

根结线虫生防细菌的筛选及鉴定

王进福^{1,2}, 文才艺¹, 刘伟成², 董丹², 裘季燕², 刘霆²

(1. 河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002; 2. 北京市农林科学院 植物保护研究所, 北京 100097)

摘要:以抗病番茄根际土壤、根为分离对象, 采用稀释分离方法, 进行了根结线虫生防细菌的筛选及鉴定。结果表明:从番茄根际土和根内分离出 47 株细菌, 其中, 根内细菌 7 株, 根际细菌 40 株。经杀根结线虫活性检测, 获得 2 株活性强且稳定的细菌菌株 W49、W21, 对根结线虫的校正死亡率均超过 90.0%, 对卵的孵化抑制率达 96.0%。通过菌落形态特征、生理生化特征观察和 16S rDNA 序列分析, W49 和 W21 分别被鉴定为简单芽孢杆菌(*Bacillus simplex*)和内生芽孢杆菌(*Bacillus endophyticus*)。

关键词:根结线虫; 生防细菌; 活性检测; 分类鉴定

中图分类号:S 482.2⁺92 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)09-0121-04

目前, 随着保护地作物栽培面积增加、日光温室大面积推广和复种指数增加, 根结线虫危害日趋严重。农业生产中主要以化学农药防治根结线虫, 虽见效快, 但带来了如食品安全、环境污染和线虫抗药性等一系列问题。从微生物群体中筛选具有应用价值的杀根结线虫菌种成为近年来研究的热点^[1-3]。细菌作为杀线虫菌株资源, 具有易培养、易定殖的优点, 且对植株根系亲和力强、抗线虫能力强, 应用前景广阔。现从抗根结线虫番茄品种根际土及根内筛选具有杀根结线虫活性的菌株, 并对活性菌株进行鉴定, 以期研究开发新型生物农药提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

土壤样品:2014 年 11 月在北京市顺义区绿奥大棚基地番茄地块, 用取样器(长度 55 cm, 直径 2 cm)取番茄根际 10 cm 深的土壤, 随机取 5 点, 共取 5 份土样, 将所得土样混匀, 装入自封袋内, 带回实验室处理。

根样品:在采集过土样的位置, 分别采集幼根, 共采集 5 份幼根, 混匀后装入自封袋内, 带回实验室处理。

番茄品种:“硬粉 8 号”。

培养基:牛肉膏蛋白胨培养基(牛肉膏 3.0 g, 蛋白

胨 10.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 15.0 g, 水 1 000 mL)。

主要试剂:细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自生物工程(上海)股份有限公司。细菌通用引物(27F、1492R)由上海生物工程有限公司合成。其它常用试剂为国产或进口分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 根内细菌的分离纯化 称取 1 g 幼根, 用 75%酒精漂洗 30 s, 无菌水清洗 3 次, 用无菌剪刀将幼根剪碎, 放进灭过菌的研钵内并加石英砂进行研磨。将研磨液加入装有 9 mL 无菌水的离心管中, 样品稀释度为 10^{-1} , 摇匀后, 依次配成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 梯度稀释液。分别吸取不同梯度稀释液 200 μ L, 均匀涂到牛肉膏蛋白胨平板上, 每个浓度重复 3 次。放置于 28℃ 培养箱中培养。2~5 d 后, 根据菌落的颜色、边缘、形状、透明度等挑取单菌落, 在牛肉膏蛋白胨培养基平板上划线 3 次, 获得纯培养。

1.2.2 土壤细菌的分离纯化 称取土样 2 g, 加入装有 18 mL 无菌水的锥形瓶中, 220 r/min 震荡 30 min。配成 10^{-2} ~ 10^{-6} 系列梯度土壤悬液。分别吸取不同梯度土壤悬液 200 μ L, 均匀涂到牛肉膏蛋白胨平板上, 每个浓度重复 3 次。放置于 28℃ 培养箱中培养, 2~5 d 后, 根据菌落的颜色、形状、边缘、透明度、光泽度等表面特征, 选取单菌落, 在牛肉膏蛋白胨培养基平板上划线 3 次, 获得纯培养。

1.2.3 细菌菌株鉴定 表观鉴定:通过观察菌体的颜色、大小、形态、边缘、透明度、光泽度、培养基的颜色等, 并通过革兰氏染色观察个体形态特征。生理生化测定:采用硝酸盐还原试验、耐盐性培养、明胶液化、淀粉水解试验、柠檬酸钠盐等生理生化试验。分子鉴定:试剂盒

第一作者简介:王进福(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向为植物病害生物防治。E-mail:1142966389@qq.com.

责任作者:刘霆(1975-), 男, 博士, 副研究员, 研究方向为植物线虫生物防治。E-mail:124297976@qq.com.

基金项目:农业部公益性行业专项资助项目(201103018); 北京市农林科学院青年科研基金资助项目(QNJJ201519)。

收稿日期:2015-12-22

法提取细菌菌株基因组 DNA。以提取的 DNA 为模板,扩增引物为通用引物 27F(5'-GAGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3')和 1492R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCG-CA-3')。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 1 min,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保温。PCR 反应产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测合格后送生工生物工程(北京)有限公司测序。将所得序列与 GenBank 数据库中序列进行比对,通过 MEGA 5.0 构建系统发育进化树。

1.3 项目测定

1.3.1 32 孔板法活性检测 将分离纯化得到的细菌接于装有 20 mL 液体牛肉膏蛋白胨培养基的 50 mL 三角瓶中,在 28℃、220 r/min 下培养 48 h 后,用 0.22 μm 的水系滤膜过滤,将滤液加入 32 孔板培养板的穴孔内,每孔加 100 μL,加入等体积的 2 龄根结线虫溶液(200 条/mL),每个处理重复 4 次,做空白对照。在 28℃ 培养箱中培养 24 h 后,在体视镜下并记录线虫死亡数,并计算校正死亡率。校正死亡率(%)=(处理组死亡率-对照组死亡率)/(1-对照组死亡率)×100。

1.3.2 菌株遗传稳定性检测 将活性菌株在牛肉膏蛋白胨培养基平板上连续 4 次划线继代培养。检测每一代菌株的抗根结线虫活性。计算出每一代菌株杀根结线虫的校正死亡率。方法同上。

1.3.3 相对抑制率的测定 将培养 48 h 的待测菌株发酵液用无菌细菌滤膜过滤后,滤液加到 24 孔板培养板的穴孔内,每孔加 900 μL 滤液,备用;取新鲜饱满的卵囊,大小基本一致,0.5% 次氯酸钠溶液表面消毒 2 min,无菌水冲洗 3 次,放入装有待测发酵液的穴孔内,每个穴孔放 2 个卵囊。每个处理重复 3 次,无菌水作对照,25℃ 下孵化。5 d 后观察统计孵化出的线虫的数量。计算线虫卵孵化的相对抑制率。相对抑制率(%)=(对照组孵化线虫平均数-处理组孵化线虫平均数)/对照组孵化线虫平均数×100。

1.3.4 趋避性检测 称取 Pluronic 胶 23 g;将 40 mL 无菌水到入 500 mL 螺口蓝盖试剂瓶,加入转子后将 Pluronic 胶加入瓶里,再加入 40 mL 无菌水,在冷藏柜内用磁力搅拌器搅拌,至 Pluronic 胶完全溶解;用一次性移液管吸取 10 mL Pluronic 胶,缓慢加入 6 cm 的培养皿内,避免气泡产生,待用;将菌株发酵液和 Pluronic 胶按 1:9 比例混匀,加入到自制的 Tip 头内,避免气泡产生,放置于待用的培养皿内,将线虫溶液滴在 Tip 头一侧,每皿放置 1 000 条线虫,每个处理重复 5 次。室温下培养 24 h 后观察试验结果。

1.4 数据分析

采用 Excel、MEGA 5.0 等软件进行数据处理和分析。

2 结果与分析

2.1 杀线活性细菌的分离筛选及活性检测

该试验共分离纯化出 47 株细菌,其中根内细菌 7 株,根际细菌 40 株。初筛发现,W21 和 W49 菌株杀根结线虫活性较好,W21 对根结线虫的校正死亡率为 99.1%,W49 对根结线虫的校正死亡率为 96.8%(图 1);2 株菌株连续培养 4 代后,W21 对根结线虫的校正死亡率为 97.1%,W49 对根结线虫的校正死亡率为 95.2%(图 2)。综上分析,W21 和 W49 菌株具有较强且稳定的杀根结线虫活性。

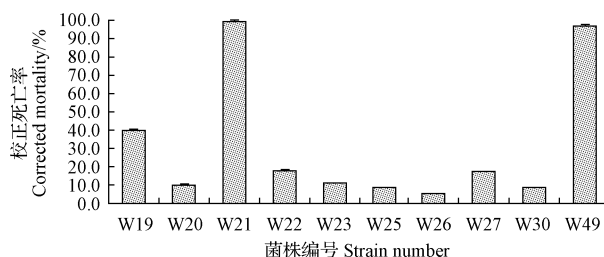


图 1 部分菌株杀根结线虫活性测定

Fig. 1 Nematicidal activity of the bacterial isolates against root knot nematodes

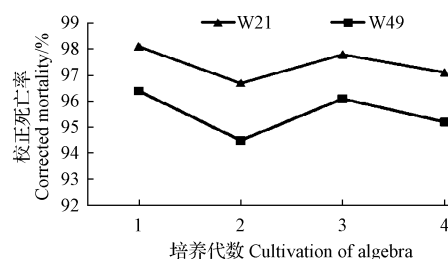


图 2 W21 和 W49 杀根结线虫遗传稳定性

Fig. 2 Genetic stability of strains W21 and W49 for controlling root knot nematodes

由表 1 可知,W21 对根结线虫卵孵化的平均抑制率为 99.0%;W49 对根结线虫卵孵化的平均抑制率为 96.0%;趋避试验结果表明,在 Tip 头内和两侧没有线虫聚集的现象,在远 Tip 头的位置也没有发现根结线虫聚集现象。综上所述,W21 和 W49 对根结线虫卵孵化有影响,但对根结线虫趋避无影响。

表 1 W21 和 W49 发酵液对根结线虫卵孵化的影响

Table 1 Effect of fermentation broth of strains W21 and W49 for root knot nematode eggs hatch

处理 Treatment	重复 Repetition/条			孵化出线虫平均数 Average incubation number /条	相对抑制率 Relative inhibition rate /%
	1	2	3		
W21	1	0	1	1	99.0
W49	6	3	4	4	96.0
CK	101	110	86	99	—

2.2 根内及根际杀线虫活性细菌菌株鉴定

2.2.1 形态学鉴定 将 W21、W49 分别在牛肉膏蛋白胨培养基平板上划线培养,观察发现 W21 菌落不规则、灰白色、菌落表面干燥无光泽、无褶皱、表面不透明(图

3A),镜检呈杆状,革兰氏染色为阴性,有芽孢;W49 菌落灰白色、不透明、有褶皱、菌落有光泽、边缘略整齐(图 3B),镜检为杆状,革兰氏染色为阳性,具芽孢。表明菌株 W21 和 W49 具有芽孢杆菌属的形态特征。

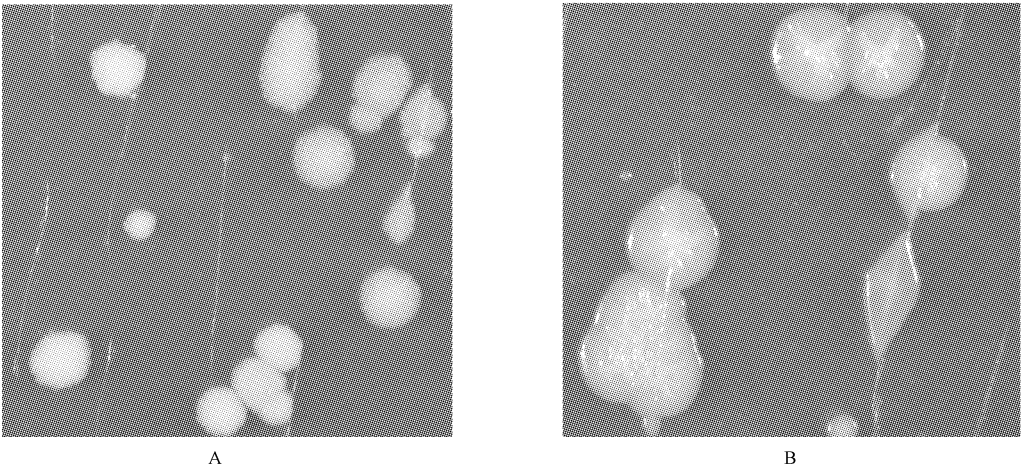


图 3 W21(A)及 W49(B)单菌落图

Fig.3 Single colony of strains W21(A) and W49(B)

2.2.2 生理生化试验 由表 2 可知,菌株 W21 和 W49 生理生化特征与芽孢杆菌属生理生化特征一致。

表 2 W21 和 W49 生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strains W21 and W49

测定指标	菌株 Strain	
Testing index	W21	W49
最适温度 Optimum temperature/℃	30	28
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+
淀粉水解 Amylolyis	+	+
硝酸还原 Nitrate reduction	+	+
硫化氢产生 Hydrogen sulfide production	+	+
纤维素水解 Cellulose hydrolyzation	—	—
柠檬酸盐利用反应 Citrate reaction	+	—
甲基红试验 Methyl red test	—	—
酪氨酸反应 Tyrosine reaction	—	—

注:“—”为阴性,“+”为阳性。

Note:‘—’ was negative,‘+’ was positive.

2.2.3 分子鉴定 经测序获得菌株 W21 和 W49 菌株的 16S rDNA 序列长度分别为 1 436 bp 和 1 300 bp,将所得序列校对后提交到 GenBank,获得登录号分别为 KR780483 和 KR780484。通过 Blast 分析,选取与之同源性较高的菌株,利用软件 MEGA 5.0 进行系统发育分析、Neighbor-Joining 法构建菌株的 16S rDNA 系统发育树。结果如图 4 所示,W21 与 *Bacillus endophyticus* 聚在一个分支上,同源性为 99%;W49 与 *Bacillus simplex* 聚在一个分支上,同源性为 100%。结合形态特征和生理生化试验,W21 和 W49 鉴定结果分别是内生芽孢杆菌和简单芽孢杆菌。

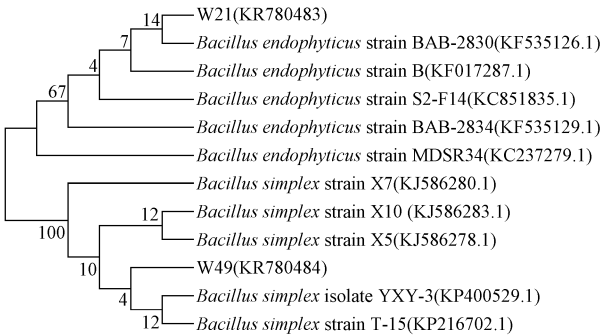


图 4 W21 和 W49 系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree of strains W21 and W49 based on 16S rDNA sequences

3 讨论

细菌作为线虫生防菌株资源,成为近年来研究的热点。YU 等^[4]发现,苏云金杆菌产生的 CryAa2 毒素杀根结线虫的 LC₅₀ 为 71.08 μg/mL,且对线虫卵的孵化有抑制作用,也能促进寄主植物生长;XIAO 等^[5]试验发现,蜡状芽孢杆菌杀根结线虫活性高达 92.8%,且使卵的孵化率显著降低至 33.1%;陈泽斌等^[6]从烟草体内筛选出全 5 株解淀粉芽孢杆菌或苏云金芽孢杆菌,杀根结线虫活性超过 90%;秦博等^[7]筛选出的 10 株芽孢杆菌属或假单胞菌属细菌,杀根结线虫活性超过 60%,其中有 9 株菌株杀大豆胞囊线虫活性在 6.3%~44.6%;张立强等^[8]从热带雨林土壤中筛选出的 *Bacillus toyonensis* 菌株,杀根结线虫活性超过 80%,且活性稳定;霍建飞等^[9]

从大棚土壤里也筛选出 1 株假单胞菌属细菌,杀根结线虫活性为 81.3%,且温室盆栽防效为 55.6%。该研究从抗性番茄品种根际土和根内筛选出 2 株具有杀根结线虫活性强且稳定的细菌菌株,分别为内生芽孢杆菌和简单芽孢杆菌,然而,目前还没有关于这 2 种芽孢杆菌防治根结线虫的报道。

简单芽孢杆菌和内生芽孢杆菌对植物有促生作用,对植物病害也有生防作用。HASSEN等^[10]的试验发现,简单芽孢杆菌对番茄植株的生长和根定殖均有促进作用;ADIYAMAN等^[11]试验发现,简单芽孢杆菌对粉红腐烂病有防治作用。孙卓等^[12]从土壤中分离出的内生芽孢杆菌具有良好的定植能力,对人参多种病原菌如核盘菌、腐皮镰孢菌、灰葡萄孢菌等具有较强的拮抗活性。穿刺芽孢杆菌是一种线虫寄生细菌,杀线活性强,但该菌繁殖必须依靠线虫,因此,实践应用受到限制^[13]。该试验筛选出的 2 株杀根结线虫芽孢杆菌培养简单、繁殖速度快,下一步将研究这 2 株芽孢杆菌杀线虫活性物质种类。

该研究筛选获得的 2 株细菌位于番茄根部不同生态位点,理论上 W21 作为内生细菌,不受外界复杂的环境因素影响,且与寄主植物有更好的亲和能力,W21 相比其它生防微生物应更能发挥出理想稳定的防效;W49 为根际细菌,其杀根结线虫活性易受多种因素的影响,如温度、湿度、pH 等。因此,W21 和 W49 菌株实际田间应用效果有待进一步研究。

参考文献

[1] 魏华,刘敏,鲍时翔,等. 1 株抗根结线虫红树林放线菌的筛选与鉴定

[J]. 微生物学杂志,2012,32(4):13-16.

[2] 陆然,王媛媛,朱晓峰. 八角根围土壤真菌种类鉴定及其对南方根结线虫的活性评价[J]. 植物保护,2014,40(6):42-46.

[3] 马金慧,朱萍萍,茆振川,等. 哈茨木霉菌株 TRI2 的鉴定及其对黄瓜根结线虫的防治作用[J]. 中国农学通报,2014,30(22):263-269.

[4] YU Z Q,XIONG J,ZHOU Q N,et al. The diverse nematocidal properties and biocontrol efficacy of *Bacillus thuringiensis* Cry6A against the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*[J]. Journal of Invertebrate Pathology,2015,125:73-80.

[5] XIAO T J,CHEN F,GAO C,et al. *Bacillus cereus* X5 enhanced bio-organic fertilizers effectively control root-knot nematodes(*Meloidogyne* sp.) [J]. Pedosphere,2013,23(2):160-168.

[6] 陈泽斌,黄丽,王海燕,等. 具杀线虫活性烟草内生细菌的筛选及鉴定[J]. 西南农业学报,2015,28(1):202-206.

[7] 秦博,段玉玺,陈长法,等. 危险性线虫生防细菌的筛选鉴定和防效试验[J]. 植物检疫,2008,22(2):83-86.

[8] 张立强,黄惠琴,崔莹,等. 一株抗根结线虫芽孢杆菌的分离筛选及鉴定[J]. 热带作物学报,2014,35(9):1825-1829.

[9] 霍建飞,任文来,郝永娟,等. 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[J]. 北方园艺,2015(8):120-123.

[10] HASSEN A I,LABUSCHAGNE N. Root colonization and growth enhancement in wheat and tomato by rhizobacteria isolated from the rhizosphere of grasses[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2010,26(10):1837-1846.

[11] ADIYAMAN T,SLININGER P J,SCHISLER D A,et al. Selection of biocontrol agents of pink rot based on efficacy and growth kinetics index rankings[J]. Plant Disease,2011,95(1):24-30.

[12] 孙卓,杨利民. 人参病原菌拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J]. 植物保护学报,2015,42(1):79-86.

[13] DAVIES K G,OPPERMAN C H. A potential role for collagen in the attachment of *Pasteuria* penetrans to nematode cuticle[J]. Multitrophic Interactions in the Soil,2006,29:11-16.

Screening and Identification of Biocontrol Bacterial Against Root-knot Nematode

WANG Jinful^{1,2}, WEN Caiyi¹, LIU Weicheng², DONG Dan², QIU Jiyan², LIU Ting²

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002; 2. Institution of Plant Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry, Beijing 100097)

Abstract: Taking rhizosphere soil and roots of disease-resistant tomatoes as isolation objects, using dilution method, biocontrol bacterial against root-knot nematode were screened and identified. The results showed that 47 isolates were got among which 40 were from rhizosphere soil and 7 were from roots. Strains W49 and W21 showed nematocidal activity and egg hatching inhibition rate against *Meloidogyne incognita* were over 90.0% and 96.0%, which were identified as *Bacillus simplex* and *Bacillus endophyticus* based on cultural and morphological characteristic and 16S rDNA sequencing analysis.

Keywords: root-knot nematodes; biocontrol bacterial; active experiment; identification