

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2013.01.004

相似穿孔线虫拮抗细菌的筛选及分子鉴定

朱莲英^{1,2}, 吴凤芝¹, 赵志祥¹, 王会芳¹, 陈绵才^{1*}

¹海南省农业科学院农业环境与植物保护研究所, 海南省植物病虫害防控重点实验室, 海南 海口 571100;

²海南大学环境与植物保护学院, 海南 海口 570228

摘要:【背景】相似穿孔线虫是一种重要的检疫性有害生物,其寄主范围广,危害具有毁灭性,已给我国农业生产造成潜在威胁。由于目前大多化学杀线剂毒性较高,筛选获得对相似穿孔线虫具有拮抗活性的微生物菌株对线虫防控具有重要意义。【方法】广泛从染病香蕉植株根际采集土壤样本,运用等比稀释涂布平板法分离菌株;采用摇瓶发酵法制备拮抗菌株上清液和发酵液。通过室内生物测定和盆栽试验,筛选出对相似穿孔线虫具有拮抗作用的细菌菌株,并通过 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析,对拮抗菌株进行种类鉴定。【结果】获得 5 株对相似穿孔线虫具有较理想拮抗活性的细菌菌株。其中,菌株 HD-86 的作用效果最好,其发酵上清液处理 24 h 后的相似穿孔线虫死亡率达 100%。盆栽试验表明,菌株 HD-86 发酵液处理 42 和 70 d 后对相似穿孔线虫的相对防效分别为 77.34% 和 90.51%,均优于对照药剂阿维菌素。【结论与意义】菌株 HD-86 对相似穿孔线虫具有很强的拮抗作用,将其鉴定为洋葱伯克氏菌 *Burkholderia cepacia*。本研究可为相似穿孔线虫生防制剂的研发和病害的防控提供依据。

关键词: 相似穿孔线虫; 拮抗细菌; 洋葱伯克氏菌

Screening and molecular identification of antagonistic bacteria to *Radopholus similis*

Lian-ying ZHU^{1,2}, Feng-zhi WU¹, Zhi-xiang ZHAO¹, Hui-fang WANG¹, Mian-cai CHEN^{1*}

¹Hainan Key Laboratory for Control of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Environment & Plant Protection, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571100, China; ²Environment and Plant Protection College, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: 【Background】*Radopholus similis* is an important quarantine pest that has wide host range and can cause a serious damage. It has become a potential threat to Chinese agricultural production. Because of the high toxicity of chemical nematicides, screening for and identifying potential bio-control microbes antagonist to nematodes is of important significance. 【Method】Soil samples were collected from the banana fields infected by *R. similis*, and the strains were isolated by the method of gradient dilution. The antagonistic bacterial supernatant and fermentation broth were obtained using shaking flask fermentation technique. Five isolates were screened against *R. similis* using toxicity tests and pot assay in greenhouse. The antagonistic bacteria were identified by amplification of 16S rDNA gene and sequence analysis. 【Result】Among five isolates, strain HD-86 had the best antagonistic effect with 100% mortality after 24 hours treatment of fermentation supernatant. In greenhouse trial, strain HD-86 showed the highest antagonistic activity against *R. similis*, compared to other strains and abamectin. HD-86's performances 42 days and 70 days after fermented inoculation were 77.34% and 90.51% respectively. 【Conclusion and significance】HD-86 has a strong antagonistic to *R. similis*. Based on 16S rDNA sequence analysis, it was identified as *Burkholderia cepacia*. The basic basis for the development of nematicide and control of *R. similis* are provided in this paper.

Key words: *Radopholus similis*; antagonistic bacteria; *Burkholderia cepacia*

植物寄生线虫是一类重要的病原物,分布广,种类多,全世界已报道的植物寄生线虫有 200 多个属 5000 余种,给农林业生产造成严重危害(冯志新,2001)。现阶段植物寄生线虫病的防治多采用化学药剂、轮作和抗病品种,对于香蕉这种多代生长的植物来说,轮作可行性较小。目前使用的化学

收稿日期(Received): 2013-01-05 接受日期(Accepted): 2013-02-01
基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903040); 海南省自然科学基金项目(312081)
作者简介: 朱莲英,女,硕士。研究方向: 植物线虫。E-mail: zhulianying2010@163.com
* 通讯作者(Author for correspondence), E-mail: mcchen@263.net

杀线剂一般属高毒、高残留农药,不但给微生物、植物、水源和大气层带来严重污染和破坏,而且会直接对人体造成危害。近年来,随着国家大力倡导农业生产的可持续发展,线虫生物防治越来越受到重视,特别是利用细菌、真菌的代谢产物控制线虫病害已取得显著成果(刘丹丹,2007;牛秋红等,2010)。由于根际细菌是从植物根际分离所得,具有与根亲和力强、拮抗性强、易于培养应用等特点,利用根际细菌防治寄生线虫已成为国内外研究热点之一(郭荣君等,1996)。目前,已有坚强芽孢杆菌 *Bacillus firmus*、巨大芽孢杆菌 *B. megaterium*、短小杆菌 *Curtobacterium luteum*、荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 和恶臭假单胞菌 *P. putida* 对相似穿孔线虫 *Radopholus similis* (Cobb) Thorne 具有拮抗活性的报道(Aalten *et al.*, 1998; Aravind *et al.*, 2010; Mendoza *et al.*, 2008)。笔者运用等比稀释涂布平板法试图从染病香蕉植株根际土壤分离菌株,通过室内生物测定和盆栽试验,筛选获得对相似穿孔线虫具有毒杀活性的菌株,以期对相似穿孔线虫病的生物防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

土样采集:采用十点取样法从 5 ~ 15 cm 土层采集感染相似穿孔线虫的香蕉根际土壤,共采集 39 份土样。土样自然风干后过 200 目筛,封装于密封袋中并编号,置于 4 °C 冰箱保存备用。

供试线虫:相似穿孔线虫由海南省农业科学院农业环境与植物保护研究所植物病理实验室保存于胡萝卜愈伤组织上。

供试植物:香蕉 *Musa paradisiaca* L.。

1.2 拮抗菌株的分离和保存

采用等比稀释分离法分离拮抗菌株。每个土样称取 5 g 粉末置于无菌三角瓶中,加入 100 mL 无菌水,于 160 r·min⁻¹ 振荡 30 min,按 10 倍稀释法依次稀释至 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶。各吸取 200 μL 稀释液涂布于 KB 培养基平板上,用封口膜封好,培养皿放于 28 °C 生化培养箱中倒置培养 48 h。每个土样和稀释梯度均重复 3 次。

挑取单菌落于装有 1 mL 液体培养基的 2 mL 无菌离心管中,在 160 r·min⁻¹、28 °C 下摇床振荡 12 h。然后用无菌移液枪吸取 200 μL 菌液与 60 μL 50% 甘油混合于 96 孔板中, -20 °C 冰箱保存备用。

1.3 相似穿孔线虫的培养

将分离获得的相似穿孔线虫进行纯化培养。从中挑选活力较强的相似穿孔线虫 25 条置于盛有 1 mL 无菌水的 2 mL 无菌试管中,加入 0.5 mL 0.5% 硫酸链霉素,3 ~ 6 h 后,用无菌移液枪吸去上层液,加入 1 mL 无菌水,轻轻震荡。然后以 4 °C、3500 r·min⁻¹ 离心 3 min,弃上清液,再加无菌水,离心,重复 2 ~ 3 次。超净工作台上用灭菌移液枪将无菌线虫悬浮液吸到胡萝卜愈伤组织上,置于 25 °C 生化培养箱中黑暗培养 40 ~ 60 d,获大量纯化的相似穿孔线虫备用(陈淳等,2006)。

1.4 分离菌株的培养与上清液的制备

采用摇瓶发酵法,从 -20 °C 冰箱中取出 96 孔板,分别吸 1 μL 菌液于装有 20 mL NA 液体培养基的三角瓶中,于 28 °C 下 160 r·min⁻¹ 摇床振荡培养 72 h。分离菌株的培养物于 4 °C、6000 r·min⁻¹ 离心 2 min,取上清液备用。

1.5 相似穿孔线虫拮抗菌株的筛选

分离的细菌菌株对相似穿孔线虫的活性测定在 24 孔平底细胞培养板中进行。每孔加入 1 mL 分离菌株的上清液和相似穿孔线虫约 300 条·孔⁻¹,以无菌水处理为对照,每个处理重复 3 次。处理 4、8、12、24 和 48 h 后分别观察和计数。基于供试线虫的假死现象,在体视显微镜下用自制毛笔刺激线虫,僵直不动视为死亡,呈弯曲蠕虫状为活虫。

生测结果计算参照陈立杰等(2008)的方法:线虫死亡率(%) = 死亡线虫数/供试线虫数 × 100。

数据处理采用 EXCEL 2003 软件,统计分析采用 DPS v7.05 软件,用 Duncan's 新复极差法在 5% 显著水平上进行多重比较。

1.6 盆栽试验

采用发酵液浸根和灌根法测定拮抗菌株发酵液对相似穿孔线虫的活性。将获得的拮抗菌株菌剂浓度调至 10⁹ cfu·mL⁻¹,以 1.8% 阿维菌素乳油 1500 倍液作阳性对照,以无菌水作阴性对照。用供试菌株的培养液浸泡香蕉根部 10 min,移栽入塑料钵中,每钵 1 株香蕉苗,重复 3 次;再用相应生防菌剂灌根处理,每株 3 mL。48 h 后接相似穿孔线虫,每盆接种线虫 1500 条,7 d 后用相应菌剂灌根处理,每株 3 mL。接种 42 和 70 d 后,将植株整盆倒出,测量香蕉株高、根质量和茎围,计数根部相似穿孔线虫数量,并对结果进行统计分析,方法同 1.5。

生防效果测定参照 Chaves *et al.* (2009) 的方法: $BC(\%) = 100 \times [1 - (N_T/N_C)]$ 。

式中: N_T 指拮抗菌处理存活的线虫数量, N_C 指空白对照存活的线虫数量。

1.7 拮抗菌株的分子鉴定

1.7.1 细菌菌液的制备 从划线培养的平板上挑取单菌落接种到 100 mL LB 液体培养基中,于 37 ℃、200 r·min⁻¹振荡培养 12 h,活化菌株备用。

1.7.2 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析 细菌基因组的提取及 16S rDNA 的扩增参照牛秋红等 (2005) 的方法,采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492 R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') 进行扩增 (赵志祥等,2010)。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并按照百泰克胶回收试剂盒的说明,回收约 1.5 kb 的 DNA 片段。

1.7.3 测序及序列分析 将上述回收的 DNA 片段连接到克隆载体 pMD18T (TaKaRa) 上,筛选阳性克隆载体并送至上海生工生物技术有限公司进行测序。将拼接好的序列在 Blast 软件的 Genbank 数据库中搜索相似性,选取同源性最高的典型菌株进行序列比对分析及构建系统进化树,从而对菌株进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株上清液对相似穿孔线虫幼虫的活性

对分离到的 789 株细菌菌株进行杀线虫活性初步筛选,结果发现,96 株供试菌株的发酵上清液对相似穿孔线虫幼虫的致死率均达到 80% 以上。其中,5 株细菌 (编号 HD-34、HD-46、HD-54、HD-86、HD-93) 菌株发酵上清液在 24 h 内对相似穿孔线虫幼虫的致死率达 90% 以上,在 48 h 内致死率达 100% (表 1、图 1)。

表 1 拮抗菌株上清液对相似穿孔线虫的活性

Table 1 Activity of antagonistic strains supernatants on *R. similis*

处理 Treatment	线虫死亡率 Nematode mortality (%)				
	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
HD-86	48.11a	79.00a	94.44a	100.00a	100.00a
HD-54	40.43a	62.00b	80.56b	96.44ab	100.00a
HD-46	20.89b	38.11c	60.78c	95.00ab	100.00a
HD-34	21.44b	39.33c	50.78c	91.66b	100.00a
HD-93	13.78b	26.78d	57.67d	90.78b	100.00a
无菌水 ddH ₂ O (CK)	4.22c	6.78e	7.89e	9.56c	10.78b

同列数据标有不同字母者为差异显著 ($P < 0.05$)。
Values with different letters in the column differ significantly at 0.05 level.

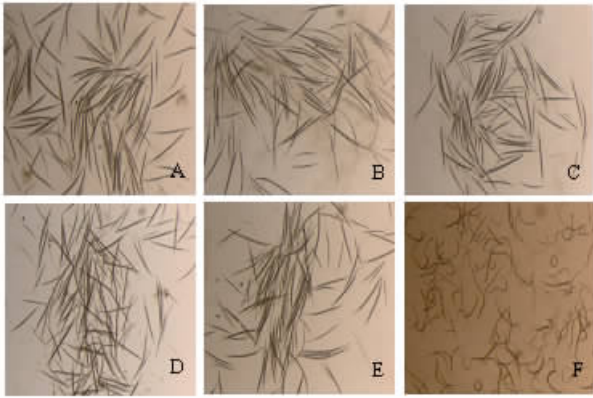


图 1 5 个菌株发酵上清液 24 h 对相似穿孔线虫的拮抗作用
Fig. 1 Effect of five antagonistic bacterial supernatant on *R. similis*, 24 hours after inoculation
A. HD-34; B. HD-46; C. HD-54; D. HD-86; E. HD-93; F. CK.

2.2 拮抗菌株发酵液对香蕉相似穿孔线虫的防控效果

结果表明,接种 5 株拮抗细菌 42 d 后,各处理的香蕉根部存活线虫数量均大幅度减少,其中以 HD-86 表现最好,相对防治效果达 77.34%,与阿维菌素的防效相当 (表 2)。接种 70 d 后,HD-86 和 HD-54 处理的香蕉根部存活的线虫数量持续下降,相对防效分别达 90.51% 和 90.18%,而阿维菌素的防效仅为 63.97%;此时,与空白对照相比,5 株拮抗细菌处理的香蕉植株株高、茎直径和根质量均明显增大,差异均达显著水平 (表 3)。从结果还可以看出,5 个拮抗细菌菌株在接种后 42 ~ 70 d 对相似穿孔线虫的防治效果均呈上升态势,而阿维菌素的防治效果却明显下降,表明这些拮抗菌株对相似穿孔线虫的防控具有较长的持效期。

2.3 拮抗菌株 16S rDNA 的 PCR 扩增和序列分析

2.3.1 PCR 产物电泳及回收转化 以提取和纯化的拮抗细菌基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增,1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收,获得约 1500 bp 的 DNA 片段 (图 2)。

2.3.2 序列分析 经上海生工生物技术有限公司测序,从菌株 HD-34、HD-46、HD-54、HD-86 和 HD-93 中扩增所获得的基因片段分别为 1665、1516、1509、1509 和 1516 bp,其与 Genbank 数据库中属的相似性见表 4。

表 2 室内盆栽香蕉接种拮抗细菌 42 d 后对相似穿孔线虫的作用效果

Table 2 Control effect of five antagonistic bacteria on *R. similis* in potting banana trial in greenhouse, 42 days after inoculation

处理 Treatment	叶片数(片) Number of leaves	株高 Plant height (cm)	茎直径 Pedicel width (cm)	根质量 Root weight (g)	线虫数(条) Number of <i>R. similis</i>	防治效果 Control effect (%)
HD-34	9.00a	16.50b	1.80b	7.42bc	151.67b	64.45f
HD-46	9.00a	15.00bc	2.00a	7.54bc	131.00cd	69.39d
HD-54	9.00a	18.00a	2.00a	6.92c	109.00ef	74.53b
HD-86	9.00a	16.30b	1.70bc	8.34b	97.00f	77.34a
HD-93	9.00a	15.80b	1.60c	5.00d	148.33bc	66.12e
阳性 CK(阿维菌素) Positive CK (abamectin)	9.00a	18.40a	2.00a	11.59a	126.67de	72.20c
阴性 CK(清水) Negative CK (water)	9.00a	14.00c	1.60c	3.51e	462.33a	

同列数据标有不同字母者为差异显著($P < 0.05$)。
Values with different letters in the column differ significantly at 0.05 level.

表 3 室内盆栽香蕉接种拮抗细菌 70 d 后对相似穿孔线虫的作用效果

Table 3 Control effect of five antagonistic bacteria on *R. similis* in potting banana trial in greenhouse, 70 days after inoculation

处理 Treatment	叶片数(片) Number of leaves	株高 Plant height (cm)	茎直径 Pedicel width (cm)	根质量 Root weight (g)	线虫数(条) Number of <i>R. similis</i>	防治效果 Control effect (%)
HD-34	12.00a	27.00b	2.98bc	26.10c	264.33c	74.33d
HD-46	12.00a	25.50c	2.50d	24.73d	169.00e	81.77b
HD-54	12.00a	27.00b	3.15b	30.00a	91.33f	90.18a
HD-86	12.00a	27.50a	3.40a	26.29c	88.00f	90.51a
HD-93	10.00b	23.50e	2.40de	19.17e	201.67d	77.45c
阳性 CK(阿维菌素) Positive CK (abamectin)	10.00b	24.50d	2.95c	28.00b	321.67b	63.97e
阴性 CK(清水) Negative CK (water)	10.00b	19.50f	2.30e	8.64f	927.00a	

同列数据标有不同字母者为差异显著($P < 0.05$)。
Values with different letters in the column differ significantly at 0.05 level.

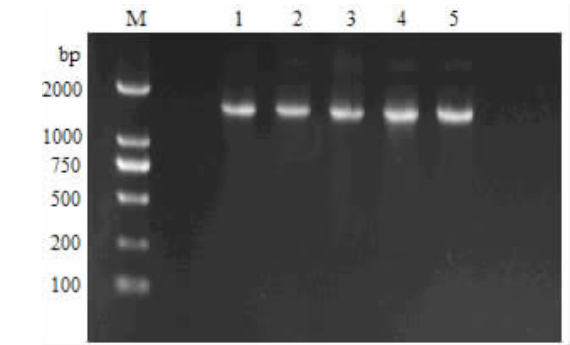


图 2 拮抗菌株 16S rDNA 基因扩增产物

Fig.2 PCR amplification of antagonistic bacteria 16S rDNA gene by bacterial universal primers
M:DNA Marker DL2000 bp; 1,2,3,4,5:HD-34,HD- 46, HD-54,HD- 86,HD-93.

表 4 5 株拮抗细菌菌株与属的相似性

Table 4 The similis of five antagonistic bacteria with genus

菌株编号 Strain code	属名 Genus	相似性 Similis (%)
HD-34	<i>Burkholderia</i>	100.00
HD-46	<i>Enterobacter</i>	99.25
HD-54	<i>Burkholderia</i>	100.00
HD-86	<i>Burkholderia</i>	100.00
HD-93	<i>Enterobacter</i>	99.52

将测定的拮抗菌株 HD-86 的基因序列结果登录 Genbank 进行 Blast 检索,并与已报道的 16S rDNA 序列进行比对,构建系统发育树(图 3),发现该菌株的序列与 *Burkholderia cepacia* isolate MSMB10 单独构成一个分支,由此将其鉴定为洋葱伯克氏菌 *Burkholderia cepacia*。

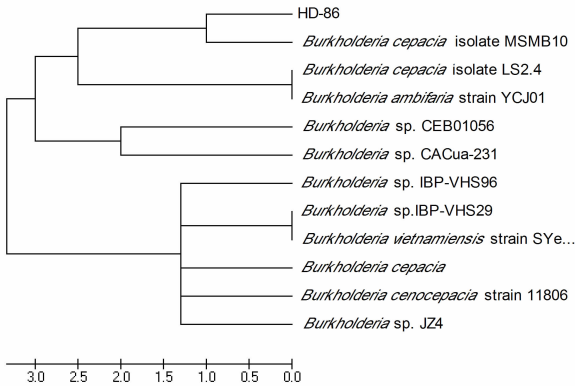


图 3 菌株 HD-86 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain HD-86

3 讨论

细菌的繁殖速度快,易于培养,所需要的养分简单,成本低,因而利用细菌开发环保生物农药防治植物线虫病害,越来越具有研究和应用价值。然而,目前我国对细菌的杀线虫活性机理方面的研究起步较晚,需要筛选出大量的具有杀线虫活性的细菌资源为其提供研究基础(牛秋红等,2005)。本研究从香蕉根际土壤获得了5株对相似穿孔线虫具有拮抗活性的细菌菌株,一定程度上丰富了杀线虫微生物的利用资源。

前人研究证实,植物线虫拮抗细菌有芽孢杆菌和荧光假单胞杆菌等(Aalten *et al.*, 1998; Aravind *et al.*, 2010)。本文从染病香蕉植株根际土壤分离物中筛选到1株编号为HD-86的对相似穿孔线虫具有极高拮抗活性的细菌菌株,并将其鉴定为伯克霍尔德菌属下的洋葱伯克氏菌。据报道,伯克霍尔德菌属细菌能抑制植物病原真菌,具有生物防治和促进植物生长的功能(陈京元等,2011; 权春善等, 2005)。本研究的生物测定和盆栽试验结果表明,菌株HD-86不仅能有效地控制相似穿孔线虫的种群数量,而且持效期长,同时明显促进香蕉植株生长。这可能与香蕉根部接种HD-86后,细菌在植株根部区域大量增殖,或者产生某些混合物质共同抑制相似穿孔线虫的生长与繁殖有关,也可能是其诱导植物抗性,从而减轻了线虫对香蕉植株的侵染(Perry & Moens, 2012)。尽管如此,洋葱伯克氏菌对相似穿孔线虫的作用方式和作用机理,以及其能否开发成菌剂进行商品化生产,均有待进一步探索和研究。

参考文献

陈淳, 谢辉, 蔚应俊, 韩玉春, 秦丹, 黄春晓, 唐炯. 2006. 香蕉相似穿孔线虫培养技术及其种群繁殖力研究. 华南农业大学学报, 27(1): 61–64.

陈京元, 蔡三山, 林亲雄. 2011. 洋葱伯克霍尔德菌 C23 抗菌活性多肽的分离纯化. 林业科技开发, 25(4): 22–24.

陈立杰, 刘彬, 段玉玺, 张国栋. 2008. 白僵菌发酵液对不同种类线虫生物活性的影响. 沈阳农业大学学报, 39(3): 305–308.

冯志新. 2001. 植物线虫学. 北京: 中国农业出版社.

郭荣君, 刘杏忠, 杨怀文. 1996. 应用根际细菌防治植物寄生线虫的研究. 中国生物防治, 12(3): 134–137.

刘丹丹. 2007. 球孢白僵菌杀线虫活性物质分离纯化研究. 沈阳: 沈阳农业大学.

牛秋红, 董冰雪, 黄思良, 惠丰立, 柯涛, 张林. 2010. 松材线虫生防细菌的筛选、鉴定及其毒性因子的初步研究. 中国生物工程杂志, 30(8): 76–81.

权春善, 郑维, 曹治明, 王军华, 范圣第. 2005. 洋葱伯克霍尔德菌 CF66 抗菌物质的分离纯化及性质的研究. 微生物学报, 45(5): 707–710.

赵志祥, 芦小飞, 陈国华, 杨宇红, 茆振川, 刘二明, 谢丙炎. 2010. 温室黄瓜根结线虫发生地土壤微生物宏基因组文库的构建及其一个杀线虫蛋白酶基因的筛选. 微生物学报, 50(8): 1072–1079.

Aalten P M, Vitour D, Blanvillain D, Gowen S R and Sutra L. 1998. Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant-parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. . *Letters in Applied Microbiology*, 27: 357–361.

Aravind R, Eapen S J, Kumar A, Dinu A and Ramana K V. 2010. Screening of endophytic bacteria and evaluation of selected isolates for suppression of burrowing nematode (*Radopholus similis* Thorne) using three varieties of black pepper (*Piper nigrum* L.). *Crop Protection*, 29: 318–324.

Chaves N P, Pocasangre L E, Elango F, Rosales F E and Sikora R. 2009. Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and for effects on plant growth. *Scientia Horticulturae*, 122: 472–478.

Mendoza A R, Kiewnick S and Sikora R A. 2008. In vitro activity of *Bacillus firmus* against the burrowing nematode *Radopholus similis*, the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and the stem nematode *Ditylenchus dipsaci*. *Biocontrol Science and Technology*, 18: 377–379.

Perry R N and Moens M. 2012. 植物线虫学. 简恒, 译. 北京: 中国农业大学出版社.

(责任编辑:彭露)

