

大豆根腐病菌拮抗细菌筛选及抗生作用^{*}

李春杰 许艳丽^{* *} 李兆林 邵洪涛 司兆胜

(中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨 150040)

摘要 从大豆根际土壤中分离纯化得到 388 个细菌菌株, 从中筛选对大豆根腐病病原尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)有拮抗作用的菌株, 采用无菌室内点接法初筛, 抑菌带大于 20mm 以上的有 12 株, 通过盆栽防效试验, 进一步证明 12 个菌株中有 6 个菌株盆栽防治尖孢镰刀菌和立枯丝核菌达到 46.0%—78.5%。菌株与病原真菌共培养结果显示, 菌株 B2、B57、B85 和 B69 使尖孢镰刀菌菌丝干重分别减少 51.27%、40.78%、38.87% 和 34.58%; 菌株 B57 使茄腐镰刀菌菌丝干重减少 71.48%。菌株分泌物对病原真菌的拮抗作用研究表明, B57 的分泌物对尖孢镰刀菌抑制率最高, 3d 为 82.1%, 6d 为 90.6%; 其次是 B16, 3d 为 58.8%, 6d 为 51.1%。

关键词 大豆根腐病; 拮抗细菌; 抗生作用

中图分类号 S 435.651 文献标识码 A 文章编号 1000—9841(2004)03—0174—04

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^[1]。随着大豆种植面积的扩大, 重迎茬面积也在增加, 使根腐病进一步加重。对大豆根腐病的防治, 一般是通过轮作、改进栽培措施、用种衣剂处理种子来防治。但由于大豆根腐病为多种病原真菌的复合侵染, 以尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)为主要致病菌^[2], 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, 所以探讨利用有益微生物防治大豆根腐病势在必行。大豆根表微生物总数中, 细菌数占绝对优势, 本研究旨在从大豆根际土壤中筛选对大豆根腐病具拮抗作用的根际细菌, 并探讨对其抗生作用。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆: 合丰 25(黑龙江省农业科学院提供)。

1.1.2 大豆根腐病病原菌: 尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌(*Fusarium solani*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)本室分离得到。

1.1.3 培养基: 大豆根腐病病原菌的分离和培养用 PSA 培养基; 细菌的分离和培养用 NA 培养基; 细菌的液体培养用 NB 培养液; 大豆根腐病病原菌和细菌共培养用 KB 培养液^[3]。

1.1.4 土壤样品: 采集于中国科学院海伦农业生态实验站长期定位区大豆耕层土壤。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌分离: 采用平板稀释法

取样茬口为各种大豆茬: ①大豆 12 连作: 豆—豆—豆……豆; ②大豆短期连作: 麦—豆—豆—豆; ③米豆连作: 米—豆—豆; ④麦豆连作: 麦—豆—豆; ⑤麦豆迎茬: 豆—麦—豆; ⑥米豆迎茬: 豆—米—豆; ⑦正常轮作: 麦—米—豆定位试验区 1991 年开始设置, 每年都有各种豆茬出现。用多点采样法取各轮

* 收稿日期: 2004—03—23

基金项目: 国家“十五”科技攻关项目(2001BA507A05—02); 中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1—SW—19—4—03); 黑龙江省重点项目(GB01B201)

* * 通讯作者: E-mail: xuyi2002@yahoo.com

作者简介: 李春杰(1976—), 女, 研究实习员, 硕士研究生, 从事大豆病虫害生物防治研究。

作区土,用浓度梯度法^[3],将土样制成浓度为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 的悬浮液,采用混菌法^[3],将土壤悬浮液与约45℃的NA培养基混匀,放置在26℃恒温培养箱中培养3天,待长出单菌落时,挑取单菌落划线纯化菌株。

1.2.2 室内拮抗活性测定:

先用点接法^[3]初筛,即将尖孢镰刀菌、茄腐镰刀菌和立枯丝核镰刀菌活化7天,用直径5mm打孔器取菌落边缘处制成菌片,将菌片转移至PSA平板培养基中央,待先生长2天后,在距菌落前沿的15mm处均匀4点,接入待测细菌菌株,放置在26℃恒温培养箱中培养2天后,观察致病菌和细菌菌落的生长变化,抑菌带大小及形状。选取抑菌作用较好,生长较快的菌株备用。

1.2.3 盆栽试验

细菌菌悬液的制备:将待测菌株接入100mlNB培养液中,在温度26℃摇床上150转/min下,振荡培养72h得到培养液^[4]。各菌株培养液用无菌水稀释50倍喷雾处理。

大豆根腐病病原菌的培养:将直径5mm菌片转移至已灭过菌的100g小米粒培养基中,在三角瓶中培养15天后,用粉碎机粉碎。

种子处理:用1%NaClO处理3min,再用无菌蒸馏水清洗3次,每培养皿60粒,分别用各菌株菌悬液5倍液浸种48h后播种。每处理4盆,每盆12粒,保苗8株。

盆栽方法:底土150g分别与9g尖孢、茄腐、5g丝核菌混合均匀,试验分三批进行。浇10倍各菌株菌悬液50ml。设空白对照(浇同体积清水)和以同体积多菌灵800倍液为对照。盆放在温室内,出苗

后1个月调查根腐病级数。病情指数计算参照方中达方法^[3],计算相对放防效。

1.2.4 待测菌株对病原菌的拮抗效果

将病原菌菌丝块(直径6mm)与不同待测菌株菌悬液0.1ml加入25mlKB培养液在摇床上150转/min,26℃下培养7天,用滤纸过滤收集菌丝,65℃烘干,称滤纸上菌丝重^[5]。对照为只接病原菌的KB培养液,每处理3次重复。

1.2.5 待测菌株分泌物对病原菌的拮抗作用

取各菌株的菌悬液0.1ml分别接种与25mlKB培养液共培养,26℃下,150转/min摇床上培养3d,3000r/min离心30min,上清液用细菌过滤器(直径0.22um)过滤,得各菌株分泌物提取液。在无菌培养皿内加0.5mm分泌物提取液,再倒入约45℃的10mlPDA培养基混匀,待凝固后,在PDA平板中央接入活化的病原菌块(直径6mm),28℃暗培养,观察病原菌菌丝生长情况并测量抑菌带宽^[5],对照为只接病原菌,每处理3次重复。

2 结果与分析

2.1 室内拮抗活性测定

从大豆根际土壤中分离纯化得到388个细菌菌株,用点接法分别接入PDA平板培养48h后,观察到有的菌株有抑菌圈出现,并达到20mm以上,60h后仍有抑菌带的菌株有12株,分别为B2、B16、B57、B69、B78、B85、B93、B120、B236、B283、B310、B356,作为待测菌株。

2.2 盆栽防效试验

盆栽试验结果(表1)表明,12个菌株中有6个

表1 待测菌株对大豆根腐病防治效果

Table 1 Effects of bacterial antagonists on soybean root rot

菌株 Strains	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>		立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>		茄腐镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	
	病情指数 Disease index	防效(%) Control effectiveness	病情指数 Disease index	防效(%) Control effectiveness	病情指数 Disease index	防效(%) Control effectiveness
B2	13.3	65.6 a	13.2	65.8 aA	35.5	37.4 b
B16	18.6	52.1 a	8.3	78.5 aA	52.2	7.9 c
B57	14.7	62.1 a	20.9	46.0 bA	36.9	34.9 b
B69	14.4	62.9 a	12.9	66.8 aA	40.7	28.2 b
B85	17.0	56.1 a	8.6	77.7 aA	50.3	11.3 b
B93	8.3	78.5 a	14.2	63.1 aA	39.2	17.3 b
多菌灵	8.1	79.1 a	10.1	73.8 aA	19.2	66.1 a
CK	38.7	—	38.6	—	56.7	—

菌株对三种病原菌防效较好,它们是 B2、B16、B57、B69、B85、B93。从表 1 可以看出,它们对尖孢镰刀菌的防效达 52.1%—78.5%,与多菌灵防效差异不显著,其中 B93 防效最高,达 78.5%,接近于多菌灵防效;对立枯丝核菌的防效达 46.0—78.5%,除 B57 防效低于 50%外(与多菌灵防效差异不显著),其它 5 个菌株防效均在 60%以上,其中 B85 和 B16 防效高于多菌灵,达 77.7%和 78.5%;对茄腐镰刀菌的防效达 7.9%—34.9%。

2.3 待测菌株对病原菌的拮抗作用

从表 2 结果看出,待测菌株与尖孢镰刀菌共培养 7d 后,菌株 B2、B57、B85 和 B69 对尖孢镰刀菌有明显的抑制作用,菌株之间差异不显著,分别使尖孢镰刀菌菌丝干重减少了 51.27%、40.78%、38.87%和 34.58%。从表 3 结果看出,拮抗菌株与茄腐镰刀菌共培养 7d 后,只有菌株 B57 对茄腐镰刀菌有明显的抑制作用,与其它菌株差异显著,使茄腐镰刀菌菌丝干重减少了 71.48%,其它菌株无明显拮抗效果。

表 2 待测菌株对尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 抑制作用
Table 2 The inhibitive effects of bacteria cultures on *Fusarium oxysporum*

菌株 Strain	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporu</i> 干重(g/瓶) Dry weight(g/flask)	较对照比+- (%) Compared with CK
B2	0.2047	- 51.27 a
B16	0.3969	- 5.5 b
B57	0.2488	- 40.78 a
B69	0.2748	- 34.58 a
B85	0.2568	- 38.87 a
B93	0.4256	+ 1.3
CK	0.4201	-

表 3 待测菌株对茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*) 抑制作用
Table 3 The inhibitive effects of bacteria cultures on *Fusarium solani*

菌株 Strain	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporu</i> 干重(g/瓶) Dry weight(g/flask)	较对照比+- (%) Compared with CK
B2	0.1295	- 7.7 b
B16	0.1481	-
B57	0.0400	- 71.48 a
B69	0.1075	- 23.4 b
B85	0.1200	- 14.5 b
B93	0.1169	- 16.7 b
CK	0.1403	-

2.4 待测菌株的分泌物对病原真菌的拮抗作用

试验结果表明(表 4),6 个菌株在第 3d 对尖孢镰刀菌均有抑制作用,抑菌率为 12.8%—82.1%。第

6d 除 B69 无抑菌作用外,其他 5 个菌株均有抑菌作用,抑菌率为 7.9%—90.6%,其中菌株 B57 的分泌物对尖孢镰刀菌抑菌率在第 3d 和第 6d 均为最高,3d 为 82.1%,6d 为 90.6%,与其它菌株抑菌率差异极显著;其次是 B16,3d 为 58.8%,6d 为 51.1%,除 B57 外,与其它菌株抑菌率差异显著,但未达到极显著。

表 4 待测菌株分泌物对尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 平板抑制效果
Table 4 The inhibitive effects of bacterial diffusions on *Fusarium oxysporum*

菌株 Strains	3d		6d	
	菌落直径 (mm) Clone diameter	抑菌率 (%) Inhibitory efficacy	菌落直径 (mm) Clone diameter	抑菌率 (%) Inhibitory efficacy
B2	32.2	28.0 cB	60.2	28.9 cB
B16	18.4	58.8 bB	41.4	51.1 bB
B57	8.0	82.1 aA	8.0	90.6 aA
B69	39.0	12.8 cB	87.2	-
B85	29.0	35.1 cB	57.4	32.2 cB
B93	39.0	12.8 cB	78.0	7.9 dB
CK	44.7	-	84.7	-

3 讨论

3.1 室内拮抗活性测定:抑菌带大于 20mm 以上的有 12 株,通过盆栽防效试验,进一步证明 12 个菌株中有 6 个菌株盆栽防治尖孢镰刀菌和立枯丝核菌效果较好。待测菌株 B2、B57、B85 和 B69 对尖孢镰刀菌菌丝干重减少幅度较大;菌株 B57 对茄腐镰刀菌菌丝干重减少幅度最大。菌株 B57 的分泌物对尖孢镰刀菌抑菌率最高;其次是 B16。总体看来 B57 对三种大豆根腐病菌尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、茄腐镰刀菌防治均有效。综合以上试验,无论盆栽试验,还是室内抑菌试验,菌株 B57 对大豆根腐病的拮抗效果最好,可作为拮抗菌株。

3.2 在本试验中,盆栽试验防效并非与室内拮抗活性测定结果呈正相关,与郑爱萍^[6]、彭化贤^[7]试验结果一致。如盆栽试验防效最好的 B93,室内拮抗活性测定结果却不是最好。盆栽试验中有 6 个菌株防效较好,在其它各项调查结果中不太一致,如菌株 B2、B69 和 B85 的菌体对尖孢镰刀菌的抑制作用明显,但对茄腐镰刀菌抑制作用不明显,其分泌物对尖孢镰刀菌抑菌率也不高。B16 的菌体对尖孢镰刀菌和茄腐镰刀菌抑制作用不明显,但其分泌物对尖孢

镰刀菌抑菌率达到 50 % 以上。B93 对尖孢镰刀菌盆栽试验防效最好, 但室内抑菌试验效果不明显。总体趋势菌株 B57 拮抗效果较好。大豆根腐病致病菌多而杂, 分布也不一致, 应用时应考虑致病菌的种类, 选择对其拮抗效果最好的菌株。所有这些问题需要进一步试验探讨、证明。所以今后需要从自然界中筛选、分离和构建优良菌株, 与大田应用相结合, 同时进一步深入研究拮抗菌生理、生化特征及其生长动力学, 在大豆上的定殖原理、模式、拮抗物质、产生的途径、机理等。

参 考 文 献

1 韩庆新, 辛惠普. 大豆根腐病主要病原菌对大豆 幼苗致病性的初步研究[J]. 大豆科学, 1990, 9(2): 157—161.
2 苔莲梅. 大豆根腐病菌(*Fusarium oxysporum*) 毒素及其对大豆根部致病菌作用的研究[D]. 东北农业大学硕士论文, 2003.
3 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1977, 161—224.
4 刘世怡, 周瑞荣, 左锐. 水稻纹枯病的拮抗 细菌筛选[J]. 贵州农业科学, 1995, 3: 15—17.
5 陈双雅, 张永祥, 蔡向群. 三株拮抗细菌对水仙叶大褐斑病的拮抗机理[J]. 中国生物防治, 2003, 19(1): 11—15.
6 郑爱萍, 李平, 王玲霞, 等. 水稻纹枯病拮抗细菌的筛选及抗生性研究[J]. 西南农业学报, 2001, 14(1): 78—81.
7 彭化贤, 刘云微, 何忠全, 等. 水稻稻瘟病拮抗细菌的分离和筛选[J]. 西南农业学报, 1999, 12(3): 85—88.

SCREENING OF ANTAGONISTIC BACTERIA AGAINST PATHOGENIC FUNGUS OF SOYBEAN ROOT ROT AND THEIR BIOCONTROL EFFICIENCY

Li Chunjie Xu Yanli * * Li Zhaolin Shao Hongtao

(*Institute of Northeast Geography and Agricultural Ecology, Chinese Academy of Sciences , Harbin , 150040*)

Abstract Three hundred and eighty eight bacterial strains were isolated from soybean rhizosphere soil. Twelve bacterial strains were screened by the inhibition zone method , which had better efficacy against the major causal agents: *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* . In potted trial, 6 strains showed some efficacy against pathogenic fungus of soybean root rot. The dry weights of *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* were reduced 40.78 % and 71.48 % respectively with which the strain B57 was cocultured in King’ s broth(KB) liquid medium. The radius of pathogenic fungi(*Fusarium oxysporum*) was reduced respectively 82.1 % in 3d and 90.6 % in 6d by the diffusion of strain B57 compared with that of the control . In general, the tests in vitro and in vivo showed that strain B57 had the best biological control efficacy against pathogens of soybean root rot.

Key words Soybean root rot; Antagonistic bacteria; Biocontrol efficiency