

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.20230115

马尾松叶际细菌多样性及其杀松材线虫活性

詹梦琳^{1,2}, 何娇萍¹, 曾丽琼³, 何学友³, 林可竟¹, 蔡学清^{1*}
¹福建农林大学植物保护学院, 福建 福州 350002; ²三明市农业科学研究院, 福建 三明 365051;
³福建省林业科学研究院, 福建 福州 350012

摘要:【目的】分析马尾松叶际细菌种群多样性, 挖掘其菌株资源; 获得具有杀松材线虫活性的菌株, 明确其分类地位, 为松材线虫病的生物防治提供菌株资源。【方法】通过平板分离培养法从福建宁德古田、霞浦及三明尤溪的马尾松植株上分离叶际细菌, 通过菌落形态特征、16S rDNA PCR-RFLP 对供试菌株进行分类; 采用离心管培养法测定叶际细菌的杀松材线虫活性, 通过生理生化特性测定、16S rDNA 基因和 *gyrB* 基因序列分析明确拮抗菌株的分类地位。【结果】从福建宁德古田、霞浦及三明尤溪的马尾松植株上分离纯化获得 141 株马尾松叶际细菌, 根据菌落形态特征将其分为 9 类, 扩增获得的 16S rDNA 经 *Hae* III 和 *Msp* I 酶切后分别有 9 和 11 种图谱类型, 将 2 种酶切图谱组合后, 在 100% 相似水平下, 供试菌株共有 19 种图谱类型。以 NB 培养基或无菌水为对照, 松材线虫的 48 h 校正死亡率为指标, 经测定具有不同程度杀线虫效果的菌株有 120 株, 占细菌总数的 85.11%; 以 NB 培养基为对照, 松材线虫校正死亡率大于 50% 的菌株有 11 株, 占筛选总数的 7.80%, 其中杀松材线虫效果最好的菌株为 GT10, 其 48 h 杀线虫率为 92.56%; 该菌株为革兰氏阳性菌, 菌体杆状、周生鞭毛, 可利用甘露醇和柠檬酸盐, 硝酸还原反应和 V-P 试验呈阳性, 系统发育树分析结果显示, 菌株的 16S rDNA 基因和 *gyrB* 基因的序列均与蜡样芽胞杆菌模式菌株 ATCC14579 聚为一支, 将菌株 GT10 鉴定为蜡样芽胞杆菌。【结论】马尾松叶际细菌具有丰富的多样性, 其中蜡样芽胞杆菌菌株 GT10 具有较高的杀松材线虫活性, 具有防治松材线虫病的潜力。

关键词: 马尾松; 叶际细菌; PCR-RFLP; 松材线虫; 蜡样芽胞杆菌



开放科学标识码
(OSID 码)

The diversity of phyllospheric bacteria of *Pinus massoniana* and its nematicidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus*

ZHAN Menglin^{1,2}, HE Jiaoping¹, ZENG Liqiong³, HE Xueyou³, LIN Kejing¹, CAI Xueqing^{1*}
¹College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China;
²Sanming Academy of Agricultural Sciences, Sanming, Fujian 365051, China;
³Fujian Academy of Forestry, Fuzhou, Fujian 350012, China

Abstract: 【Aim】The main goal was to explore the strain resources of phyllospheric bacteria of *Pinus massoniana* and analyze its population diversity. Moreover, we aimed to screen strains with *Bursaphelenchus xylophilus* killing activity and clarify their classification status, as well as to provide strain resources for biological control of pine wilt disease. 【Method】Using plate separation culture method, the phyllospheric bacteria of *P. massoniana* was isolated and cultivated from Gutian and Xiapu counties of Ningde and Youxi county of Sanming. Bacterial strains were classified based on colony morphological characteristics and 16S rDNA PCR-RFLP analysis. The killing activity of the phyllospheric bacteria against *B. xylophilus* was determined using a centrifuge tube culture. The classification status of the antagonistic strains was determined through physiological and biochemical characterization and 16S rDNA and *gyrB* gene sequence analysis. 【Result】The 141 phyllospheric bacterial strains of *P. massoniana* were isolated from plants from Gutian and Xiapu counties of Ningde and Youxi county of Sanming. The 141 strains of phyllospheric bacteria of *P. massoniana* were classified into nine types based on colony morphology. The 16S rDNA obtained by amplification was digested with *Hae*III and *Msp*I, and there were nine and 11 map types, respectively. At 100% similar level, the 141 strains of phyllospheric bacteria had 19 map

收稿日期 (Received): 2023-12-30 接受日期 (Accepted): 2024-04-30
基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0201106-02); 福建省林木种苗科技攻关六期项目 (KJH19H01A); 福建省科技特派员工作经费 (KTP21267A)
作者简介: 詹梦琳, 女, 硕士。研究方向: 植物病理学。E-mail: menglin0120@163.com
* 通信作者 (Author for correspondence), 蔡学清, E-mail: caixq90@163.com

types after combining the two map types. Using NB medium or sterile water as the control and the 48 h corrected mortality rate of *B. xylophilus* as the indicator, 120 strains with varying degrees of nematocidal effects were screened, accounting for 85.11% of the total screened strains. Using NB medium as the control, 11 strains with a corrected mortality rate greater than 50% of *B. xylophilus*, accounted for 7.80% of the total screened strains. Among them, the strain with the best nematocidal effect was strain GT10, with a 48 h nematode killing rate of 92.56%. The strain was gram-positive (G^+) with rod-shaped, peritrichous flagella. The strain was able to utilize mannitol and citrate and showed positive results in the nitrate reduction reaction and V-P determination. Phylogenetic tree analysis showed that the 16S rDNA sequence and *gyrB* gene sequence of the strain clustered with those of the *B. cereus* model strain ATCC14579. Therefore, the strain GT10 was identified as *B. cereus*. 【Conclusion】 There was rich diversity of phyllospheric bacteria of *P. massoniana*. The *B. cereus* strain GT10 had a high nematocidal effect against *B. xylophilus* and could potentially be used for the biological control of pine wilt disease.

Key words: *Pinus massoniana*; phyllospheric bacteria; PCR-RFLP; *Bursaphelenchus xylophilus*; *Bacillus cereus*

松材线虫病又称松树枯萎病(Pine wilt disease, PWD),是由松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Buhrer) Nickle 引起的一种全球性森林病害,可导致松树的树脂道周围空化和木质部导管功能障碍(张弘弢等,2021),进而引起松树萎蔫、死亡。我国自首次发现松材线虫病以来,已累计致死松树达 5 亿多株,导致的直接和间接经济损失高达上百亿元(叶建仁,2019)。松材线虫病的防治主要包括植物检疫、疫木除治、诱杀媒介昆虫、化学防治、生物防治以及树干注射等(叶建仁,2019)。但化学防治在防治松材线虫及松墨天牛 *Monochamus alternatus* Hope 的同时,可能会危害其他有益生物,对生态环境和人畜安全有一定隐患。生物防治具有安全、环保以及对病原生物高度特异性等优点,故利用生防微生物对松材线虫病进行防治已成为目前的研究热点(张婉君等,2019)。

叶际细菌(phyllospheric bacteria)是指在植物叶、茎、花和果实等地上部组织的表面或内部定殖的细菌,其密度在叶部可达 10^8 CFU · g⁻¹ (Lemanceau *et al.*, 2017; Lindow & Brandl, 2003)。叶际细菌具有防治植物病害、提高植物抗病性、促进植物生长及参与生态系统碳氮循环等优点(王贞霖等,2023; Bulgarelli *et al.*, 2013),从植物叶际分离生防细菌用于防治植物病害已成为挖掘生防资源的主要途径之一。马尾松 *Pinus massoniana* Lamb. 是松材线虫的主要寄主之一,也是中国主要的造林树种之一,具有重要的生态作用和经济价值(汪远秀等,2020)。因此,开展马尾松叶际细菌多样性研究及其杀松材线虫活性测定,可为松材线虫的生物防治提供菌株资源,也为马尾松抗松材线虫品种的选育等提供理论依据。

研究表明,松科植物的叶际细菌具有防病、促生、耐受逆境等丰富多样的生态功能,如曾丽琼等(2018)在马尾松茎部分离获得的 2 株短小芽胞杆菌 *Bacillus pumilus* 能有效抑杀松材线虫,其培养滤液处理松材线虫 24 h 后线虫死亡率可达 89% 以上;贺丽娜等(2022)从马尾松上分离获得一株铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* NZM13-11,其发酵滤液在与松材线虫混合培养 12 h 后,松材线虫的校正死亡率达 92.2%、消解率达 85%;姚伍等(2018)在福建三明三元区喷洒美国松 *Pinus elliotii* Engelm. 林内分离获得的嗜麦芽窄食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* Smal-007,其防治效果可达 90.9% 以上;Padma *et al.* (2021)从扭叶松 *P. contorta* var. *latifolia* 中分离获得 14 株固氮细菌,其中 3 株假单胞菌菌株使松树幼苗高度增加了 1.6 倍,生物量增加了 4 倍;Papen *et al.* (2002)发现云杉 *Picea asperata* Mast. 叶际的硝化自养细菌可吸收氨气、参与大气氮循环。另有研究表明,马尾松叶际细菌具有丰富的多样性,如袁贵云等(2021)通过扫描电子显微镜观测到马尾松针叶表面定殖有大量细菌,高通量测序结果表明,其优势种为蓝细菌属 *Cyanobacteria*、拜叶林克氏菌属 *Beijerinckia* 以及鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*;尹诗恒等(2021)通过变性梯度凝胶电泳(DGGE)及高通量测序技术研究发现马尾松内生细菌共 442 属,主要包括蓝细菌属、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、假单胞菌属 *Pseudomonas* 等。

近年来,松科植物叶际细菌的相关研究主要针对其种群多样性以及生态功能,但关于可培养马尾松叶际细菌杀松材线虫的相关报道较少,在获得后续可研究、开发以及应用的有益菌株方面存在局

限;鉴于松材线虫造成的危害持续加重,疫情防控和发态势不容乐观,杀松材线虫的细菌菌种资源相对匮乏,研究人员急需获得更多的生防细菌菌种资源以加强对松材线虫病的防治。本试验从福建宁德古田和霞浦、三明尤溪采集马尾松松枝,对其可培养叶际细菌进行分离并纯化,依照其菌落形态以及采用 16S rDNA PCR-RFLP 技术对其叶际细菌进行系统归类、分析其遗传多样性;测定叶际细菌的杀松材线虫活性,获得杀松材线虫活性高的菌株,并明确其分类地位,为松材线虫的生物防治提供菌株资源和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试样品及菌株 采自福建宁德古田(15 份样品)、三明尤溪(4 份样品)、宁德霞浦(4 份样品)健康的马尾松松枝;从以上样品上分离纯化的马尾松叶际细菌菌株编号的前缀分别用 GT、YX 和 XP 表示。

枯草芽胞杆菌 *B. subtilis* BS168 由福建农林大学细菌学实验室保存。

松材线虫和盘多毛孢菌 *Pestalotia* sp. 由福建省林业科学研究院保存。

1.1.2 供试引物 16S rDNA 基因序列扩增引物 27F/1492R (Lane, 1991): 5'-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3'/5'-TACGGTTACCTGTTACGACTT-3'; *gyrB* 基因序列扩增引物 UP-1/UP-2 (Yamamoto & Harayama, 1995): 5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTG-CAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3'/5'-AGCAGGCTACG-GATGTGCGAGCCRTCACRTCNCRCTCNGTCAT-3'。

1.2 试验方法

1.2.1 马尾松叶际细菌分离与纯化 参照胡振亮等(2019)的方法,将采集的马尾松用自来水冲洗干净后晾干,称取马尾松针叶 0.3 g 或枝干 0.5 g,用 75% 的酒精消毒 1 min,无菌水漂洗后,置于无菌滤纸上晾干;再将植物组织剪成小段,装入 2 mL 研磨管,加入适量石英砂、2 颗研磨钢珠和 1 mL 无菌水,使用高通量组织研磨仪研磨匀浆(60 Hz, 4 min);静置 15~20 min,取 100 μ L 研磨原液涂布于 NA 平板培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 48 h (方中达,1998)。根据细菌的菌落形态特征进行归类、纯化,保存备用。

1.2.2 叶际细菌 16S rDNA PCR-RFLP 分析 参照 Lane (1991) 的方法,采用菌落 PCR 方法对叶际细

菌的 16S rDNA 基因序列进行扩增,1% 琼脂糖凝胶电泳,以 DL2000 为 Marker 进行分析。

参照杨瑞先(2013)和王娜娜(2010)的方法,对 16S rDNA 序列扩增产物分别用 *Hae* III 和 *Msp* I 限制性内切酶进行酶切(37 $^{\circ}$ C, 4 h),2% 琼脂糖凝胶电泳,以 100 bp DNA Ladder 为 Marker 进行分析。分析酶切后的电泳图谱,将不同菌株酶切后具有相同条带数及条带大小归为同一性状,用字母随机标记性状,随机标记为 A、B、C、D……和 a、b、c、d……。对 2 种酶切结果的电泳条带建立 01 矩阵图进行统计分析,用电泳条带图像分析软件(Quantity One)校准电泳条带后输入 Excel 表格内生成矩阵表,每个样品不同条带存在时记为“1”,不存在时记为“0”,利用 NTSYS-pc 软件构建聚类树状图。每一个分离株设定为一个分类学单位(operational taxonomic unit, OTU),并把相似性大于 90% 的菌株看作相同起源的分离株。

1.2.3 松材线虫液的获得 参照白兴月和程瑚瑞(1992)的方法,采用玉米粒培养基培养松材线虫;将培养有松材线虫的玉米粒倒在无菌培养皿中,正置,每隔 6~8 h 用无菌水冲洗、收集爬上皿盖的线虫,离心(3000 $r \cdot \min^{-1}$, 2 min)去上清后,将线虫液浓缩至 2 mL,加入 8 mL 0.2% 硫酸链霉素溶液混匀后浸泡 15 min 后离心去上清,无菌水漂洗 3 次,离心去上清,最后加入适量无菌水混匀得到松材线虫液,备用。

1.2.4 细菌悬浮液的获得 活化菌株于 NA 平板培养基上培养 24~48 h 后,挑取单菌落于 NB 培养基中(方中达,1998),置于摇床中恒温振荡培养(180 $r \cdot \min^{-1}$, 28 $^{\circ}$ C) 48 h 后,备用。

1.2.5 叶际细菌杀松材线虫活性的测定

参照曾丽琼等(2018)的方法,采用离心管培养法,以 NB 培养基和无菌水作为空白对照(其中,以无菌水为对照用于观察松材线虫自然死亡率,以 NB 培养基为对照用于排除培养基的杀松材线虫活性),每个处理重复 3 次,分别在 0、24 和 48 h 后,将含松材线虫的混合液混匀后吸取 20~50 μ L 并滴加等量 2% NaCl 溶液计数(观察的线虫总数不少于 30 条),5 min 后在光学显微镜下观察线虫死亡情况,死虫虫体僵直,活虫虫体卷曲或扭动。

校正死亡率/% = [(处理死亡率-对照死亡率)/(1-对照死亡率)] $\times$ 100

1.2.6 杀松材线虫菌株的鉴定 (1)形态学鉴定。病原菌的培养性状观察:供试菌株接种于 NA 平板培养基上,28 ℃培养 48 h,观察菌落形态特征。病原菌的形态观察:供试菌株接种于 NA 平板培养基上,28 ℃培养 12~16 h,采用 2%磷钨酸负染法并在透射电子显微镜 Hitachi HT7800 下观察细菌菌体和鞭毛的形态特征并拍照。

(2)生理生化测定。以枯草芽胞杆菌标准菌株 BS168 为对照菌株,革兰氏染色反应、运动性测定、硝酸还原反应、耐盐性测定、柠檬酸盐利用测定、过氧化氢酶测定、淀粉水解酶测定、氧化酶测定、甲基红试验和吲哚试验参照方中达(1998)的方法,V-P 试验参照东秀珠和蔡妙英(2001)的方法,糖醇类物质利用测定参照 Huang *et al.* (2012)的方法。

1.2.7 16S rDNA 序列和 *gyrB* 基因序列分析 参照 Lane (1991)的方法进行 16S rDNA 基因鉴定;参照 Yamamoto & Harayama (1995)的方法进行 *gyrB* 基因分析。以供试菌株的总 DNA 为模板,分别用 16S rDNA 的通用引物和 *gyrB* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测后,将条带大小正确的 PCR 产物委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,通过 DNAMAN 软件拼接序列。

通过 NCBI 的 BLAST 检索系统进行序列同源性分析。选取同源性最近的序列及相关的模式菌株序列,用 MEGA 7.0 进行比对分析,采用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建 16S rDNA 的系统发育进化树,采用最大似然法 (maximum-likelihood, ML) 构建 *gyrB* 基因的系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 叶际细菌的分离结果

从宁德古田、霞浦和三明尤溪分离获得马尾松叶际细菌菌株数分别为 117、17 和 7 株。根据菌落的颜色、质地及形态特征将分离获得的叶际细菌分为 9 类:菌落 A 白色、圆形、边缘毛絮状、较湿润,有 98 株,占总数的 69.50%;菌落 B 白色、边缘不规则、平展,有 26 株,占总数的 18.44%;菌落 C 白色、圆形、隆起、黏稠,有 7 株;菌落 D 淡黄色、圆形、半透明,有 4 株;菌落 E 白色、近圆形、黏稠、略微隆起,有 2 株;菌落 F 淡黄色、半透明、流动性强,有 1 株;菌落 G 黄色、边缘不规则、隆起、有褶皱,有 1 株;菌落 H 黄白色、边缘不规则、较湿润,有 1 株;菌落 I 淡黄色、半透明、边缘不规则,有 1 株(图 1)。

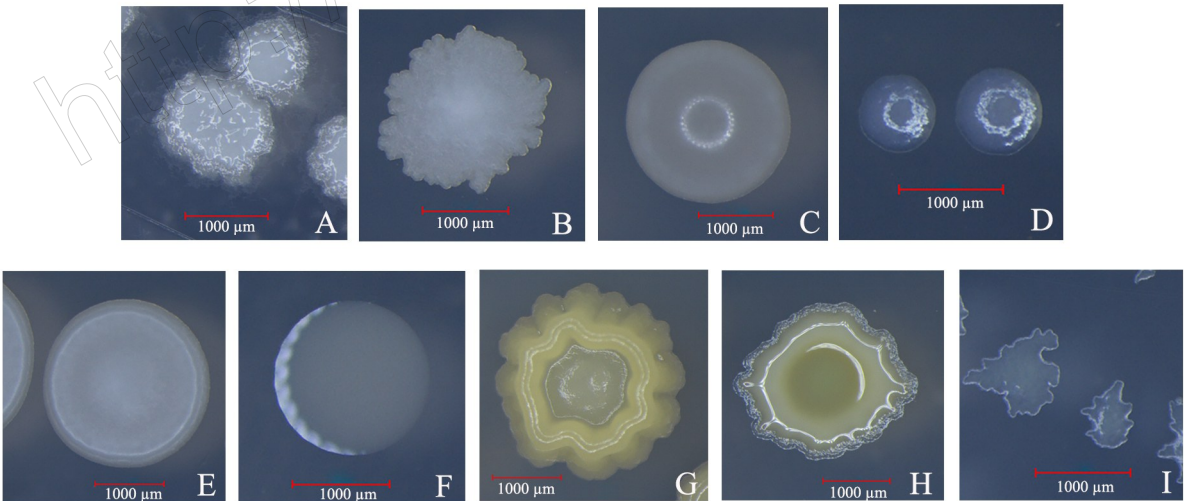


图 1 马尾松叶际细菌的菌落形态特征

Fig.1 Colony morphological characteristics of phyllospheric bacteria of *P. massoniana*

2.2 叶际细菌 16S rDNA 扩增产物限制性酶切结果及聚类分析

对分离获得马尾松叶际细菌进行 16S rDNA PCR 扩增,用限制性内切酶 *Hae* III 和 *Msp* I 对 PCR 扩增产物分别进行酶切,分别有 9 和 11 种图谱类

型(图 2),将 2 种限制性内切酶的酶切图谱类型进行组合,共有 19 种组合图谱类型(表 1)。其中第 V 类组合图谱的菌株数量最多(44 株),占酶切分析总数的 31.21%;其次为第 II 类组合图谱的菌株(36 株),占酶切分析总数的 25.53%;第 III、VIII、XI、

XII、XIII、XVI、XVII、XVIII和XIX类型的菌株均只有1株。其中,分离自宁德古田的117株叶际细菌产生14种图谱类型(I、II、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIX、XVII和XIX类型);分离自宁德霞浦的17株叶际细菌产生7种图谱类型(III、IV、VI、X、XV、XVI和XVIII类型);分离自三明尤溪的7株叶际细菌均为VI类型。

另通过NTSYS-pc软件采用平均连锁方式(UPGMA)进行聚类分析,构建聚类树状图(扫描本

文OSID码,查看聚类树状图),在100%相似水平上,141株叶际细菌被分为了19个类群,与酶切图谱组合类型分类一致,证明聚类结果可信。

从以上结果可知,从福建不同地区的马尾松松枝上分离到的可培养叶际细菌的16S rDNA-RFLP图谱存在差异,宁德古田和霞浦的马尾松叶际细菌的16S rDNA基因扩增片段均具有丰富多样的RFLP遗传图谱类型。

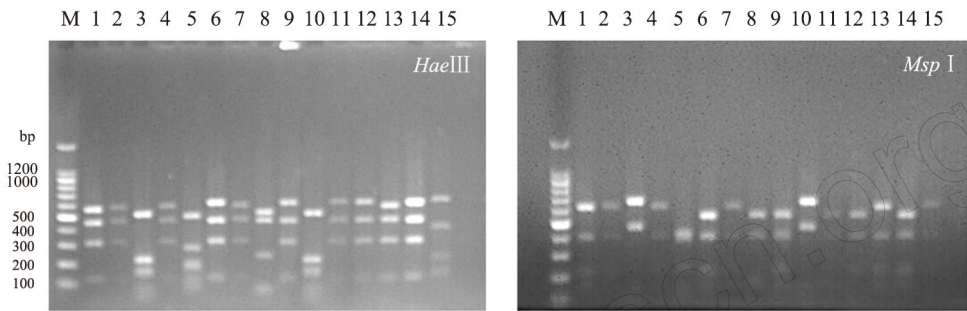


图 2 部分供试菌株 16S rDNA 的限制性酶切图谱
Fig.2 Restriction map of 16S rDNA of some tested strains
M: 100 bp DNA ladder; 1~15: 供试细菌菌株。
M: 100 bp DNA ladder; 1~15: The test bacterial strains.

表 1 马尾松叶际细菌菌株 16S rDNA-RFLP 图谱类型
Table 1 16S rDNA-RFLP map types of phyllospheric bacteria strains of *P. massoniana*

Hae III	Msp I	16S rDNA 酶切图谱类型 Type of enzyme digestion map	菌株数 Quantity	Hae III	Msp I	16S rDNA 酶切图谱类型 Type of enzyme digestion map	菌株数 Quantity
A	a	I (Aa)	2	D	e	XI (De)	1
A	c	II (Ac)	36	D	g	XII (Dg)	1
A	f	III (Af)	1	D	i	XIII (Di)	1
B	b	IV (Bb)	2	E	d	XIV (Ed)	3
C	c	V (Cc)	44	F	j	XV (Fj)	2
C	d	VI (Cd)	23	G	g	XVI (Gg)	1
C	e	VII (Ce)	3	H	c	XVII (Hc)	1
C	i	VIII (Ci)	1	H	h	XVIII (Hh)	1
D	c	IX (De)	3	I	k	XIX (Ik)	1
D	d	X (Dd)	14				

2.3 叶际细菌杀松材线虫活性的测定结果

以无菌水或 NB 培养基为对照,供试的 141 株马尾松叶际细菌中有 120 株对松材线虫有不同程度的杀线虫活性,占叶际细菌总数的 85.11%;完全无杀松材线虫活性的菌株有 21 株,占测定菌株数的 14.89%。其中,以 NB 培养基为对照,48 h 后杀松材线虫活性大于 50%的菌株有 11 株,占筛选总数的 7.80% (表 2),分别为 GT10、GT29、GT30、GT13、GT19、GT22、GT16、GT1、GT32、GT38 和 GT34。其中,菌株 GT10 的杀线虫活性最好,处理后 48 h 的杀松材线虫活性为 92.56%,经该菌株处理后的松材线虫僵直不动、死亡(图 3)。

2.4 菌株 GT10 的鉴定

2.4.1 生物学测定结果 菌株 GT10 的革兰氏染色呈阳性,菌体短杆状,周生鞭毛,具有运动性,能利用葡萄糖、阿拉伯糖、山梨醇、甘露醇、海藻糖、麦芽糖、纤维二糖、丙三醇;不能利用鼠李糖、甜醇、蔗糖、棉籽糖和香叶醇;柠檬酸钠的利用、硝酸还原、淀粉水解、V-P 试验和过氧化氢酶均为阳性,氧化酶、甲基红试验和吡啶的产生均为阴性,耐盐性为 7%;与枯草芽孢杆菌 BS168 菌株相比,除了棉籽糖和香叶醇的利用情况以及耐盐性 10%存在差异外,其余所有测定结果均与其一致,故将菌株 GT10 初步鉴定为芽孢杆菌属(表 3、图 4)。

表 2 叶际细菌对松材线虫的杀线虫活性
Table 2 Nematicidal activity of phyllospheric bacteria against *B. xylophilus*

菌株 Strains	24 h		48 h	
	H ₂ O	NB	H ₂ O	NB
GT10	66.58±11.81a	65.55±12.17a	95.03±5.18a	92.56±7.77a
GT29	26.35±0.60b	24.07±0.61bc	83.75±2.51ab	75.64±3.76ab
GT30	13.47±23.43b	10.79±24.15c	77.97±4.81bc	66.97±7.21bc
GT13	31.96±4.38b	29.85±4.51bc	77.95±4.03bc	66.94±6.03bc
GT19	19.64±3.92b	17.15±4.04bc	77.21±3.91bc	65.84±5.86bc
GT22	22.01±16.82b	19.60±17.34bc	73.14±6.09bc	59.73±9.13bc
GT16	21.47±4.25b	19.04±4.38bc	72.66±12.10bc	59.02±18.14bc
GT1	51.92±2.55a	38.77±3.25b	65.31±5.93c	55.77±7.56c
GT32	19.98±11.31b	17.51±11.66bc	70.42±5.57c	55.65±8.36c
GT38	19.27±6.61b	16.77±6.81bc	69.37±11.55c	54.08±17.32c
GT34	15.17±9.69b	12.55±9.99c	68.24±6.70c	52.40±10.05c

同列相同字母表示在 $P<0.05$ 水平下无显著差异。
The same letter in the same column indicates that there is no significant difference at the level of 0.05.

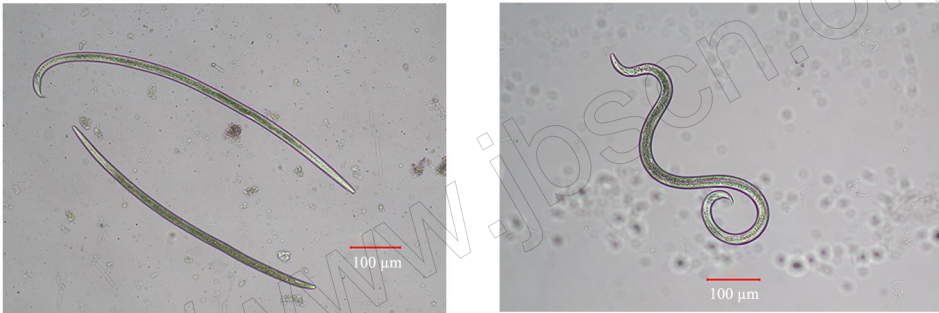


图 3 菌株 GT10 的杀线虫效果
Fig.3 Nematoid effect of the strain GT10

表 3 供试菌株 GT10 的生理生化测定结果
Table 3 Determination of physiological and biochemical indexes of strain GT10

测试项目 Test items	GT10	BS168	测试项目 Test items	GT10	BS168
革兰氏染色 * Gram staining	+	+	运动性 Motility	+	+
鞭毛类型 * Flagellum type	周生 Periflagella	周生 Periflagella	糖醇的利用 阿拉伯糖 Arabinose	+	+
硝酸还原 * Nitrate reduction	+	+	Utilization of 鼠李糖 Isodulcite	-	-
淀粉水解酶 * Starch hydrolase	+	+	sugar alcohol 甜醇 Dulcitol	-	-
过氧化氢酶 Catalase	+	+	山梨醇 Sorbitol	+	+
氧化酶 Oxidase	-	-	甘露醇 * Mannitol	+	+
甲基红试验 Methyl red test	-	-	丙三醇 Glycerol	+	+
V-P 试验 * V-P determination	+	+	香叶醇 Geraniol	-	+
柠檬酸钠的利用 * Citrate utilization	+	+	葡萄糖 Glucose	+	+
吡嗪的产生 Indole production	-	-	蔗糖 Sucrose	-	-
耐盐性 Salt tolerance			海藻糖 Trehalose	+	+
2%	+	+	麦芽糖 Maltose	+	+
5% *	+	+	棉籽糖 Raffinose	-	+
7%	+	+	纤维二糖 Cellobiose	+	+
10%	-	+			

+: 阳性反应; -: 表示阴性反应; *: 关键性测试。
+: Positive reaction; -: Negative reaction; *: Critical test.

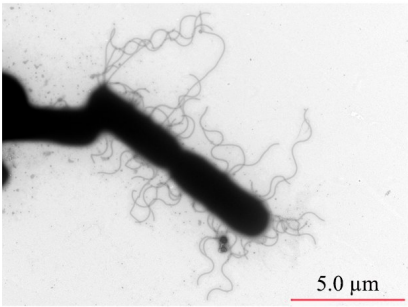


图 4 菌株 GT10 鞭毛图
Fig.4 Flagellum of strain GT10

2.4.2 16S rDNA 序列和 *gyrB* 基因序列分析 供试菌株的 16S rDNA 基因核苷酸序列长度为 1447 bp, *gyrB* 基因核苷酸序列长度为 1181 bp。通过 NCBI 数据库在线的对比与分析结果显示,菌株 GT10 的 16S rDNA 基因和 *gyrB* 基因核苷酸序列与蜡样芽胞杆菌 *B. cereus* 的同源性达 99%,选取与供试菌株相似的菌株及相关模式菌株,用 MEGA 7 软件分别依据 16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列,分别用 neighbor-joining 法和 maximum likelihood 构建系统发育树,结果显示,供试菌株均与蜡样芽胞杆菌模式菌株 ATCC14579 聚为一支(图 5、6)。

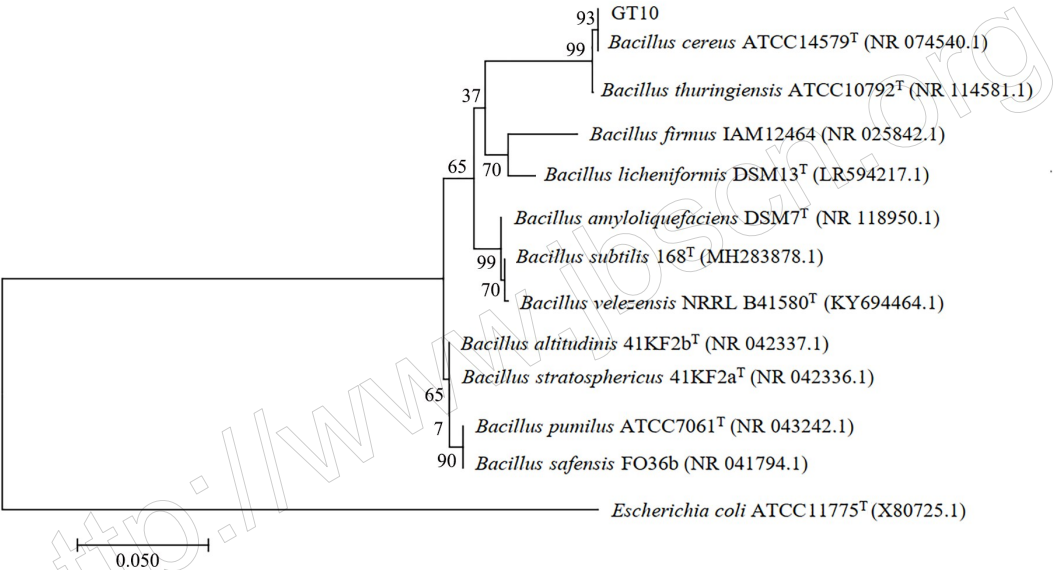


图 5 依据 16S rDNA 序列构建拮抗菌株 GT10 的系统发育树
Fig.5 The phylogenetic tree of biocontrol bacteria strain on 16S rDNA sequences

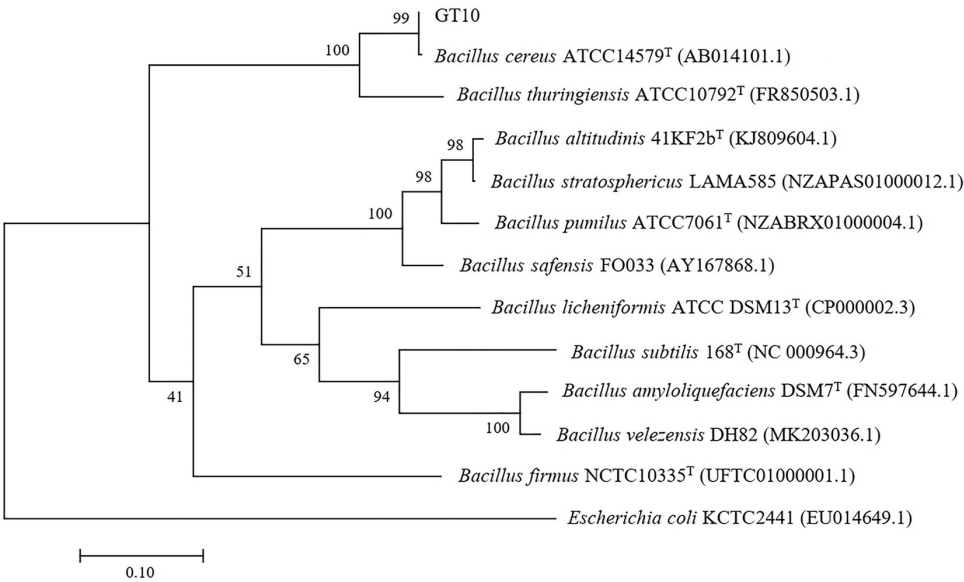


图 6 依据 *gyrB* 序列构建拮抗菌株 GT10 的系统发育树
Fig.6 The phylogenetic tree of biocontrol bacteria strain GT10 on *gyrB* sequences

3 讨论

研究植物叶际细菌多样性的方法主要包括组织分离法、限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP) 分析技术、变性梯度凝胶电泳和高通量测序技术等, 其中, PCR-RFLP 技术具有结果准确、操作简便的优点, 是研究细菌多样性常用手段之一, 目前已利用该方法对烟草 *Nicotiana tabacum* Linn. (陈泽斌等, 2012)、大豆 *Glycine max* (Linn.) Merr. (Hung *et al.*, 2007)、铁皮石斛 *Dendrobium officinale* Kimura *et* Migo (王珊珊等, 2021)、红豆杉 *Taxus chinensis* (Pilger) Rehd. (张晶晶等, 2013) 和胡杨 *Populus euphratica* Oliv. (杨多等, 2022) 等植物体内的细菌种群多样性进行了分析。本研究首次用该方法分析了马尾松叶际细菌多样性, 结果显示, 从福建省 3 个地方分离获得的 141 株马尾松叶际细菌中有 19 种酶切图谱组合类型, 说明马尾松叶际细菌具有丰富的种群多样性。有研究通过高通量测序技术对马尾松 (尹诗恒等, 2021; 袁贵云等, 2021)、赤松 *Pinus densiflora* Sieb. *et* Zucc. (谢宪等, 2021) 和红松 *Pinus koraiensis* Sieb. *et* Zucc. (Deng *et al.*, 2022) 等松科植物的叶际细菌多样性进行分析, 发现松科植物的叶际细菌具有丰富的种群多样性, 主要包括蓝细菌属、甲基杆菌属、伯克氏菌属 *Burkholderia* 和嗜麦芽窄食单胞菌属等。但本研究尚未明确马尾松叶际细菌的具体种类与比例, 有待进一步研究。

利用酶切图谱对供试菌株进行分类时, 限制性内切酶的选择尤为重要, 选择的内切酶要能产生一定程度多样性的图谱类型, 还需方便分类。吕志堂和刘志恒 (2000) 用 *Hae* III、*Msp* I 和 *Hha* I 3 种内切酶将 12 株糖单孢菌 *Saccharomonospora* 归为 5 个类群, 而另一种内切酶 *Rsa* I 则不适于糖单孢菌属的 PCR-RFLP 分析, 它不能将任何一种与其他种区分开; 徐正金等 (2014) 用 4 种限制性内切酶对固氮酶基因 *nifH* 进行酶切及聚类分析, 发现 *Hae* III 和 *Msp* I 的图谱类型多于 *Hinf* I 和 *Hha* I。本研究选取了 *Hae* III 和 *Msp* I 这 2 种限制性内切酶进行马尾松叶际细菌多样性分析, 结果表明, 这 2 种酶可将供试菌株分为 19 类。若增加第 3 或第 4 种限制性内切酶, 分类结果是否与本结果一致, 还需进一步试验验证。

本研究结果发现, 不同地理位置的细菌遗传类型存在差异, 如宁德古田马尾松叶际细菌酶切图谱

类型最多, 三明尤溪叶际细菌仅有 1 种遗传图谱类型, 这与已有的报道结果相似, 如唐璎等 (2024) 发现甘肃不同地区的紫花苜蓿 *Medicago sativa* Linn. 叶面附生的乳酸菌及青贮乳酸菌群落结构存在差异, 在河西干旱灌区, 以植物乳杆菌 *Lactobacillus plantarum* 为主, 而在雨水充沛湿热的陇南地区, 以乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* 和戊糖片球菌 *P. pentosaceus* 为主。还有研究表明, 植物叶际细菌种群组成与病害的发生具有相关性, 如烟草野火病 *Pseudomonas tabaci* 不同发病等级的叶片与其叶际细菌群落组成之间有着密切联系, 叶际细菌物种丰富度与野火病发病等级呈负相关 (程浅, 2020); 枯梢病菌 *Sphaeropsis sapinea* 的侵染影响了赤松针叶内生细菌的群落结构, 枯梢病的发病程度与细菌多样性及其相对丰度呈负相关 (谢宪等, 2021); 但高爽 (2016) 研究发现, 柑橘溃疡病 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 的发生能够影响叶表细菌群落结构和组成, 发病叶片样品的细菌群落结构组成较于未发病样品更加复杂。另外, 杨瑞先 (2013) 研究发现, 不同树龄银杏 *Ginkgo biloba* Linn. 叶片中细菌的种群组成存在差别。由此推测不同区域、不同病害发生情况、环境条件、品种或树龄等因素均可能导致叶际细菌多样性存在一定的差异, 因此为了明确以上相关因素对马尾松叶际细菌多样性的影响, 还需更加系统地进行样品采集、分离和分析。

16S rDNA 测序技术具有快速、准确性高等优点, 是常用的细菌分子生物学鉴定方法之一。但在芽胞杆菌属中, 其种间 16S rDNA 序列高度相似, 无法单纯依靠该方法准确定位到种, 而 *gyrB* 基因是用于编码 DNA 促旋酶的 B 亚单位, 其进化速度高于 16S rDNA 序列, 可以区分近缘种 (傅奇等, 2021)。本研究在对杀松材线虫菌株 GT10 的 16S rDNA 基因序列进行分析时, 发现菌株 GT10 与蜡样芽胞杆菌模式菌株 ATCC14579 以及苏云金芽胞杆菌 *B. thuringiensis* 模式菌株 ATCC10792 聚为一支; 而依据 *gyrB* 基因序列构建的系统发育树分析结果显示, 菌株 GT10 与蜡样芽胞杆菌菌株 ATCC14579 聚为一支, 其可信度为 99%, 高于依据 16S rDNA 序列构建的系统发育树中的 93%; 且菌株 GT10 与苏云金芽胞杆菌菌株 ATCC10792 的距离更远, 即二者之间的同源性更小, 进一步说明 *gyrB* 基因序列分析用于区分细菌种的准确性较 16S rDNA 序列分

析高。

据报道,广泛利用杀线虫的细菌主要有蜡样芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens* 和短小芽胞杆菌等。郝颖等(2013)在腌制的芥菜表面分离筛选得到一株具有较高毒杀松材线虫活的细菌菌株,经鉴定为蜡样芽胞杆菌,其杀线虫率达 99.04%,具有很强的杀线虫活性。朱丽梅等(2008)从松树的体内分离筛选出对松材线虫具有较高毒杀线虫活性的解淀粉芽胞杆菌 JK-JS3,朱丽梅等(2011)又通过气质联用方法对该菌株分泌的具有杀松材线虫活性物质的水溶液进行分析和鉴定,鉴定出 3 种杀线虫化合物。李亮亮等(2017)从马尾松体内分离筛选到 2 株芽胞杆菌,其中短小芽胞杆菌 LYMC-3 细菌悬浮液的 10 倍稀释液的处理松材线虫 2 d 后线虫的死亡率达到 94.70%,蜡样芽胞杆菌 NJSZ-13 细菌悬浮液处理 48 h 后线虫的死亡率达到 81.5%,且可导致松材线虫虫体断裂、体壁消解。孙玉凤等(2023)研究发现,蜡样芽胞杆菌 NJSZ-13 可附着于松材线虫体表并分泌蛋白酶将松材线虫杀死。本研究从马尾松叶际分离获得的杀松材线虫菌株蜡样芽胞杆菌 GT10 也具有较高杀线虫活性,处理线虫 48 h 后松材线虫的死亡率达 92.56%以上,但该菌株细菌悬浮液中导致松材线虫死亡的具体物质还需进一步研究。

参考文献

白兴月,程瑚瑞,1992. 松材线虫的大量繁殖和少量松材线虫的表面消毒新技术. 植物检疫, 6(6): 420-421.

陈泽斌,夏振远,雷丽萍,陈海如,2012. 烟草可培养内生细菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 和系统发育分析. 中国烟草学报, 18(1): 92-100, 105.

程浅,2020. 烟草叶际细菌群落多样性与烟草野火病发生的关系及调控效应研究. 硕士学位论文. 重庆:西南大学.

东秀珠,蔡妙英,2001. 常见细菌系统鉴定手册. 第 2 版. 北京:科学出版社.

方中达,1998. 植病研究方法. 第 3 版. 北京:中国农业出版社.

傅奇,甘美裕,王艳,林俊杰,卢源钦,肖玉娟,2021. 16S 与 *gyrB* 基因联合建树快速鉴定一株蜡样芽胞杆菌. 食品与生物技术学报, 40(10): 98-103.

高爽,2016. 柑橘叶表细菌种群结构与溃疡病的关联研究. 硕士毕业论文. 长沙:湖南农业大学.

郝颖,岳同卿,李荣贵,2013. 一株具有杀松材线虫活性细菌的筛选和鉴定. 山东林业科技, 43(6): 8-11, 4.

贺丽娜,冯源,石慧敏,叶建仁,2022. 具有杀线活性马尾松内生细菌的筛选与鉴定. 生物技术通报, 38(9): 47-54.

胡振亮,靳轩 庞久帅,王雪菲,陈孟,李会平,2019. 油松内生细菌的分离及拮抗菌的筛选. 中国森林病虫, 38(4): 1-6.

李亮亮,谈家金,陈凤毛,2017. 两株松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定. 南京林业大学学报(自然科学版), 41(4): 37-41.

吕志堂,刘志恒,2000. 糖单孢菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析. 微生物学报, 40(6): 567-572.

孙玉凤,谈家金,赵晓佳,袁裕超,2023. 蜡样芽胞杆菌 NJSZ-13 致死松材线虫的因子. 东北林业大学学报, 51(1): 127-131.

唐璎,刘晓静,赵雅姣,董霖,2024. 甘肃不同区域青贮紫花苜蓿乳酸菌群落特征及其驱动因子研究. 草业学报, 33(2): 112-124.

汪远秀,李快芬,丁贵杰,刘海燕,2020. 铝对马尾松菌根苗生长及营养元素吸收的影响. 森林与环境学报, 40(2): 119-125.

王娜娜,2010. 拮抗性大蒜内生细菌的多样性及其促植物生长特性研究. 硕士学位论文. 杨凌:西北农林科技大学.

王珊珊,刘佳萌,孙晶,贾宁,金诺,刘佳妮,范蓓,王凤忠,2021. 不同栽培方式的铁皮石斛根、茎中内生细菌多样性及其抑菌活性研究. 微生物学报, 61(12): 4006-4025.

王贞霖,马瑞,徐芮,杨顺义,芮凯,2024. 槟榔叶表微生物前处理方式对基因组 DNA 提取效果的影响. 分子植物育种: 1-7. DOI: 10.13271/J.MPB.022.004341.

谢宪,梁军,朱彦鹏,时良,高燕,张铭,程元,张星耀,2021. 赤松混交林枯梢病不同病级针叶内部细菌多样性研究. 林业科学研究, 34(2): 122-130.

徐正金,罗明,王卫霞,王纯利,2014. 3 种典型荒漠灌木内生固氮菌及固氮酶基因 *nifH* 多样性分析. 中国沙漠, 34(2): 472-480.

杨多,岳海涛,伍杰毅,赵鲁玉,邢祥祥,郭飞,杨洁,2022. 胡杨叶片及韧皮部内生细菌多样性及生物学功能分析. 微生物学报, 62(1): 213-226.

杨瑞先,2013. 银杏内生细菌防治辣椒疫病机制研究. 博士学位论文. 福州:福建农林大学.

姚伍,郑催云,陈红梅,刘侃诚,韩正敏,2018. 福建三明市应用 Smal-007 菌剂防治松材线虫病的效果. 林业科学, 54(1): 168-173.

叶建仁,2019. 松材线虫病在中国的流行现状、防治技术与对策分析. 林业科学, 55(9): 1-10.

尹诗恒,张绍勇,刘骥骅,吴酬飞,王俊伟,李阳,张立钦,2021. 松材线虫侵染对马尾松苗不同部位内生细菌菌群结构的影响. 浙江农林大学学报, 38(4): 846-853.

- 袁贵云, 孙学广, 郑炆, 郭其强, 丁贵杰, 2021. 马尾松叶表微生物多样性. *森林与环境学报*, 41(3): 318-324.
- 曾丽琼, 何学友, 蔡守平, 黄金水, 2018. 具杀松材线虫活性细菌的筛选和鉴定. *江苏林业科技*, 45(2): 6-9.
- 张弘弢, 赵宇, 李晓岩, 牛犇, 2021. 生防细菌杀松材线虫的作用机制及应用. *中国森林病虫*, 40(4): 26-33.
- 张晶晶, 兰阿峰, 邓百万, 陈文强, 孔亚男, 2013. 红豆杉免培养内生细菌多样性的初步研究. *微生物学通报*, 40(5): 766-774.
- 张婉君, 吴小芹, 王亚会, 2019. 松材线虫拮抗细菌的杀线活性及其发酵培养特性. *生物技术通报*, 35(7): 76-82.
- 朱丽梅, 吴小芹, 胡飞杰, 徐浩, 2011. 解淀粉芽孢杆菌 JK-JS3 杀线活性物质的分离与结构分析. *林业科学*, 47(7): 133-137.
- 朱丽梅, 吴小芹, 徐旭麟, 2008. 松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 32(3): 91-94.
- 朱丽梅, 吴小芹, 徐旭凌, 2010. 具杀松材线虫活性的解淀粉芽孢杆菌 JK-JS3 的培养条件. *南京林业大学学报(自然科学版)*, 34(5): 55-58.
- BULGARELLI D, SCHLAEPI K, SPAEPEN S, VER LOREN VAN THEMAAT E, SCHULZE-LEFERT P, 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1): 807-838.
- DENG J, YU D, ZHOU W, ZHOU L, ZHU W, 2022. Variations of phyllosphere and rhizosphere microbial communities of *Pinus koraiensis* infected by *Bursaphelenchus xylophilus*. *Microbial Ecology*, 84(1): 285-301.
- HUANG Q, YAN X, WANG J F, 2012. Improved biovar test for *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Microbiological Methods*, 88(2): 271-274.
- HUNG P Q, KUMAR S M, GOVINDSAMY V, ANNAPURNA K, 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biology and Fertility of Soils*, 44(1): 155-162.
- LANE D J, 1991. 16S/23S rRNA sequencing // STACKE-BRANDT E, GOODFELLOW M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: Wiley: 115-175.
- LEMANCEAU P, BARRET M, MAZURIER S L, MONDY S, PIVATO B, FORT T, VACHER C, 2017. Plant communication with associated microbiota in the spermosphere, rhizosphere and phyllosphere. *Advances in Botanical Research*, 82: 101-133.
- LINDOW S E, BRANDL M T, 2003. Microbiology of the phyllosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(4): 1875-1883.
- PAPEN H, GESSLER A, ZUMBUSCH E, RENNENBERG H, 2002. Chemolithoautotrophic nitrifiers in the phyllosphere of a spruce ecosystem receiving high atmospheric nitrogen input. *Current Microbiology*, 44(1): 56-60.
- PADDA K P, PURI A, CHANWAY C P, 2021. Long-term effects of inoculating lodgepole pine seedlings with plant growth-promoting bacteria originating from a disturbed gravel mining ecosystem. *Canadian Journal of Forest Research*, 51(4): 533-545.
- YAMAMOTO S, HARAYAMA S, 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3): 1104-1109.

(责任编辑:郭莹)