

# 大豆根际细菌<sup>I</sup>拮抗大豆根腐病菌研究<sup>\*</sup>

郭荣君 刘杏忠 杨怀文

(中国农科院生物防治研究所 100081)

## 摘 要

本研究从 41 个土样中分离到大豆外根际细菌 723 株,根内细菌 194 株。通过对病原菌  $F_3$  (*Fusarium oxysporum*)、 $W_1$  (*Fusarium solani*)、 $S_1$  (*Fusarium* SP.) 的平板拮抗测定,得到拮抗菌 279 株,对其中 15 株根际细菌进行了温室防病试验,得到 2 株防病效果较好的菌株,其中  $BH_1$  防效最高,对  $F_3$ 、 $W_1$ 、 $S_1$  的防效分别为: 64. 0%、63. 4%、33. 3%。

关键词 大豆根腐病;根际细菌;拮抗

## 前 言

大豆根腐病分布广、危害重,是防治困难的世界性病害。在我国东北和黄淮海大豆主要产区,大豆根腐病危害严重,韩庆新和辛惠普<sup>[1]</sup>报道:大豆根腐病在黑龙江垦区发病率达 75—90%,减产 10—20% 左右。随着大豆种植面积的增长,重迎茬面积必增加,使根腐病进一步加重。对根腐病的防治,国内一般是通过轮作、改进栽培措施、用种衣剂处理种子来防治。但由于根腐病为多种病原真菌的复合侵染,且病原真菌是土壤习居菌,采用轮作难以达到防治效果。药剂防治则因用药量大,成本高,毒性大及对环境的污染而受到限制。

用根际细菌防治土传病害,在最近十几年有很大发展<sup>[1, 2, 5, 6, 9, 10, 11, 12]</sup>,也有许多成功的报道。其中研究较多的是 *Bacillus* spp.、*Pseudomonas* spp., 荧光假单胞菌对多种作物(西红柿、花生、大豆、大麦、玉米)还有促生长或增产作用。对大豆根腐病的生物防治,只有张新德<sup>[4]</sup>曾做过细菌拮抗的初步测定,而对其系统研究未见报道。

大豆起源于中国,大豆根表微生物总数中,细菌数占绝对优势<sup>[3]</sup>。本研究旨在从大豆根际土中筛选出对大豆根腐病具拮抗作用的根际细菌,为大豆根腐病的生物防治打下基础。

## 材料和方法

### 1 供试材料

#### 1.1 大豆 垦农 4 号 黑龙江省农垦科学院作物所提供

\* 收稿日期 1997-05-20 This paper was received on May 20, 1997.

## 1.2 病原真菌

F<sub>3</sub> (*Fusarium oxysporum*) 菌株 黑龙江省农垦科学院植保室谢云清提供

W<sub>1</sub> (*Fusarium solani* f. sp. *glycines*) 山东省农科院植保所李长松提供

S (*Fusarium* sp.) 本室分离得到

## 1.3 培养基

PDA培养基; Czapek蔗糖硝酸盐培养液; NA培养基; NB培养液; King's B培养基 (KMB); 几丁质培养基; 明胶培养基

## 2 方法

### 2.1 根际细菌分离方法

从山东、安徽、河南、山西、辽宁、吉林、河北采集土样 41个, 放置在种植器小室中(每小室的体积 324cm<sup>3</sup>, 高 18cm, 上底面积 20cm<sup>3</sup>, 下底面积 16cm<sup>3</sup>), 于每小室种 3棵大豆, 每个土样 4个重复。于幼苗期进行根际细菌的分离。

2.1.1 外根际 (Ectorrhizosphere) [包括根际 (Rhizosphere) 根表 (Rhizoplane)] 细菌分离

取大豆幼苗(第一片真叶期)根, 轻轻抖去大块土, 放于 20ml 无菌的 0.02M 磷酸缓冲液 (pH6.8) 中, 加入 0.5ml/100吐温 80(终浓度 0.025%), 150rpm 振荡 1小时。从中取 10ml 系列稀释, 涂于 KMB 和 NA 平板上。剩余样品 80℃ 水浴 20分钟, 系列稀释, 涂于 NA 平板上

### 2.1.2 根内 (Endorhizosphere) 细菌分离

根段用 1/10 (1.7-1.8%) NaClO 表面消毒 10分钟, 在无菌研钵中研碎, 稀释 100倍, 涂布于 NA 和 KMB 平板上。

NA 平板于 28℃ 培养 24-48小时, 挑单菌落, 纯化, 保存于斜面, 胶塞封口, 4℃ 冰箱保存。KMB 平板于 25-26℃ 培养 48小时, 在紫外灯下有荧光的, 挑单菌落, 纯化, 保存于 KMB 斜面上或蒸馏水中。

## 2.2 平板拮抗测定

2.2.1 革兰氏染色: 将所得菌株新鲜培养物, 通过革兰氏染色进行鉴别, 保留芽胞菌和 G<sup>-</sup> 菌。

2.2.2 拮抗测定<sup>[8]</sup>: 在 PDA 平板上靠近边缘处划线接种细菌, 每平板 4种, 28℃ 倒置培养 24小时后, 于中央接种直径为 5mm 的病原菌菌丝块。再培养 3天后, 观察抑菌情况。设置 3个重复。抑菌带大于 5mm 的为阳性指标, 保留菌株。荧光假单胞菌于 KMB 平板上进行测定。

## 2.3 温室防病试验

种子用 1% NaClO 消毒 3分钟, 无菌水洗涤 5次, 用浓度为 10<sup>7</sup> cfu/ml 的菌液浸泡 30分钟, 取出, 室温晾 1hr

病原菌接种于 Czapek 蔗糖硝酸盐培养液中, 25℃ 150rpm 振荡培养 6天, 然后按每 0.015m<sup>3</sup> 接种 250ml 液体病原菌 (孢子浓度为 10<sup>7</sup> cfu/ml, 菌丝干重为 1.2g) 的比例, 与自然土混匀。放入加拿大种植器小室, 浇水, 上面覆盖 0.5cm 的潮湿无病土。每个小室放 5颗处理过的种子, 再放 1.5cm 厚无病土。每处理 4个小室, 共 20颗种子。塑料布覆盖, 5

天后移去塑料布,浇水。3—5周后,检查病情。检测株高和病情指数<sup>[1]</sup>。以种植自然种子和农药处理作为对照

## 2.4 根际细菌的鉴定

依据《一般细菌常用鉴定方法》和《伯杰细菌鉴定手册》(第8版)进行形态观察和生理生化反应测定,将有效根际细菌鉴定到属

# 结 果

## 1 大豆根际细菌的分离

从所采集的41个土样中共分离到937株根际细菌,其中从外根际分到细菌723株,根内细菌194株。在从根际分离细菌时,使用了3种选择性培养基,从各种培养基上分离

表1 根际细菌对大豆根腐病菌的平板拮抗结果(抑菌带>3mm)

Table 1 The antagonistic effect of *rhizobacteria* to *Fusarium* spp. causing soybean root-rot disease (antagonistic zone > 3mm)

菌株编号	抑菌带 (mm)			菌株编号	抑菌带 (mm)		
	F <sub>3</sub>	W <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>		F <sub>3</sub>	W <sub>1</sub>	S <sub>1</sub>
DS <sub>31-2</sub>	3.0	2.0	3.0	SHG- A <sub>9</sub>	2.0	5.0	-
DS <sub>13-3</sub>	5.0	2.0	2.5	JSY- 6	-	4.0	-
DS <sub>A4</sub>	4.0	1.0	-	JJ3- A <sub>6</sub>	6.0	7.0	8.0
DS <sub>28</sub>	-	8.0	-	JJ <sub>5</sub> - A <sub>10</sub>	4.0	1.0	7.0
BH <sub>1</sub>	2.0	2.0	3.0	PZW S <sub>1</sub> - A <sub>8</sub>	6.0	-	-
BH <sub>2</sub>	2.0	1.0	4.0	PZDTB <sub>1</sub> - B <sub>2</sub>	6.0	3.0	7.0
BHD <sub>9</sub>	-	1.0	3.0	QSG- 6	5.0	4.0	5.0
XB- K <sub>4</sub>	1.0	3.0	3.0	ZJ- A <sub>14</sub>	5.0	5.0	5.0
XB- P <sub>2-1</sub>	稍抗	5.0	2.0	SZ- A <sub>6</sub>	3.0- 4.0	1.0- 2.0	2.0- 3.0
XB- P <sub>5</sub>	稍抗	稍抗	3.0	TPZ- A <sub>2</sub>	2.0- 3.0	2.0- 3.0	2.0- 3.0
DS <sub>B9</sub>	3.0	2.0	3.0	TPZ- A <sub>4</sub>	2.0- 3.0	4.0- 5.0	2.0- 3.0
DS <sub>32</sub>	5.0	3.0	6.0	HN <sub>3</sub> - A <sub>5</sub>	5.0- 6.0	5.0- 6.0	5.0- 6.0
DS <sub>45</sub>	7.0	6.0	6.0	JQ <sub>1</sub> - A <sub>7</sub>	5.0- 6.0	5.0- 6.0	5.0- 6.0
DSOC <sub>3</sub>	2.0	1.0	3.0	JQ <sub>1</sub> - A <sub>1</sub>	2.0- 3.0	2.0- 3.0	2.0- 3.0
MCB <sub>12</sub>	5.0	稍抗	3.0	BH <sub>1</sub> - 0A <sub>12</sub>	5.0- 6.0	5.0- 6.0	5.0- 6.0
DS <sub>1</sub> - D <sub>8</sub>	3.0	2.0	-	BH <sub>1</sub> - 0B <sub>1</sub>	7.0	7.0	7.0
DS <sub>1</sub>	3.5	3.0	-	DS <sub>3</sub> A <sub>9-1</sub>	5.0	5.0	4.0
MC D- A <sub>13</sub>	3.0	2.5	3.5	DS <sub>45-1</sub>	4.0	4.0	4.0
LX- A <sub>6</sub>	3.0	1.0	-	XB- A <sub>4</sub>	3.0	2.0	3.0
ZJ <sub>3</sub> - D <sub>7</sub>	5.0	5.0	-	SY- A <sub>3</sub>	6.0	6.0	6.0
ZJ <sub>3</sub> - D <sub>18</sub>	3.0	2.5	-	TPZ- A <sub>2</sub>	5.0	1.0	6.0
DS <sub>45</sub>	8.0	7.0	7.0	SY- A <sub>12</sub>	6.0	3.0	4.0
QSG- A <sub>10</sub>	6.0	-	-	BH <sub>1</sub> - 0A <sub>5</sub>	3.0	1.0	-
JN- A <sub>11</sub>	3.0	2.0	4.0	SY- A <sub>1</sub>	6.0	6.0	1.0
JN- A <sub>4</sub>	3.0	5.0	6.0	JQ <sub>1</sub> - A <sub>5-1</sub>	6.0	-	9.0
JN- A <sub>3</sub>	5.0	6.0	5.0				

注: - 无拮抗作用 no antagonistic action

到的细菌数分别为:从几丁质培养基分到10株,明胶培养基上分到10株,King's B培养

## 基上分到 37株

### 2 平板拮抗测定,筛选拮抗菌

#### 2.1 革兰氏染色结果

对所分离的根际细菌进行革兰氏染色,发现大多数根际细菌为  $G^+$ ,而且芽胞菌居多。

#### 2.2 平板拮抗测定结果

从所分离的 937株根际细菌中,经平板拮抗测定,得到抗性菌株 279株,对病原菌  $F_3$   $W_1$   $S_1$  抑菌带均大于 5mm的细菌 7株 拮抗带大于 3mm的菌株 51株(表 1),其中对  $F_3$  拮抗菌株 48株,对  $W_1$ 拮抗菌株 48株,对  $S_1$ 拮抗菌株 39株。

#### 2.3 根际细菌温室防病试验

根际细菌拮抗病原菌的机理并不只是产生拮抗物质一种,因此选取了平板拮抗效果较好菌株  $BH_1$   $XB-K_4$   $DS_{13-3}$   $DS_{39}$   $DS_{45}$   $DS_1$   $MCB_{12}$ 从 King's B培养基上分离,可能产生 Siderophore的菌株  $SY-P(2)$   $DSLHX_3$   $MCD-P(3)$ ,从几丁质培养基上分离,可能产生几丁质酶的菌株  $SY-NS$ ,及稍有拮抗作用,可能通过营养竞争起作用的菌株  $BH_1$   $DS_4$   $MCB_1$   $DS_{0c3}$ 进行温室实验。

表 2 根际细菌对大豆根腐病温室防病效果

Table 2 The biocontrol of *rhizobacteria* to soybean root-rot disease in greenhouse

处理	种子包衣浓度 (cfu/ml)	株高(cm)			病情指数%			防效%		
		$F_3$	$W_1$	$S_1$	$F_3$	$W_1$	$S_1$	$F_3$	$W_1$	$S_1$
$BH_1$	$3.39 \times 10^7$	20.0	19.5	17.1	18.0	18.3	33.4	64.0	63.4	33.3
$BH_3$	$1.07 \times 10^7$	24.3	24.0	24.6	20.0	46.5	38.4	40.0	7.0	23.3
$DSLHX_3$	$7.6 \times 10^7$	24.7	23.0	16.5	45.0	38.4	43.4	10.0	23.3	13.3
$DS_{13-3}$	$6.3 \times 10^7$	20.8	18.5	26.0	31.7	43.4	43.4	36.7	13.3	13.3
$DS_4$	$5.0 \times 10^6$	12.0	15.0	24.0	40.0	48.4	48.4	20.0	3.3	3.3
$DS_{45}$	$1.20 \times 10^7$	24.7	27.6	27.8	18.4	23.4	40.0	63.3	53.3	20.0
$DS_1$	$2.53 \times 10^7$	22.5	28.2	16.0	35.5	38.4	40.0	30.0	23.3	20.0
$DS_{39}$	$1.27 \times 10^7$	* *	26.9	24.5	50.0	30.0	35.0	0	40.0	30.0
$DS_{0c3}$	$1.22 \times 10^7$	26.4	18.0	28.0	38.4	36.6	30.0	23.3	26.7	40.0
$MCB_{12}$	$2.77 \times 10^7$	26.9	22.5	27.1	41.7	46.7	30.0	16.7	6.7	40.0
$MCB_1$	$9.0 \times 10^6$	25.0	23.0	20.5	46.7	46.7	43.4	6.7	6.7	13.3
$MCD-P(3)$	$9.76 \times 10^7$	13.7	11.3	17.5	36.7	41.7	38.4	26.7	16.7	23.3
$SY-NS$	$5.86 \times 10^7$	14.3	21.5	23.3	45.0	46.7	48.4	10.0	6.7	23.3
$SY-P(2)$	$4.54 \times 10^7$	34.0	28.0	21.0	50.0	50.0	45.0	0	0	10.00
$XB-K_4$	$2.58 \times 10^7$	14.0	20.0	17.0	48.4	46.7	48.4	13.3	6.7	13.3
多菌灵	- *	7.0	21.0	16.6	46.7	50.0	50.0	16.7	0	0
$\text{CK}$	- *	17.3	- **	- **	50.0	50.0	50.0	0	0	0

注: - \*: 未用细菌处理 not treated by *rhizobacteria* - \*\*: 死苗 seedlings died

菌株  $BH_1$   $DS_{45}$ 对大豆根腐病原菌  $F_3$   $W_1$  防效较好(表 2),防效分别为 64.0%、

63.3%, 63.4%、53.3%, 对  $S_1$  防效较低, 分别为 33.3%、20.0%。与平板拮抗效果一致其它菌株没有表现出明显的防治效果。菌株  $DS_{45}$  还可促进植株生长

## 2.4 根际细菌的鉴定

菌株  $BH_1$  和  $DS_{45}$  细胞形态为: 细胞杆状, 在老培养物中仍为杆状, 革兰氏染色阳性, 能形成芽胞, 芽胞近端生, 接触酶反应阳性, 据这些特点将其定为芽胞杆菌属 (*Bacillus* sp.) 菌株  $DS_1$  的细胞形态为: 细胞极短杆状, 革兰氏染色阴性, 在大豆根部不能形成根瘤, 能氧化葡萄糖和乙醇, 具鞭毛, 鞭毛极生, 氧化酶阳性, 在 pH 4.5 生长良好, 据其特点将其定为葡萄糖细菌属 (*Gluconobacter* sp.)

## 讨 论

目前在拮抗细菌的筛选模式上, 还局限于某种单一的作用方式。但根际细菌拮抗病原真菌的机理很复杂, 涉及到抗生素、毒素等有毒物质、酶类生理活性物质和营养及空间位点的竞争等多种作用方式, 也可能是这些机制的共同作用。因此本研究在温室实验中选取的不仅仅是平板拮抗效果较好的菌株, 在温室试验中还采用了接种病原真菌的自然土以接近于田间自然环境。这种筛选模式在一定程度上弥补了单一作用方式的缺点, 但所选取的菌株有限, 因此在筛选模式上还有待于改进。

本研究所分离筛选到的 2 株有效细菌 ( $BH_1$  和  $DS_{45}$ ) 温室防效在 60% 以上, 且均为 *Bacillus* spp., 芽胞菌能够产生芽胞, 抵抗不良环境 (耐干旱、耐高温), 有利于加工成各种剂型, 适于田间应用。但从 2 年的田间试验看, 其防效不稳定,  $BH_1$  菌株在 1995 年的田间小区试验中防效最高, 达 56.1%; 而在温室试验中防效不高的  $DS_1$  菌株的防效达到 47.1%, 高于  $DS_{45}$  菌株。在 1996 年的田间小区试验中  $DS_1$  菌株的防效最高, 达 51.3%; 菌株  $BH_1$  处理表现防效不高。从增产效果看, 迎茬地大豆经  $DS_1$  菌剂处理产量增加了 11.6%, 但在重茬地却无增产作用; 而经  $BH_1$  菌剂处理后重茬地大豆产量增加了 21.8%。因此要达到提高防效并增产的目的, 还需要对菌株防效的稳定性, 田间应用菌株的混合及剂型方面进行更深一步的研究。

## 参 考 文 献

- [1] 韩庆新, 辛惠普, 1990, 大豆科学, 9(2): 157~ 161
- [2] 李长松, 1992, 生物防治通报, 8(4): 168~ 172
- [3] 刘增柱等, 1992, 大豆科学, 9(3): 206~ 211
- [4] 张新德等, 1993, 黑龙江农业科学, 2: 20~ 22
- [5] Becker, J. O., 1993, Pestic. Sci., 37: 355~ 363
- [6] Horneby, D. (ed.), 1990, In Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens, CAB International, Wallingford
- [7] Klopper, J. W. et al., 1991, Plant and Soil 136: 95~ 102
- [8] Lambert, B. et al., 1987, Applied and Environmental Microbiology, 53(8): 1866~ 1871
- [9] Schroth, M., N. & Hancock, J. G., 1981, Annu. Rev. of Microbiology, 35: 453~ 476

- [10] Schroth, M. N. & Hancock, J. G., 1982, *Science*, 216: 1376- 1381  
[11] Weller, D. M. , 1988, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 26: 710- 713  
[12] Roders, P. B., 1993, *Pestic. Sci.* , 39: 117- 129

## SOYBEAN RHIZOBACTERIA I STUDIES ON CONTROL OF SOYBEAN ROOT ROT DISEASE

Guo Rongjun Liu Xingzhong Yang Huaiwen

(*Institute of Biological Control, CAAS, Beijing, 100081*)

### Abstract

Rhizobacteria were isolated from the ectorhizosphere and endorhizosphere of soybean and 937 isolates were obtained. The antagonistic tests of all these isolates to three strains of *Fusarium* spp. named F<sub>3</sub> (*Fusarium oxysporum*), W<sub>1</sub> (*Fusarium solani*) and S<sub>1</sub> (*Fusarium sp.*) were carried out by pairing culture on PDA or King's B media. The results showed that 279 isolates were antagonistic to 3 pathogens. Of 15 isolates tested in the greenhouse, 2 significantly suppressed soybean root rot (SRR), they were identified as *Bacillus* sp.. Isolate BH showed the best efficacy. It suppressed SRR by 64.0%, 63.4% and 33.3% to F<sub>3</sub>, W<sub>1</sub> and S<sub>1</sub> respectively.

**Key words** Soybean root rot disease; Rhizobacteria; Antagonism