

芽孢杆菌 BL-21、HNDF2 对大豆胞囊线虫抑制效果的研究

李晓明¹, 杜春梅², 郑楠¹, 迟莉³, 浦子钢³, 韩东伟³, 王立达³

(1. 黑龙江省农业科学院 经济作物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 3. 黑龙江省农业科学院 齐齐哈尔分院, 黑龙江 齐齐哈尔 161000)

摘要:从黑龙江大豆胞囊线虫病已发生衰退的地块中分离得到的2株生防菌株 BL-21 和 HNDF2, 试验考察了 BL-21 和 HNDF2 菌液及菌株发酵液处理对大豆胞囊线虫胞囊孵化和二龄幼虫产生的影响。结果表明:菌液处理的效果好于除菌发酵液处理, BL-21 与 HNDF2 的混合菌液抑制作用最明显, 对胞囊孵化的相对抑制率达到 80.93%, 对二龄幼虫的校正死亡率达到 91.08%, 孵化出的线虫数和二龄幼虫死亡率均与对照呈极显著差异。

关键词:芽孢杆菌; 大豆胞囊线虫; 抑制作用

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)04-0710-03

Inhibitory Effect of *Bacillus* BL-21, HNDF2 on Soybean Cyst Nematode

LI Xiao-ming¹, DU Chun-mei², ZHENG Nan¹, CHI Li³, PU Zi-gang³, HAN Dong-wei³, WANG Li-da³

(1. Institute of Industrial Crops, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. College of Life Sciences of Heilongjiang University, Harbin 150080; 3. Qiqihar Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Qiqihar 161001, Heilongjiang, China)

Abstract: Two *Bacillus* BL-21 and HNDF2 were isolated from recessive land of soybean cyst nematode in Heilongjiang province, the effect of their bacteria liquid and fermentation filtrate on cyst hatching and J₂ were observed. There were 6 treatments including the bacteria liquids and fermentation filtrates of BL-21, HNDF2 and their mixture, respectively. The effect of bacteria liquid was better than fermentation filtrate. The mixed bacteria liquid of two *Bacillus* strains had best inhibition effect on cyst hatching and lethality of J₂, its relative inhibition rate of cyst hatching were 80.93%, the corrected mortality rate of J₂ reached 91.08%, which were significantly different with water control. Results suggest that the mixed bacteria liquid of BL-21 and HNDF2 had the best inhibition effect on soybean cyst nematode.

Key words: *Bacillus*; Soybean cyst nematode; Inhibition

大豆胞囊线虫病 (Soybean cyst nematode) 是世界性大豆病害, 广泛分布于大豆种植区^[1], 一般使大豆减产 10% ~ 30%, 严重地块减产 70% ~ 90%^[2]。大豆胞囊线虫病是典型的土传病害^[3], 线虫的卵由胞囊壁保护, 在干燥、无寄主条件下能长期生存^[4], 所以大豆胞囊线虫对不良环境耐性强, 土壤条件的复杂性使得常规防治措施均有其局限性^[5], 近年来, 随着人们生态保护意识的提高, 生物防治逐渐成为综合控制大豆胞囊线虫病的一条重要途径^[6]。利用土壤中的微生物资源对大豆胞囊线虫进行生物防治成为现阶段研究的热点^[7]。段玉玺等^[8]从东北和华北等地区采集土样分离获得 295 株芽孢杆菌, 通过筛选获得 6 株对大豆胞囊线虫有明显抑制作用的菌株。该研究以分离得到的芽孢杆菌 BL-21 和 HNDF2 为材料, 研究其对大豆

胞囊线虫生物活性的抑制效果, 以期获得具有开发价值的生防资源。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

侧孢芽孢杆菌 (*Bacillus laterosporus*) BL-21 为黑龙江大学生命科学学院微生物重点实验室保存菌种。枯草芽孢杆菌 HND-F2 (*Bacillus subtilis*) 由黑龙江八一农垦大学刘惕若教授提供。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆胞囊线虫卵悬液的制备 采用改良的淘洗-过筛法^[9]从土壤中分离胞囊, 在解剖镜下用自制的解剖针和毛刷挑出新鲜饱满成熟的胞囊, 1% NaClO 消毒, 4℃ 冰箱保存备用。挑取成熟且饱满的大豆胞囊线虫胞囊, 放入组织研磨器中加水研磨至

收稿日期: 2011-04-06

基金项目: 国家转基因作物新品种培育重大专项资助项目 (2008ZX08004-002)。

第一作者简介: 李晓明 (1983-), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事向日葵遗传育种研究。E-mail: fuzzy1314@163.com。

通讯作者: 杜春梅 (1972-), 女, 副教授, 主要从事植物病害生物防治研究。E-mail: duchunmei1972@sohu.com。

破壁,混合液过 200 目筛网,35% 蔗糖溶液中离心,2 500 r · min⁻¹离心 5 min,500 目筛上收集大豆胞囊线虫卵^[10],加水制备卵悬液。

1.2.2 生防菌液及除菌发酵液的制备 用接种环在芽孢杆菌 BL-21 和 HNDF 的牛肉膏蛋白胨(NA)培养基上刮两环,接入 50 mL 灭菌的 NA 液体培养基于 100 mL 的三角瓶内,25℃,180 r · min⁻¹摇瓶发酵培养 3 d,做为种液,取 2 mL 种液接种于 50 mL 灭菌的 NA 液体培养基于 100 mL 的三角瓶内,25℃,180 r · min⁻¹摇瓶发酵培养 7 d,得到发酵菌悬液,即生防菌液;将发酵菌液于 8 000 r · min⁻¹离心 10 min,取上清液,抽滤后过细菌滤器得到除菌发酵液,4℃冰箱中保存。

1.2.3 胞囊孵化的影响 取新鲜饱满的胞囊,无菌水浸泡过夜,0.5% NaClO 表面消毒 5 min,无菌水冲洗 3 次。放入自制的孵化池。每个孵化池放入 10 个胞囊,孵化池为自制双层套管,在双层套管间夹入擦镜纸。将孵化池置于灭菌的培养皿中,向培养皿内加入生防菌液或除菌发酵液 1 mL(混合菌液按 1:1 比例添加)、无菌水 9 mL,对照加入 10 mL 无菌水,3 次重复,25℃下恒温培养箱培养。9 d 后开始观察并记录孵化出的胞素数量^[11]。孵化率和相对抑制率公式如下:

孵化率(%) = 孵化胞囊数/供试胞囊数 × 100

相对抑制率(%) = (对照孵化率 - 处理孵化率)/对照孵化率 × 100

1.2.材4 芽孢杆菌对二龄幼虫的影响 在灭菌后的 12 孔细胞培养皿内分别加入生防菌液或除菌发酵液 10 mL,混合菌液中 BL-21、HNDF2 菌液各 5 mL,混合除菌发酵液中 BL-21、HNDF2 除菌发酵液各 5 mL,无菌水 10 mL 为对照然后分别向培养皿中加入新孵化的大豆胞囊线虫二龄幼虫 30 条每孔,3 次重复。25℃恒温培养,24 h 后观察二龄幼虫的死亡数量,计算死亡率,计算死亡线虫数用 NaOH 刺激法^[12-13]。

死亡率计算公式如下:

线虫死亡率(%) = 死亡线虫数/供试线虫数 × 100

校正死亡率(%) = (处理线虫死亡率 - 对照死亡率)/(1 - 对照死亡率) × 100

1.3 数据分析

所得数据经 SPSS13.0 软件进行方差分析,新

复极差法进行多重比较。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌 BL-21、HNDF2 对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

从表 1 可知,BL-21、HNDF2 的菌液及除菌发酵液对大豆胞囊线虫胞素孵化均表现了较强的抑制作用,菌液的抑制作用强于除菌发酵液;BL-21、HNDF2 单菌与混合菌液对胞囊孵化的抑制作用都很明显,相对抑制率均在 70% 以上,与除菌发酵液处理和对照差异极显著。混合菌液对胞囊孵化的相对抑制率达 80.93%,抑制效果好于 BL-21 和 HNDF2 单独处理,孵化的线虫数为 10.33 条,与单独菌液处理差异极显著。BL-21、HNDF2 混合的除菌发酵液的相对抑制率为 74.68%,效果好于单菌发酵液处理,孵化出的线虫数为 13.67 条,与单独除菌发酵液差异不显著。

表 1 芽孢杆菌 BL-21、HNPDF2 对大豆胞囊线虫胞囊孵化的影响

Table 1 Effect of BL-21 and HNDF2 on the hatching of cyst

处理 Treatment	孵化出的线虫数 Number of nematodes	相对抑制率 Relative restrained rates/%
BL-21 菌液	15.00 bB	72.22
HNDF2 菌液	14.33 bB	73.52
BL-21 + HNDF2 菌液	10.33 aA	80.93
BL-21 除菌发酵液	15.67 bB	70.93
HNDF2 除菌发酵液	16.33 bB	69.81
BL-21 + HNDF2 除菌发酵液	13.67 bB	74.68
清水对照	54.00 cC	—

同列数值后的不同大小写字母分别代表 0.01 和 0.05 水平的差异显著性,下表同。

Values with a column followed by different capital and lowercase letter were significant different at 0.01 and 0.05 probability level, respectively, the same as below.

2.2 芽孢杆菌 BL-21 与 HNDF2 对大豆胞囊线虫二龄幼虫活性的影响

从二龄幼虫的死亡率(表 2)可以看出,菌液对二龄幼虫的毒性强于除菌发酵液。菌液 BL-21、HNDF2 及其混合液的二龄幼虫死亡率极显著高于除菌发酵液各处理和对照,但各菌液处理间差异不显著,校正死亡率分别为 87.56%、85.42%、91.08%;除菌发酵液处理中,BL-21、HNDF2 及混合除菌发酵液处理的二龄幼虫校正死亡率分别为 61.20%、70.93% 和 70.35%,与清水对照差异极显

著,但除菌发酵液各处理之间差异不显著。

表 2 芽孢杆菌 BL-21、HNPDF2 对
大豆胞囊线虫二龄幼虫活性的影响

Table 2 Effect of BL-21 and HNDF2
on J2 of *H. glycines*

处理 Treatment	二龄幼虫死亡率 Mortality rate of J2/%	校正死亡率 Revised mortality rate/%
BL-21 菌液	88.35 ± 2.73aA	87.56
HNDF2 菌液	86.35 ± 3.72aA	85.42
BL-21 + HNDF2 菌液	91.65 ± 1.20aA	91.08
BL-21 除菌发酵液	63.67 ± 2.85bB	61.20
HNDF2 除菌发酵液	72.78 ± 4.20bB	70.93
BL-21 + HNDF2 除菌发酵液	72.23 ± 8.37bB	70.35
清水对照	6.35 ± 1.16 cC	—

3 结论与讨论

芽孢杆菌 BL-21 和 HNDF2 的菌液和除菌发酵液对胞囊孵化和二龄幼虫均表现出了较强的抑制作用,且菌液效果好于除菌发酵液,BL-21 和 HNDF2 芽孢杆菌混合菌液对胞囊孵化的相对抑制率达到了 80.93%,对二龄幼虫校正死亡率为 91.08%,效果均好于其它处理。考虑到土壤微生物的复杂性,向土壤中添加单一微生物容易受到其它微生物的影响,因而考虑在今后工作中将 2 种芽孢杆菌菌液复配来增强防治效果和稳定性,但混合发酵条件有待进一步研究。

微生物农药是生物防治的一个重要方向,目前,世界各国均在生防菌的筛选和生防制剂的试验研制工作^[14-16],但国内大多研究还处于实验室阶段,在田间防效、制剂加工、药效稳定性等方面还有待于进一步研究。应尽快结合实际生产,利用有良好应用前景的生防菌株研制出环保、经济有效的杀线制剂。

参考文献

- [1] Niblack T L. Protect your soybean profits: manage soybean cyst nematode [M]. Columbia: American Soybean Association, University of Missouri, 1993.
- [2] 刘维志. 植物病原线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 415. (Liu W Z. Plant pathogenic nematology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2000: 415.)
- [3] 段玉玺. 大豆胞囊线虫病及其防治 [M]. 北京: 金盾出版社, 2006: 44-51. (Duan Y X. Soybean cyst nematode disease and control [M]. Beijing: Jindun Press, 2006: 44-51.)
- [4] 李天飞, 张克勤, 刘杏忠. 食线虫菌物分类学 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2000. (Li T F, Zhang K Q, Liu X Z. The Histopathological changes of cotton bollworm infected by *Beauveria bassiana* [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 2000.)
- [5] 许艳丽. 土壤环境对大豆胞囊线虫卵孵化影响及线虫分子诊断研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学. 2004. (Xu Y L. The effects of soil environment on soybean cyst nematode egg hatch and nematode molecular diagnosis [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2004.)
- [6] Tian H, Robert D R, Devany I C. Control of soybean cyst nematode by chitinolytic bacteria with chitin substrate [J]. Journal of Nematology, 2000, 32(4): 370-376.
- [7] 马兰, 陈效杰, 姚文秋, 等. 黑龙江省东部地区大豆胞囊线虫防治技术研究 [J]. 大豆科学, 2007, 26(2): 218-222. (Ma L, Chen X J, Yao W Q, et al Control of soybean cyst nematode in Heilongjiang province and relation with growth character [J]. Soybean Science, 2007, 26(2): 218-222.)
- [8] 段玉玺, 于海峰, 陈立杰, 等. 防止大豆胞囊线虫芽孢杆菌初步筛选 [J]. 大豆科学, 2008, 27(5): 811-818. (Duan Y X, Yu H F, Chen L J, et al. Screening of *Bacillus* sp. a gainst soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) [J]. Soybean Science, 2008, 27(5): 811-818.)
- [9] 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. (Liu W Z. Method of plant-parasitic nematodes research [M]. Shenyang: Liaoning Science & Technology Press, 1995.)
- [10] 孙漫红, 刘杏忠. 淡紫拟青霉发酵滤液对大豆胞囊线虫趋化性的影响 [J]. 植物病理学报, 2004, 34(4): 376-379. (Sun M H, Liu X Z. Effects of *Paecilomyces lilacinus* M-14 fermentation filtrate on the affinity between soybean cyst nematode and soybean root [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004, 34(4): 376-379.)
- [11] 孙漫红, 刘杏忠, 晋治波. 淡紫拟青霉对大豆胞囊线虫卵及 2 龄幼虫的影响 [J]. 植物保护学报, 2002, 29(1): 57-61. (Sun M H, Liu X Z, Jin Z B. Effects of *paecilomyces lilacinus* on egg hatching and juvenile mortality of *Heterodera glycines* [J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2002, 29(1): 57-61.)
- [12] 陈立杰, 段玉玺, 王媛媛, 等. 不同细菌菌株对大豆根腐病菌及胞囊线虫病的影响 [J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(6): 831-834. (Chen L J, Duan Y X, Wang Y Y, et al. Bio-effect of different bacterial strains on soybean root rot pathogens and *Heterodera glycines* [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2006, 37(6): 831-834.)
- [13] Chen S Y, Dickison D W. A technique for determining live second-stage juveniles of *Heterodera glycines* [J]. Journal of Nematology, 2000, 32(1): 117-121.
- [14] Stirling G R. Biological control of plant parasitic nematodes: progress, problems and prospects [M]. UK: CAB Int, 1991. 282.
- [15] Kerry B R. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes [J]. Annual Review of Phytopathology, 2000, 38: 423-432.
- [16] Riggs R D, Wrather J A. Biology and management of the Soybean Cyst Nematode [M]. Minnesota: APS Press, 1992.