



# 大豆镰刀菌病害生防菌的分离鉴定及防治效果验证

贾昱靖, 王晨骄, 徐海洋, 刘洪伯, 马雅秋, 李 婕, 孔德成, 黄晶心

(云南师范大学 能源与环境科学学院, 云南 昆明 650500)

**摘要:**为解决镰刀菌病害对大豆种植业造成的损失,避免化学药剂对农产品质量和人体健康的风险,本研究分离针对大豆镰刀菌病害的生防菌,通过分子生物学和生物信息学手段鉴定生防菌类型,并通过温室试验验证生防菌对大豆尖孢镰刀菌病害的防治效果。研究共分离得到 144 株菌,其中 1 种 Y8 菌株对尖孢镰刀菌大豆专化型有较强的防治效果,这种菌经鉴定为假单胞菌属微生物。试验结果显示:Y8 菌株能够有效保护大豆免受尖孢镰刀菌的侵染,使大豆的病情指数降低 42.23%。相对于对照组,Y8 菌株使大豆的生物量提高 45.9%,使根生物量提高 73.3%,大豆籽产量提高 35.4%,叶绿素含量提高 22.7%。这可能是由于 Y8 菌株成功的在大豆根际定植,抑制尖孢镰刀菌的生长,并且其次生代谢物能促进大豆的生长。本研究发现的假单胞菌属微生物可为大豆尖孢镰刀菌病害的防治提供一种有效的解决途径。

**关键词:**大豆;生物防治;尖孢镰刀菌;植物保护

## Isolation, Identification and Control Effect of Biocontrol Bacteria Against Soybean *Fusarium Oxysporum* Disease

JIA Yu-jing, WANG Chen-jiao, XU Hai-yang, LIU Hong-bo, MA Ya-qiu, LI Jie, KONG De-cheng, HUANG Jing-xin  
(School of Energy and Environment Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China)

**Abstract:** In order to solve the loss of soybean planting caused by *Fusarium oxysporum* disease and avoid the risk of chemical agents to the quality of agricultural products and human health, the biocontrol bacteria against soybean *F. oxysporum* were isolated by microbial method, and its type were identified by molecular biology and bioinformatics. The control effect of biocontrol bacteria against soybean *F. oxysporum* was tested by greenhouse experiments. A total of 144 strains were isolated, strain Y8 had strong control effect on *F. oxysporum* soybean specific type. The strain was identified as *Pseudomonas*. The greenhouse experiment results showed that Y8 strain could effectively protect soybean from *F. oxysporum* infection. Compared with control treatment, the total and ground biomass of soybean were 45.9% and 73.3% higher, produced 35.4% and 22.7% more soybean seeds and chlorophyll content. This might be due to the successful colonization of strain Y8 in soybean rhizosphere, which inhibited the growth of *F. oxysporum*, and its secondary metabolites could promote the growth of soybean. The *Pseudomonas* microorganisms found in this study could provide an effective way to control soybean *F. oxysporum* disease.

**Keywords:** Soybean; Biological control; *Fusarium oxysporum*; Plant protection

大豆占全球农作物种植面积的 5%, 是全世界最重要的农作物之一<sup>[1]</sup>。镰刀菌引起的大豆减产造成严重的经济损失, 并且镰刀菌的毒性次生代谢产物还间接的通过污染大豆而潜在的影响人体健康<sup>[2-3]</sup>。目前针对大豆镰刀菌病害的防治手段主要是化学农药防治法, 但是化学农药的使用不仅会造成土壤生物多样性的丧失, 还会使致病微生物产生抗药性<sup>[3]</sup>。化学防治还容易造成农药在土壤中的残留, 胡启山等<sup>[4]</sup>研究表明农药利用率一般为

10%, 约有 90% 的剩余农药残留在环境中。生物防治因环境友好, 便于实施, 并且可以持久有效地防治农作物病害, 在全世界范围内取得广泛的关注<sup>[5-6]</sup>。在农业生产上常用的生防菌种类有真菌、细菌和放线菌, 其中生防真菌包括木霉菌等, 生防细菌包括芽孢杆菌等, 生防放线菌包括链霉菌属和小单孢菌属, 施用的对象包括粮食作物和油料作物等<sup>[7-8]</sup>。利用生物防治代替化学农药防治作物病害已成为目前发展的趋势<sup>[9-10]</sup>, 大豆病害的生物防治

收稿日期: 2018-11-19

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31800443); 云南省教育厅基金(2018JS144); 云南师范大学博士启动基金(2017ZB021)。

第一作者简介: 贾昱靖(1995 -), 女, 硕士, 主要从事农业病害防治。E-mail: HiLynette1108@yeah.net。

通讯作者: 黄晶心(1986 -), 男, 博士, 讲师, 主要从事农业病害防治、污染土壤改良。E-mail: huangjingxin17@163.com。

也有报道,例如全赞华等<sup>[11]</sup>获得的两株拮抗菌株,其发酵滤液在平板抑菌试验中对致病菌的抑菌率分别为 77.0% 和 81.4%;郭荣君等<sup>[12]</sup>获得两株防病效果较好的菌株,平板抑菌试验中对尖孢镰刀菌的防效分别为 64.0% 和 63.4%,但目前上述生防菌对镰刀菌的抑制效果均为实验室内平板抑菌试验中获得,而高效生防菌在大豆栽培中的实际效果如何仍需要进一步的验证。

本研究通过微生物试验方法分离获取针对大豆镰刀菌病害的高效生防菌,通过分子生物学及生物信息学方法鉴定生防菌的类型,并通过温室试验验证了生防菌针对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的防治效果,旨在为大豆镰刀菌病害的防治提供更多的微生物菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

参照 Riley 和 Barber<sup>[13]</sup>所提供的的方法,在我国西南地区大豆的产区之一云南省文山州采集健康大豆植株根际土,采集样地大豆的种植品种为山东 7222。本研究使用镰刀菌大豆专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*)作为指示菌。

1.2 生防菌的分离纯化与筛选鉴定

1.2.1 土壤细菌的纯化分离 采用稀释涂布法分离和纯化土壤微生物,具体做法如下:取大豆根际土壤 0.5 g,通过梯度稀释法稀释为 10<sup>-5</sup> 倍土壤悬液。取 50 μL 土壤悬液涂布至 LB 固体培养基,培养 48 h 后通过划线法对长出的菌落进行分离纯化。将分离纯化后的细菌转移至 LB 液体培养基,摇床培养 48 h 后,取 2 mL 保存在 -80℃ 的冰箱中作进一步筛选。

1.2.2 生防菌的初步筛选 通过平板对峙法筛选纯化得到的株菌中具有生防功能的种类,平板对峙试验中所用的目标菌株为尖孢镰刀菌大豆专化型。具体的做法如下:将浸有生防菌液的滤纸放在平板上静置 30 min,用打孔器将镰刀菌菌饼置换入平板中央待接种 7 d 后测抑菌圈大小<sup>[14]</sup>,筛选抑制镰刀菌大豆专化型效果最优的微生物作进一步的研究。

1.2.3 生防菌种类鉴定 将筛选出的生防作用最强的菌株接种于 LB 液体培养基中,28℃ 摇床培养 48 h 后离心收集。使用 SK8255 kit 试剂盒(Sagan corporation, Shanghai)提取 Y8 菌株 DNA,使用正向引物 27F (5'-AGAGTTTGGATCCTGGCTCAG-3') 和反

向引物 1492R (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3')<sup>[15]</sup>扩增 Y8 菌株 16S rDNA,扩增后的 DNA 片段纯化后交上海生工测序。

1.3 防治效果验证

为验证 Y8 菌株在田间防治大豆镰刀菌病害中的效用,本研究于 2018 年 3-9 月在云南师范大学校园温室内开展大豆镰刀菌病害的生防试验。共设计 5 个处理组,包括对照组(CK)、尖孢镰刀菌处理组(F)、尖孢镰刀菌+多菌灵处理组(F+C)、尖孢镰刀菌+Y8 菌液处理组(F+Y)、Y8 菌液处理组(Y),每处理 3 个重复。采集云南师范大学校园绿化用地中未种植过农作物的土壤,自然风干后仔细去除其中的杂物和动植物残体,然后将其破碎、混匀、过 5 目筛。过筛后的土壤分装至 15 个 22.5 cm × 18 cm × 21 cm(上径 × 下径 × 高)的塑料花盆中,每个盆中装土 3 kg,每盆土壤中种植大豆 3 株作为 1 个重复。

待大豆发芽长至 10 cm 后,CK 组只进行日常的浇水和除草;F 处理添加浓度均为 1 × 10<sup>6</sup> cfu · mL<sup>-1</sup> 的尖孢镰刀菌大豆专化型菌液 1 L;本研究为了更加清楚的判断 Y8 菌株的防治效果,使用具有广谱杀菌活性的多菌灵作为参照设置 F+C 处理组,F+C 处理按照一般农业病害防治的方法添加稀释 750 倍的多菌灵(江苏泰仓农化有限公司,有效成分含量 80%)和尖孢镰刀菌大豆专化型菌液各 1 L;F+Y 处理添加尖孢镰刀菌大豆专化型菌液和浓度为浓度为 1 × 10<sup>6</sup> cfu · mL<sup>-1</sup> 的 Y8 菌液各 1 L;Y 处理添加 Y8 菌液 1 L。为了降低试验误差,本研究中加液量不足 2 L 的 F 处理和 Y 处理均用无菌水补足至 2 L。

1.3.1 对大豆生长发育的影响 8 月中旬使用 SPAD-502 Plus (KONICA MINOLTA, Japan)测定大豆植株第 3 伸展叶叶绿素含量。待大豆种子成熟以后测定大豆植株的株高。将清洗后的大豆植株分装至信封后带回实验室 72℃ 烘干 48 h,称重确定大豆整株的生物量、地下生物量、籽粒重量,使用游标卡尺测量大豆植株的茎基直径。

1.3.2 镰刀菌病害防治效果 株高测量完毕后,将同一盆中的 3 株大豆植株小心取出,按照以下标准将大豆的镰刀菌的发病情况进行分级:

- 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。

根据根腐病分级标准对大豆根部进行分级,根据以下公式计算病情指数及防治效果。

病情指数(%) =  $\frac{\sum(\text{级数} \times \text{该级株数})}{(\text{发病最高级数} \times \text{总株数})} \times 100$

防治效果(%) =  $\frac{(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数})}{\text{对照病情指数}} \times 100$

1.4 数据分析

使用 R 3.1.2 对数据进行统计分析和差异行比较,使用 Excel 2016 绘制图表。

2 结果与分析

2.1 镰刀菌病害生防菌的分离鉴定结果

2.1.1 镰刀菌病害生防菌的分离结果 本研究共纯化得到 144 株细菌,通过平板对峙试验,从中筛选出对尖孢镰刀菌大豆专化型生防作用最强的菌株,命名为 Y8 菌株。Y8 菌株在平板对峙中对尖孢镰刀

菌的抑制效果试验显示尖孢镰刀菌无生长,无产孢现象,并且 Y8 菌苔可在 5 d 后完全覆盖尖孢镰刀菌接种的菌饼,这表明 Y8 菌株对大豆尖孢镰刀菌专化型具有良好的抑制效果(图 1)。

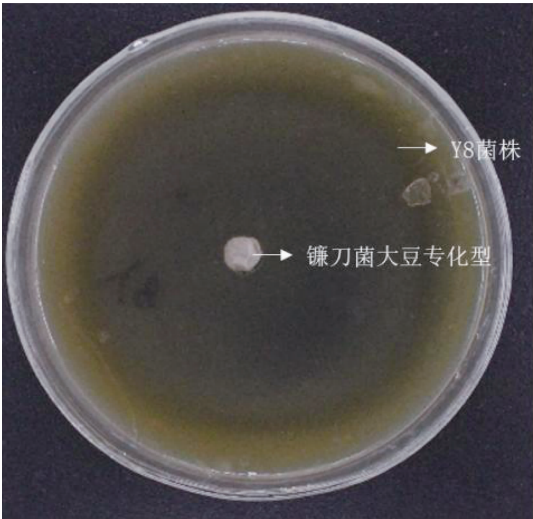


图 1 Y8 菌株对尖孢镰刀菌的抑制效果  
Fig. 1 Inhibitory effect of Y8 strain on *F. oxysporum*

2.1.2 镰刀菌病害生防菌的鉴定结果 经序列比对,Y8 菌株被鉴定为假单胞菌(图 2),将测序结果上传至 NCBI-GeneBank 数据库获得的序列登录号为:MK172782。

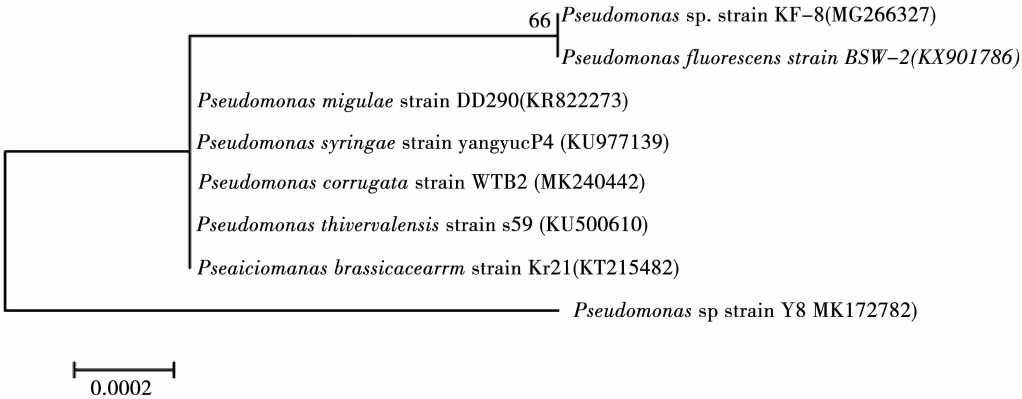


图 2 Y8 菌株基于 16S rDNA 序列进化树  
Fig. 2 Phylogenetic tree of Y8 strain based on 16S rDNA sequences

2.2 防治效果验证结果

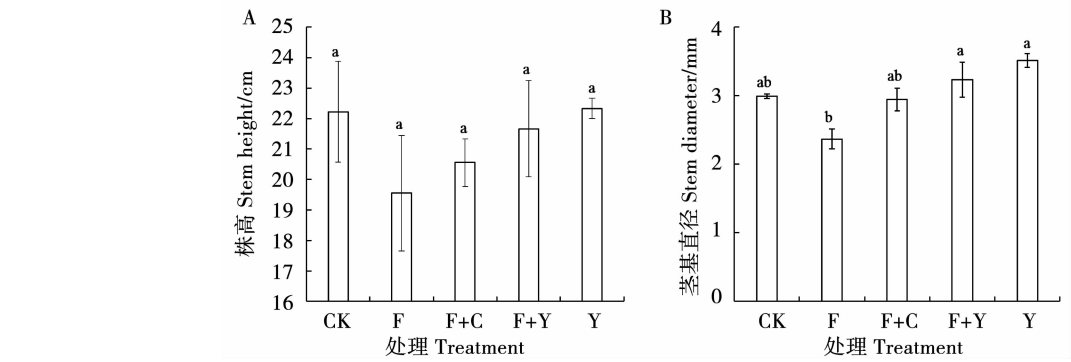
- 2.2.1 发病指数和防治效率 由表可知,在 F + Y 组的处理下,病情指数较 F + C 组降低了 7.41%,防治效率提高了 11.5%。并且,在 Y 处理下,大豆的病情指数也较 CK 组低。说明 Y8 菌株本身对大豆没有危害,并且能有效的防治大豆根腐病(表 1)。
- 2.2.2 株高和茎粗 Y 处理组大豆的株高最高,F 处理组的株高最低,不同处理组之间大豆的株高没

有显著差异( $P>0.05$ )。不同处理组之间大豆的茎基直径之间存在显著差异( $P<0.05$ ),其中 Y 处理组大豆的茎基直径最高,为 3.51 mm,F 处理组的茎基直径最低,为 2.37 mm(图 3A)。说明 Y8 菌株能够很好的抑制镰刀菌对大豆的侵染,降低镰刀菌对大豆株高和茎基直径的影响,并且相对于稀释 750 倍多菌灵 Y8 菌株有更好的抑制大豆镰刀菌病害的作用(图 3B)。

表 1 不同处理大豆尖孢镰刀菌发病指数和防治效率

Table 1 Different treatments of soybean *F. oxysporum* disease index and control efficiency

指标 Index	CK	F + C	F + Y	F	Y
0 级	0	3	4	0	3
1 级	1	3	4	0	5
2 级	3	1	1	1	1
3 级	3	2	0	3	0
4 级	2	0	0	2	0
5 级	0	0	0	3	0
总计 Total	9	9	9	9	9
病情指数 Disease index/%	66. 67	40. 74	33. 33	75. 56	38. 89
防治效率 Control efficiency/%	—	36. 78	48. 28	—	39. 65



不同字母代表组间存在显著差异  $P < 0.05$ 。下同。  
Different lowercase indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). The same below.

图 3 不同处理下大豆的株高 (A) 和茎基直径 (B)

Fig. 3 Stem height (A) and stem dimeter (B) under different treatments

2. 2. 3 干物质积累 不同处理间大豆的总生物量存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 其中 F + Y 和 Y 处理组相对于 CK、F 处理组有更高的总生物量 ( $P < 0.05$ ), 并且 F + Y 和 Y 处理组相对于 F + C 组的总生物量更高。说明 Y8 菌株能够有效的控制镰刀菌对大豆的致病作用, 并且相对于稀释 750 倍多菌灵效果更好 (图 4A)。不同处理间大豆的单株粒重存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ), 其中 Y 处理组大豆的单株粒重最高, F 处理组大豆的单株粒重最低。说明

Y8 菌液能够控制镰刀菌病害对大豆结籽的影响。F + Y 组的生物量和单株粒重均显著高于 CK 组, 说明 Y8 菌株能够有效控制加入的尖孢镰刀菌对大豆的致病作用, 还能够抑制其它土壤病害对大豆的影响 (图 4B)。不同处理间大豆地下生物量存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), F + C、F + Y、Y 组的地下生物量显著高于 F 组, 说明 Y8 菌株能够有效保护大豆根部 (图 4C)。

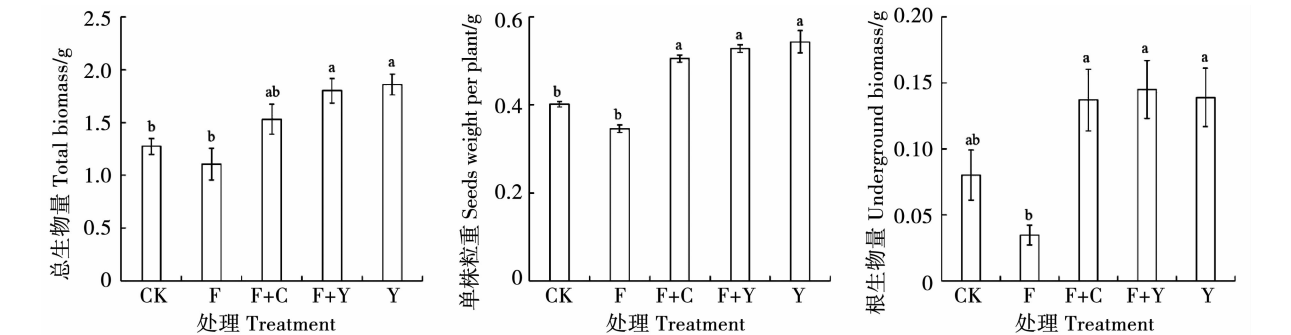


图 4 不同处理下大豆的总生物量 (A)、单株粒重 (B) 和地下生物量 (C)

Fig. 4 Total biomass (A), seeds weight per plant (B) and underground biomass (C) under different treatments

2.3.4 叶绿素含量 不同处理间大豆叶片叶绿素含量之间存在极显著差异 ( $P < 0.01$ ), F 处理组大豆的叶绿素含量最低, 仅为 10.43, Y 处理组大豆叶绿素含量最高为 37.7, 是 F 处理组 3.61 倍。F + Y 组相对 CK 组和 F + C 组叶绿素含量显著的高 ( $P < 0.05$ )。说明 Y8 菌株能够促进大豆叶绿素的合成, 并且相对于稀释 750 倍多菌灵对大豆合成叶绿素有更好的保护作用(图 5)。

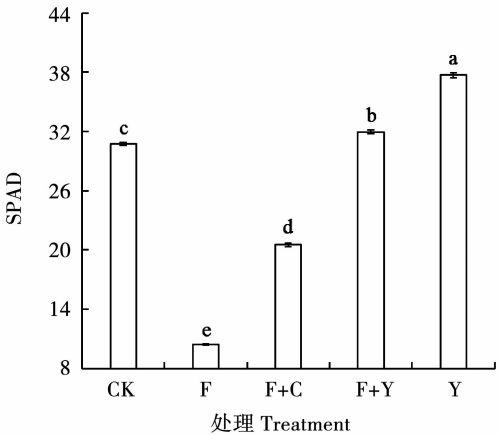


图5 不同处理下大豆叶片叶绿素含量  
Fig. 5 Chlorophyll content under different treatments

3 讨论

本研究从健康大豆根际分离出的生防菌属于假单胞菌属,很多研究报道假单胞菌属生防菌具有良好的生防效果,比如能够有效地控制黄瓜枯萎病,玉米镰刀菌病害<sup>[16-17]</sup>。并且一系列研究结果显示假单胞菌分泌的次生代谢物:吩嗪、吡咯硝嗪、2,4-二乙酰基间苯三酚(DAPG)能够使镰刀菌细胞壁溶解、变形,导致镰刀菌的死亡<sup>[9, 18]</sup>。平板对峙试验中可看出 Y8 菌株完全抑制了尖孢镰刀菌的生长,接种至平板中心的镰刀菌出现死亡和溶菌的现象,这和上述研究结果相类似,推测可能是 Y8 菌株能够分泌上述类型的次生代谢产物,从而对镰刀菌具有抑制和杀灭的作用。本研究使用的对象致病菌为镰刀菌大豆专化型,Y8 菌株在平板对峙试验和温室试验中均表现出对镰刀菌大豆专化型具有较强的抑制作用,说明假单胞菌属生防菌对于大豆镰刀菌病害同样具有良好的生防效果,可潜在的用于大豆镰刀菌病害的生物防治。研究结果表明 Y8 菌株对大豆镰刀菌专化型的防治效果优于多菌灵稀释 750 倍液的效果,这或许是由于多菌灵施入土壤后会分解,只能短时间起到杀灭镰刀菌的效果,而生防菌往往能定植于作物的根际,长时间地起到抑制和杀灭镰刀菌的效果<sup>[5, 10]</sup>。

本研究中 Y8 菌株能够显著抑制尖孢镰刀菌,并且具有促进大豆株高、茎基直径、生物量和结籽重量的作用,这和其它研究的结果相类似<sup>[5-6, 16-17]</sup>。假单胞菌类生防菌能通过两种途径促进植物的生长发育,一方面能够利用植物根际分泌物,并且在根际形成抵抗病原微生物的"前线",保护植物的根部免受病原微生物的侵染,从而促进植物的生长<sup>[5-6]</sup>。另一方面有些类型的假单胞菌类微生物还能合成长素类似物,这些生长素类似物能够促进植物叶绿素的合成和根的生长,从而促进植物的光合作用和对营养物质的吸收<sup>[5, 9]</sup>。本研究发现 Y8 菌株能够提高大豆叶绿素含量,并且降低大豆根部尖孢镰刀菌的侵染,这或许是由于 Y8 菌株成功地定植在了大豆根际,在根部形成保护大豆的生物屏障,减少镰刀菌对大豆根的侵染;同时,Y8 菌株或许还能分泌生长素类似物,促进大豆根的生长和叶绿素的合成,从而促进大豆的光合作用和营养物质的吸收,通过这两方面的作用进而促进大豆的生长和结实。

4 结论

本研究通过微生物方法分离得到针对尖孢镰刀菌大豆专化型具有良好抑菌活性的微生物,并通过分子生物学和生物信息学的方法鉴定为假单胞菌属微生物。通过温室试验发现这种微生物能够有效的控制大豆镰刀菌病害,并且能够使镰刀菌对大豆根的病情指数降低 42.23%,使大豆的总生物量和根生物量分别提高 45.9%、73.3%,大豆结实量提高 35.4%,叶绿素含量提高 22.7%。说明本研究发现的生防菌对大豆尖孢镰刀菌病害具有良好生防效果,并且能通过保护大豆根和促进叶绿素合成的方式促进大豆的生长和结实,具有良好的应用前景。

参考文献

[1] Leff B, Ramankutty N, Foley J A. Geographic distribution of major crops across the world [J]. Global Biogeochemical Cycles, 2004, 18(1): GB1009.

[2] Wang D, Kurle J E, Estevez J C, et al. Radiometric assessment of tillage and seed treatment effect on soybean root rot caused by *Fusarium* spp. in central Minnesota [J]. Plant and Soil, 2004, 258 (1): 319-331.

[3] Hartman G L, West E D, Herman T K. Crops that feed the world 2. Soybean-worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests[J]. Food Security, 2011, 3(1): 5-17.

[4] 胡启山. 农作物农药污染的综合防控[J]. 科学种养, 2012

(10): 53. (Hu Q S. Comprehensive prevention and control of pesticide pollution in crops [J]. Scientific Breeding, 2012 (10): 53. )

[ 5 ] Compant S, Reiter B, Sessitsch A, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4951-4959.

[ 6 ] Arseneault T, Filion M. Biocontrol through antibiosis: Exploring the role played by subinhibitory concentrations of antibiotics in soil and their impact on plant pathogens[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2017,39(3): 267-274.

[ 7 ] 童晓茹,王学翠,温学森,等. 植物叶片真菌病害生物防治的研究进展[J]. 山东科学, 2008(1): 41-46. (Tong X R, Wang X C, Wen X S, et al. A survey of the research on biological prevention and treatment of foliage fungal diseases [J]. Shandong Science, 2008(1): 41-46. )

[ 8 ] Ghorbanpour M, Omidvari M, Abbaszadeh-Dahaji P, et al. Mechanisms underlying the protective effects of beneficial fungi against plant diseases[J]. Biological Control, 2018,117: 147-157.

[ 9 ] Rahman S F S A, Singh E, Corn   M J, et al. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens[J]. Plant Science, 2018, 267: 102-111.

[ 10 ] Lecomte C, Alabouvette C, Edel-Hermann,et al. Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review[J]. Biological Control, 2016, 101: 17-30.

[ 11 ] 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,1998(1):26-28. (Tong Z H, Wang X S. Screening for antagonistic isolations against soybean root rot disease in the laboratory and greenhouse [J]. Chinese journal of biological control, 1998(1): 26-28. )

[ 12 ] 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): 54-59. (Guo R J, Liu X Z, Yang H W. Soybean rhizobacteria I studies on control of soybean root rot disease [J]. Crop Science, 1998,17(1): 54-59. )

[ 13 ] Riley D, Barber S A. Salt accumulation at the soybean [ *Glycine max* (L. ) Merr] root-soil interface[J]. Soil Science Society of America Journal, 1970, 34(1): 154-155.

[ 14 ] Wellmanlabadie O, Lemaire S, Mann K, et al. Antimicrobial activity of lipophilic avian eggshell surface extracts[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010,58(18): 10156-10161.

[ 15 ] Suzuki M T, Giovannoni S J. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(2): 625-630.

[ 16 ] Senthil R, Selvaraj S, Anand T, et al. Efficacy of liquid *Pseudomonas fluorescens* (Pfl) against sugarcane red rot, caused by *Colletotrichum falcatum*, under field conditions [J]. International Sugar Journal, 2011,113(1356): 888-893.

[ 17 ] Raza W, Ling N, Zhang R, et al. Success evaluation of the biological control of *Fusarium wilts* of cucumber, banana, and tomato since 2000 and future research strategies[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2017,7(2): 202-212.

[ 18 ] Anderson A J, Kim Y C. Biopesticides produced by plant-probiotic *Pseudomonas chlororaphis* isolates[J]. Crop Protection, 2018, 105: 62-69.