

生防微生物 BRF—1 对大豆根腐病的拮抗作用^{*}

王光华¹ 周克琴² 金 剑¹ 潘相文¹ 刘晓冰¹ 罗英辉²

(1. 中国科学院东北地理与农业生态研究所, 哈尔滨, 150040; 2. 黑龙江绿色食品发展中心, 哈尔滨, 150066)

摘要 BRF—1 是从大豆根际分离获得的生防细菌 (*Bacillus spp.*)。平板对峙培养结果表明, 该菌对大豆根腐病 4 种主要病原菌大豆尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、腐霉菌 (*Pythium spp.*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 和茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*) 具有很强的拮抗作用。进一步盆栽试验发现, BRF—1 的不同处理不仅可以有效抑制由尖孢镰刀菌引起大豆根腐病发生, 而且还具有促进幼苗生长的作用, 是一株极有希望的生防微生物。

关键词 大豆根腐病; BRF—1; 拮抗; 生物防治

中图分类号 S 435. 651 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2004)03—0188—04

0 前言

大豆根腐病是一种世界性的病害。韩庆新和辛惠普报道仅黑龙江省垦区的发病率就达到 75%—90%, 减产 10%—20% 左右^[1]。目前生产上多用化学农药防治大豆根腐病, 对大豆根腐菌的生物防治的报道很少^[2, 3]。

利用生防细菌来防治植物病害成为国内外在生物防治研究中的一个热点。大量的研究表明, 生防细菌不仅在其生长发育过程中产生多种拮抗性 or 竞争性的代谢产物, 通过直接或间接作用, 达到阻碍或杀死病原菌的效果, 而且这些细菌大多是从植物的根围和叶围等处分离得到的, 对植物具有较好的亲合性, 接种后易于在植物上定植, 生防效果持久稳定^[4—6]。

本文作者从 2001—2003 年间以大豆尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、腐霉菌 (*Pythium spp.*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*) 等为目标进行了室内拮抗菌筛选试验, 并以尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 为目标进行了拮抗菌的盆栽试验, 旨在从大豆根际土中筛选出对大豆根腐病具有拮抗作用的根际细菌, 为大豆根腐病的生防菌剂研制提供微生物资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆品种: 东农 434, 由中科院东北地理与农业生态研究所海伦生态试验站提供。

1.1.2 生防菌: BRF—1 由本实验室分离得到^[7], 在 PA 液体培养基培养 4 天, 使菌液浓度达 108 cfu/ml 后备用。

1.1.3 病原真菌: 大豆尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 和茄腐镰刀菌 (*Fusarium solani*) 由中国科学院东北地理与农业生态研究所许艳丽研究员提供; 腐霉菌 (*Pythium spp.*) 和立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 由本实验室保存。对峙培养用 PDA 培养基。盆栽试验时用小麦粒培养基培养扩繁病原菌。

1.1.4 土壤: 取自海伦农业生态实验站, 按土/砂为 3/1 的比例混匀, 120℃连续 2h 高温灭菌备用。

1.2 方法

1.2.1 对峙培养: 将病原菌接在培养皿中心, 在其周围等距离接三点拮抗菌, 28℃培养 3—5 天, 待病原菌充分长大, 测量抑菌圈的大小。以不接拮抗菌的平板为对照, 每处理 3 次重复。

1.2.2 盆栽试验

1.2.2.1 种子处理: 大豆种子表面用 1.5% NaClO 溶液消毒 3 分钟, 无菌水清洗残留 NaClO 5 次, 晾

* 收稿日期: 2004—03—30

基金项目: 哈尔滨市青年科学基金(2003AFQYJ002)和中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1—SW—19—4—03)资助

作者简介: 王光华(1966—), 男, 研究员, 从事根际微生态研究。

干。依据试验方法进一步处理种子。实验处理见表 1。

表 1 BRF-1 盆栽试验设计
Table 1 Pot experiments of BRF-1

编号 No.	处理 Treatments	编号 No.	处理 Treatments
1	对照, 种子未处理	6	每盆加 BRF-1 菌悬液 20ml
2	BRF-1 菌悬液包衣	7	3%多菌灵可湿性粉剂拌种
3	BRF-1 灭活菌包衣	8	先将尖孢镰刀菌混入土壤中 72 小时后接 BRF-1 菌悬液 10ml
4	每盆加 BRF-1 菌悬液 1ml	9	10ml BRF-1 先混入土壤 72 小时后接尖孢镰刀菌播种
5	每盆加 BRF-1 菌悬液 10ml		

1.2.2.2 土壤处理: 将扩繁后的大豆尖孢镰刀菌(小麦粒培养基)按盆土重量的 0%, 3%, 6%, 9% 的比例添加到土壤中, 混匀装盆, 每盆装土 400g, 浇透, 播种, 覆土。每处理 4 盆, 每盆 8 株。大豆出苗后常规管理, 不施肥和其它农药。

1.2.3 调查项目及方法: 大豆幼苗出土后生长 4 周, 扣盆, 用流水洗去根土, 大豆根腐病发病情况采用辛惠普等(1987)的病害分级标准进行分级^[8], 病情指数及防效统计采用方仲达(1979)方法^[9]。地上部和根干重测定采用烘干法, 根体积测定采用排水法。

1.3 统计

使用 SAS 统计分析软件计算显著性差异。

2 结果与分析

2.1 平板对峙培养实验

对峙培养结果表明, BRF-1 对 4 种根腐病菌

表现出极强的拮抗作用, 抑菌圈明显(表 2)。对峙培养 10 天后测定拮抗作用仍不减弱, 病原真菌菌丝不覆盖抑菌圈。表明该菌的代谢产物具有很强的抗真菌活性。

2.2 盆栽试验

2.2.1 对株高的影响

由表 3 可以看出, 对于同一处理随着土壤中所加病原菌量的提高, 植株的株高一般表现为逐渐下降的趋势, 表明大豆尖孢镰刀菌对大豆生长具有危害作用。比较土壤未加病原菌时各处理的株高发现, 使用 BRF-1 处理的植株平均高度都高于对照, 说明 BRF-1 还具有促进大豆生长的作用。当土壤中病原菌的添加量为 3%和 6%时, 除 7(3%多菌灵浸种)和 8(先加病原菌, 后加 BRF-1)处理的株高低于对照外, 其余都高于对照, 其中处理 5(加 BRF-1 悬浮液 10ml)和处理 6(加 BRF-1 悬浮液 20ml)的株高分别比对照高出 66.7%、53.3%和 38.3%、32.9%, 差异显著。当土壤病菌添加量为 9%时, 各处理株高与对照相比差异不显著。

表 2 生防菌 BRF-1 对 4 种大豆根腐病菌菌丝生长的抑制效果(mm) *

Table 2 The antagonistic effect of BRF-1 to 4 pathogens of soybean root-rot disease (mm)

病原真菌 Pathogen	CK 直径 Diameter of CK	抑菌圈直径 Diameter of inhibited halo	BRF-1 直径 Diameter of BRF-1
茄腐镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	70	24	6
立枯丝核 <i>Rhizoctonia solani</i>	82	38	10
腐霉菌 <i>Pythium</i> spp.	59	37	6
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	70	32	6

注: * 培养 3 天时的测定结果

表 3 各处理对大豆幼苗株高的影响(mm)

Table 3 Influence on different treatments to the seedling height of soybean (mm)

病原菌接种量 Density of pathogen	处理方法 Treatments								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0%	52.6b	61.6a	61.6a	55.5ab	66.4a	68.1a	38.9c		
3%	44.7bcd	58.8abc	54.8bcd	53.7bcd	74.5a	61.8ab	39.4d	41.2bcd	62.4ab
6%	42.8cd	53.6abcd	52.7abcd	60.4ab	65.6a	56.9ab	38.4bcd	40.0c	56.1abc
9%	49.4ab	52.41a	48.7ab	47.2ab	48.4ab	40.0ab	37.5b	38.4ab	49.3ab

2.2.2 对幼苗根体积的影响

由表 4 可以看出, 同一处理随着土壤中病原菌量的增加, 植株的根体积逐渐减小。当土壤中病原菌的添加量为 0%、3%和 6%时, 接种生防菌 BRF-1 的不同处理植株根体积都不同程度地高于对照和

多菌灵处理, 表明 BRF-1 有促进大豆根系生长的作用; 而当病原菌接种量为 9%时, 除处理 9 与对照相比根体积差异显著外, BRF-1 其它处理没有表现出促进根系的生长的作用。

表 4 各处理对大豆幼苗根体积的影响(mm³/株)

Table 4 Influence on different treatments to the root volume of soybean seedling (mm³/ plant)

病原菌接种量 Density of Pathogen	处理方法 Treatments								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0%	1368bc	1462bc	1703 a	1475bc	1542bc	1914a	951c		
3%	946bc	1290ab	1167ab	1327ab	1467a	1631a	642c	1195ab	1442a
6%	808 ab	1056ab	808ab	850ab	1444a	1244ab	778b	800ab	1361ab
9%	860b	825b	722b	917b	856b	1009b	750b	667b	1387a

2.2.3 对植株生物量的影响

不同处理对大豆植株生物量影响总的趋势是:随着土壤中加入病原菌量的增加,植株的生物量呈减少趋势;BRF-1 不同处理不同程度地增加了植株生物量,当病原菌接种量为 0%时,以灭活菌包衣处

理效果最好,而当接种量为 3%、6%和 9%时,处理 5 增加植株生物量的效果最好;处理 9 的效果明显优于处理 8,说明 BRF-1 优先占领生态位点,有利于提高植株的生物量;3%多菌灵拌种明显抑制了大豆苗期生物量积累。

表 5 各处理对大豆幼苗生物量的影响(mg/株)

Table 5 Influence of different treatments on biomass of soybean seedling (mg/ plant)

生物量 Biomass	病原菌接种量 Density of pathogen	处理方法 T reatments								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
茎叶 Shoot	0%	161abc	151bc	226a	168abc	161abc	213ab	135c		
	3%	132c	134bc	154abc	154abc	191a	142bc	118c	139bc	183ab
	6%	126b	147ab	158a	198a	161a	151a	141ab	147ab	200a
	9%	121c	156b	147bc	147bc	162b	138bc	120bc	134bc	183a
根 Root	0%	102c	106c	138a	124bc	136a	132ab	69c		
	3%	70c	105abc	112ab	95bc	104abc	136a	64c	69c	104bc
	6%	65a	65a	74a	83a	118a	79a	73a	58a	98a
	9%	65b	62b	67b	71b	68b	78b	59b	59b	97a

2.2.4 对大豆根腐病防治效果

盆栽实验结果表明,BRF-1 不同处理对由尖孢镰刀菌引起的大豆根腐病具有较好的防治效果,且这种防治效果与 BRF-1 接种方式和土壤中病原菌含量关系较大。当土壤中病原菌接种量为 3%时,每盆接种 20ml 生防菌处理防病效果最好,防效达到 75%,远高于 3%多菌灵可湿性粉剂拌种处理;当土

壤病原菌接种量为 6%时,各处理的防效比 3%病原菌接种量的相同处理明显下降,其中处理 9 和 6 的防效为 62%和 46%,效果最好;而当土壤中病原菌接种量为 9%时,只有处理 9 防治效果达到了 34%,其它处理基本上未表现出防病效果。可见大剂量生防菌接种或预先接种,有利于提高 BRF-1 防治大豆根腐病的效果。

表 6 BRF-1 不同对大豆根腐病的防治效果

Table 6 Biocontrol effect of BRF-1 against soybean root-rot disease caused by *Fusarium oxysporum* in pot experiment

项目 Item	病原菌接种量 Density of pathogen	处理方法 T reatments								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
病情指数 Disease index	3%	42.40	22.00	32.00	22.61	20.80	10.34	36.92	27.50	22.40
	6%	72.73	58.57	63.08	64.44	52.86	39.00	54.12	66.00	28.00
	9%	93.68	92.63	92.80	95.78	96.00	92.63	96.00	98.10	43.52
防效(%) Control efficiency	3%	—	48.11	24.53	44.67	50.93	75.61	12.92	35.14	47.17
	6%	—	19.47	13.27	11.40	27.32	46.38	25.59	9.25	61.50
	9%	—	<5	<5	<5	<5	<5	<5	<5	34.35

3 讨论

BRF-1 是从大豆根际土壤获得的具有较强抗真菌活性的细菌, 经电镜观察和耐高温试验鉴定为芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.)。该菌产生的拮抗物质具有一定的耐酸、碱和高温特性, 能有效地抑制病原真菌菌丝生长和孢子萌发, 表现出较好的生防潜力^[7]。

在本研究中, 通过室内平板对峙培养也表明 BRF-1 对引起大豆根腐病的 4 中常见致病菌也表现出较强的拮抗活性, 说明该菌产生的抗生物物质作用范围广谱。进一步的盆栽试验结果表明, BRF-1 不仅可以促进大豆生物量的增加, 表现出一定的增产作用(未接病原菌处理), 而且对优势病原菌尖孢镰刀菌引起的大豆根腐病表现出较好的防治效果。BRF-1 对大豆根腐病的防治效果与接种方法关系密切, 随着病原菌接种量的增加, 防效明显降低。当尖孢镰刀菌接种量增加到 9% 时, 除了预先接种 BRF-1 处理, 其它 BRF-1 接种方法防效不明显, 这说明 BRF-1 与病原菌数量的比例在决定其防治效果中起到重要的作用。

另外在本研究中发现 BRF-1 菌悬浮液经过高温灭活后, 同样具有一定的防病和促生长作用, 这种

作用可能与 BRF-1 产生的代谢产物刺激了大豆植株生长或提高了植株的抗性有关, 具体的机理有待于进一步研究。对 BRF-1 菌悬浮液灭活后作用的研究可能有助于植物疫苗的开发。

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 仝赞华, 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.
3 郭荣君, 刘杏忠, 杨怀文. 大豆根际细菌 1 拮抗大豆根腐病菌研究[J]. 大豆科学, 1998, 17(1): 5358.
4 Raaijmakers JM, Weller DM, Thomashow LS. Frequency of antibiotic-producing *Pseudomonas* spp. in natural environments[J]. Appl Environ Microbiol, 1997, 63: 881-887.
5 Handelsman J, Stabb EV. Biocontrol of soilborne plant pathogens[J]. Plant Cell, 1996, 8: 1855-1869.
6 王光华, Jos Raaijmakers. 生防细菌产生的拮抗物质在植物病害生物防治中的作用[J]. 应用生态学报, 2004, (5) (In press).
7 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.
8 辛惠普, 马汇泉, 刘静茹, 等. 大豆根腐病发生与防治的初步研究[J]. 大豆科学, 1987, 6(3): 189—196.
9 方仲达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1979.

ANTAGONISM ON ORGANISM BRF-1 AGAINST SOYBEAN ROOT ROT

Wang Guanghua¹ Zhou Kebin¹ Jin Jian¹ Pan Xianwen¹ Liu Xiaobing¹ Luo Yinghui²

(1. Institute of Northeast Geography and Agricultural Ecology, CAS, Harbin, 150040;
2. Green Food Developmental Center of Heilongjiang Province, Harbin, 150066)

Abstract Organism BRF-1 (*Bacillus* spp.) was isolated from soybean rhizosphere. Dual-culture tests showed that it had strong antifungal activity to 4 pathogens of soybean root-rot disease. Further pot experiment indicated it would be a hopeful bio-control strain because it was not only to inhibit the soybean root-rot disease caused by *Fusarium oxysporum* but also promoted soybean seedling.

Key words Soybean root-rot disease; BRF-1; Antagonism; Biocontrol