



杨帆,李新民,刘春来,等.四株生防菌对大豆根腐尖镰孢菌及根腐病的作用效果[J].黑龙江农业科学,2021(3):41-45.

四株生防菌对大豆根腐尖镰孢菌及根腐病的作用效果

杨帆^{1,2},李新民^{1,2},刘春来²,王爽²,刘亮^{1,2},蒋希峰²,刘宇²,徐充²

(1.黑龙江省农业科学院 博士后科研工作站,黑龙江 哈尔滨 150086;2.黑龙江省农业科学院 植物保护研究所/农业部哈尔滨作物有害生物科学观测实验站,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为筛选评价优良生防菌,本试验选取4株生防菌,通过平板扩散法对大豆根腐病优势致病菌尖孢镰刀菌进行平板抑菌试验测定及盆栽防效初探。结果表明:枯草芽孢杆菌 HMGR-8 和解淀粉芽孢杆菌 NH2 对靶标菌表现出较好的抑制作用,抑制率分别是 46.52% 和 65.95%,木霉菌 4-R-8 以竞争方式对靶标菌产生强抑制作用。木霉菌 MM2 除了以重寄生方式抑制靶标菌外,其代谢产物对靶标菌菌丝生长起到了一定抑制作用。盆栽试验中,4 株生防菌均有不同程度的促生作用,且经木霉菌 MM2 菌悬液和枯草芽孢杆菌 HMGR-8 发酵液单一菌剂处理以及两者混合处理的植株病情指数为 25.33%、25.60% 和 24.17%,与化学药剂多菌灵处理组病情指数 17% 差异不显著,与只接病原菌处理组病情指数 53.33% 差异显著。筛选出的木霉菌 MM2 和枯草芽孢杆菌 HMGR-8 可有效降低大豆根腐病的危害程度。

关键词:生防菌;大豆根腐病;抑菌作用;盆栽防效

大豆根腐病是一种分布广、危害严重的世界性大豆土传病害^[1],我国大豆各产区均有发生,一般可导致大豆减产 10%~60%,严重时可使大豆绝产^[2]。引起大豆根腐病的病原菌种类较多,其中以镰孢菌(*Fusarium* spp.)为主要病原菌的大豆根腐病在世界各地均有相关报道^[3-4]。在我国大豆主产区的东北,尽管大豆根腐镰孢菌的种类三省间存在差异,但尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)仍是该地区的强致病种^[5]。目前,大豆根腐病的防治普遍采用是化学药剂种子包衣处理。随着农业生产的可持续发展,微生物农药在农业生产上的应用不断扩大。在防控农作物土传病害、促进植物生长等方面,利用根际促生真菌、细菌的研究取得了显著成果,其中以具有代表性的木霉菌属的生防真菌和芽孢杆菌属的拮抗细菌等表现出很好的发展前景^[6-9]。

本研究选用课题组从作物根际土壤、野生药

用植物中分离、筛选获得的对植物病原菌具有一定拮抗作用的4种生防菌株,开展生防菌对优势致病菌尖孢镰刀菌抑制作用及对大豆根腐病盆栽防治效果初步评价,旨在为大豆根腐病生物防治与应用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种:绥农 53。

大豆根腐尖孢镰孢菌:M3-3XU 菌株由黑龙江省农业科学院植物保护研究所生物防治研究室分离自大豆根腐病样,并鉴定和保存。

生防菌株:木霉菌 4-R-8、MM2,芽孢杆菌 NH2、HMGR-8 由黑龙江省农业科学院植物保护研究所生物防治研究室保存。

多菌灵:80%可湿性粉剂。

1.2 方法

1.2.1 大豆根腐病原接种体制备 将保存至斜面的尖镰孢 M33 菌株活化转接到 PDA 培养基,培养 7 d,备用。

将高粱粒沸水煮 30 min,取 200 g 放入罐头瓶中,高压灭菌 120 min。每瓶接入活化后直径 7 mm 的病原菌 5 块,25±1℃ 培养 10 d,备用。

1.2.2 生防菌制备 木霉菌接种到 PDA 培养基中,于 25±1℃ 培养 7 d;芽孢杆菌接种到 LB

收稿日期:2020-11-10

基金项目:国家重点研发计划(2017YFD0201108-04);黑龙江省现代农业大豆产业技术协同创新体系-大豆病害防控岗位课题;黑龙江省农业科学院科研项目计划(2019YYYY037);黑龙江省农业科学院农业科技创新跨越工程-经济作物科技创新专项(HNK2019CX06-01-03)。

第一作者:杨帆(1982-),女,博士,副研究员,从事作物病虫害生物防治研究。E-mail:yf_echo2011@163.com。

通信作者:李新民(1963-),男,硕士,研究员,从事微生物源农药研究。E-mail:xinmin63@163.com。

培养基中,于 28±1 ℃、180 r·min⁻¹振荡培养 3 d,备用。

1.2.3 盆栽土壤处理 盆栽用土采自黑龙江省哈尔滨市道外区民主乡国家现代农业科技示范展示基地,经间歇式灭菌后备用。各生防菌分别在培养完成时按照体积与质量比 1:1,用等质量无菌草炭分别吸附各生防菌菌悬液,室温风干后制成真菌、细菌单一生防菌剂和真菌、细菌复合生防菌菌剂(复合比为 1:1)。2 株木霉菌分生孢子终浓度为 10⁸个孢子·g⁻¹干土,2 株芽孢杆菌终浓度为 10⁷CFU·g⁻¹干土,待用。

1.2.4 生防菌拮抗作用测定 采用平板扩散培养法^[10],略加改动。在 PDA 培养基平皿中央接种植物病原菌菌碟,在菌碟周围按等边三角形距培养皿边缘 1 cm 处等距离打孔($\varphi=7$ mm),每孔分别接入生防菌菌悬液和生防细菌发酵液 20 μ L,每处理重复 3 次。生防真菌和生防细菌分别以每孔接入无菌水和无菌 LB 培养液为对照。

表 1 生物菌剂土壤处理及施用量

编号	土壤处理	每千克土壤中施用量	
		生物菌剂/mL	病原菌接种体/g
1	木霉菌 MM2 菌悬液 T1+根腐病原菌	20	40
2	木霉菌 4-R-8 菌悬液 T2+根腐病原菌	20	40
3	解淀粉芽孢杆菌 NH2 发酵液 C1+根腐病原菌	20	40
4	枯草芽孢杆菌 HMGR-8 发酵液 C2+根腐病原菌	20	40
5	复合菌 T1 C1+根腐病原菌	10+10	40
6	复合菌 T1 C2+根腐病原菌	10+10	40
7	复合菌 T2 C1+根腐病原菌	10+10	40
8	复合菌 T2 C2+根腐病原菌	10+10	40
9	根腐病原菌对照	-	40
10	空白对照	-	-
11	多菌灵+根腐病原菌 对照	500 倍液 100 mL·盆 ⁻¹	-

1.2.6 统计分析 采用 SPSS 22.0 数据处理系统进行方差分析和 Duncan 氏多重比较。

2 结果与分析

2.1 生防菌对病原菌的抑菌作用

枯草芽孢杆菌 HMGR-8 和解淀粉芽孢杆菌 NH2 对靶标菌表现出较好的抑制作用,有明显的抑菌圈,抑制率分别是 46.52%和 65.95%。2 株木霉菌在扩散培养 2 d 后,因生长速度较快,对靶

置 25±1 ℃ 培养箱黑暗培养,待对照菌落长满培养皿,测量病原菌菌落半径,计算菌丝生长抑制率。

抑制率(%)=(对照菌落半径-对峙培养菌半径)/对照菌落半径×100

1.2.5 盆栽试验处理 生防菌剂、病原菌接种体分别按盆栽土壤重量的 2%、4%与无菌土壤混匀装盆,加水保持含水量 40%~60%。大豆种子经表面消毒后播种,每盆播 9 粒,出苗后,间苗保留每盆 5 株。试验设接种病原菌和空白对照,另选 500 倍液多菌灵每盆灌 100 mL 做处理,每处理 3 次重复。待 25 d 左右,三出复叶期,调查病情指数及植株的根、茎鲜重,调查结束后将样本放 80 ℃烘箱烘干后称量根、茎干重。大豆根腐病的分级标准参照王春玲等^[11]的方法。

病情指数=100× \sum (各级病根数×相对级数值)/(调查总根数×最高级数)

标菌产生强抑制作用(图 1)。

2.2 生防菌对大豆的促生防病效果

由表 2 可知,解淀粉芽孢杆菌 NH2 发酵液单一菌剂处理 3 植株的地上部干重与其他处理组差异显著。解淀粉芽孢杆菌 NH2 发酵液和木霉菌 4-R-8 菌悬液混合处理 7 植株的地上部干重高于其他混合菌剂处理,比只接病原菌处理 9 的地上部干重提高了 42.96%。木霉菌 MM2 菌悬液

处理 1 和枯草芽孢杆菌 HMGR-8 发酵液处理 4 的植株病情指数为 25.33%和 25.60%,与多菌灵处理 11 差异不显著,与只接病原菌处理 9 的病情指数(53.33%)差异显著。同时,只接病原菌的处

理 9 病情指数与除处理 10 外的其他处理存在显著差异。生物菌剂处理中,木霉菌 MM2 菌悬液处理 1 对大豆根腐病的防效最高为 50.80%。



图 1 生防菌对番茄灰霉病菌菌丝抑制作用

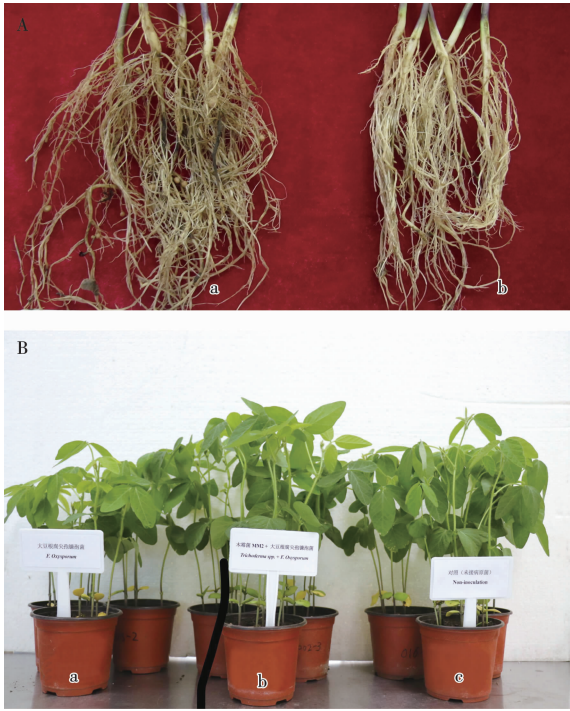
表 2 生防菌对大豆的防病促生效果

处理	地上部干重/g	地下部干重/g	病情指数/%	防治效果/%
1	1.83±0.58 bcd	0.70±0.28 abc	25.33±10.01 ef	50.80±14.78 a
2	1.57±0.45 bcd	0.60±0.25 bc	32.00±8.64 cde	41.55±18.18 a
3	2.55±1.37 a	0.99±0.39 ab	34.00±12.59 cde	40.10±13.16 a
4	1.58±0.53 bcd	0.57±0.22 c	25.60±3.58 ef	48.99±16.59 a
5	1.54±0.45 bcd	0.63±0.26 bc	26.00±5.16 def	46.55±23.15 a
6	1.49±0.34 bcd	0.56±0.17 c	24.17±5.00 ef	49.20±21.17 a
7	1.83±0.04 bcd	0.63±0.08 bc	32.75±6.60 cde	40.92±10.90 a
8	1.62±0.25 bcd	0.74±0.04 abc	34.25±7.23 cde	46.50±21.59 a
9	1.28±0.11 e	0.89±0.46 abc	53.33±12.22 a	-
10	2.27±0.22 bc	0.91±0.04 ab	49.33±2.31 ab	-
11	1.77±0.53 bcd	0.78±0.15 abc	17.00±2.65 f	68.13±5.47 a

注: 同列数据不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

通过对幼苗期根部发病情况调查,与对照相比,处理组幼苗根系发达,根腐病发病不明显。表明生物菌剂对盆栽大豆幼苗根腐病有很好的

防治效果。同时,生物菌剂处理的大豆幼苗与对照组相比,植株生长健壮,具有明显的促生作用(图 2)。



A-a:病原菌处理组;A-b:病原菌+拮抗菌株处理组;B-a:病原菌处理组;B-b:病原菌+拮抗菌株处理组;B-c:空白对照处理

图2 生防菌株对大豆幼苗防病促生效果

3 结论与讨论

生物防治一直被认为是对生态环境友好型的防治手段,各国研究者们也在一直挖掘、筛选生防菌剂。而植物内生真菌是一类生长在植物体内、与寄主植物协同进化生长的一类真菌,不仅具有抗菌、抗氧化等活性,还能促进植物生长,成为了筛选新型生防菌的重要微生物资源。木霉属作为生防因子对病原菌的拮抗机制报道中,主要是通过快速生长与植物病原菌产生空间竞争,达到抑制病原菌生长的作用,很少有产生抑菌圈报道。此外,木霉还可通过几丁质酶和葡聚糖酶分解植物病原真菌细胞壁的几丁质,进而穿透病原菌细胞壁,抑制细胞壁再合成,达到抑制病害再发生^[12]。本研究中的木霉菌株MM2产生了明显的抑菌圈,很有可能是菌株MM2产生了具有抗生活性的次生代谢产物。关于木霉菌在温室及田间条件下防治农作物病害的报道有很多,木霉菌能明显降低病害的发生,同时具有促进植株生长的能力^[13-14]。本试验中的两株木霉菌菌悬液对大豆苗期的病情指数分别为25.33%和32.00%,

均与处理9和处理10对照组差异显著。

关于根际细菌芽孢杆菌属防治土传病害的研究,国内外学者进行了大量报道,且对病原菌的作用机理一般被认为是抗生、竞争、生长促进和诱导系统获得抗性^[15]。在利用芽孢杆菌防治大豆根腐病方面,有些学者直接利用生防菌培养液浸种或是作为种衣剂包衣处理,或是将培养液与播种土混合后播种,结果都可促进大豆幼苗生长,对根腐病也都有一定防效^[16-18]。本研究选取的两株芽孢杆菌在平皿试验中,对病原菌生长有明显抑制作用,但是否与其各自代谢产物有关有待进一步试验验证。盆栽试验中,解淀粉芽孢杆菌NH2和枯草芽孢杆菌HMGR-8对大豆苗期防控效果较好。在大豆三出复叶期调查发现,无论是单一还是复合菌剂处理较接种根腐病原菌的对照处理显著提高植株干重,但对根干重影响不显著。木霉菌MM2与枯草芽孢杆菌HMGR-8的复配菌剂处理6对大豆苗期的防效为49.20%,可适当考虑在今后的防治应用上采用两菌剂复配使用。在实际生产中,大豆根腐病是多种病原菌复合感染导致,在一定栽培条件下,生防菌复配使用更能适应作物生长的环境,进而减轻病害的发生程度,促进作物的生长。但是利用复配菌株处理不是简单的累加,而有一定的协同作用,充分发挥不同菌株的生防机制,可以起到防病增产的作用^[19]。

参考文献:

- [1] 李长松,赵玖华,杨崇良,等.我国大豆根腐病研究概况及存在的问题[J].中国油料,1997,19(3):82-84.
- [2] 姚亮亮,王平,于铭,等.3种液体地膜对大豆根腐病及产量的影响[J].农学学报,2016,6(1):33-36.
- [3] María M,Díaz Arias,Leonor F,et al. Aggressiveness of *Fusarium* species and impact of root infection on growth and yield of soybean [J]. Phytopathology, 2013, 103 (8): 822-832.
- [4] Oliveira P R P D M, Dianese A D C, Fragoso R R, et al. Variability of *Fusarium* spp. isolates, causal agents of the soybean sudden death syndrome[J]. Soil and Plant Science, 2014, 64(8):675-682.
- [5] 王晓艳,文景芝.东北三省大豆根腐镰孢菌种类及其致病力分析[J].中国油料作物学报,2011,33(4):391-395.
- [6] Barari H, Foroutan A. Biocontrol of soybean charcoal root rot disease by using *Trichoderma* spp. [J]. Cercetari Agro-nomice in Moldova, 2016, 49(2):41-45.

- [7] Ji M X, Yao K B, Li G P, et al. Control effects of *Bacillus subtilis* DJ-6 and Pyraclostrobin alone and in combination against *Fusarium oxysporum* [J]. Agricultural Science and Technology, 2014, 15(11): 2020-2025.
- [8] Toghuae R M K, Eke P, González Í Z, et al. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of common bean root rot (*Fusarium solani*) [J]. Biological Control, 2016, 96: 8-20.
- [9] 杨可欣, 王欢, 刘雪娇, 等. 生防芽孢杆菌 8-32 对盆栽大豆土壤酶系和微生物区系的影响 [J]. 大豆科学, 2018, 37(5): 762-768.
- [10] 杨帆, 李新民, 刘春来, 等. 解淀粉芽孢杆菌抑菌活性初步研究 [J]. 黑龙江农业科学, 2015(9): 55-59.
- [11] 王春玲, 耿肖兵, 黄铭慧, 等. 一种引起大豆根腐病的尖镰孢致病性苗期鉴定方法 [J]. 吉林农业科学, 2014, 39(5): 69-72.
- [12] Tijerino A, Cardoza R E, Moraga J, et al. Overexpression of the trichodiene synthase gene *tri5* increases trichodermin production and antimicrobial activity in *Trichoderma brevicompactum* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2011, 48: 285-296.
- [13] 朱萍萍, 凌健, 席亚东, 等. 蔬菜土传病害生防木霉菌株资源的筛选及其防治效果评价 [J]. 中国蔬菜, 2015(8): 28-33.
- [14] 李松鹏, 崔琳琳, 程家森, 等. 两株哈茨木霉菌株防治水稻纹枯病及促进水稻生长的潜力研究 [J]. 植物病理学报, 2018, 48(1): 98-107.
- [15] Cao Y, Zhang Z H, Ling N, et al. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots [J]. Biology & Fertility of Soils, 2011, 47: 495-506.
- [16] 张红骥, Xue A G, Zhang J X, 等. 尖镰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.
- [17] 朱文静, 伍辉军, 高学文. 芽孢杆菌对大豆根腐病防治效果研究 [J]. 大豆科学, 2011, 30(4): 621-625.
- [18] 高同国, 李术娜, 张冬冬, 等. 大豆根腐病生防细菌优势菌株的筛选、鉴定及生防效果验证 [J]. 大豆科学, 2015, 34(4): 661-665.
- [19] 许艳丽, 张红骥, 张匀华, 等. 复配生防菌株防治大豆根腐病的研究 [J]. 大豆科学, 2008, 27(2): 270-275.

Evaluation of Four Antagonistic Biocontrol Agents Against Soybean Root Rot Caused by *Fusarium oxysporum*

YANG Fan^{1,2}, LI Xin-min^{1,2}, LIU Chun-lai², WANG Shuang², LIU Liang^{1,2}, JIANG Xi-feng², LIU Yu², XU Chong²

(1. Postdoctoral Programme, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 2. Plant Protection Institute, Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pest in Harbin, Ministry of Agriculture, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: In order to screen and evaluate the excellent biocontrol bacteria, four strains of biocontrol bacteria were selected in this experiment. The plate diffusion method was used to determine the plate bacteriostasis test of the dominant pathogen *Fusarium oxysporum* of soybean root rot and the preliminary study on the control effect of pot culture. The results showed that *Bacillus subtilis* HMGR-8 and *Bacillus amyloliquefaciens* NH2 showed good inhibitory effect on the target bacteria, the inhibition rates were 46.52% and 65.95%, respectively, and *Trichoderma* 4-R-8 had strong inhibitory effect on target bacteria in a competitive way. The metabolites of *Trichoderma* MM2 inhibited the mycelial growth of target bacteria in addition to parasitism. In the pot experiment, the four biocontrol bacteria had different growth promoting effects. The disease indexes of the plants treated with *Trichoderma* MM2 suspension and *Bacillus subtilis* HMGR-8 fermentation broth separately and their mixture treatment were 25.33%, 25.60% and 24.17%, respectively, which was not significantly different from that of carbendazim treatment of 17% and was significantly different from that of pathogen treatment of 53.33%. The result suggests that antagonistic strains MM2 and HMGR-8 can reduce root rot severity significantly.

Keywords: biocontrol agents; soybean root rot; inhibition activity; control effect