

## 大豆疫病拮抗细菌的筛选及生防作用

杨光红<sup>1</sup>, 高智谋<sup>1\*</sup>, 曹舜<sup>1</sup>, 江涛<sup>1</sup>, 汪涛<sup>2</sup>

(1. 安徽农业大学植物保护学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业科学院植物保护研究所, 合肥 230031)

**摘要:** 从大豆根围土样中筛选得到对大豆疫霉有较好拮抗作用的生防菌株 4 株, 经平板测定, 生防菌株 BY-2 的防效最好, 达 79.00%; 对其不同发酵时间的代谢液活性进行测定, 发现 72 h 代谢液的抑制效果最佳, 达到 40.93%。BY-2 代谢液能显著抑制大豆疫霉游动孢子萌发, 抑制效果为 39.89%~57.71%; 其挥发性物质能显著抑制疫霉菌丝的生长, 抑制效果为 81.70%~91.94%。离体和盆栽试验结果表明, BY-2 菌液处理对大豆疫病具较好的防治效果, 离体叶片防效和盆栽防效分别为 63.38% 和 75.01%。此外, 用 BY-2 活菌液灌根大豆幼苗的鲜重、干重、根长和茎长显著增加, 表明生防菌株 BY-2 能促进大豆植株的生长。

**关键词:** 生防细菌; 大豆疫霉; 生防效果; 促生作用

中图分类号: S435.651

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2012)05-0677-05

### Screening and biocontrol effects of antagonistic bacteria against *Phytophthora sojae*

YANG Guang-hong<sup>1</sup>, GAO Zhi-mou<sup>1</sup>, CAO Shun<sup>1</sup>, JIANG Tao<sup>1</sup>, WANG Tao<sup>2</sup>

(1. School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Institute of Plant Protection, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

**Abstract:** Four bacterial strains were isolated from the soil in rhizosphere of soybean plants. Antagonistic tests showed that BY-2 strongly restricted the growth of *Phytophthora sojae*. In the dual-culture test in plates, the results showed that the bacterial culture of strain BY-2 significantly inhibited the hyphal growth of *P. sojae*, with a high inhibition rate of 79.00%. The results also showed that the inhibition activity of fermentation liquid against BY-2 varied with time, and the inhibition of metabolic liquid at 72 h treatment against *P. sojae* was 40.93%, being the highest. The metabolic liquid could evidently inhibit germination of zoospores, with the inhibitory rates from 39.89% to 57.71%. The volatiles from BY-2 could evidently inhibit hyphal growth of *P. sojae*, with the inhibitory rates from 81.70% to 91.94%. Detached leaves and pot experiments demonstrated that the bacterial of BY-2 had significant control on soybean blight, with the control effectiveness being 63.38% and 75.01%, respectively. In addition, the fresh weight and dry weight were all increased significantly and the growth of soybean was promoted after root affused with BY-2 bacterial suspension.

**Key words:** antagonistic bacteria; *Phytophthora sojae*; biological control; growth promoting

由大豆疫霉 (*Phytophthora sojae* Kaufmann et Gerdemann) 引致的大豆疫病, 是大豆生产上的重要危险性病害, 可藉土壤和种子传播, 一旦传入, 能在病区土壤中长期存活, 难以根除<sup>[1]</sup>。该病最早于 1948 年发生在美国, 此后不断蔓延, 现已广泛分布于亚、非、欧、南北美洲近 20 个国家的大豆主产区, 每年给大豆生产带来的直接经济损失高达几十亿美元, 成为大豆生产上最严重的病害<sup>[2]</sup>。该病菌

于 20 世纪 80 年代后期首次在我国东北地区发现, 随后该病在我国北方的大豆主产区逐步扩展, 目前已成为黑龙江省大豆生产上的首要病害, 一般情况下可导致大豆减产 10% ~ 30%, 严重发生时减产达 50% 以上<sup>[1]</sup>。

近年来随着大豆种植面积的增加, 大豆疫病的发生呈逐年增加的趋势<sup>[3-5]</sup>。目前, 大豆疫病的防治除实行检疫外主要采用化学药剂, 其中使用最多的

收稿日期: 2012-05-18

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (3-20) 资助。

作者简介: 杨光红, 女, 硕士研究生。E-mail: yangguanghong407@163.com

\* 通讯作者: 高智谋, 男, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: gaozhimou@126.com

是甲霜灵 (Metalaxyl)<sup>[4-5]</sup>。但由于甲霜灵对病菌的作用位点单一,病原菌容易对其产生抗性突变,致使药剂防治效果降低甚至失败<sup>[6]</sup>。随着杀菌剂抗性问题的出现以及人类对环境保护和食品安全的日益关注,生物防治因其具有环境友好,对人和非靶标生物安全的特点,在植物卵菌病害防治方面已显示出独特优势<sup>[7-9]</sup>。

关于生防制剂对大豆疫病的防治作用已有少量研究<sup>[7,10]</sup>,但业已报道的生防制剂或成本太高,或贮运温度要求苛刻,或防效不佳,均不便推广应用<sup>[7]</sup>。为了寻求理想的大豆疫病生防菌株,作者从安徽大豆疫病病田土壤中分离、鉴定获得了一批菌株,并进一步研究了其中4个拮抗菌株对大豆疫病菌的拮抗作用及其机制,以期为开发大豆疫病的生防制剂提供必要的试验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

拮抗菌株 BH-1、BY-1、BZ-2、BY-2 系从安徽怀远发生大豆疫病的大豆田大豆根围土样中分离筛选获得;大豆疫病菌 (*Phytophthora sojae*) AH19、SD191、HN24 系本实验室分别从安徽、山东、河南的大豆田土样中分离得到。

### 1.2 供试培养基

NA 培养基:牛肉浸膏 3 g,蛋白胨 5 g,葡萄糖 10 g,琼脂粉 15 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0; LBA 培养基:利马豆 60 g,琼脂粉 15 g,蒸馏水 1 000 mL; LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,氯化钠 10 g,蒸馏水 1 000 mL,调节 pH 为 7.0~7.7; V8 培养基按郑小波<sup>[11]</sup>的方法配制。以上培养基不加琼脂即为相应的液体培养基。

### 1.3 生防菌株对大豆疫霉的平板拮抗作用测定

采用平板对峙法。在 LBA 平板中央划线接种拮抗菌株 BY-2,在距离直线两侧 2 cm 处分别接种直径为 0.6 cm 的大豆疫病菌菌碟,并以单独接种病原菌的处理为对照。每个处理重复 3 次,25℃ 黑暗培养,接种 2 d 后开始测定菌落直径,连续测量 4 d。抑菌率 (%) = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 6 mm) × 100。

### 1.4 BY-2 代谢液对大豆疫霉的抑菌作用测定

将拮抗菌株在 NA 培养基上活化培养 24 h 后,取 1 环菌苔接种于 100 mL NB 培养液中,28℃、160 r·min<sup>-1</sup> 摇床上分别振荡培养 48 h、72 h、96 h 和 120 h;培养液经 4℃、5 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,上清液用 0.22 μm 的细菌过滤器过滤得到代谢液。取 1

mL 代谢液与 19 mL 利马豆培养基混匀制成平板,在其中接种直径为 6 mm 的疫霉菌饼,以用无菌水作对照,重复 3 次,于 25℃ 黑暗培养 3 d 后,测量拮抗菌株对疫霉菌的拮抗直径,按 1.3 计算抑菌率。

### 1.5 BY-2 代谢液对大豆疫霉游动孢子萌发的抑制

供试大豆疫霉菌株在 LBA 平板上生长 5 d 后,按郑小波<sup>[11]</sup>的方法诱发产生孢子囊得到游动孢子悬浮液。取 15 mL 游动孢子悬浮液(浓度为 2.13 × 10<sup>4</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>) 分别与 10 mL 拮抗细菌 BY-2 代谢液在培养皿内混匀,用等体积的 NB 培养液代替 BY-2 代谢液为对照,于 25℃ 黑暗培养;处理后 8 h、12 h、16 h 和 24 h 分别镜检孢子萌发情况,以芽管长度超过孢子直径 1/2 作为萌发标准,每处理 5 个视野,每个视野观测 20~30 个游动孢子,计算孢子萌发抑制率。

孢子萌发抑制率 (%) = (对照孢子萌发率 - 处理孢子萌发率) / 对照孢子萌发率 × 100

### 1.6 BY-2 挥发性产物对大豆疫霉的抑菌活性测定

在一培养皿中倒入 15 mL LBA 培养基,待其冷却后在平板中央接种直径 6 mm 的疫霉菌碟,另一培养皿中倒入 15 mL NA 培养基,冷却后划线接种 BY-2,将两培养皿对扣用封口膜密封;以 NA 培养基上不划线接种 BY-2 为对照,5 次重复,置 25℃ 培养箱内黑暗培养,3 d、5 d、7 d 后分别测定菌落生长直径,计算抑菌率。

抑菌率 % = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 6 mm) × 100。

### 1.7 生防菌株活菌液对大豆疫病的离体防效测定

选择生长整齐的大豆植株,采集大小一致的健康叶片,自来水冲洗干净,70% 的酒精表面消毒 30 s,无菌水冲洗 2 min,晾干。将拮抗菌株在 NA 培养基上活化后,接种于 NB 培养液中,28℃ 下 150 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 7~8 h,获得各菌株的活菌液,调节浓度至 10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>。将大豆叶片在菌液中浸泡 1 min,取出自然晾干,接种直径为 6 mm 的大豆疫霉菌饼。以无菌水为对照,每个处理重复 5 次。接种完毕,置于 25℃、相对湿度 90% 的光照培养箱内黑暗培养,48 h 后测量病斑直径,计算防治效果。

防治效果 (%) = [(对照病斑直径 - 处理病斑直径) / 对照病斑直径] × 100。

### 1.8 生防菌对大豆疫病的盆栽防效试验

大豆疫霉菌株在 LBA 上培养 5 d 后,取菌碟于 V8 培养液中培养,按郑小波<sup>[11]</sup>的方法诱发生孢子囊,得到游动孢子悬浮液;取 30 mL 游动孢子悬

浮液(浓度为  $2 \times 10^4$  cfu·mL<sup>-1</sup>) 分别与 15 mL 拮抗菌液(浓度为  $10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>) 混合,加水稀释至 150 mL,将 4~6 片叶的大豆幼苗(品种为合丰 35)从育苗盆中轻轻拨出,放入菌液中浸根处理 2 h,然后将幼苗移栽于育苗盆中;对照用无菌水代替拮抗菌液,试验共设 3 个处理,分别为:BY-2 菌液提前 3 d 浸根后接疫霉游动孢子悬浮液;BY-2 菌液、疫霉游动孢子悬浮液同时接种;对照为疫霉游动孢子悬浮液单独接种;每盆 6 株苗,每个处理 3 次重复,置温室内管理。病情调查在接种后 10 d 进行,病情分级参照文献<sup>[12]</sup>,分别计算各处理发病率、病情指数和防效。

### 1.9 生防菌液对大豆幼苗的促生作用的测定

供试大豆品种为合丰 35,采用营养钵种植方式,每盆装 250 g 灭菌土,每盆播种 8~10 粒种子,

常规管理,定苗 6 棵。待幼苗长至 4~6 片叶时,每株用 15 mL BY-2 活菌液(菌液浓度为  $1 \times 10^8$  cfu·mL<sup>-1</sup>)灌根,以清水处理作对照,4 次重复。接种 20 d 后调查大豆的生长状况,测定豆苗根长、茎长、鲜重、干重,计算生物量增加率。生物量增加率(%)=(处理组鲜重-对照组鲜重)/对照组鲜重  $\times 100\%$

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌株对大豆疫霉的平板抑制作用

平板对峙试验结果(表 1 和图 1)表明,供试拮抗菌株对大豆疫霉均有很好的抑制作用,在对峙培养第 5 天,生防菌株 BH-1、BY-1、BZ-2、BY-2 对大豆疫霉的抑制率分别为 47.06%、48.75%、63.97% 和 79.00%;其中以 BY-2 的抑制作用最强。

表 1 4 个生防细菌菌株对大豆疫霉的平板抑制作用

Table 1 Inhibitory activity of four antagonistic bacterial strains against *Phytophthora sojae* in vitro

生防菌株 Biocontrol strains	不同处理时间的抑制率/% Inhibitory rate at different time after treatment			
	3 d	4 d	5 d	6 d
BH-1	28.15 <sup>d</sup>	35.13 <sup>d</sup>	47.06 <sup>d</sup>	42.39 <sup>d</sup>
BY-1	34.81 <sup>c</sup>	41.12 <sup>c</sup>	48.75 <sup>c</sup>	51.32 <sup>c</sup>
BZ-2	43.40 <sup>b</sup>	51.25 <sup>b</sup>	63.97 <sup>b</sup>	68.50 <sup>b</sup>
BY-2	56.85 <sup>a</sup>	75.00 <sup>a</sup>	79.00 <sup>a</sup>	76.65 <sup>a</sup>

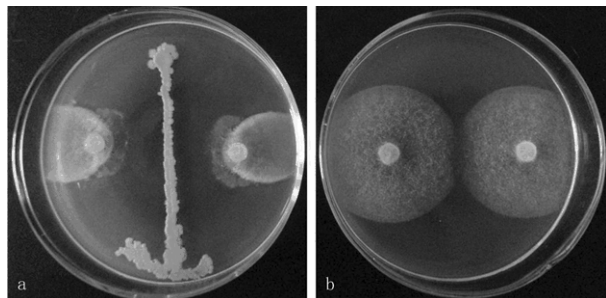
注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下同。

Note: Data followed by different small letters within a column are significantly different at the 0.05 level. The same below.

表 2 菌株 BY-2 代谢液对大豆疫霉菌丝生长的抑制效果

Table 2 Inhibitory activity of metabolic liquid of strain BY-2 against mycelium growth of *Phytophthora sojae*

供试菌株 Strains	不同发酵时间 BY-2 代谢液的抑制率/% Inhibitory rates of metabolic liquid of strain BY-2 at different time			
	48 h	72 h	96 h	120 h
AH19	30.56 <sup>a</sup>	40.93 <sup>a</sup>	5.20 <sup>b</sup>	3.95 <sup>b</sup>
SD191	16.12 <sup>c</sup>	23.90 <sup>b</sup>	11.70 <sup>b</sup>	8.56 <sup>b</sup>
HN24	24.50 <sup>b</sup>	30.69 <sup>b</sup>	28.74 <sup>a</sup>	19.87 <sup>a</sup>



a: 拮抗菌抑制生长的菌落 Colony inhibited by antagonistic bacteria; b: 正常菌落 Normal colony

图 1 BY-2 对疫霉菌丝生长的抑制作用

Figure 1 Inhibitory effect of BY-2 on the mycelia growth of *Phytophthora sojae*

### 2.2 BY-2 代谢液对大豆疫霉菌丝生长的抑制作用

结果表明, BY-2 不同发酵时间的代谢液对供试病原菌的菌丝生长均有一定的抑制效果,以 72 h 代谢液对供试病原菌的菌丝生长抑制效果最好; BY-2 72 h 代谢液对供试病原菌 AH191 的抑制效果显著高于其他各菌株,抑制效果达到 40.93%(表 2);显微镜下观察可以看到代谢液处理的病原菌菌丝发生断裂、溶解或畸形,对照菌丝生长正常。

### 2.3 BY-2 代谢液对大豆疫霉游动孢子萌发的抑制作用

试验结果表明, BY-2 72 h 代谢液无菌滤液能显著抑制游动孢子的萌发,培养滤液处理 8 h、12 h、

16 h、24 h 的孢子萌发抑制率分别为 53.09%，39.89%，53.14%和 57.71% (表 3)。

#### 2.4 BY-2 挥发性产物对大豆疫霉的抑菌活性

结果表明，BY-2 挥发物处理对供试病原菌的菌丝生长均有显著的抑制作用，不同菌株和不同时间

的抑制率有显著差异，其中对菌株 AH191 第 7 天时的抑制率最高，为 91.94%，显著高于其他各菌株(表 4)。显微观察发现，经挥发物处理的菌丝均发生不同程度的畸形、膨大，菌丝内部原生质明显褐化、聚集成块；对照菌丝正常生长。

表 3 BY-2 代谢液对大豆疫霉游动孢子萌发的抑制作用

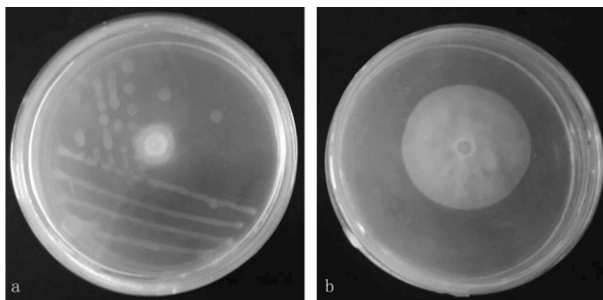
Table 3 Inhibition of BY-2 metabolic liquid against the germination of the zoospores of *Phytophthora sojae*

培养时间/h Incubation time	处理 Treatment			对照 Control			萌发抑制率/% Inhibitory rate
	萌发数 Germination number	镜检总数 Tested total	萌发率/% Germination rate	萌发数 Germination number	镜检总数 Tested total	萌发率/% Germination rate	
8	41	107	38.32	107	131	81.68	53.09
12	60	122	49.18	117	143	81.82	39.89
16	51	132	38.64	127	154	82.46	53.14
24	46	138	33.33	119	151	78.81	57.71

表 4 BY-2 挥发物对大豆疫霉菌丝生长的抑制作用

Table 4 Inhibitory activity of volatiles from BY-2 against *Phytophthora sojae* in vitro

病原菌株 Strain	不同处理时间的抑菌率/% Inhibitory rates at different time after treatment		
	3 d	5 d	7 d
SD191	73.08 <sup>ab</sup>	80.69 <sup>ab</sup>	81.70 <sup>b</sup>
HN24	55.84 <sup>b</sup>	76.71 <sup>b</sup>	84.64 <sup>ab</sup>
AH19	81.18 <sup>a</sup>	85.43 <sup>a</sup>	91.94 <sup>a</sup>



a: BY-2 挥发物处理 Treated with volatiles from BY-2; b:对照 Control

图 2 BY-2 挥发物对大豆疫霉菌丝生长的平板抑制效果

Figure 2 Inhibitory activity of volatiles from BY-2 against *Phytophthora sojae* in vitro

#### 2.5 生防菌活菌液对大豆疫病的离体防效

测定结果表明，离体大豆叶片经不同生防菌株活菌液浸叶处理后，接种大豆疫霉所致的病斑直径显著小于对照，不同生防菌株活菌液浸叶处理病斑直径间差异显著，生防菌活菌液浸叶处理离体防治效果在 32.89%~63.38%；其中以 BY-2 活菌液浸叶处理的防治效果最高 (表 5)。

#### 2.6 生防菌活菌液对大豆疫病的盆栽防效

盆栽试验结果 (表 6) 表明，生防菌活菌液浸根处理对大豆疫病有较好的防治效果，但不同处理间防病效果存在显著差异；接种 10 d 后调查，BY-2 活菌液提前 3 d 浸根的防效显著高于 BY-2 菌液和疫霉游动孢子悬浮液同时接种处理，防效为 75.01%。

表 5 生防菌 BY-2 菌悬液对大豆疫病的离体防效

Table 5 Control efficacy of BY-2 bacterial suspension against *Phytophthora sojae* on detached leaves

处理 Treatment	病斑直径/mm Disease diameter	防治效果/% Control efficacy
BY-2	8.35 <sup>a</sup>	63.38 <sup>a</sup>
BH-1	12.10 <sup>b</sup>	46.93 <sup>b</sup>
BZ-2	12.30 <sup>b</sup>	46.05 <sup>b</sup>
BY-1	15.30 <sup>bc</sup>	32.89 <sup>b</sup>
CK	22.80 <sup>c</sup>	—

表 6 生防菌 BY-2 对大豆疫病的盆栽防效

Table 6 Control effects of BY-2 strain on soybean *Phytophthora* blight in pot experiments

生防菌株 Biocontrol strain	发病率/% Disease incidence	病情指数 Disease index	防效/% Control efficiency
BY-2*	44.44	12.22 <sup>e</sup>	75.01
BY-2	55.56	37.79 <sup>d</sup>	22.45
CK	83.33	48.89 <sup>b</sup>	—

注: \*表示提前 3 d 接种 BY-2。Note: \* inoculation with BY-2 3 days in advance.

表 7 BY-2 灌根接种对大豆幼苗的促生作用

Table 7 Promoting effects of BY-2 strain on the growth of soybean seedlings

处理 Treatment	根长/cm Roots length	增长率/% Increased rate	鲜重/g Fresh weight	增长率/% Increased rate	干重/g Dry weight	增长率/% Increased rate	茎长/cm Stem length	增长率/% Increased rate
CK	10.27 <sup>b</sup>	—	1.9 <sup>b</sup>	—	0.46 <sup>b</sup>	—	24.60 <sup>b</sup>	—
BY-2	16.08 <sup>a</sup>	56.57	3.1 <sup>a</sup>	85.87	0.66 <sup>a</sup>	43.48	26.31 <sup>a</sup>	6.95

## 2.7 生防菌 BY-2 灌根对大豆幼苗的促生作用

结果(表 7)表明, BY-2 菌液处理可显著地促进大豆幼苗的生长; 处理的鲜重、干重都显著地高于对照, 分别增加了 85.87%和 43.48%; 根长和茎长也都显著高于对照, 分别比对照增加 56.57%和 6.95%, 由此可见生防菌液灌根能显著增加植株的干重、鲜重、根长和茎长, 有显著的促进植株生长作用。

## 3 小结与讨论

本研究从大豆根围土壤中分离得到多株细菌, 进一步筛选得到 4 株大豆疫病生防细菌, 通过平板对峙实验, 离体叶片法复筛选出 1 株对大豆疫霉病原菌有很好的拮抗作用的生防菌株 BY-2, 其平板抑菌效果达到 79.00%, 离体叶片防效也高达 63.38%。BY-2 菌株能产生挥发性的物质, 显著抑制病原菌的菌丝生长, 抑制率高达 81.70%~91.94%; BY-2 的代谢液对大豆疫霉游动孢子的萌发有很强的抑制效果; BY-2 菌液浸根处理对大豆疫病有较好的防治效果, 提前 3 d 浸根的防治效果最好, 处理后 10 d 的防治效果为 75.01%, 同时对大豆植株的生长有较好的促生效果。通过对生防菌株 BY-2 生理生化反应测定、菌体形态电镜观察及分子鉴定, 现已明确该菌为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (另文报道)。关于生防菌株 BY-2 的拮抗机理, 从本试验结果看, 主要涉及抗生作用和竞争作用。但有关抗生作用活性物质的分离提纯和鉴定, 尚需进一步研究。

## 参考文献:

- [1] 沈崇尧, 苏颜纯. 中国大豆疫霉根腐病的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 298.
- [2] Wrather J A, Stienstraw C, Koennings R. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1998[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2001, 3: 122-131.
- [3] 刘方平, 高智谋, 汪小福. 安徽省大豆疫霉病原菌鉴定及生物学特性研究[J]. 广西农业生物科学, 2006, 25(1): 48-51.
- [4] 代瑞平, 刘海. 大豆疫霉根腐病研究进展[J]. 大豆科技, 2011(1): 20-23, 26.
- [5] 金娜, 杨成武, 马淑梅. 大豆疫霉病菌对四种杀菌剂的敏感性测定[J]. 大豆科学, 2010, 29(5): 826-829.
- [6] Gisi U and Sierotzki H. Fungicide modes of action and resistance in downy mildews [J]. Eur J Plant Pathol, 2008, 122(1): 157-167.
- [7] 申宏波, 姚文秋, 于永梅. 不同类型生物农药对大豆疫霉根腐病的防治效果[J]. 大豆科学, 2011, 30(6): 54-57.
- [8] 梅新兰, 赵青云, 谭石勇, 等. 辣椒疫病拮抗菌株筛选、鉴定及其防效[J]. 应用生态学报, 2010, 21(10): 2652-2658.
- [9] 马艳, 常志州, 赵江涛, 等. 一株疫病拮抗青霉 P.st10 菌株的抗菌活性及其对辣椒疫病的盆栽防效[J]. 中国生物防治, 2006, 22(3): 239-243.
- [10] 付红梅, 李淼, 檀根甲, 等. 大豆疫霉拮抗菌株的筛选与鉴定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(19): 11482-11484; 11495.
- [11] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- [12] 陈申宽, 闫任沛, 王秋荣, 等. 大豆疫病分级标准与危害性研究[J]. 大豆通报, 2002(5): 7.