

蔬菜根结线虫生防细菌的筛选及菌株 HJT2-1 种类的初步鉴定

霍建飞¹, 任文来², 郝永娟¹, 刘春艳¹, 王勇¹, 王万立¹

(1. 天津市植物保护研究所, 天津 300381; 2. 廊坊市文安县农业局, 河北 廊坊 065800)

摘要:以天津地区 7 个区县的蔬菜大棚土壤中分离出的 306 株细菌菌株为试材, 采用亚甲基蓝染色法, 研究 306 株细菌菌株发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的影响。结果表明: 细菌菌株 HJT2-1 发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率较高为 81.3%, 其温室盆栽防效为 55.6%, 略低于阿维菌素防效。采用对细菌核糖体 DNA 的内转录间隔区进行分析的方法将菌株 HJT2-1 初步鉴定为假单胞菌属细菌。该试验获得了对根结线虫 2 龄幼虫具有较高致死率的细菌菌株 HJT2-1, 为开发防治根结线虫的生防制剂奠定了基础。

关键词:蔬菜根结线虫; 生防细菌; 筛选; 鉴定

中图分类号:S 436.44 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)08-0120-04

根结线虫(*Meloidogyne* spp.) 是一类在蔬菜上为害极大的植物病原线虫, 能侵染的植物超过 3 000 种^[1], 尤其以茄科、葫芦科和十字花科等蔬菜受害最重^[2]。根结线虫不仅在蔬菜大棚、温室中为害, 近几年有逐步向露地栽培蔬菜为害的趋势^[3-4]。目前天津市设施蔬菜发展迅速, 至 2013 年, 设施蔬菜面积已超过 40 000 hm², 2009、2010 年对天津市各区县根结线虫病发生情况调查, 发现西青、北辰、津南、东丽、静海、武青、宝坻、蓟县等 8 区县的蔬菜大棚中均有不同程度的根结线虫病为害, 其中一般发病地块蔬菜减产 20%~30%, 严重地块减产达 50%以上。生产上主要应用化学农药对蔬菜根结线虫病进行防治, 而化学杀线剂一般毒性较高, 不仅污染环境、对人体有伤害, 且容易产生抗药性^[5], 防治效果也并不理想。因此, 人们的视线逐渐转移到生物防治上来。生防菌株具有不污染环境、不产生抗药性、防治效果稳定、对人畜安全等优点, 因此筛选出高效的防治线

虫的生防菌株成为众多学者研究的目标。目前杀线虫微生物种类较多, 包括细菌、真菌、放线菌等。而细菌由于容易定植、培养, 且对根结线虫的防治效果较稳定, 具有广阔的市场前景和开发力。该研究旨在从天津各区县蔬菜大棚土壤中分离的细菌菌株中筛选出对根结线虫二龄幼虫具有较高致死率的菌株, 以期开发研制高效的杀线虫生物制剂奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株为从天津西青、北辰、东丽、武清、静海、宝坻、蓟县等区县的蔬菜大棚土壤根际分离的 306 株细菌菌株。供试番茄品种为“白果强丰”。供试根结线虫均为南方根结线虫。

1.2 试验方法

1.2.1 根际细菌的采集与分离 在天津各区县的蔬菜大棚地块采集根际土壤样品, 采用稀释分离法, 于 NA 培养基(牛肉膏 3 g, 蛋白胨 5 g, 氯化钠 10 g, 琼脂 17 g, 水 1 000 mL, pH 7.2)平板上进行分离, 所分离细菌纯化后保存、备用。

第一作者简介:霍建飞(1981-), 男, 河北承德人, 硕士, 助理研究员, 研究方向为植物真菌及线虫病害。E-mail: hujf2203@163.com.

基金项目:天津市农科院院长基金资助项目(090401)。

收稿日期:2015-01-20

multiplication; activated carbon was used to screen the appropriate rooting medium. The results showed that the stems with buds was suitable for inducing callus and the browning rate was only 6.7%, and the leaf and petiole browning rate were more than 60%. It indicated that the optimum medium for callus induction was MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L and the rate of callus was 100.00%; the best shoot proliferation was MS+6-BA 0.5 mg/L+IBA 0.1 mg/L and the multiplication coefficient was 13.8; the optimum root rooting medium was 1/2 MS+IBA 0.2 mg/L+AC 1.0 g/L.

Keywords: *Peperomia obtusifolia*; explant; regeneration system; calus; induction

1.2.2 南方根结线虫二龄幼虫的收集 取感染南方根结线虫的番茄根,采用过筛法^[2]收集根结线虫的卵。将收集的卵置于放有一张面巾纸的 75 μm 网筛上,将网筛放于一小塑料盆中,往盆中注水至刚没过网筛底为好;将塑料盆放于 28℃ 环境条件下孵化;每隔 1 d 收集塑料盆中的线虫于三角瓶中,最后配置成 100 条/mL 的线虫悬浮液置于 4℃ 冰箱中,以备番茄苗根部接种使用。

1.2.3 生防菌室内筛选 将分离纯化的细菌菌株 28℃ 下在 NA 培养基平板上培养,2 d 后将单菌落接种于 NA 液体培养基中,30℃ 条件下 180 r/min 振荡培养 24 h 后,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,将其配成 10^9 CFU/mL 的菌悬液。取 2 mL 菌液+2 mL 线虫悬浮液一起加入到灭菌的培养皿中,放在 25℃ 恒温箱中,以 2 mL NA 液体培养基+2 mL 线虫悬浮液培养作为对照,重复 3 次。24 h 后,每皿加入 2 滴 0.05% 亚甲基蓝溶液,10 min 后镜检线虫死亡率,虫体蓝色的为死虫,不着色的为活虫。校正死亡率=[处理死亡率-对照死亡率/(1-对照死亡率)] \times 100%。

1.2.4 细菌菌株发酵液的制备 将室内生测结果较好的菌株在 NA 培养基平板上活化,挑取单菌落接种于 NA 液体培养基中,30℃ 条件下 180 r/min 振荡培养 24 h 后,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,将其配成 10^9 CFU/mL 的菌悬液。

1.2.5 温室盆栽防效试验 将“白果强丰”番茄种子经 1% 高锰酸钾溶液消毒后,清水冲洗 3 遍后,放置于 25℃ 恒温培养箱中催芽,待种子露白后,播种于塑料钵中(塑料钵中的基质提前灭菌),每钵放 2 粒种子,待 2 片真叶完全展开后,间苗使每钵中保留 1 株番茄苗,然后进行生防菌和线虫的接种。采用灌根法测定生测效果较好的菌株 HJT2-1 和 HJT6 的发酵液对南方根结线虫防控能力。首先,将提前收集好的菌株 HJT2-1 和 HJT6 的发酵液浓度调至 10^9 CFU/mL,以 NA 液体培养基处理为对照,分别灌于 2 片真叶期番茄苗的塑料钵中,每钵 30 mL。2 d 后,采用根部接种法,在番茄苗根部 2 cm 处打 3~5 cm 深的小孔,每株灌入 10 mL 提前配置好的线虫悬浮液(共含 1 000 条二龄幼虫)。接种后的温度控制在 20~25℃,水肥常规管理,正常光照。每处理 10 株,重复 3 次,45 d 后倒出整个植株,调查苗长、地上部分鲜重、根结数和土壤中幼虫数,计算根结指数和防效,并对结果进行统计分析,采用的分级标准如下,0 级:无根结;1 级:有少数根结,占全根系的 1%~25%;2 级:根系根结数量中等,占全根系的 26%~50%;3 级:根系根结数量很多,占全根系的 51%~75%;4 级:根系根结数量很多,占全根系的 76%~100%;根结指数= \sum [(级数 \times 本级病株数) \times 100]/(调查总株数 \times 4), \sum 是各级乘积数值的总和,防效=[(对照根结指数-处理根结指数)/对照

根结指数] \times 100%。

1.2.6 菌株 HJT2-1 的分子鉴定 菌株 HJT2-1 DNA 的提取参照 Koumoutsis 等^[6]的方法进行。16S rDNA 的扩增,扩增所用引物为,上游引物 P1:5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAGAACGAACGCT-3',下游引物 P6:5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTTCACCC C-3'。PCR 体系为:上游引物 P1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ,下游引物 P6 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ,2 \times Es Taq MasterMix 25 μL ,模板 DNA 2 μL ,灭菌重蒸水 21 μL ,总反应体系为 50 μL 。扩增条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s;55℃ 退火 40 s;72℃ 延伸 1 min;35 个循环;72℃ 延伸 10 min,置 4℃ 保存备用。电泳:取 2 μL 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶(含 0.5 $\mu\text{g/mL}$ goldview)中电泳,电泳缓冲液为 0.5 \times TBE,电压为 120 V,时间约为 30 min,在凝胶图像分析仪上照相并保存。PCR 产物纯化及测序:纯化 PCR 产物,并将其送往北京三博远志生物技术有限责任公司测序。将测序的结果在 NCBI 上(网址为: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源性比对。

2 结果与分析

2.1 细菌发酵液对线虫的致死作用测定

对分离的 306 株细菌菌株发酵液进行室内生测试验,菌株发酵 24 h 后其发酵液对根结线虫的致死率达到 50% 以上的菌株有 5 株,由表 1 可知,菌株 HJT2-1 的校正死亡率最高为 81.3%,菌株 HJT6 对线虫的致死率为 77.5%。

表 1 菌株发酵 24 h 后对南方根结线虫二龄幼虫的致死效果

Table 1 The control effect of strain HTT2-1 fermentation liquor to J2 after 24 hours

处理 Treatment	二龄幼虫总数 The total number of J2/个	死亡二龄幼虫数 The death number of J2/个	死亡率 The death rate/%	校正死亡率 The corrected death rate/%
HJT2-1	111	92	82.9	81.3
HJT6	87	69	79.3	77.5
WQ20	118	81	68.6	65.8
JX11	105	67	63.8	60.5
LH4	79	49	62.0	58.6
阿维菌素 Abamectin	95	81	85.3	84.2
CK	98	8	8.2	—

2.2 温室盆栽防效试验

2.2.1 菌株 HJT2-1 及 HJT6 发酵液对番茄根结指数及土壤中幼虫数的影响 由表 2 可以看出,番茄生长 45 d 后,菌株 HJT2-1 发酵液、HJT-6 发酵液及对照药剂阿维菌素处理对根结线虫的防效分别为 55.6%、23.9% 和 61.3%,而土壤中二龄幼虫密度分别降低了 51.3%、29.5% 和 63.4%。

表 2 番茄生长 45 d 后菌株 HJT2-1 及 HJT6 发酵液对根结线虫的防治效果

Table 2 The control effect of strain HJT2-1 and HJT6 fermentation liquor to J2 after tomatoes were sowed 45 days

处理 Treatment	药前虫口密度 The density of J2 before treatment /(头·(100 g) ⁻¹ 土)	药后虫口密度 The density of J2 after treatment /(头·(100 g) ⁻¹ 土)	线虫减少 The decrement rate of J2 /%	根结指数 Root knot index	防效 Control effect /%
HJT2-1	232	113	51.3	28.3	55.6
HJT6	278	196	29.5	48.5	23.9
阿维菌素 Abamectin	246	90	63.4	24.7	61.3
CK	215	365	-69.8	63.8	—

2.2.2 菌株 HJT2-1 及 HJT6 发酵液对番茄株高和鲜重的影响 由表 3 可以看出,菌株 HJT2-1 发酵液处理的平均株高比清水对照高出 24.17%,菌株 HJT6 发酵液处理的平均株高比清水对照高出 10.83%,阿维菌素处理比对照组高出 12.11%;在地上平均鲜重方面,HJT2-1 发酵液处理组比对照组高出 60.53%,HJT6 发酵液处理组比对照组高出 18.42%,阿维菌素处理的地上平均鲜重比对照高出 22.73%。

表 3 番茄生长 45 d 后菌株 HJT2-1 发酵液处理对株高及鲜重的影响

Table 3 The influence of strain HJT2-1 fermentation liquor to plant height and fresh weight after tomatoes were sowed 45 days

处理 Treatment	平均株高 The average plant height /mm	平均增高率 The average increase rate /%	地上平均鲜重 The average fresh weight /g	平均增重率 The average weight gain rate /%
HJT2-1	30.05	24.17	6.71	60.53
HJT6	26.82	10.83	4.95	18.42
阿维菌素 Abamectin	27.13	12.11	5.13	22.73
CK	24.20	—	4.18	—

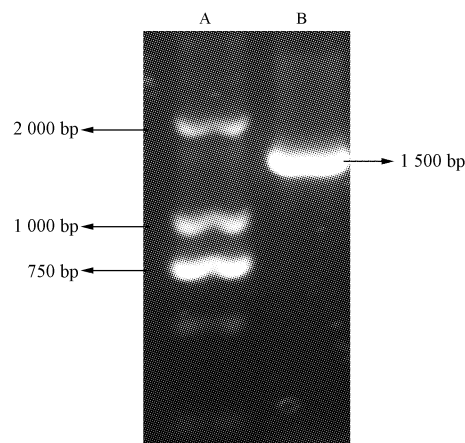
2.3 菌株 HJT2-1 的分子鉴定结果

2.3.1 菌株 HJT2-1 的 16S rDNA 扩增结果 用特异性引物扩增菌株 HJT2-1 的 16S rDNA,在 1 500 bp 左右处有一扩增条带(图 1)。

2.3.2 PCR 产物测序及同源性比对结果 PCR 产物经纯化以后送往北京三博远志生物技术有限责任公司测序,其结果如图 2。将测序的结果在 NCBI 上(网址为: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行同源性比对,发现菌株 HJT2-1 与 *Pseudomonas moraviensis* strain IARI-HHS1-33(序列号 KF054775.1)的 16S rDNA 区的序列同源性很高,其序列相似性为 99%,与 *Pseudomonas putida* strain NBFALD-RAS137(序列号 KJ819580.1)的 16S rDNA 区的序列相似性也为 99%,这说明菌株 HJT2-1 属于假单胞菌属菌株,但具体属于哪个种,还有待于做进一步鉴定。

3 结论与讨论

菌株 HJT2-1 发酵液对南方根结线虫校正死亡率为 81.3%,温室盆栽防效为 55.6%。通过对菌株 HJT2-1 的 16S rDNA 区进行扩增测序及序列同源性比对初步将菌



注:A 表示 Marker 2 000,B 表示 16S rDNA。

Note:A represents Marker 2 000,B represents 16S rDNA.

图 1 16S rDNA 扩增图谱

Fig.1 The electrophoretogram of 16S rDNA

```

ATTTATCCACCGTGGTACCGTCTCCGAGGTTAGACTAGTACTTCTGGTGCAACCCAC
TCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCGCGACATTC
TGATTCGCGATTACTAGCGATTCGACTTCACGCAGTCGAGTTGCAGACTGCGATCCGG
ACTACGATCGGTTTATGGGATTAGCTCCACCTCGCGGCTTGCAACCCCTTTGTACCGA
CCATTGTAGCAGTGTGTAGCCAGGCCGTAAAGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCC
ACCTTCCTCCGTTTGTACCGCGAGTCTCCTTAGAGTGCCACCATACGTGCTGGTA
ACTAAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTACGGGACTTAACCAACATCTCAGCACAGGAGC
TGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAATGTTCCCGAAGGCACCAATCCATCTCTGG
AAAGTTCATTGGATGTCAAGGCTGGTAAGGTTCTTCGCGTGTGCTTGAATTAACCCAC
ATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCGCTCAATTCATTGAGTTTAACTTGGCGCCGT
ACTCCCCAGGCGGTCAACTTAATGCGTTAGCTGCGCCACTAAGAGCTCAAGGCTCCCA
ACGGCTAGTTGACATCGTTTACGGGCTGGATACAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCC
CCACGCTTTCGCACCTCAGTGTGAGTTCAGTCCAGGTGCTGCGCTTCGCCACTGCTGT
TCCTTCCTATATCTACGCAATTCACCGCTACACAGGAAATCCACCACCTCTACCATAC
TCTAGCTTGCCAGTTTGGATGCAATTCAGGTTGAGCCCGGGGATTTCACATCCAAAC
TTAACAACCACTACGCGCGCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCCTC
TGTATTACCGCGGTGCTGGCACAGATTACCGCGGTCTTATCTGTCGGTAACGTCAA
AATTGCAGAGTATTAATCTACAACCCCTTCCTCCCACTTAAAGTGTCTTAACATCCGAA
GACCTTCTTACACACGCGGCTGGCTGGATCAGGCTTTCGCCCATTTGCTCAATATCC
CCACTGCTGCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCAGTGTGACTGATCATC
CTCTCAGACAGTTACGGATCGTGGCTTGGTAGGCCATTACCTCACCACCTAGCTAAT
CCGACCTAGGCTCATCTGATAGCGCAAGGCCGGAAGGTCCCTTCTTCTCCGTAAGG
ACGATATGCGGTATTAGCGTTCCTTTCGAACGTTGTCCTCCCACTACAGGAGATTCTT
AGGCATTACTACCCGTCGCGCGCTGAATCCAGGAGCAAGCTCTTCATCCGCTCGAC
TGCATGTGTAGCGCGGCCCTC

```

图 2 PCR 产物测序结果

Fig.2 The result of sequenced PCR products

株 HJT2-1 鉴定为假单胞菌。

蔬菜根结线虫病已经成为危害我国蔬菜的一种重要病害,并且近几年来发生越来越严重,在目前缺乏安

全而有效的防治药剂情况下,筛选高效的生防菌株并制成商品化制剂是防治线虫病害的一种新思路。该试验从天津几个区县的蔬菜大棚土壤中分离细菌菌株 306 株,通过室内生测及温室盆栽试验获得的菌株 HJT2-1 发酵液室内生测对根结线虫二龄幼虫的校正死亡率最高为 81.3%,温室盆栽防效为 55.6%。虽然菌株 HJT6 发酵液的室内生测试验中对二龄幼虫的校正死亡率达到 77.5%,但温室盆栽试验防效却不理想,这可能与该菌株在土壤中定殖能力差有关。有研究表明,一些生防菌株在无菌土中可以很好地定殖和生长,而在土壤中却难以大量定殖,这可能由于自然土壤中多种微生物的相互作用或菌株不能适应土壤环境而导致^[7-9],这或许可以解释为什么有些细菌菌株室内生测效果较好而温室盆栽试验却不理想。

在促生长方面,HJT2-1 发酵液处理组的株高比清水对照组高出 24.17%,在地上平均鲜重上,比清水对照组高出 60.53%,很明显,HJT2-1 发酵液对番茄植株有一定的促生长作用,但这种促生长作用可能由于发酵液的使用降低了土壤中的根结线虫密度,从而使根结线虫的危害减轻,而使处理组的株高高于对照组,也可能是由于菌株 HJT2-1 发酵液本身对番茄植株就有一定的促生长作用,至于菌株 HJT2-1 发酵液对番茄植株的促生长作用机制还有待于更深一步研究。虽然菌株 HJT2-1

发酵液温室盆栽试验效中防治南方根结线虫的效果尚可,但下一步工作仍需对菌株 HJT2-1 发酵液对根结线虫的防治效果进行大田试验,为开发防治根结线虫的生防制剂奠定基础。

参考文献

- [1] 刘维志. 植物线虫志[M]. 北京:中国农业出版社,2004.
- [2] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [3] 赵世福,王泽民,王德,等. 北京市顺义区蔬菜根结线虫病发生及防治技术应用[J]. 北京农业,2007(21):25-27.
- [4] 刘翠珍. 近郊保护地蔬菜根结线虫调查及应对措施[J]. 北方园艺,2008(3):208-209.
- [5] Sasser J N, Eisenback J D, Carter C C, et al. The international *Meloidogyne* project its goals and accomplishments[J]. Annual Review of Phytopathology, 1983, 21: 271-288.
- [6] Koumoutsi A, Chen X H, Henne A, et al. Structural and functional characterization of gene clusters directing nonribosomal synthesis of bioactive cyclic lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(4): 1084-1096.
- [7] 袁虹霞,陈莉,张飞跃,等. 小麦禾谷孢囊线虫生防真菌的筛选与鉴定[J]. 植物保护学报, 2001, 38(1): 52-58.
- [8] 刘健,李俊,姜昕,等. 荧光假单胞菌 AS1. 867 和 3-PHB 的 luxAB 基因标记及其在小麦根际的定殖[J]. 华东理工大学学报, 2002(6): 42-45.
- [9] 杨合同,陈凯,李纪顺,等. 重组巨大芽孢杆菌在小麦根际的定殖及其对植物真菌病害的防治效果[J]. 山东科学, 2003, 16(3): 12-17.

The Screening of Biocontrol Bacteria Against Vegetable Root-knot Nematode and Identification of Bacterial Strain HJT2-1

HUO Jian-fei¹, REN Wen-lai², HAO Yong-juan¹, LIU Chun-yan¹, WANG Yong¹, WANG Wan-li¹

(1. Plant Protection Institute of Tianjin, Tianjin 300381; 2. Agriculture Bureau of Wen'an County Langfang City, Langfang, Hebei 065800)

Abstract: Taking 306 bacterial strains which were isolated from vegetable soils of greenhouses in seven different areas of Tianjin as material, the effect of fermentation liquor of 306 bacterial strains on the death rate of *Meloidogyn incognita* (J2) by using methylene blue stain method. The results showed that the bacterial strain HJT2-1 caused more than 81.3% of corrected mortality against J2, and the control effect in greenhouse could reach to 55.6% and was lower than Avermectin. The bacterial strain HJT2-1 was preliminarily identified as *Pseudomonas* by analyzing the sequence of bacterial ribosomal DNA internal transcription space. This experiment obtained strain HJT2-1 which was effective to J2, and laid a solid foundation to develop biocontrol preparations against root-knot nematode.

Keywords: vegetable root-knot nematodes; biocontrol bacteria; screening; identification