

枯草芽孢杆菌 Bs-18 菌株分离与鉴定及对根结线虫的防治效果

张 玉 芹

(唐山职业技术学院,河北 唐山 063000)

摘 要:从植物的根际土壤中分离到 1 株芽孢杆菌菌株 Bs-18,通过 16S rDNA 序列分析鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。在室内,通过浸泡法用 Bs-18 菌株发酵液处理南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)的 2 龄幼虫,发现其对线虫具有显著的致死作用,发酵原液及 10 倍稀释液在 6 h 时致死率均高于 95%。在温室试验中,Bs-18 菌株发酵液及 10 倍稀释液对根结线虫的减退率达到 81.8%和 76.5%,表现出较高的防治效果,为进一步的田间应用奠定了基础。

关键词:芽孢杆菌;根结线虫;筛选;防治效果

中图分类号:S 432.4⁺5 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)01-0130-03

植物寄生性线虫每年造成的损失估计达 1 000 多亿美元^[1],特别是根结线虫(*Meloidogyne* spp.)几乎侵染所有的栽培植物^[2],在感病番茄上至少要造成 50%以上的损失^[3]。生物防治是控制根结线虫危害的一个重要策略,特别是随着农业安全生产受到人们广泛的关注,许多剧毒、高毒的化学农药禁止或是限制在农作物上应用,生物防治因绿色无公害而被提倡。在研究中,已经有许多关于生物菌剂防治根结线虫的报道^[4-5]。为了进一步发掘土壤微生物的生防资源,发现高效的防治根结线虫的菌株,现对根结线虫病植物的根际土壤进行了微生物分离,其中筛选获得了 1 株枯草芽孢杆菌 Bs-18,并对其杀线虫作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

自河北滦南根结线虫严重发生的番茄大棚中采集土壤样品,在距主根 20 cm 处取深 5~15 cm 的土壤,并进行 3 点取样混合均匀。采用梯度稀释法,在牛肉膏蛋白胨培养基中分离细菌,并采用划线法对获得的菌落进行单胞分离纯化。南方根结线虫的 2 龄幼虫准备:从番茄病株根部挑取新鲜卵块,用 1%次氯酸钠消毒 3 min,无菌水漂洗 3 次后于 25℃下孵化,通过 60 目的尼龙网滤除杂质和卵块,24 h 后收集 2 龄幼虫,用于试验。番茄品种“白果强丰”,购于市场。

1.2 试验方法

1.2.1 Bs-18 菌株的分子鉴定

作者简介:张玉芹(1974-),女,硕士,讲师,现从事园艺教学及研究工作。E-mail:zhangyuqin345@163.com。

收稿日期:2011-10-08

16S rDNA 片段测序法进行鉴定,PCR 扩增所用引物:27f: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 1492r: 5'-TACGCTACCTTGTTCAGACTT-3'^[6]。PCR 扩增所用反应体系:10×Buffer 5 μL,Mg²⁺(25 mmol/L)4 μL,dNTP(5 mmol/L)2 μL,上下游引物(10 mmol/L)各 3 μL,模板 DNA 10 ng(或菌液 0.5 μL),Taq DNA 聚合酶(5 U)1 μL,用无菌 ddH₂O 补足 50 μL 体系。PCR 扩增程序设置:94℃预变性 5 min;94℃变性 40 s,55℃退火 40 s,72℃延伸 2 min,35 循环;72℃延伸 5 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳回收纯化后分别连接于 pGEM-T 克隆载体,委托上海申友生物技术公司进行测序,测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 用 BLAST 软件对序列进行序列分析。

1.2.2 Bs-18 菌株制剂的制备 将分离到的 Bs-18 菌株移至 LB 平板上,经过 2 次活化,用灭菌牙签挑取平板上纯化的单菌落到含有 LB 培养液的试管中,在 28℃、160 r/min 的条件下培养,当 OD 值达到 0.6 时,按 1:100 的比例将种菌接到含有 LB 培养液的三角瓶中,28℃、160 r/min 振荡培养 24 h,制得发酵液。将菌体用灭菌水配成含有 1×10⁹ cfu/mL 的菌悬液。

1.2.3 室内离体试验 将菌悬液原液、10 倍和 100 倍稀释液,分别吸取 0.5 mL 加入细胞培养板孔穴中,每孔中加入约 100 条南方根结线虫,在室温下处理 1、6、12、24 和 48 h 时检查线虫死亡率。每个浓度做 10 个处理,3 次重复,并以清水作对照。

1.2.4 温室盆栽试验 将供试番茄播种于灭菌土中,当 2 片真叶完全展开时,植株移栽于直径 8 cm 的塑料钵中。移栽 5 d 后,分别浇稀释 1、10、100 倍的菌悬液 10 mL,2 d 后每株接种 500 条幼虫到番茄根部,每处理

接种 10 株,3 次重复,并以无菌水作为模拟接种对照。蕃茄苗接种后在 25~28℃ 下培养 8 周,然后用水轻洗根系检测根结数及卵块数。

1.3 数据分析

结果采用 SAS 9.1 软件 ANOVA 程序分析数据差异显著性。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与鉴定

分离出的 Bs-18 菌株在 LB 培养基上形成乳白色圆形菌落边缘较整齐,呈革兰氏阳性。将 PCR 扩增的得到的 16S rDNA 片段进行测序,片段长度为 1 514 bp(图 1),其序列在基因库(www. ncbi. nlm. nih. gov)中进行 blastn 对比,发现其序列与枯草芽孢杆菌 C9-1 菌株的 16S rDNA 序列(EU257446)符合率分别为 99.0%,排除期望值为 0。因此,初步鉴定 Bs-18 菌株为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

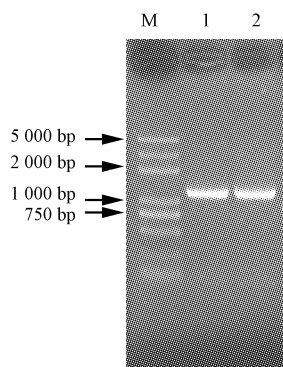


图 1 Bs-18 菌株 16S rDNA 片段凝胶检测

注:M 为 DNA marker,1,2 为 Bs-18 菌株 16S rDNA 片段。

2.2 Bs-18 菌液对南方根结线虫活性的影响

在处理 1 h 时发现 Bs-18 菌株发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的活性有作用,死亡线虫虫体僵硬不动,伸直或略有弯曲,虫体灰暗没有光泽。将线虫放入清水中不能复活,证实线虫死亡。由表 1 可知,原液和 10 倍稀释菌液对线虫具有明显的抑制作用,在处理 12 h 后对线虫的杀死率均接近 100%。100 倍稀释液对线虫的杀死作用明显降低,在 1 h 时死亡率仅达到 31.7%,在 6 h 时为 45.9%,但在 48 h 后发酵液对线虫的杀死率也达到了 74.3%。在清水对照中线虫始终保持活跃状态,线虫均呈现有规律的“S”形运动,在 48 h 时个别线虫出现僵直现象。方差分析表明,处理与对照之间的死亡率存在极显著差异,而对照之间差异不显著,说明 Bs-18 菌液对线虫具有明显的致死作用。

2.3 Bs-18 菌株温室防治根结线虫效果

Bs-18 菌剂处理黄瓜根际土壤 8 周后,检查根结及卵块的数量。在对照中根结和卵块数量较多,根结较

大。菌剂处理中根结和卵块少且小,其中以原液和 10 倍稀释菌悬液处理组根结和卵块数量减少最为明显,单株根结数量分别为 26.1 和 33.7 个,与对照相比,根结减退率分别达到了 81.8% 和 76.6%。相应的卵块数量也明显降低。而 100 倍稀释液处理中根结和卵块的数量明显增多,达到 97.5 个,根结减退率只有 32.1%。记录各处理番茄苗的平均根结及卵块数量,并采用 SAS 软件进行方差分析结果表明,Bs-18 菌剂处理与对照之间存在极显著差异(表 2)。说明 Bs-18 菌剂在高浓度下可以有效地防治根结线虫。

表 1 Bs-18 菌株发酵液对南方根结线虫 2 龄幼虫的致死率

处理	处理时间/h				
	1	6	12	24	48
1×Bs-18	90.5 EF	99.8 F	99.9 F	100 F	100 F
10×Bs-18	82.4 E	95.2 F	98.6 F	100 F	100 F
100×Bs-18	31.7 B	45.9 C	70.5 D	72.5 D	74.3 D
对照(无菌水)	0.0 A	0.1 A	0.5 A	0.9 A	2.2 A

注:不同大写字母表示在 $P<0.01$ 水平具有显著差异,下同。

表 2 Bs-18 菌株防治根结线虫病的效果

处理	单株根结数	根结减退率/%	单株卵块数	卵块减退率/%
1×Bs-18	26.1 C	81.8	19.3 C	76.3
10×Bs-18	33.7 C	76.5	23.4 C	71.2
100×Bs-18	97.5 B	32.1	52.6 B	35.3
对照(无菌水)	143.5 A	—	81.3 A	—

注:菌剂含量为 $(1\sim2)\times 10^9$ cfu · mL⁻¹。

3 讨论

枯草芽孢杆菌是一种重要的生防资源,从根结线虫土壤中分离到的 Bs-18 菌株在离体试验及温室试验中对根结线虫具有良好的防治效果,Bs-18 菌株处理根结线虫后,在高浓度下可以很快地杀死根结线虫,在原液及 10 倍稀释液处理中 6 h 即可达到 95% 的致死效果,但是随着菌液浓度的降低,防治效果明显下降,说明菌量及发酵条件与防治效果紧密相关。这为进一步通过优化发酵条件形成高效的生物菌剂进行田间防治根结线虫危害奠定了基础。

在温室试验中,Bs-18 菌株发酵液在盆栽试验中取得了很高的防治效果,根结的减退率到了 81.8%,10 倍稀释液也达到了 76.5% 的防治效果,这可能与试验中采用灭菌土作为栽培介质相关,在田间自然生长条件下,土壤中含有大量微生物形成的微生态环境会对生防菌产生影响,因此在田间条件下 Bs-18 菌株对根结线虫的防治效果还需要作进一步验证。

参考文献

- [1] Abad P, Gouzy J, Aury J M, et al. Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26: 909-915.
- [2] 刘维志,段玉玺. 植物病原线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2000: 243-281.

不同药剂对感染根结线虫黄瓜生理性状的影响

卢树昌¹, 刘慧芹², 王小波¹, 王瑞¹

(1. 天津农学院 农学系, 天津 300384; 2. 天津农学院 园艺系, 天津 300384)

摘要:以根结线虫侵染后的黄瓜幼苗为试材, 用无线美、海绿素、毒线丹、阿维菌素处理种植土壤后, 测定了黄瓜叶绿素、SOD、POD、相对电导率含量的变化, 检测药剂对线虫的防治效果。结果表明: 经药剂处理后, 黄瓜叶部的 SOD 活性高于对照, 在 4 种药剂中以无线美的最高; 处理的 POD 活性均显著高于对照, 其中无线美处理值是对照的 3 倍多; 药剂处理的相对电导率均显著低于对照。根结线虫侵染番茄后, 经不同药剂处理均有一定的防效, 且使黄瓜的生理指标有明显变化。

关键词:根结线虫; SOD; POD; 相对电导率

中图分类号:S 436.642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)01-0132-03

近年来黄瓜病害种类增多, 蔓延速度快, 防治难度大, 其中黄瓜根结线虫病尤为引起人们的注意^[1]。黄瓜根结线虫病是近年来危害黄瓜的一种重要根部病害, 分布普遍。这种病害在温室、大棚和露地等栽培的黄瓜植株上都有发生, 可直接导致减产 30%~70%^[2]。黄瓜根

结线虫病的防治也成为学者们的研究热点, 防治方法主要有农业防治、物理防治、化学防治、生物防治、微生物源及植物源农药防治等^[3]。其中化学防治在根结线虫的防治过程中占有重要地位, 在实际生产中效果明显, 是菜农常用的方法^[4]。但目前使用的化学杀线剂存在毒性大、环境污染严重、线虫易产生抗药性等诸多问题^[5]。植株根系侵染土壤根结线虫后, 根系局部形成根结瘤, 根系吸收水分、矿质养分性严重受抑制, 进而影响植株光合作用、酶系统及膜透性等生理性状, 如叶绿素、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、丙二醛

第一作者简介:卢树昌(1970-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事园艺作物土壤质量与植物营养的研究工作。E-mail: lsc9707@163.com。

基金项目:天津市农业科技成果转化与推广资助项目(0804140)。

收稿日期:2011-09-29

[3] Johnson A W. Vegetable crops. In G Pederson, G Windham, K Barker, eds, Plant-Nematode Interactions[J]. Agronomy Society of America, Madison, WI, 1998:595-635.

[4] Becker J O, Zavaetamejia E. Effects of rhizobacteria on root knot nematodes and gall formation[J]. Phytopathology, 1998, 78(11):1466-1469.

[5] 付艳平, 褚世海, 王明祖. 筛选根际促生细菌防治蔬菜根结线虫[J]. 云南农业大学学报, 1999, 6(增):66-69.

[6] 刘玮琦, 郝振川, 杨宇红, 等. 应用 16S rRNA 基因文库技术分析土壤细菌群落的多样性[J]. 微生物学报, 2008, 48(10):1344-1350.

Screening and Identification of *Bacillus subtilis* Strain Bs-18 and Its Biocontrol Evaluation Against *Meloidogyne incognita*

ZHANG Yu-qin

(Tangshan Vocational and Technical College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: A strain Bs-18 was got from the soil surrounding plant root, and based on the blast of 16S rDNA sequence, the strain Bs-18 was identified as *Bacillus subtilis*. *In vitro*, the root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) second stage juveniles (J2) were treated with bacterial suspension of strain Bs-18. Responding to 6 hours treatment, the motility of nematode reached to 99.8% and 95.2% in the bacterial suspension and 10 times dilution of strain Bs-18 respectively. In greenhouse, the quantity of gall and egg mass of the strain Bs-18 treatment were decreased significantly, the galls of 81.8% and 76.5% were less in the treatment of suspension and 10 times dilution of Bs-18 than in the control group. This revealed that the nematocide effectiveness the strain Bs-18 was obviously.

Key words: *Bacillus subtilis*; *Meloidogyne incognita*; screening; identification