

## 拮抗大豆胞囊线虫根瘤菌的研究

尹丽娜<sup>1</sup>, 段玉玺<sup>1</sup>, 王媛媛<sup>2</sup>, 罗在全<sup>1</sup>, 陈立杰<sup>1</sup>

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学 生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 对传统筛选生防根瘤菌的方法进行了改良, 建立一种新的生防根瘤菌筛选体系一半根瘤法。利用此法结合根瘤菌回接结瘤鉴定, 从全国7个省市土样诱集到的根瘤中, 筛选出23株根瘤菌。分别测定其菌悬液、发酵液对大豆胞囊线虫J2的作用。结果表明: 处理48 h后, 5株根瘤菌菌悬液及发酵液对大豆胞囊线虫J2具有较高击倒率, 分别为Snb21、Snb53、Snb92、Snb166和Snb711; 处理72 h后, 菌株Snb166和Snb711对大豆胞囊线虫J2具有较高致死活性, 其中Snb166发酵液72 h处理J2致死率最高, 达到84.27%。

**关键词:** 根瘤菌; 大豆胞囊线虫; 发酵液; 校正死亡率

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2010)02-0276-04

## Screening of Rhizobia Against Soybean Cyst Nematode

YIN Li-na<sup>1</sup>, DUAN Yu-xi<sup>1</sup>, WANG Yuan-yuan<sup>2</sup>, LUO Zai-quan<sup>1</sup>, CHEN Li-jie<sup>1</sup>

(1. Department of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161; 2. Department of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, Liaoning, China)

**Abstract:** Soybean Cyst Nematode (*Heterodera glycines*) is an important root disease which causes significant economic damage to soybean. Rhizobia are bacterial symbionts of Leguminous plants and of advantage for root colonization. In the present study an attempt was made to use improved method namely half a nodule for screening antagonistic Rhizobia against *Heterodera glycines*. Soil samples were collected from seven provinces in China and soybean root nodules were trapped from the soil sample. Twenty-three strains were screened from soybean root nodules. Effect of *H. glycines* J2 treated with different strain suspensions and fermentation filtrates was tested. The results showed that Snb21, Snb53, Snb92, Snb166 and Snb711 strains were against *H. glycines* J2 after 48 h; Snb166 and Snb711 were effective significantly after 72 h, the corrected mortality rate of nematodes of fermentation filtrate with Snb166 were 84.27% after 72 h.

**Key words:** Rhizobia; *Heterodera glycines*; Fermentation broth; Correct mortality rate

大豆营养丰富, 除含有优质的蛋白质和多种氨基酸外, 还含有脂肪、无机盐、亚油酸、维生素E和卵磷脂等多种有效生理活性成分<sup>[1]</sup>, 在人类的日常生活中扮演着不可或缺的角色。然而大豆病害严重影响着大豆产量, 从而间接阻碍人类对于这些物质的获得, 大豆胞囊线虫病就是大豆的重要虫害之一。大豆胞囊线虫病是严重危害大豆产量和品质的土传病害。该病害发生的特点是分布广、为害重、传播途径多, 一般减产10%~30%, 严重地块可达70%~90%, 甚至绝产。在作物病害防治领域, 生物防治研究已然成为热点, 寻找出大豆胞囊线虫病生物防治新途径迫在眉睫。

根瘤菌是一类环境友好型的豆科植物促生细菌, 具备生防菌要求的定殖竞争优势。近年来, 将根瘤菌作为防治豆科植物真菌病害以及根结线虫

病害的报道较多, 而将其作为防治大豆胞囊线虫病生防因子的报道较少。因此, 该试验利用改良的拮抗性根瘤菌筛选方法, 筛选拮抗大豆胞囊线虫的根瘤菌, 为探索大豆胞囊线虫病生物防治新途径奠定基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

供试土样: 采集自新疆、海南省、山东省、昆明市、重庆市、兰州市、沈阳市7个省市35份土样。诱集及回接大豆品种: 辽豆15, 购自辽宁省农业科学院。供试根瘤: 利用消毒种子原始土壤捕捉根瘤菌法诱集根瘤<sup>[2]</sup>。40 d后采集根系根瘤, 冲洗干净4℃保存备用。供试大豆胞囊线虫J2: 采集自沈阳农业大学线虫研究室感染大豆胞囊线虫试验田, 采

收稿日期: 2009-10-30

基金项目: 大豆现代产业技术体系资助项目。

第一作者简介: 尹丽娜(1984-), 女, 在读博士, 现从事线虫生物防治方面的研究。E-mail: yln19841011@163.com。

通讯作者: 段玉玺, 教授, 博士生导师。E-mail: duanyx6407@163.com。

用淘洗-过筛法分离胞囊<sup>[3]</sup>,挑取新鲜饱满的胞囊,0.5% NaClO 表面消毒 3 min,无菌水冲洗 3 遍,放入自制灭菌孵化池中,25℃ 条件下孵化,5 d 后收集孵化出的 J2。

1.2 半根瘤对大豆胞囊线虫 J2 的作用

挑选个大而饱满的根瘤从寄主根部取下,将根瘤表面消毒<sup>[4]</sup>,用无菌解剖刀将其切成大小均匀两半,一半放入含有 30 条 J2(约含有 0.4 mL 无菌水)的贝氏小皿中,以无菌水处理为对照,48 h 后检测 J2 的致死率;另一半立即放入结晶紫 YMA<sup>[5]</sup> 平板中,28℃ 条件下培养根瘤菌。

1.3 供试根瘤菌的分离纯化及鉴定

根瘤菌的分离纯化:48 h 后,根据半根瘤处理 J2 的结果,分离致死率≥70% 半根瘤相对应的另半根瘤内生细菌。从菌苔边缘处沾取少量菌苔在刚果红 YMA<sup>[5]</sup> 平板上划线稀释,视菌体生长速度而定,根据菌落形态差别挑取不同的不吸色单菌落,刚果红 YMA 平板划线直至得到纯培养,单菌落编号,在 15% 甘油—YMA 培养基中于-80℃ 保存。根瘤菌的鉴定:采用双层套钵沙培法<sup>[6]</sup>,略有改良<sup>[7]</sup>。

1.4 根瘤菌对大豆胞囊线虫的作用

刮取培养基上根瘤菌菌苔加入无菌水制备成浓度约为 10<sup>9</sup>cfu·mL<sup>-1</sup>根瘤菌悬液。吸取浓度为 10<sup>9</sup>cfu·mL<sup>-1</sup>根瘤菌悬液 2 mL 放入 50 mL YMA 液体培养基中,于 28℃,120 r·min<sup>-1</sup>下摇瓶发酵,快生菌 4 d,慢生菌 8 d,6000 r·min<sup>-1</sup>下离心 10 min,

充分过滤菌体,取上清液作为根瘤菌发酵液。  
准备含有 30 条 J2(约含有 0.1 mL 无菌水)的贝氏小皿,根据不同处理分别加入 0.4 mL 菌悬液和发酵液,以无菌水和无菌液体 YMA 培养基处理为对照,每个处理 3 次重复,置于 28℃ 培养箱中,注意保湿,分别于 48、72 h 观察线虫的死亡情况,其中 48 h 后以解剖镜钠灯照虫体 1 min 后观察线虫活动情况来判断菌株处理对线虫的毒力效果,镜检计数,计算校正击倒率;72 h 后滴加 1 滴 0.5% NaClO 溶液,30 s 后观察线虫活动状态来判断线虫死亡情况,镜检计数,计算校正死亡率。

1.5 计算方法

$$\text{线虫死亡率}(\%) = \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{供试线虫数}} \times 100\%$$
$$\text{校正死亡率}(\%) = \frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100\%$$

数据处理采用 EXCEL2003,统计分析采用 DPS7.55。

2 结果与分析

2.1 半根瘤对大豆胞囊线虫 J2 的作用

从盆栽诱集挑选的 128 粒根瘤中,筛选出 21 粒对 J2 致死率≥70% 的根瘤,结合根瘤菌分离以及拮抗性根瘤菌的筛选情况,列出具有代表性的半根瘤对 J2 作用结果(表 1)。

表 1 半根瘤对大豆胞囊线虫 J2 的作用  
Table 1 Effect of half a nodule on *H. glycines* J2

根瘤 Nodules	校正致死率 Correct mortality rate / %	土样来源,根际土壤植被覆盖 Origin, vegetational cover	分离出的拮抗性根瘤菌 Rhizobium strains from different nodules against <i>H. glycines</i> J2
G021	96.57	沈阳市康平县大豆试验田,大豆田	Snb21
G053	79.22	兰州理工大学,槐树根际	Snb53
G092	81.08	重庆市西南大学,牛麻藤根际	Snb92
G071	85.06	海南大学,翅荚槐根际	Snb711
G166	86.30	新疆霍城县伊东嘎善乡,大豆田	Snb166

2.2 供试根瘤菌的初步鉴定

要确定某个培养物是否为根瘤菌,回接是主要的验证性试验<sup>[3]</sup>。采用组织分离法从 21 粒拮抗性根瘤中共分离出 23 株纯培养物,与主栽品种辽豆 15 回接,15 株结瘤,5 株未结瘤,3 株结瘤但根瘤内部为白色,为无效根瘤。在 15 株根瘤菌中根据寄主植株干重选取 10 株固氮能力较强的根瘤菌测定其对大豆胞囊线虫 J2 的活性。

2.3 根瘤菌菌悬液对大豆胞囊线虫 J2 的作用

结果表明,供试 10 株根瘤菌中,5 株根瘤菌菌悬液对 J2 未表现出毒性,与对照相比差异不显著;另外 5 株根瘤菌菌悬液均对大豆胞囊线虫 J2 具有毒性,与对照相比差异显著,其中 Snb166 菌悬液处理 48 h 后,对大豆胞囊线虫 J2 校正击倒率达到 56.31%(表 2)。

表 2 根瘤菌悬液对大豆胞囊线虫 J2 的作用  
Table 2 Effect of different strain suspensions on *H. glycines* J2

菌株 Strains	48 h 击倒率		72 h 致死率	
	Rhizobium strains at 48h/%		Rhizobium strains at 72h/%	
	平均击倒率 Average inhibition rate	校正击倒率 Corrected inhibition rate	平均致死率 Average mortality	校正致死率 Corrected mortality
Snb166	58.85aA	56.31	51.73aA	51.02
Snb711	48.35abAB	45.17	40.94bAB	40.07
Snb21	40.71bAB	37.07	34.57bcB	33.60
Snb92	36.77bB	32.88	32.17cB	31.17
Snb53	34.81bB	30.80	29.33cB	28.29
SDW	5.80cC	-	1.45dC	-

数字后字母为 Duncan 氏新复极差测验结果,不同大小写字母分别表示差异显著 ( $P < 0.05$ ) 和差异极显著 ( $P < 0.01$ ),SDW = 无菌水,YMA = 无菌液体 YMA 培养基,下同。According to Duncan's multiple range test,the uppercase and lowercase letter behind numeral in each column indicate significantly different at  $P < 0.01$  and  $P < 0.05$ , respectively. SDW = sterile distilled water; YMA = culture medium without bacterium,the same as below.

2.4 根瘤菌发酵液对大豆胞囊线虫 J2 的作用

结果表明,5 株根瘤菌发酵液均对大豆胞囊线虫 J2 具有毒性,与 2 个对照相比差异显著;无菌液

体 YMA 培养基对大豆胞囊线虫 J2 也具有一定的毒性,与无菌水处理相比差异显著,故将无菌液体 YMA 培养基作为不同菌株处理的最终对照(表 3)。

表 3 根瘤菌发酵液对大豆胞囊线虫 J2 的作用  
Table 3 Effect of different bacterial culture filtrates on *H. glycines* J2

菌株 Strains	48 h 击倒率		72 h 致死率	
	Rhizobium strains at 48h/%		Rhizobium strains at 72h/%	
	平均击倒率 Average inhibition rate	校正击倒率 Corrected inhibition rate	平均致死率 Average mortality	校正致死率 Corrected mortality
Snb166	89.51aA	86.13	85.84aA	84.27
Snb711	86.12aA	81.66	66.29abAB	62.55
Snb21	73.98abAB	65.62	57.61bcAB	52.91
Snb92	56.32cB	42.29	38.35cBC	31.50
Snb53	63.56bcB	51.84	47.33bcB	41.49
YMA	24.32dC	-	9.99dCD	-
SDW	5.80cC	-	1.45dD	-

3 结论与讨论

植物病害拮抗细菌的筛选和应用是植物病害防治的研究热点<sup>[8]</sup>。传统筛选拮抗性根瘤菌的方法存在目的性不强、工作量大、浪费试剂材料等缺陷。因此在筛选拮抗性根瘤菌过程中,将传统方法改为半根瘤法,即以大豆胞囊线虫 J2 为靶标,半根瘤处理 48 h。此种方法最大程度排除了无拮抗性的根瘤菌,目的性强、筛选效率高、节约试验材料、节省时间。此外,利用此法亦可筛选拮抗性根瘤内生细菌。

在室内离体条件下,利用不同根瘤菌菌株处理大豆胞囊线虫 J2,结果表明,不同根瘤菌菌株对 J2 作用结果具有较大差异,其中 50% 以上菌株对 J2

不具有明显的杀线活性。赵宇枢报道供试的 50% 根瘤菌菌株处理 J2 后对其表现为促进作用<sup>[7]</sup>。这与该试验的结果有所不同,原因可能是采用半根瘤法筛选拮抗大豆胞囊线虫根瘤菌,最大程度地排除了非拮抗性的根瘤菌。菌株 Snb166、Snb711 对大豆胞囊线虫 J2 均表现出较高的杀线活性,这与半根瘤对 J2 作用的趋势基本符合。Tian 等报道接种根瘤菌能够诱导作物产生系统抗病性<sup>[9]</sup>;Siddiqui 报道接种根瘤菌能够明显抑制豆科植物根部病害<sup>[10-11]</sup>。筛选出的根瘤菌菌株 Snb166 在离体条件下,其菌悬液对大豆胞囊线虫 J2 处理 72 h 后,校正致死率达到 51%,处理时间越长,对 J2 毒性越明显,且 Snb166 在回接结瘤试验中表现出较强的结瘤能力,因此,无论在土壤中还是大豆根内,拮抗性根

瘤菌能控制胞囊线虫对大豆的危害。

以无菌液体 YMA 培养基为对照,菌株 Snb166、Snb711 发酵液均具有较高杀线活性,其中 Snb166 发酵液处理 72 h 后,对大豆胞囊线虫 J2 校正致死率达到 84.27%,这表明该菌株的代谢产物有很强的杀线作用。由此可知,供试菌株对 J2 的活性可能是由于某种代谢产物引起的。Chakraborty 报道根瘤菌能够产生一种有效抑制豆科植物土传病害的活性物质,用色谱法、紫外及红外光谱分析表明,这种有毒物质为根瘤菌毒素<sup>[12]</sup>。这与 1968 年及 1972 年 Owens 报道的研究结果相同<sup>[13-14]</sup>。试验筛选出 2 株根瘤菌的杀线活性物质是否与根瘤菌毒素相关,有待进一步研究。2009 年,赵宇枢报道从辽宁锦州松树根围土壤中分离到 1 株根瘤菌,其发酵液处理 72 h 后,对大豆胞囊线虫 J2 校正致死率达到 83%<sup>[7]</sup>,相比之下,该试验分别从新疆大豆田及海南省翅荚槐根际土壤中筛选出的 Snb166 和 Snb711 对 J2 均具有较高杀线活性,其中 Snb166 对 J2 致死率高达 84.27%,可见,具有杀线活性的根瘤菌在我国分布范围比较广泛。

结果表明,在室内离体条件下,利用半根瘤法能够最大程度排除非拮抗性菌株,从而最大机率地筛选到拮抗性菌株。根瘤菌是内生细菌,具有天然的定殖优势,其与豆科植物之间具有其它生防菌株无法比及的相容关系,能够筛选出多株具有较高杀线活性的根瘤菌,将会为今后相关的深入研究提供必要的物质基础,从而更好的控制大豆胞囊线虫的危害。

## 参考文献

- [1] 韩立德,盖钧镒,张文明.大豆营养成分研究现状[J].种子,2003(5):57-59. (Han L D, Gai J Y, Zhang W M. The research of Soybean Nutrient Ingredient[J]. Seed, 2003(5): 57-59.)
- [2] Donate-Correa J, Leon-Barrios J, Hernandez M, et al. Different Mesorhizobium species sharing the same symbiotic genes nodulate the shrub legume Anagyris[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2007, 30(8):615-623.
- [3] 刘维志.植物线虫学研究技术[M].沈阳:辽宁科学技术出版社,1995:36-41. (Liu WZ. The technique of plant nematode research[M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 1995:36-41.)
- [4] 王素英.根瘤菌分离纯化、回接工作的几点建议[J].生物学通报,1994,29(12):36. (Wang S Y. Giving advice in isolation, purification and reciprocal of Rhizobia[J]. Bulletin of Biology, 1994, 29(12):36.)
- [5] 朱剑光,尉亚辉.花生慢生根瘤菌的分离与鉴定[J].生物技术,2006,16(12):45-47. (Zhu J G, Wei Y H. Isolation and identify of Bradyrhizobium Bacterium from peanut[J]. Biotechnology, 2006, 16(12):45-47.)
- [6] 徐传瑞.高效固氮大豆根瘤菌的筛选和鉴定[D].武汉:华中农业大学,2004:21-47. (Xu C R. Screening and identification of highly efficient Rhizobia[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2004: 21-47.)
- [7] 赵宇枢,段玉玺,王媛媛,等.辽宁省大豆根瘤菌资源抗逆性及生防潜力研究[J].大豆科学,2009, 28(1):113-117. (Zhao Y S, Duan Y X, Wang Y Y, et. al. Stress resistance and biocontrol potential of soybean rhizobia resources isolated from Liaoning Province[J]. Soybean Science, 2009, 28(1):113-117.)
- [8] 程亮,游春平,肖爱萍.拮抗细菌的研究进展[J].江西农业大学学报,2003,25(5):732-737. (Cheng L, You C P, Xiao A P. Advance in the study on antagonistic bacteria[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2003, 25(5): 732-737.)
- [9] Tian H L, Riggs R D. Effects of rhizobacteria on soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*[J]. Journal of Nematology, 2000, 32(4):377-388.
- [10] Siddiqui Z A, Mahmood I. Effects of rhizobacteria and root symbionts on reproduction of *Meloidogyne javanica* and growth of chickpea[J]. Bioresource Technology, 2001, 79:41-45.
- [11] Siddiqui Z A, Baghel G, Akhtar M S. Biocontrol of *Meloidogyne javanica* by *Rhizobium* and plant growth-promoting rhizobacteria on lentil[J]. World Journal Microbiology and Biotechnology, 2007, 23:435-441.
- [12] Chakraborty U, Purkayastha R P. Role of rhizobitoxine in protecting soybean roots from *Macrophomina phaseolina* infection[J]. Canada Journal of Microbiology, 1984, 30: 285-289.
- [13] Owens L D, Thompsen J F, Ptcher R G. Structure of Rhizobitoxine, an antimetabolic enol-ether amino acid from *Rhizobium japonicum*[J]. Journal of the Chemical Society, Chemical Communications, 1972: 714.
- [14] Owens L D, Guggenheim S, HiLton J. Rhizobium-synthesized phytotoxin: an inhibitor of *Salmonella typhimurium*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1968, 158: 219-225.