

# 连作大豆土壤病原菌的分离 及其致病性的研究

陈宗泽 殷勤燕 戴秉丽 王旭明 邹永久 杨振明

(中国人民解放军农牧大学农学农机系, 长春 130062)

**提 要** 在微生物 3 大类群中, 细菌总数在整个大豆生育期内占绝对优势, 重茬低于正茬, 花期、结荚期尤为明显; 放线菌数量总体变幅不大, 花期、成熟期重茬高于正茬, 而苗期则相反; 真菌数量变化很大, 重茬高于正茬, 花期最为显著。在连作大豆根际土壤中, 有益真菌减少, 有害真菌增加。将真菌优势菌群中的尖镰孢菌、半裸镰孢菌和粉红粘帚菌回接大豆, 均产生不同程度的致病性, 导致大豆根腐病的发生, 花期前后(38~50 d)病症明显。3 菌株毒素粗提物对大豆毒害性试验结果表明: 大豆发芽率显著降低, 植株生长受阻。

**关键词** 大豆连作; 重茬; 根腐病; 优势菌群; 真菌

近年来, 地方及部队农场大豆种植面积不断扩大, 重茬比例不断上升。大豆最忌连作, 连作减产可达 30%~50%, 甚至高达 70% 左右, 减产程度与连作年限之间呈正相关<sup>[1~3]</sup>。许多学者曾对大豆连作减产障碍机理进行不同程度的探讨<sup>[3~6]</sup>, 但至今为止, 除连作能加重病虫害和孢囊线虫病危害获得一定共识外, 其它方面尚无统一认识。据有关资料报道, 出现连作障碍原因不仅和土壤有害生物有关, 还与土壤微生物的关系密切, 土壤微生物是连作障碍的主因<sup>[7]</sup>。连作障碍主要来自土壤微生物分泌的毒素或直接的机械损伤, 土壤中病原性根际微生物分泌产生的生物毒素直接影响着根系的生长发育、形态和生理过程<sup>[8, 9]</sup>。但关于连作大豆根际微生物分泌毒素的种类、作用机制等, 目前研究的还不多。鉴于此, 本试验在连作大豆根际土壤中筛选引起连作障碍的优势菌群, 回接于正常大豆, 检查其致病性及毒害作用, 以图搞清连作大豆土壤中病原菌的种类及其危害程度, 为解决大豆连作减产提供理论依据。作者从 1991 年开始, 对连作大豆土壤中病原菌的分离及其致病性进行了研究, 现将部分研究结果报道如下:

## 1 材料和方法

### 1.1 试验处理

盆栽试验: 供试土壤为草甸黑土, 采自解放军农牧大学农科站实验田。设正茬、重茬 2 个处理, 3 次重复。每盆栽土 12.5 kg, 每钵定植大豆(长农 5 号)5 株, 分别于播前、苗期、花期、结荚期和成熟期采集根区土壤, 供测试用。

田间小区试验: 试验地在解放军农牧大学农科站, 土壤类型、试验处理同上。小区面积 25 m<sup>2</sup>, 随机区组排列, 3 次重复, 采样时期同上。

### 1.2 土壤样品菌悬液的制备

按常规法进行。菌的分离采用稀释平板法。所用培养基为细菌—牛肉膏蛋白胨培养基、放线菌—高氏1号琼脂培养基和真菌—PDA琼脂培养基。换算成每克干土的菌数。

### 1.3 优势菌群鉴定

进行强化分离、纯化的优势菌群——真菌,经校内初步鉴定送中科院微生物所进行菌属、菌株的认定。

### 1.4 致病性检查

经鉴定的菌株,分别标为29号、30号和43号,回接大豆采用盆栽对比进行试验。接种土壤经过高压灭菌处理,用煮熟的麦粒培养基分别接种这3个菌株(25℃培养7~10 d),接种量为土壤重量的3%。设8个处理,即29号、30号、43号、29+30号、29+43号、30+43号、29+30+43号及对照,3次重复。供试品种为长农5号,播前种子用0.1%升汞表面消毒,充分水洗。播后每盆定植5~10株,按常规进行管理,于20、26、32、38、40和50 d检查结果。分级标准如下:

- 0级:无症状,生长正常;
- 1级:侧、主根褐黑变;
- 2级:主根褐黑,二分之一腐烂;
- 3级:主根褐黑,全部腐烂。

## 2 结果和讨论

### 2.1 微生物区系动态变化及优势菌群的检测

对大豆播前、苗期、花期、结荚期及成熟期5个生育期的正茬、重茬土壤中微生物区系动态及优势菌群的检测结果见表1。

表1 大豆连作对根际微生物的影响

| 生育期 | (个/g·干土) |      |        |       |         |      |
|-----|----------|------|--------|-------|---------|------|
|     | 真菌×104   |      | 细菌×105 |       | 放线菌×105 |      |
|     | 正茬       | 重茬   | 正茬     | 重茬    | 正茬      | 重茬   |
| 播前  | 7.1      | 6.1  | 86.9   | 72.9  | 31.9    | 32.5 |
| 苗期  | 6.3      | 4.4  | 147.8  | 155.9 | 42.6    | 23.9 |
| 花期  | 7.8      | 14.3 | 195.2  | 112.5 | 35.1    | 54.7 |
| 结荚期 | 13.3     | 17.0 | 252.1  | 124.3 | 53.7    | 55.4 |
| 成熟期 | 15.0     | 19.1 | 96.7   | 85.4  | 21.3    | 37.2 |

从表1结果可以看出,在微生物3大种群中,细菌总数在整个大豆生育期占绝对优势,重茬低于正茬,花期、结荚期尤为明显。由于大豆根系微生物的数量受基质供应的影响,随根系分泌物的质和量不同而异。大豆根系分泌物,如糖类、氨基酸类、维生素和有机酸类等都是微生物生长繁殖所需要的碳、

氮源及生长素。这些物质分泌量随着大豆生长而增加,以花期和结荚期达到最高峰,在此期间,正是七八月份,温度和湿度适于微生物大量繁殖。到成熟期和收获期,根系分泌物减少,加之温、湿度降低等环境因素影响,所以根际微生物数量也随着根系分泌物的质和量及环境因素的影响而变化。重茬大豆根际细菌数量低于正茬,这与连作障碍机理相关<sup>[10]</sup>。

放线菌数量总体动态变化与细菌不同,花期、结荚期和成熟期重茬高于正茬,以花期、成熟期较为明显,而苗期则相反。放线菌主要不借植物根为营养进行生活,而积极参与根残体的分解过程<sup>[11]</sup>,花期、结荚期和成熟期放线菌数量重茬高于正茬,这是因为重茬大豆根系比正茬根系脱落早些,放线菌参与分解根系残体行营养生活,而导致放线菌数量增加。但从总体趋势来看,大豆根际放线菌活动不明显,变化幅度不大。

从连作大豆根际土壤微生物区系测定结果来看,连作促使土壤微生物区系从高肥的“细菌型”土壤向低肥的“真菌型”土壤转化,与于贵瑞、王震宇等研究结果相符合。随着大豆生

育期的进程,根际真菌数量逐渐上升。连作大豆与正茬相比,真菌数量增加,花期、结荚期及成熟期的真菌数量均高于正茬,以花期最为显著。从数量最具优势的真菌类群中,筛选出两属 3 株致病菌,即镰刀菌属中的尖镰孢菌 (*Fusarium oxysporium*)、半裸镰孢菌 (*F. semitectum*)和轮枝孢属的粉红粘帚菌 (*Gliocladium roseum*)。其分泌产生的毒害物质致使有益真菌减少,细菌密度下降,但真菌种类则因连作而单一化<sup>[12]</sup>。不同的土壤产生不同的微生物区系。重茬大豆根系分泌物间与微生物种群间的错综复杂反应,使重茬大豆的土壤环境不同于正茬大豆,它有利于镰刀菌的繁殖发育<sup>[5]</sup>,从而使其成为大豆根际土壤中的优势种群。重茬大豆播种后至花期,显著增量而又单一化的真菌类群,以镰刀菌占优势,说明真菌对重茬大豆生长发育障碍作用主要在大豆开花以前。镰刀菌可以侵染大豆根部,导致根腐病。因此,重茬大豆根际土壤真菌的优势种群对大豆根系的生长发育和养分吸收起不良作用,这是重茬大豆生长发育障碍的重要原因。

作者在重茬大豆根际土壤中的真菌优势菌群筛选认定的 3 个菌株与上述资料报道趋势一致,为此,拟定以致病菌进行回接试验,加以验证。

## 2.2 致病性检测

大豆播种后,于苗期和花期(20~50 d)采样进行检查,其致病结果见表 2。

表 2 不同时期优势菌株引发大豆根腐病病株危害等级

| 天数(d) | 29 | 30 | 43 | 29+30 | 29+43 | 30+43 | 29+30+43 | CK |
|-------|----|----|----|-------|-------|-------|----------|----|
| 20    | 1  | 0  | 2  | 2     | 1     | 2     | 2        | 0  |
| 26    | 2  | 2  | 2  | 2     | 1     | 3     | 2        | 0  |
| 32    | 3  | 2  | 3  | 3     | 2     | 2     | 2        | 0  |
| 38    | 3  | 3  | 3  | 3     | 3     | 3     | 3        | 0  |
| 50    | 3  | 3  | 3  | 3     | 3     | 3     | 3        | 0  |

表 2 显示,在 3 株菌和 1 组对照的 8 个处理中,分别于 20、26、32、38 和 50 d 分 5 批次随机采样检测。结果表明,回接 20 d 采样检查,除 30 号菌外,各处理组对大豆均产生不同程度侵染和病害,29 号和 29+43 号菌株处理组侵染较轻,大豆主、侧根仅发生褐黑变,其余处理组均为主根二分之一腐烂及褐黑变。随着大豆生育进程,病原真菌侵染不断深入,病害逐渐加重,到 38 d 至以后生育期内,各处理的大豆主根均发生了褐黑病变、腐烂及全部腐烂的严重病害。从表 2 还可以看出,危害最重的时期正是大豆花期前后,在大豆的整个生育期中,花期至关重要。而从表 1 结果来看,重茬大豆花期真菌数量比正茬增量显著,致使有益真菌减少,有害真菌增多,从而促使大豆生育进程受阻,导致植株后期发育不良,大豆产量和品质下降。由于病原菌向大豆根内的侵入及毒害作用,导致了根腐病的发生,致使大豆根系生长不良,植株矮小,冠层分布失常,中层叶片面积变小,叶面积指数低,叶色黄,功能期持续时间短,同化产物积累少,从而严重影响了大豆产量。

从表 2 得知,单一菌株与混合组菌株的致病能力差别不明显,混合菌株之间既没有拮抗现象,又没有协同作用,而各自发挥着对大豆根的侵染和破坏作用。纵观 7 个试验组,似乎由单一菌株回接的大豆,其危害程度比混合株(29+30 号除外)稍大些;在单一菌株中,其致病性基本一致,略呈 43>29>30 号的态势。王震宇(1991)认为,镰刀菌 (*Fusarium sp.*)对大豆根系生长发育有害,这是重茬大豆生长发育障碍的主要原因之一<sup>[5]</sup>,本试验结果与其报道相符。

李长松(1995)等报道了尖镰孢菌可引发根腐病,致病力不强,分离频率仅为 8.6%<sup>[13]</sup>。作者在优势菌株回接大豆 50 d 时,采取各处理组的土样进行分离、纯化,均获得了相应目的菌株,分离频率达 100%。本试验结果表明,尖镰孢菌致病力最强,与上述资料报道相悖。此外,半裸镰孢菌、粉红粘帚菌均有较强的致病力,有关这两个菌株具有致病力,可引发根腐病的资料尚未见报道,尤其是作者分离的轮枝孢菌属的粉红粘帚菌可侵染大豆,导致根腐病的报道尚属首次。

对分离获得的 3 株致病真菌经培养后,分别用无水乙醇和乙腈浸提 24 h,获得粗提物后,回接大豆进行毒害性检测。结果表明,两种浸提法所获得的毒素均显著抑制大豆的发芽率,抑制率达 50%以上。大豆呈现芽胚萎缩、褐黄、霉变,根系生长不良,植株矮小,生长受阻,与对照差异显著。

### 参 考 文 献

- 1 计钟程. 大豆重迎茬减产的主要原因及对策. 土壤通报, 1990, 21(2): 76~78
- 2 邵玉彬, 等. 重迎茬对大豆病虫害及经济性状的影响. 内蒙古农业科技, 1996(1): 19~21
- 3 杨庆凯, 等. 黑龙江省大豆重迎茬问题及对策. 大豆科学, 1994, 13(2): 157~163
- 4 于广武, 等. 大豆连作障碍机制研究初报. 大豆科学, 1993, 13(3): 237~243
- 5 王震宇, 等. 重茬大豆生长发育障碍机制初探. 大豆科学, 1991, 10(1): 31~35
- 6 刘晓冰, 等. 大豆连作效应分析. 农业系统科学与综合研究, 1990(3): 40~43
- 7 沈岛. 防治连作障碍的措施. 日本土壤肥料科学杂志, 1983(2): 170~178
- 8 于贵瑞. 连作与轮作体系的土壤微生物区系及其作用的研究. 沈阳农大硕学位论文, 1984
- 9 刘芷宇. 根际微域环境的研究. 土壤, 1993, 25(2): 225~230
- 10 于贵瑞, 等. 大豆、向日葵等作物连作障碍与轮作效应机理的研究初报. 生态学杂志, 1988, 7(2): 1~8
- 11 娄隆后, 等. 微生物在土壤养分转化中的作用. 北京: 科学出版社, 1962
- 12 铃木达彦. 微生物活动与连作障碍. 农业及园艺, 1980, 55(1)
- 13 李长松, 等. 山东省大豆根腐病研究与防治. 大豆通报, 1995, 95(3): 7~8

## Study on Isolation and Pathogenicity of Soil Pathogen in Continuous Cropping Systems of Soybean

Cheng Zongze Yin Qinyan Dai Bingli et al.

(University of Agricultural and Animal Sciences of PLA, Changchun 130062)

**Abstract** The number of bacteria was dominant over other kinds of microorganisms in all growing stages of soybean in soil, the following soybean was less than that of soybean following other crops, especially in flowering and podding stage. The number of actinomycete doesn't changed evidently, and with soybean following soybean was higher than that of soybean following other crops in flowering and maturing stages, and was opposite in seeding stages. The number of fungi changed obviously, and in soybean following soybean was observed to be much more than that of soybean following other crops, especially in flowering stage. In rhizosphere soil of soybean following soybean, beneficial (下转封三)

## 参 考 文 献

- 1 束怀瑞,等·穴贮水肥对苹果生长发育的影响及肥水效益·1984(1):6~8
- 2 束怀瑞,等·地膜覆盖穴贮肥水旱栽技术标准·园艺,1984(3~4):34~36
- 3 李圣龙·穴贮肥水地膜覆盖对山楂树生长结果的效应·中国果树,1990(4):44~45
- 4 龚明哲·微型喷灌系统·全国喷灌科技情报网专题资料,1984,81~87
- 5 张志新·果树滴灌灌溉制度·全国喷灌科技情报网专题资料,1984,132~136

---

(上接第 39 页)fungi decreased and pernicious fungi increased·The superior species of fungi, *Fusarium oxysporum* Schlecht, *F. semitectum* Berk·et Rav·and *Gliocladium roseum* (Link) Bain inoculated into soybean could produce difference degree pathogenicity and led to soybean root rot, especially in flowering stage (38 ~ 50 days)·It has not been reported that *F. semitectum* Berk·et Rav·and *G. roseum* (link) Bain·may result in pathogenicity and soybean root rot·The toxicity experimental results on soybean by the unrefined extract of three fungi toxin manifest were the germination percentage of soybean decreased obviously, and the growth of soybean was hindered·

**Key words** Soybean continuous cropping, Soybean following soybean, Soybean root rot, Superior species, Fungi

(责任编辑:张 琰)