛,每盆(直径13 cm×高12 cm)装入土1 000 g。浇透水晾2 d后,每盆放入5块直径为6 mm的尖孢镰刀菌菌块。将表面消毒后的大豆播种于盆中,每盆保苗3株,每个处理60盆。同时,在每粒种子上加入1 mL浓度为1×10⁸ CFU·mL⁻¹(处理组)的枯

草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) 8-32 菌液。待大豆生长到第 7 天,第 14 天和第 21 天对大豆根腐病病情指数进行调查。方法如下:

每个处理取 20 盆,对 60 株对其发病程度进行分析,根据根腐病分级标准对大豆幼苗根部进行分级。

- 根腐病分级标准:
- 0 级:主根须根健全,无病斑,根瘤多;
 - 1 级:主根上有零星病斑,但不连片,须根上无病斑;
 - 2 级:主根病斑连片,但小于根部周长 1/4,须根略有发病;
 - 3 级:主根病斑大于根部周长的 1/4,但小于 1/2,须根病斑较多,但不连成片;
 - 4 级:主根病斑大于 1/2,但小于 3/4,须根病斑成片部分须根脱落;
 - 5 级:整个根部均有病斑包围,根部腐烂,须根近无。

分级后对病情指数进行计算:
病情指数 = $100 \times \sum (\text{级数} \times \text{该级株数}) / (\text{发病最高级数} \times \text{总株数})$

1.3 数据分析

采用 Excel 2010 和 SPSS 18.0 软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 初筛结果

采用“十字”划线法从实验室保藏的 237 株细菌中初步筛选出对尖孢镰刀菌具有拮抗活性的菌株,如图 1A 所示,初步筛选出 11 株对尖孢镰刀菌具有较强活性的菌株,分别是 B-7-1、3A3-15、X-2、Z-15、25a-3、7-76、12-82、12-64、12-34、Z-8 和 8-32。随后采用打孔法通过发酵液中是否产生拮抗物质对上述菌种进行复筛。

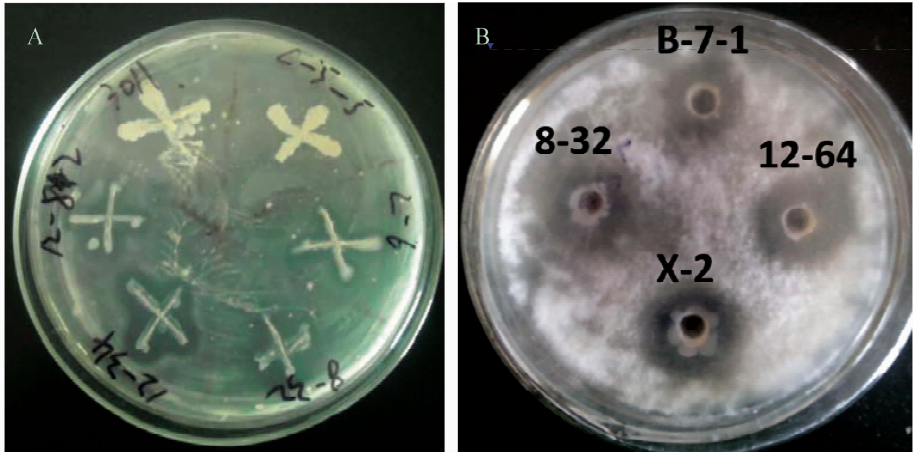


图 1 拮抗菌部分初筛、复筛结果
Fig. 1 Partial results of first and second screening

2.2 复筛结果

采用打孔法对初筛得到的 11 株活性较好的菌株进行复筛,将含有尖孢镰刀菌的 NA 平板平均分 4 个区域,在每个区域中央打直径 6 mm 的小孔,取活化好的这 11 株菌株的上清液 70 μL 注入孔内,每个菌有 4 组平行,培养 3 ~ 5 d 后得到的结果如图 1B 所示,将它们的直径依次测出,直径的平均值见表 1,根据实际测量,8-32 在 11 株菌株里活性最强,对其进行进一步鉴定。

表 1 抑菌圈直径大小 Table 1 Diameter of inhibition zone			
菌株名称 Strain name	直径 Diameter/mm	菌株名称 Strain name	直径 Diameter/mm
B-7-1	20.30	12-82	17.23
3A3-15	16.00	12-64	18.12
X-2	20.13	12-34	17.11
Z-15	17.52	Z-8	15.62
25a-3	17.51	8-32	21.62
7-76	16.33		

2.3 优势菌株的菌落及菌体形态

用竹签挑取少量 8-32 菌株,在 NA 平板上梯度划线,然后倒置于 30℃ 培养箱中培养 24 h。如图 2 所示,8-32 菌落呈乳白色,边缘不整齐有褶皱,表面凸起,不光滑,湿润易挑起(图 2A)。光学显微镜下,菌株 8-32 菌体呈短杆状,有芽孢,革兰氏染色呈阳性(图 2B)。

2.4 菌株 16S rRNA 基因序列分析

采用 1% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,条带清晰,可用于直接测序(图 3)。以菌株 8-32 的 DNA 为模板,PCR 扩增得到该菌株 1 453 kb 的特异性片段,回收测序。该序列经 Blast 分析后用 MEGA 6 构建系统发育树,如图 4 所示,菌株 8-32 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的亲缘关系最近,并且该序列已在 NCBI 上申请序列登录号:KJ955375。

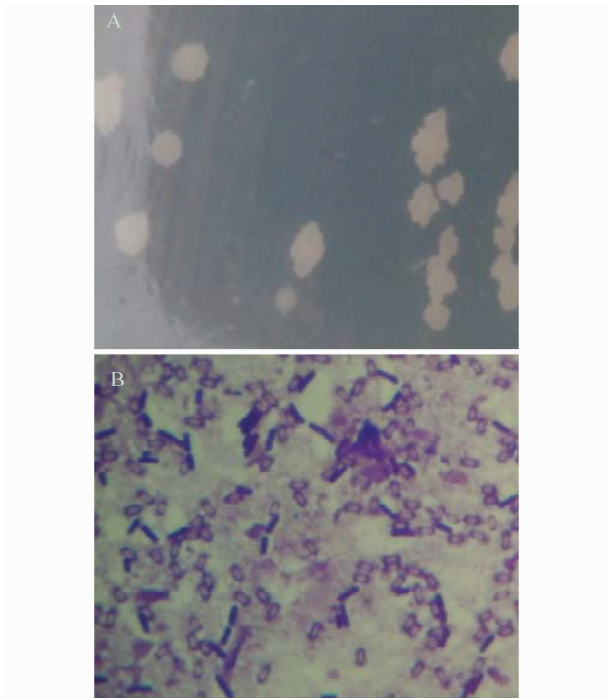
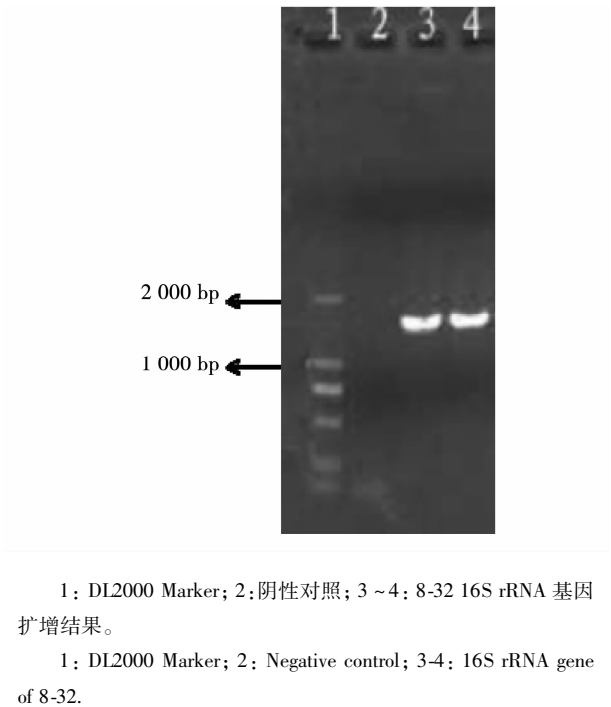


图2 8-32 菌落形态和经结晶紫染色后光学显微镜下菌体形态 (10 × 100 倍)
Fig. 2 8-32 colony morphology and thallimor-
phology under optical microscope (10 × 100)



1 : DL2000 Marker; 2:阴性对照; 3 ~4: 8-32 16S rRNA 基因
扩增结果。

1 : DL2000 Marker; 2: Negative control; 3-4: 16S rRNA gene
of 8-32.

图3 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果
Fig. 3 16S rRNA gene PCR amplified spectrum
of strain 8-32

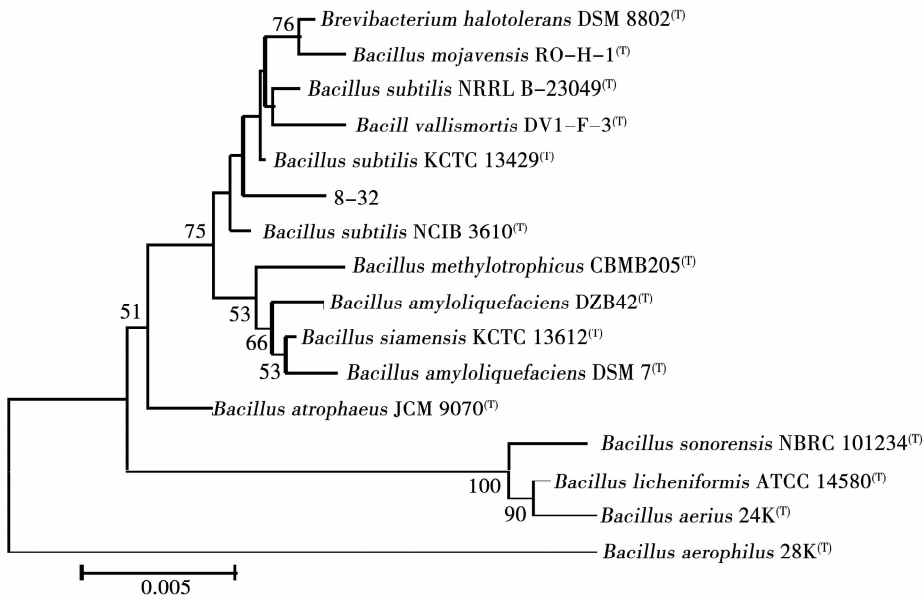


图4 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence

2.5 生理生化性质鉴定

根据《常见细菌鉴定手册》对筛选到的 8-32 菌株进行生理生化性质的测定 (表 2)。结合上述 16S rRNA 基因序列结果,表明 8-32 为 *Bacillus subtilis*。

2.6 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 8-32 的生防效果

通过大豆盆栽试验研究了枯草芽孢杆菌对大豆根腐病的防治效果,结果见表 3。幼苗期是大豆根腐病易发病的时期,本试验研究了在人工接入病原菌情况下研究枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)

8-32对由尖孢镰刀菌引起的根腐病的防治效果。从表 3 可以看出与对照相比,8-32 有效减低了根腐病发病等级,第 7 天时,大豆幼苗的染病情况不明显,对照 CK 实验中染病株数明显高于处理实验。第 14 天和第 21 天时,植株基本上都有不同程度的染病,但 8-32 有效减少了根腐病的发生,尤其是在第 14 天其防治效果达到 32.08%。结果表明,枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 8-32 对大豆根腐病有很好的防治效果。

表 2 拮抗菌株 8-32 的生理生化性质
Table 2 Physiological and biochemical properties of antagonistic strain 8-32

实验种类 Experiment type	菌株 8-32 Strain 8-32	实验种类 Experiment type	菌株 8-32 Strain 8-32
运动性	+	糖、醇类发酵	+
厌氧性实验	兼性厌氧性	甲基红	+
荧光色素	-	V-P 测定	+
丙二酸利用	+	淀粉水解	+
柠檬酸利用	-	产氨实验	+
接触酶	+	吲哚实验	+
2% 氯化钠	+	硝酸盐还原	+
5% 氯化钠	+	卵磷脂酶	+
7% 氯化钠	+	明胶液化	+
10% 氯化钠	-		

+ :表示阳性; - :表示阴性。
+ :Positive; - :Negative.

表 3 大豆根腐病病情指数分级数及 8-32 生防效果
Table 3 Disease index of soybean root rot and biocontrol effect of 8-32

指标 Index	第 7 天 The 7th day		第 14 天 The 14th day		第 21 天 The 21st day	
	CK	处理组	CK	处理组	CK	处理组
		Treatment		Treatment		Treatment
0 级	26	33	3	6	0	4
1 级	14	10	14	23	7	13
2 级	9	11	13	17	11	12
3 级	7	4	11	7	18	16
4 级	4	2	9	5	14	10
5 级	0	0	10	2	10	5
共计 Total	60	60	60	60	60	60
病情指数 Disease index	28.75	21.67	53	36	63	50
防治效果 Control	-	24.64	-	32.08	-	20.63
efficiency/%						

3 结论与讨论

大豆根腐病是影响中国大豆产量的主要病害之一,利用生物防治替代化学药剂成为防治植物病害的发展趋势。国内利用生物防治手段在防治大豆根腐病上也取得了一些效果,其中大多属于芽孢杆菌属,如芽孢杆菌 BH1 对尖孢镰刀菌引起的大豆根腐病的田间防效达 56.1%,大豆增产 7.6%^[8-9];温室条件下,采用 10⁸CFU·mL⁻¹培养液对种子进行包衣处理,AS818 和 AS929 菌株对由尖孢镰刀菌引起的大豆根腐病的防效分别为 77.0% 和 81.4%^[10];王光华等^[11]采用 10⁷CFU·mL⁻¹培养液浸种后,细菌 BRF-1 可促进大豆幼苗生长,在豆长连、重一年和正茬土壤上,对大豆根腐病的防治效果分别达 53.9%、34.4% 和 15.8%。温广月等^[12]也研究了 6 株拮抗细菌对大豆根腐病的拮抗效果,当接种浓度为 10⁸CFU·g⁻¹干土时,菌株 18BRR2-2 盆栽防效达到了 45.9%;与上述结果相比,本试验中每株接入 1 mL 1.0 × 10⁸CFU·mL⁻¹的 8-32 菌液,

土壤中生防菌的含量远低于 10⁸CFU·g⁻¹干土,但生物防治效果可以达到 20.63% ~ 32.08%,说明枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)8-32 在防治由尖孢镰刀菌引起的根腐病上具有显著的生防效果,具有一定的商业开发潜力。8-32 具有较强的尖孢镰刀菌拮抗能力,但其机理尚不明确,需要进一步的研究。

参考文献

[1] 梁喜龙,郑殿峰,左豫虎. 大豆根腐病的研究现状及展望[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2003, 15(4):30-34. (Liang X L, Zheng D F, Zuo Y H. The status of the study and prospect on soybean root rot[J]. Journal of Heilongjiang August First Land Reclamation University, 2003, 15(4):30-34.)

[2] 刘金波,许艳丽. 我国连作大豆土壤微生物研究现状[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(1):132-136. (Liu J B, Xu Y L. Current research of soilmicrobial of successive soybean cropping in China[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(1):132-136.)

[3] Li C G, Li X M, Kong W D, et al. Effect of monoculture soybean on soil microbial community in the Northeast China[J]. Plant Soil, 2010, 330:423-433.

[4] Li Y G, Ma F M. Antagonistic mechanism of *Fusarium oxysporum* of soybean root rot by *Bacillus subtilis*[J]. Applied Mechanics and Materials, 2012, 108:127-131.

[5] 谢晶. 植物病原菌拮抗微生物的筛选、鉴定及拮抗机理研究[D]. 成都:四川大学,2004. (Xie J. Sereening, identification and antagonism of antagonistic organisms againstphytopathogene [D]. Chengdu: SichuanUniversity, 2004.)

[6] Baker K F. Evolving concepts of biological control of plant pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 1987, 25(1):67-85.

[7] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社, 2001:349-388. (Dong X Z, Cai M Y. Common bacterial i-identification manual [M]. Beijing: Science Press, 2001: 349-388.)

[8] 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 rhizobac-teria BH1 (*Bacillus* sp.) to suppress soybean root rot disease caused by *Fusarium* spp[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2003, 19(4):180-184.)

[9] 郭荣君,刘杏忠,杨怀文. 大豆根际细菌 I 拮抗大豆根腐病菌研究[J]. 大豆科学, 1998, 17(1):53-58. (Guo R J, Liu X Z, Yang H W. Soybean rhizobacterial I: Studies on control of soybean root rot disease[J]. Soybean Science, 1998, 17(1):53-58.)

[10] 全赞华,王学士. 大豆根腐病拮抗菌的室内筛选及温室测定[J]. 中国生物防治, 1997, 14(1):25-27. (Tong Z H, Wang X S. Screening for antagonistic isolates against soybean root rot dis-ease in the laboratory and greenhouse[J]. Chinese Journal of Bio-logical Control, 1997, 14(1):25-27.)

[11] 王光华,周克琴,张秋英,等. 拮抗细菌 BRF-1 对几种植物病原真菌的抗生效果[J]. 中国生物防治, 2003, 19(2):73-77. (Wang G H, Zhou K Q, Zhang Q Y. Antagonism of *Bacillus* strain BRF-1 against plant pathogenic fungi[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2003, 19(2):73-77.)

[12] 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 potentialbio-control agents against soybean root rot[J]. Soybean Science, 2005, 24(2):121-125.)