

诱导大豆抗胞囊线虫病和根腐病的生防细菌研究

闫继辰, 王媛媛, 朱晓峰, 刘晓宇, 陈立杰, 段玉玺* (沈阳农业大学植物保护学院植物线虫学实验室, 辽宁沈阳 110161)

摘要 [目的] 筛选诱导大豆抗胞囊线虫病和根腐病的生防细菌, 挖掘高效的新型微生物代谢物种衣剂。[方法] 从诱导抗性角度, 以大豆胞囊线虫和大豆根腐病菌为靶标, 通过对 2 400 株细菌发酵液包衣大豆种子处理、大田和温室盆栽试验, 筛选诱导大豆抗胞囊线虫病和根腐病的生防细菌。[结果] 获得 Sneb152、Sneb572、Sneb877、Sneb1076、Sneb1401 和 Sneb1499 共 6 株对病原物具有诱抗活性的生防细菌, 6 株生防细菌均可诱导大豆抗胞囊线虫病, 抑制率超过 74.98%, 且能显著促进大豆生长, 增产效果明显; 菌株 Sneb572 和 Sneb1076 对大豆根腐病也有一定防效。[结论] 优良诱抗生防菌株 Sneb572 和 Sneb1076 用于处理大豆种子前景广阔。

关键词 生防菌; 大豆胞囊线虫病; 根腐病; 促生长; 诱导抗性

中图分类号 S435.651 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)09-134-06

Study on the Biocontrol Bacteria Inducing Soybean Cyst Nematode and Soybean Root Rot Diseases

YAN Ji-chen, WANG Yuan-yuan, ZHU Xiao-feng, DUAN Yu-xi* et al (Laboratory of Plant Nematology, College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

Abstract [Objective] To screen the biocontrol bacterium inducing soybean cyst nematode and soybean root rot diseases, and to find high-efficient new microbial metabolites seed coatings. [Method] From the aspect of induced resistance, soybean cyst nematode and soybean root rot pathogen were used as the targets. A total of 2 400 coating soybean seeds were processed in bacteria fermentation liquid. [Result] After field and greenhouse screening, 6 strains of biocontrol bacteria (Sneb152, Sneb572, Sneb877, Sneb1076, Sneb1499 and Sneb1401) were obtained, which had resistance activity to the pathogen. The 6 strains of biocontrol bacteria could all induce soybean cyst nematode with the inhibition rate being more than 74.98%. They could significantly promote the growth of soybean and had obvious yield increasing effect. Besides, strains Sneb572 and Sneb1076 also had certain control effects on soybean root rot. [Conclusion] Sneb572 and Sneb1076 have broad application prospects in soybean seed treatment.

Key words Biocontrol bacteria; Soybean cyst nematode; Root rot disease; Growth promotion; Induced resistance

连作大豆通常减产幅度在 15%~30%^[1], 减产的原因是多种因素综合作用导致的, 以土壤中的病原物威胁最大^[2]。大豆根部病害首要的是大豆胞囊线虫病, 其次是幼苗根腐病菌等。大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)病是由大豆胞囊线虫(SCN)侵染引起的, 是危害世界大豆生产的重要病害之一, 具有分布广、传播途径多、休眠体存活时间长、危害严重等特点, 是一种极难防治的土传病害, 给大豆生产造成严重损失。目前, 该病在许多大豆主产国如美国、巴西、阿根廷和中国等都有发生^[3]。该病一般造成大豆减产 10%~20%, 严重时减产 70%~90% 甚至绝产^[4]。由于大豆胞囊线虫病的危害, 致使大豆根部受损, 致根部次生菌侵染, 加重根腐病的危害。大豆根腐病是严重影响大豆苗期生长的一种土传病害^[5], 由于其传播速度快、分布广泛、危害性大、毁灭性强、防治困难, 已被列为大豆生产中毁灭性病害之一^[6-7], 严重影响了大豆的质量和产量, 其造成的产量损失一般在 10%~30%, 严重时达 50%~60% 甚至绝产^[8]。大豆根腐病是由多种土壤习居菌复合侵染引起的, 主要为尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、燕麦镰孢菌(*F. avenaceum*)、茄腐镰孢菌(*F. solani*)、半裸镰孢菌(*F. semitectum*)、终极腐霉菌(*Pythium ultimum*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)^[9]。发病普遍的是由疫霉菌、镰刀菌引起

的根腐病, 少部分是由腐霉菌侵染及立枯丝核菌引起, 重茬使大豆根腐病加重, 致其防治更加困难^[5,10]。近 20 年来, 我国各省也分别对大豆根腐病进行了报道^[9-12]。

种衣剂是 20 世纪 60 年代发展起来的一类农药, 多采用杀菌剂或高毒杀线剂, 用其包衣种子不但可防治病虫害、增加产量, 而且可增加植物抗逆性、节约成本^[13]。种衣剂在大豆上已得到广泛应用^[12,14-15], 对大豆根腐病和胞囊线虫有一定的防治效果, 但部分种衣剂效果不理想。某些高毒的杀虫剂由于环境问题被逐渐禁用, 从而促使人们必须找到替代高毒农药的新产品。生物种衣剂是一种新的选择, 笔者选用真菌发酵液包衣处理大豆种子, 挖掘高效的新型微生物代谢物种衣剂, 探索了利用微生物代谢物和诱导抗性防控大豆根腐病的新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株。2 400 株细菌由沈阳农业大学北方线虫研究所提供。

1.1.2 根腐病原菌。尖孢镰刀菌、茄腐镰刀菌均由沈阳农业大学北方线虫研究所提供。

1.1.3 供试品种, 大豆品种:辽豆 15, 由辽宁省农业科学院大豆研究所提供。

1.1.4 种衣剂。商品种衣剂商品名为 BFA, 为中财盛世(北京)生物科技发展有限公司内蒙古莫旗分公司产品。其主要成分为生物体制剂“BFA”结合先进菌种。标准代号: Q/CHS03-2001。

1.2 方法

1.2.1 诱导大豆抗根部病害的生防细菌初筛试验。

基金项目 行业公益性项目(201503114-12); 国家自然科学基金重点项目(31330063); 国家自然科学基金面上项目(31171569); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04-PS13)。

作者简介 闫继辰(1989-), 男, 辽宁海城人, 硕士研究生, 研究方向: 植物病害。* 通讯作者, 教授, 从事生物防治研究。

收稿日期 2016-03-01

1.2.1.1 材料准备。2 400 株细菌在蛋白胨牛肉膏 (NA) 液体培养基中发酵 5 d。筛选出的生防菌发酵液采用 1:70 的种子量进行种子包衣处理,以不包衣为空白对照 (CK),干燥后装袋并编号备用。

1.2.1.2 田间布置。在辽宁省康平县进行试验,每个处理行长为 5.00 m,行距为 0.65 m,处理间隔为 1.00 m。以不包衣为空白对照 (CK)。试验田为连作大豆田,土壤为大豆胞囊线虫病和大豆根腐病田间自然发病土。

1.2.1.3 田间调查。在大豆播种后 35 d (大豆苗期),每个处理随机取 5 株苗。取样时先去掉表土 (0~5 cm),将植株连根挖出,保持根系完整,先计数根上胞囊数量,然后放入取样袋中封存,写好标签带回实验室。测定项目:胞囊抑制率、大豆根腐病病情指数、根腐病防效。根腐病病级分级按 0~5 的 6 级分类法进行 (表 1)。

表 1 根腐病病情分级

Table 1 Classification of root rot disease

严重度分级 Severity classification	分级标准 Classification standard	各级代表值 Representative value of each grade
0 级 Grade 0	幼苗茎基部和主根上均无病斑	0
1 级 Grade 1	茎基部和主根上有少量病斑,病斑面积在 25% 以下	1
2 级 Grade 2	茎基部和主根上病斑面积占茎基部和主根总面积的 25%~50%	2
3 级 Grade 3	茎基部和主根上病斑面积占茎基部和主根总面积的 50%~75%	3
4 级 Grade 4	茎基部和主根上病斑连片,形成绕茎现象,但根系并未坏死	4
5 级 Grade 5	根系坏死,地上部萎蔫或死亡	5

病情指数 = \sum (病情指数 \times 该级指数) / (调查株数 \times 最高病级) \times 100

根腐病防效 = (对照病情指数 - 处理病情指数) / 对照病情指数 \times 100%

胞囊抑制率 = (对照胞囊数 - 处理胞囊数) / 对照胞囊数 \times 100%

1.2.2 诱导大豆抗根部病害的生防细菌复筛试验。

1.2.2.1 材料准备。初步筛得的细菌在 NA 液体培养基中发酵 5 d。筛选出的生防菌发酵液采用 1:70 的种子量进行种子包衣处理,BFA 按照使用说明包衣大豆作为对照,干燥后装袋并编号备用。

1.2.2.2 田间布置。在辽宁省康平县进行 5 次重复试验,每个处理行长为 5.00 m,行距为 0.65 m,处理间隔为 1.00 m。以不包衣为空白对照 (CK),以商品种衣剂 BFA 为平行对照。试验田为连作大豆田,土壤为大豆胞囊线虫病和大豆根腐病田间自然发病土。

1.2.2.3 田间调查取样。在大豆播种后 35 d (大豆苗期),每个处理随机取 5 株苗。取样时先去掉表土 (0~5 cm),将植株连根挖出,保持根系完整,先计数根上胞囊数量,然后放入取样袋中封存,写好标签带回实验室。测定项目:胞囊抑制率、大豆根腐病病情指数、根腐病防效、根长、苗高、根部鲜

重、地上部鲜重和出苗率。同时于大豆成熟期,各处理随机选取 5 株大豆,测定其单株大豆株高、单株荚数、单株粒数和百粒重。

出苗率 = 出苗总数 / 播种种子总数 \times 100%

1.2.3 生防细菌诱导大豆抗根部病害的室内验证试验。

1.2.3.1 发酵液包衣对大豆种子萌发的影响试验。将试验所需的培养皿进行高压蒸汽灭菌,备用。每份取 100 粒大豆种子,使用直径为 90 cm 的培养皿,在其底部垫上大小合适的灭菌圆形滤纸,用无菌水湿润后,均匀放入经种衣剂包衣处理的种子,每皿放入 20 粒种子,每个处理 5 次重复。同时设空白对照。盖上培养皿盖,置于温度为 (28 \pm 1) $^{\circ}$ C、相对湿度为 85% 的恒湿培养箱中培养。7 d 后记录发芽率并测量芽长和根长,计算种子活力指数^[16]。

发芽率 = 第 7 天发芽的种子数 / 供试种子数 \times 100%

种子活力指数 (VI) = (芽长 + 根长) \times 发芽率

1.2.3.2 生防细菌促进大豆生长试验。采用室内盆栽处理,取无大豆胞囊线虫的土和细沙,165 $^{\circ}$ C 干热灭菌 2 h,通风冷却 2 d 后,将土、沙按体积比 2:1 的比例混合均匀,装入 16 cm \times 16 cm 黑色塑料钵中。用生防菌发酵液包衣大豆,待种子阴干后播种。每钵播种 3 粒包衣好的大豆种子,以无菌水为对照,5 次重复。30 d 后,将植株取出,保持根系完整。用流水将根部泥土洗净,并用滤纸吸干,测量单株大豆的株高、主根长、地上部分鲜重和地下部分鲜重。

1.2.3.3 生防细菌诱导大豆抗胞囊线虫试验。采用室内盆栽处理,取无大豆胞囊线虫的土和细沙,165 $^{\circ}$ C 干热灭菌 2 h,通风冷却 2 d 后,将沙、土按体积比 2:1 的比例混合均匀,装入 16 cm \times 16 cm 黑色塑料钵中。用生防菌发酵液包衣大豆,待种子阴干后播种。每钵播种 3 粒包衣好的大豆种子,以无菌水为对照,5 次重复。待豆苗长至 2 片子叶时,每钵留苗 1 颗,接种 2 000 条大豆胞囊线虫 2 龄幼虫 (J2)。30 d 后,将植株取出,保持根系完整。用流水将根部泥土洗净,用滤纸吸干并计根内线虫数和线虫抑制率。同时将根系用流水冲洗,滤纸吸干根表水分,称量根鲜重。采用次氯酸钠 - 酸性品红染色法进行根内线虫的染色,在体式显微镜下观察记录根内各虫态线虫数量。

线虫抑制率 = (对照线虫数 - 处理线虫数) / 对照线虫数 \times 100%

1.2.3.4 生防细菌诱导大豆抗大豆根腐病试验。用高粱米对镰孢菌分离菌株进行扩繁。将 100 g 高粱米置于 500 mL 三角瓶中,用水浸泡过夜后弃水,高压灭菌 1 h。选取 PDA 培养基上活化 2~3 d 的供试尖孢镰刀菌和茄腐镰孢菌菌丝尖端部分,用直径为 8 mm 的打孔器采集菌片,接种至上述高粱米表面,28 $^{\circ}$ C 培养 7~10 d。待镰孢菌菌丝长满高粱米培养物后,将其粉碎成粉末状备用。盆栽致病性测定试验在 28 $^{\circ}$ C 恒温温室内进行,先将盆栽土于 121 $^{\circ}$ C 湿热灭菌 90 min,再按照 2% 质量比混合镰孢菌于高粱米粉末并置于已灭菌的 0.5 L 盆栽盆中,每盆播入 5 粒大豆。30 d 时记录根腐病发病级别,计算病情指数^[17]。

1.2.3.5 系统性诱导抗性试验。参照裂根法^[18]验证生防菌诱导大豆产生对大豆胞囊线虫病和大豆根腐病的系统抗性。大豆在室内生长到2叶期,将大豆根系按照垂直方向从中间分成两部分,并且分别标注诱导部分和应答部分,然后将两部分根分开放入新的营养钵中。在诱导部分接种5 mL生防菌发酵液或灭活生防菌发酵液,应答部分不接种。空白对照中,诱导部分接种无菌水。为了防止生防菌在两部分根中发生污染,每一个营养钵底部都用单独的托盘隔离放置。接种生防菌28 d后,在每株大豆的应答部分接种2 000条J2和大豆根腐病原菌 1×10^5 个/mL的孢子悬浮液。3 d后,取出应答部分根系,然后对根系进行染色,计数根系内侵染的J2数量和线虫抑制率;5 d后,取出应答部分根系,测定病情指数和防治效果。

1.3 数据处理 应用Excel和SPSS软件对数据进行处理和分析。

2 结果与分析

2.1 诱导大豆抗根部病害的生防细菌初筛试验结果 通过初次大田试验,从2 400株细菌中筛选出6株细菌,分别为Sneb152、Sneb572、Sneb877、Sneb1076、Sneb1401和Sneb1499(图1),该6株生防菌均能显著提高大豆抗胞囊线虫病(抑制率超过74.98%)和大豆根腐病(防效超过22.22%)。

2.2 诱导大豆抗根部病害的生防细菌复筛试验结果

2.2.1 大田促进生长试验结果。通过三地大田复筛试验,苗期的调查结果(表1)显示,BFA促进植株增高的效果不及对照,与对照相比,生防细菌Sneb1401促进植株增高的效果最好,Sneb1076和Sneb572次之;BFA促进植株增高的效果

与对照相当,与对照相比,生防细菌Sneb1401促进植株根系增长的效果最好,Sneb572、Sneb877和Sneb152次之;BFA促进地上部分鲜重增加的效果与对照相当,与对照相比,生防细菌Sneb877促进植株增高的效果最好,Sneb1076和Sneb1499次之;BFA促进根系鲜重增加的效果不及对照,与对照相比,生防细菌Sneb152促进根系鲜重增加的效果最好,Sneb1499、Sneb572和Sneb1401次之;BFA促进出苗的效果优于对照,与BFA相比,生防细菌Sneb877促进出苗的效果最好,Sneb1076、Sneb1499和Sneb572次之。综上,与对照和BFA相比,生防细菌Sneb1401促进植株增高、植株根系增长、地上部分鲜重增加、根系鲜重增加和出苗效果最显著,而Sneb877、Sneb1076、Sneb572、Sneb1499和Sneb152次之。

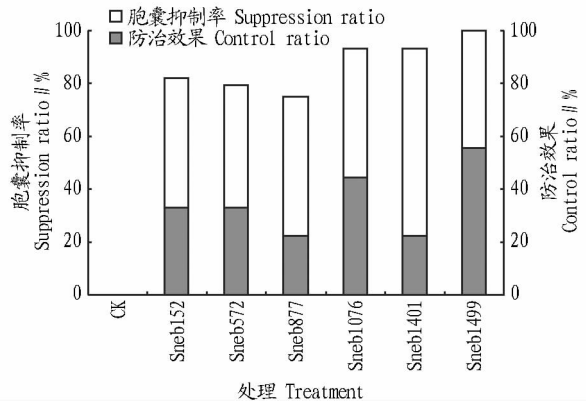


图1 不同菌株包衣处理大豆种子对大豆苗期生长的影响

Fig. 1 Effects of coating treatment of soybean seeds on the seedling growth of soybean

表1 不同生防菌株包衣处理大豆种子对大豆苗期生长的影响

Table 1 Effects of coating treatment of soybean seeds by biocontrol bacteria on the seedling growth of soybean

处理 Treatment	株高 Plant height//cm			根长 Root length//cm			地上部分鲜重 Fresh weight of aboveground part//g		
	沈农 Shennong	康平 Kangping	大庆 Daqing	沈农 Shennong	康平 Kangping	大庆 Daqing	沈农 Shennong	康平 Kangping	大庆 Daqing
CK	15.98cdeCDE	13.88dE	13.88dE	13.14eABCDE	18.76deDE	19.80eAB	2.84eE	2.48eE	4.06bB
BFA	15.12deDE	14.82cdDE	14.82cdDE	19.20cBCDE	19.20cdeCDE	19.72eAB	3.38deDE	3.38deDE	4.22bB
Sneb152	17.20abcdeCDE	19.26aABCD	19.26aABCD	22.54abABCD	20.12abcdeABCDE	22.26deAB	5.28abcABCD	5.12abcABCD	6.36aA
Sneb572	19.22abABCD	16.42abcdCDE	16.42abcdCDE	16.64dCDE	25.06aA	25.64abcAB	4.38bcdeBCDE	4.66abcdABCD	6.18aA
Sneb877	16.06bcdeCDE	17.94abcABCD	17.94abcABCD	23.56aABCDE	23.56aA	24.02abcdAB	6.70aA	6.70aAB	7.40aA
Sneb1076	19.76aABC	16.28abcdCDE	16.28abcdCDE	15.90deABCDE	22.38aABC	24.00abcdAB	5.98abABC	6.66aAB	7.22aA
Sneb1401	17.52abcdeBCDE	22.30aAB	22.30aAB	25.92aABCDE	25.92aA	25.86abAB	4.42bcdeABCDE	4.42bcdBCDE	5.96aA
Sneb1499	17.44abcdeBCDE	18.48aABCD	18.48aABCD	21.00abcABCDE	21.00abcdABCD	23.02bcdB	6.22aABC	6.22aABC	6.00aA
处理 Treatment	根部鲜重 Root fresh weight//g			出苗率 Emergence rate//%					
	沈农 Shennong	康平 Kangping	大庆 Daqing	沈农 Shennong	康平 Kangping	大庆 Daqing			
CK	2.00abcde	1.46eB	1.68bcdABC	53.33cB	30.67eE	49.33cdCD			
BFA	1.58bcdeBCDE	1.58deB	1.46dC	69.33bcAB	35.33deDE	53.33bcdBCD			
Sneb152	2.38abABCD	2.42abAB	2.10abcdABC	70.67abcAB	46.67abcdABCDE	53.33abcdBCD			
Sneb572	1.48cdeCDE	2.12abcdeAB	1.74bcdABC	76.00abAB	48.67abcdABCDE	68.67aABCD			
Sneb877	1.90abcdeABCDE	1.90bcdeAB	1.80bcdABC	86.00abA	54.67aABC	71.33abcdABCD			
Sneb1076	1.82abcdeABCDE	1.82bcdeB	1.92bcdABC	78.67abAB	50.00abcABC	86.00bcdA			
Sneb1401	2.10abcdABCDE	2.10abcdeAB	1.94abcdABC	77.33abAB	38.00bcdeBCDE	64.67abcdABCD			
Sneb1499	2.26abcABCDE	2.26abcdAB	1.90abcdABC	82.00abA	57.33aA	64.00abcdABCD			

注:同列数值后标以不同大、小写字母者表示不同处理间分别在0.01和0.05水平差异显著。

Note: Data were the mean value. Different capital letters and lowercases in the same row indicated significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

2.2.2 生防细菌诱导大豆抗胞囊线虫和根腐病的大田试验

结果。由表2可知,BFA在抑制胞囊作用方面的效果显著优

于对照,与 BFA 相比,生防细菌 Sneb572 在抑制胞囊作用方面的效果最好,Sneb1076 和 Sneb877 次之;BFA 在抑制根腐病作用方面的效果不及对照,与 BFA 相比,生防细菌 Sneb1401 在抑制根腐病作用方面的效果最好,Sneb572、Sneb877 和 Sneb1076 次之。综上,与对照和 BFA 相比,生防

菌普遍具有显著促进植株出苗作用,生防细菌 Sneb572 在抗胞囊线虫病和根腐病原菌的作用方面具有最显著效果。生防细菌 Sneb1076、Sneb877 和 Sneb1401 在抗胞囊线虫病和根腐病原菌的作用方面同样具有显著效果。

表 2 不同菌株包衣处理大豆种子对大豆根腐病的防治效果和大豆根系胞囊形成的影响

Table 2 Effect of coating treatment of soybean seeds by biocontrol bacteria on the control of soybean root rot and the formation of soybean root cyst

处理 Treatment	平均胞囊数 Cyst number per plant//个/株			胞囊抑制率 Suppression ratio//%		
	沈农 Shennong	康平 Kangping	大庆 Daqing	沈农 Shennong	康平 Kangping	大庆 Daqing
CK	24.78aA	19.33aA	24.78aA			
BFA	13.89abcdeABCD	7.89bB	13.89abcdeA	43.95	59.18	43.95
Sneb152	23.56abcdeABCD	5.33abcBC	14.67abcdeB	4.92	72.43	40.80
Sneb572	10.78bcdeABCD	3.67abcBC	7.89bcdeBCD	56.50	81.01	68.16
Sneb877	14.44abcdeABCD	4.00abcC	10.89bcdeBCD	41.73	79.31	56.05
Sneb1076	7.89aCDABCD	3.78bcBC	17.11abcBCD	68.16	60.89	30.95
Sneb1401	10.89bcdeABCD	5.00abcBC	13.56abcdeD	56.05	74.13	45.28
Sneb1499	17.22abcABCD	5.89abBC	14.44abcdeBCD	30.51	69.53	41.73

处理 Treatment	病级指数 Disease index			防病效果 Control effect//%		
	沈农 Shennong	康平 Kangping	大庆 Daqing	沈农 Shennong	康平 Kangping	大庆 Daqing
CK	60.00abAB	60.00abAB	68.00aAB			
BFA	72.00aA	76.00aA	76.00aA	-20.00	-26.67	-11.76
Sneb152	52.00abcdABC	40.00abcdABC	44.00abcCD	13.33	33.33	35.29
Sneb572	40.00bcdeBC	28.00bcdeBC	28.00cdD	33.33	53.33	58.82
Sneb877	40.00bcdeBC	40.00bcdeBC	40.00abcdCD	33.33	33.33	41.18
Sneb1076	44.00bcdeABC	36.00bcdeBC	48.00abBCD	26.67	40.00	29.41
Sneb1401	32.00deBC	32.00deBC	24.00dD	30.00	46.67	64.71
Sneb1499	56.00abcABC	56.00abcABC	56.00abcdABC	6.67	6.67	21.43

注:同列数值后标以不同大、小写字母者表示不同处理间分别在 0.01 和 0.05 水平差异显著。

Note: Data were the mean value. Different capital letters and lowercases in the same row indicated significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

2.2.3 生防细菌对大豆产量构成的影响。通过对大田成熟期大豆的调查,结果(表 3)表明,BFA 促进植株增高的效果显著优于对照,与 BFA 相比,生防细菌 Sneb152 促进植株增高的效果最好,Sneb1401 和 Sneb1499 次之;BFA 促进单株豆荚数增长的效果显著优于对照在辽宁省康平县的试验田,与 BFA 相比,生防细菌 Sneb1076 促进单株豆荚数增长的效果最好,Sneb877 和 Sneb152 次之;BFA 促进单株豆粒数增长的效果显著优于对照在辽宁省康平县的试验田,与 BFA 相比,生防细菌 Sneb877 促进单株豆粒数增长的效果最好,Sneb1076 次之;BFA 促进百粒豆粒鲜重增加的效果与对照相当,与 BFA 相比,生防细菌 Sneb1401 促进单株豆粒数增长的效果最好,Sneb1076、Sneb1499、Sneb152 和 Sneb572 次之。综上,与对照和 BFA 相比,在大豆成熟期生防细菌普遍促进植株增长效果显著,而生防细菌仅有 Sneb152、Sneb1401 和 Sneb1499 具有促进植株增长的作用。生防细菌 Sneb1076 在促进植株单株荚数和单株粒数增长、百粒重鲜重增加方面效果最显著,Sneb877、Sneb152、Sneb1401、Sneb1499 和 Sneb572

次之。

2.3 生防细菌诱导大豆抗根部病害的室内试验验证结果

2.3.1 促进大豆种子萌发的试验结果。通过室内生防菌发酵液包衣大豆种子发芽试验,结果(图 2)表明,与对照相比,Sneb572、Sneb1076、Sneb1401 和 Sneb1499 都具有显著促进大豆种子发芽率和种子活力指数的作用。综上,与对照相比,生防细菌 Sneb1401 促进大豆种子发芽率和种子活力效果最显著,Sneb1499 和 Sneb572 次之。

2.3.2 生防细菌促进大豆生长的试验结果。通过室内盆栽试验,结果(表 4)表明,与对照相比,4 株生防菌均具有显著促进株高和根长增加的作用;在地上部分重方面和根重方面,与对照相比,Sneb1076 和 Sneb1499 生防菌株都能显著促进植株鲜重增加。综上,与对照相比,生防细菌 Sneb1499 在促进植株增高、根系增长、地上部分鲜重增加和根系鲜重增加方面效果最显著,Sneb1401、Sneb1076 和 Sneb572 次之。

2.3.3 生防细菌诱导大豆抗胞囊线虫的试验结果。通过室内抗胞囊线虫病试验,结果(图 3)表明,与对照相比,在抗胞

表3 不同菌株包衣处理大豆种子对大豆成熟期的影响

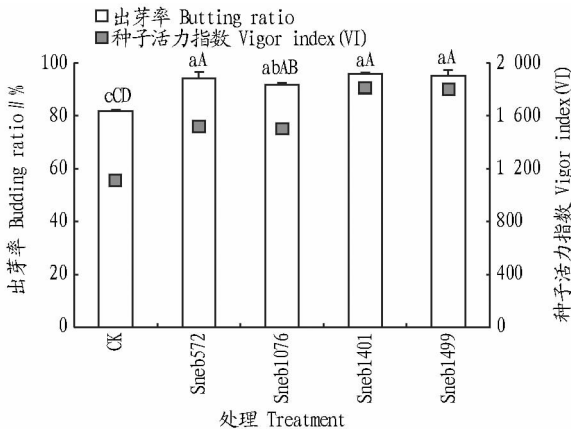
Table 3 Effect of coating treatment of soybean seeds by biocontrol bacteria on soybean maturing stage

处理 Treatment	株高 Plant height//cm		单株豆荚数 Pot number per plant//个	
	沈农 Shennong	康平 Kangping	沈农 Shennong	康平 Kangping
CK	69.67 ± 2.94IG	87.50 ± 9.80eD	44.10 ± 11.16deBC	38.63 ± 18.29cdCD
BFA	77.60 ± 3.05efghCDEF	92.38 ± 2.45bedeABCD	34.20 ± 3.96eC	69.88 ± 18.86aA
Sneb152	81.80 ± 2.77abcdefABCDE	100.38 ± 5.42aA	66.60 ± 13.61abcAB	56.88 ± 23.63abcABC
Sneb572	76.00 ± 3.06fghDEFG	92.13 ± 4.88bedeBCD	65.40 ± 13.28abcAB	58.78 ± 18.12abcABC
Sneb877	80.60 ± 4.18abcdefgABCDEF	94.50 ± 4.11abcdABCD	67.20 ± 14.57abAB	61.25 ± 14.18abcABC
Sneb1076	76.40 ± 3.05fghCDEFG	93.50 ± 3.74bedeABCD	73.80 ± 11.52aAB	57.38 ± 17.55abcABC
Sneb1401	73.60 ± 4.72hiFG	96.63 ± 6.35abcABC	65.40 ± 14.40aAB	44.63 ± 10.03abcdABCD
Sneb1499	81.60 ± 5.46abcdefABCDE	95.25 ± 2.43abcdABCD	65.80 ± 12.48abAB	53.88 ± 13.24abcABC

处理 Treatment	单株豆粒数 Seed number per plant//粒		百粒重 100 seed weight//g	
	沈农 Shennong	康平 Kangping	沈农 Shennong	康平 Kangping
CK	72.00 ± 22.25d	55.00 ± 14.94cdBC	20.00 ± 0gF	24.00 ± 0eD
BFA	72.00 ± 14.70d	99.25 ± 22.27abA	23.67 ± 0.58deE	24.00 ± 0eD
Sneb152	82.40 ± 16.85abcd	84.63 ± 22.17abABC	24.00 ± 0cdCD	26.67 ± 0.58abAB
Sneb572	83.40 ± 21.87abcd	88.22 ± 24.86abABC	23.33 ± 0.58deD	24.00 ± 0.58eD
Sneb877	82.20 ± 22.60abcd	111.25 ± 22.07aA	23.00 ± 0eDE	24.33 ± 0.58deD
Sneb1076	95.00 ± 17.25abcd	96.88 ± 24.28abA	26.33 ± 0.58aA	25.33 ± 0.58bcdeBCD
Sneb1401	83.40 ± 14.85abcd	76.63 ± 14.09bcdABC	24.00 ± 0cdCD	27.33 ± 0.58aA
Sneb1499	92.60 ± 16.77abcd	92.00 ± 24.42abAB	26.00 ± 0abAB	26.00 ± 1.00abcABCD

注:同列数值后标以不同大、小写字母者表示不同处理间分别在0.01和0.05水平差异显著。

Note: Data were the mean value. Different capital letters and lowercases in the same row indicated significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively.



注:柱上不同大、小写字母表示不同处理间分别在0.01、0.05水平差异显著。

Note: Different capital letters and lowercases in the same row indicated significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

图2 不同生防菌株包衣处理大豆种子对大豆萌发的影响

Fig. 2 Effect of coating treatment of soybean seeds by biocontrol bacteria on soybean germination

表4 不同生防菌株包衣处理大豆种子对温室大豆苗期生长的影响

Table 4 Effects of coating treatment of soybean seeds by biocontrol bacteria on seedling growth of soybean in greenhouse

处理 Treatment	株高	根长	地上部分鲜重	根鲜重
	Plant height cm	Root length cm	Fresh weight of aboveground part//g	Root fresh weight//g
CK	22.43 ± 0.47eA	15.93 ± 0.55cC	10.45 ± 0.15aA	9.57 ± 0.12cB
Sneb572	28.17 ± 0.40abA	18.67 ± 0.30bB	6.43 ± 0.40bB	7.77 ± 0.15dC
Sneb1076	27.87 ± 0.25bA	22.37 ± 0.50aA	11.53 ± 0.32aA	9.60 ± 0.10cB
Sneb1401	29.00 ± 0.61aA	22.27 ± 0.65aA	8.53 ± 0.35bB	11.87 ± 0.25bA
Sneb1499	28.10 ± 1.28abA	22.63 ± 0.25aA	11.60 ± 0.26aA	12.10 ± 0.20abA

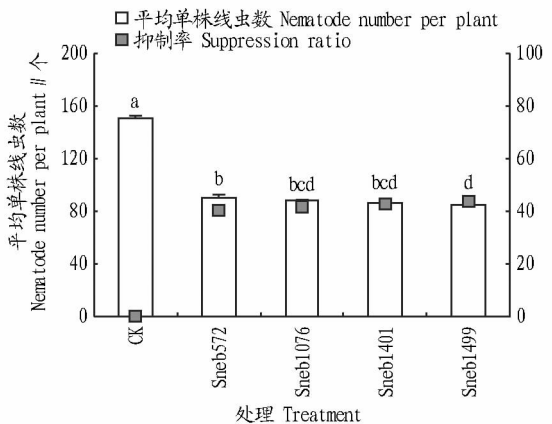
注:同列数值后标以不同大、小写字母者表示不同处理间分别在0.01和0.05水平差异显著。

Note: Different capital letters and lowercases in the same row indicated significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

囊线虫病方面4株生防细菌可显著促进大豆抗大豆胞囊线虫。Sneb1499促进大豆防效最高达43.71%。综上,与对照和菌剂相比,生防细菌Sneb1499抑制胞囊线虫作用效果最显著,Sneb1401和Sneb1076次之。

2.3.4 生防细菌诱导大豆抗大豆根腐病的试验结果。通过室内抗根腐病试验,结果(图4)表明,与对照相比,在抗根腐病原菌尖孢镰刀菌和茄腐镰刀菌方面,4株生防菌都显著促进大豆抗病,其中Sneb572和Sneb1076对茄腐镰刀菌和尖孢镰刀菌的防效高达70.00%。综上,与对照相比,生防菌皆对茄腐镰刀菌和尖孢镰刀菌有显著抗性。

2.3.5 系统性诱导抗性试验结果。通过室内系统性诱导抗性试验,结果(表5)表明,应答根系与空白根系相比,生防细菌对线虫抑制率超过50.90%,其中Sneb572对线虫的抑制率高达84.88%;生防细菌对茄腐镰刀菌的防效超过58.34%。综上,与对照相比,生防细菌Sneb572诱导大豆抗胞囊线虫以及对茄腐镰刀菌和尖孢镰刀菌的防治效果最显著,Sneb1076、Sneb1401和Sneb1499次之。

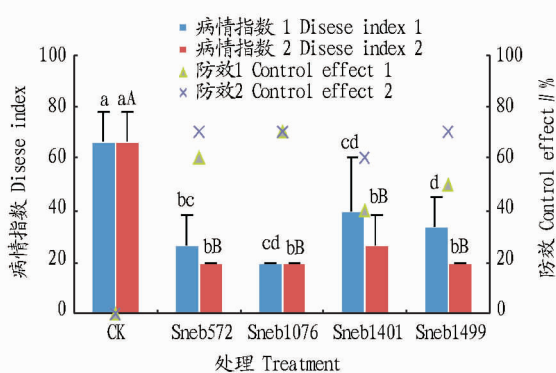


注:柱上不同小写字母表示不同处理间分别在 0.05 水平差异显著。

Note: Different lowercases in the same row indicated significant differences at 0.05 level.

图 3 不同生防菌株包衣处理大豆种子对大豆根内胞囊线虫的影响

Fig. 3 Effects of coating treatment of soybean seeds by biocontrol bacteria on soybean cyst nematode



注:1 为单独接茄腐镰刀菌;2 为单独接尖孢镰刀菌;柱上不同大、小写字母表示不同处理间分别在 0.01、0.05 水平差异显著。

Note: 1 was inoculated with *F. solani*; 2 was inoculated with *F. oxysporum*. Different capital letters and lowercases in the same row indicated significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

图 4 不同生防菌株包衣处理大豆种子对根腐病的防治效果

Fig. 4 Effect of coating treatment of soybean seeds by biocontrol bacteria on the control of root rot

表 5 不同生防菌株包衣处理大豆苗诱导抗性的影响

Table 5 Effect of coating treatment of soybean seeds by biocontrol bacteria on induced resistance of soybean seedling

处理 Treatment	胞囊线虫 Cyst nematode		茄腐镰刀菌 <i>F. solani</i>		尖孢镰刀菌 <i>F. oxysporum</i>	
	单株线虫数 Nematode number per plant // 个	抑制率 Inhibition ratio // %	病情指数 Disease index	防效 Control effect %	病情指数 Disease index	防效 Control effect %
	CK	184.67 ± 4.51aA		80.00 ± 20.00aA		86.67 ± 11.55aA
Sneb572	83.33 ± 2.08cdABCD	84.88	33.33 ± 11.55bB	58.34	33.33 ± 11.55bB	61.54
Sneb1076	81.00 ± 2.00deCD	56.14	26.67 ± 11.55bB	66.67	33.33 ± 11.55bB	61.54
Sneb1401	84.67 ± 3.51cdABCD	54.15	26.67 ± 11.55bB	66.67	33.33 ± 11.55bB	61.54
Sneb1499	86.00 ± 2.65bcdABC	53.43	26.67 ± 11.55bB	66.67	40.00 ± 0bB	53.85

注:同列数值后标以不同大、小写字母者表示不同处理间分别在 0.01 和 0.05 水平差异显著。

Note: Data were the mean value. Different capital letters and lowercases in the same row indicated significant differences at 0.01 and 0.05 levels, respectively.

3 结论与讨论

本研究从 2 400 株细菌中筛选出 6 株生防细菌 Sneb152、Sneb572、Sneb877、Sneb1076、Sneb1401 和 Sneb1499, 采用这 6 株菌处理大豆种子, 均能显著提高大豆抗胞囊线虫病和大豆根腐病的抗性; 经过第 2 年复筛试验, 结果表明, 与对照和 BFA 种衣剂相比, Sneb152、Sneb572、Sneb877、Sneb1076、Sneb1401 和 Sneb1499 不仅能显著提高大豆抗胞囊线虫病和大豆根腐病的抗性, 还具有促进根系增长、提高生物学产量的作用, 并且在不同地区重复中均保持稳定效果; 室内功能验证结果表明, Sneb572、Sneb1076、Sneb1401 和 Sneb1499 均具有显著诱导大豆抗茄腐镰刀菌、尖孢镰刀菌和大豆胞囊线虫效果, 可促进大豆发芽和增长, 并且通过裂根试验证明筛选出的生防菌对大豆胞囊线虫和大豆根腐病具有系统性诱导抗性。综合上述结果, 获得的 Sneb572 和 Sneb1076 生防菌株发酵液具有显著地系统诱导大豆抗胞囊线虫病和大豆根腐病、显著地促进大豆生长和增产等作用, 这与黄姗姗等^[19]的研究结果相似, 该 2 株优良诱抗生防菌株对大豆种子处理具有良好的应用前景, 对其鉴定、复配和发酵条件及机制还

有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 鞠会艳, 韩丽梅, 王树起. 邻苯二甲酸和丙二酸对大豆根腐病原菌的化感作用[J]. 吉林农业科学, 2002, 27(5): 38-40.
- [2] 何志鸿, 刘忠堂, 许艳丽, 等. 大豆重迎茬减产的原因及农艺对策研究: 重迎茬大豆减产的主要原因[J]. 黑龙江农业科学, 2003(2): 1-4.
- [3] 段玉玺. 植物线虫学[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [4] 陈立杰, 王媛媛, 朱晓峰, 等. 大豆胞囊线虫病生物防治研究进展[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(4): 393-398.
- [5] 李春杰, 许艳丽, 赵志权, 等. 木霉颗粒剂对大豆根腐病的防治作用[J]. 大豆科学, 2009, 28(3): 499-506.
- [6] 张淑珍, 王维峰, 西芳, 等. 大豆抗疫霉根腐病机制的研究进展[J]. 大豆科学, 2001, 20(4): 290-294.
- [7] 张红骥, XUE A G, ZHANG J X, 等. 尖孢孢菌和禾谷镰孢菌引起的大豆根腐病生物防治研究[J]. 大豆科学, 2011, 30(1): 113-118.
- [8] 徐佳, 王士强, 张兴梅. 生物制剂拌种对盆栽大豆根腐病防效及土壤酶的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2008, 20(5): 21-24.
- [9] 马汇泉, 辛惠普. 大豆根腐病原菌种类鉴定及其生态学研究[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 1998(2): 115-121.
- [10] 袁军, 孙福在, 田宏先, 等. 防治马铃薯环腐病有益内生细菌的分离和筛选[J]. 微生物学报, 2002, 42(3): 270-274.
- [11] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉菌的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(3): 298.

(下转第 149 页)

率明显下降。因此,选择 1:25 为最佳径长比。

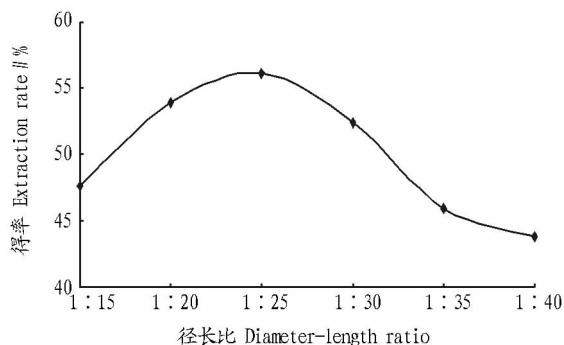


图 5 径长比对洗脱效果的影响

Fig. 5 Effects of diameter-length ratio on the elution efficiency

2.3 正交试验 从表 2 可看出,各因素对洗脱效果影响的主次顺序为洗脱流速 > 径长比 > 洗脱剂浓度,多酚得率最高

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal experiment

试验号 Test code	A	B	C	D(空列 Blank)	得率 Extraction rate // %
1	1	1	1	1	50.79
2	1	2	2	2	56.57
3	1	3	3	3	36.17
4	2	1	2	3	56.65
5	2	2	3	1	49.39
6	2	3	1	2	54.12
7	3	1	3	2	41.66
8	3	2	1	3	43.64
9	3	3	2	1	53.35
k_1	47.84	49.70	52.75		
k_2	52.39	49.87	55.52		
k_3	46.22	47.88	42.41		
R	6.17	1.99	13.11		

的组合为 $A_2B_1C_2$; 根据极差分析,最佳组合为 $A_2B_2C_2$ 。因此,在 $A_2B_2C_2$ 条件下,进行 3 次平行验证试验,红皮云杉多酚得率结果分别为 56.48%、56.82%、57.35%,平均得率为 56.88%,高于 $A_2B_1C_2$ 的得率。因此,选择 $A_2B_2C_2$ 为纯化红皮云杉多酚的最佳工艺条件,即径长比为 1:25、洗脱剂浓度为 70%、洗脱流速为 2.0 mL/min。

3 结论

该试验采用大孔吸附树脂法纯化红皮云杉多酚,通过静态试验从 5 种大孔吸附树脂中筛选出效果最好的 D-101;再以 D-101 为固定相介质进行动态试验,通过单因素和正交试验,得到了纯化红皮云杉多酚的最佳工艺条件:上样浓度 1.5 mg/mL、上样量 25 mL、径长比 1:25、洗脱剂浓度 70%、洗脱流速 2.0 mL/min,在此最佳条件下多酚得率为 56.88%。

参考文献

- [1] 赵扬帆,郑宝东. 植物多酚类物质及其功能学研究进展[J]. 福建轻纺, 2006(11):107-110.
- [2] 苏晓雨,王振宇. 红松子种皮提取物活性成分及抗氧化作用研究[J]. 林产化学与工业, 2010,30(4):99-102.
- [3] 周芳,赵鑫,宫婕,等. 响应面法优化超声辅助提取红皮云杉多酚工艺[J]. 食品工业科技, 2014,35(1):210-213.
- [4] 董文斌,许仙猛. 杜仲叶多酚的提取及分离工艺研究[J]. 陕西科技大学学报(自然科学版), 2011,29(1):60-65.
- [5] 苏晓雨,王振宇. 红松种子壳多酚物质的提取及抗氧化特性[J]. 农业工程学报, 2009,25(1):198-203.
- [6] 熊何健,吴国宏. 大孔吸附树脂分离纯化葡萄多酚的研究[J]. 食品研究与开发, 2007,28(11):74-77.
- [7] 赵艳红,李建科,李国荣,等. 石榴皮多酚纯化及其抗氧化活性表征[J]. 食品科学, 2011,31(11):31-37.
- [8] 王振宇,刘春平. 大孔树脂 AB-8 对苹果多酚的分离纯化[J]. 食品研究与开发, 2009,30(4):21-24.
- [9] 崔泰花,沙迪,申玉,等. 桔梗茎叶多酚提取工艺的优化[J]. 延边大学学报, 2015(3):221-226.
- [10] 王有琼,马李一,张重权,等. 印楝树皮多酚的提取工艺研究[J]. 西南农业学报, 2016(3):552-557.

(上接第 139 页)

- [12] 张全党,郭庆元,白丽艳,等. 防治大豆根腐病的种子处理用药筛选[J]. 新疆农业科学, 2009,46(1):106-111.
- [13] 何迎春,高必达. 立枯丝核菌的生物防治[J]. 中国生物防治, 2001,16(1):31-34.
- [14] 陈立杰,万传浩,朱晓峰,等. Snea253 生物种衣剂防治大豆胞囊线虫的研究[J]. 大豆科学, 2011,30(1):459-462.
- [15] 杜春梅,李海燕,李晓明,等. HND1 生物种衣剂防治大豆胞囊线虫药效研究[J]. 大豆科学, 2009,28(6):1126-1129.
- [16] ABDUL-BAKI A A, ANDERSON J D. Vigour determination in soybean

seed by multiple criteria[J]. Crop Sci, 1973,13:630-633.

- [17] 魏巍,许艳丽,张思佳,等. 大豆根腐病原镰孢菌种群多样性 DGGE 分析及其致病性研究[J]. 植物病理学报, 2013,43(5):500-508.
- [18] MARTINUZ A, SCHOUTEN A, SIKORA R A. Post-infection development of *Meloidogyne incognita* on tomato treated with the endophytes *Fusarium oxysporum* strain Fol62 and *Rhizobium etli* strain G12[J]. BioControl, 2013,58:95-104.
- [19] 黄姗姗,段玉玺,陈立杰,等. 诱导大豆抗逆细菌的筛选及分子鉴定[J]. 大豆科学, 2011,30(2):205-210.