

# 根际细菌 9 个菌株对南方根结线虫的盆栽防效\*

黄金玲<sup>1</sup> 刘志明<sup>1,2\*\*</sup> 陆秀红<sup>1</sup> 刘纪霜<sup>3</sup> 秦碧霞<sup>1</sup> 乔丽娅<sup>2</sup>

1. 广西壮族自治区农业科学院植物保护研究所, 南宁 530007; 2. 广西大学农学院, 南宁 530005;  
3. 广西壮族自治区南宁市试验中心, 南宁 530001)

**摘要** 通过盆栽试验, 观察了土壤细菌 9 个菌株对番茄上南方根结线虫的生物防治效果。结果表明: 供试菌株能够降低番茄线虫的根结指数, 且对番茄生长有一定的促进作用。119 号菌株处理 30 d 后, 防治效果最好, 平均防效达 57.75%; 处理 60 d 后, 平均防效达 55.88%。333 号菌株处理 30 d 后, 番茄植株生长最好, 株高达 43.00 cm, 株鲜质量达 11.17 g, 分别比对照提高了 37.25% 和 76.46%。对单个菌株防效比较好的菌株进行初步混用试验, 结果表明: 部分菌株混用的防治效果不太理想, 但对番茄的株高和鲜质量有促进作用, 且与对照差异显著。通过 16S rDNA 序列分析, 并结合形态学和生理生化特征试验, 初步鉴定 119 号菌株为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*。

**关键词** 南方根结线虫; 生物防治; 根际细菌; 番茄

**中图分类号** S 432.4<sup>+</sup>5; S 482.3<sup>+</sup>9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)06-0700-04

根结线虫是蔬菜上的重要植物寄生线虫, 每年给蔬菜生产造成严重损失。目前对线虫病害主要防治措施仍是使用化学药剂, 但多数化学杀线剂毒性较高且品种少, 远不能满足实际要求。利用生物杀线剂控制根结线虫已成为研究热点。根际细菌能产生对线虫起抑制或毒害作用的代谢物、分泌物、酶和抗生素<sup>[1-3]</sup>。这些根际细菌具有杀死线虫的活性, 而且在温室和田间对线虫也有一定防效<sup>[4-6]</sup>。笔者从蔬菜地土壤样品中分离根际细菌, 通过室内毒力测定, 获得了 9 株对南方根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率达 80% 以上的细菌菌株, 观察了其对于番茄上南方根结线虫的盆栽防治效果。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

供试拮抗菌菌株为笔者从蔬菜地根际土壤中分离得到, 经室内离体拮抗测定对南方根结线虫 2 龄幼虫的室内校正死亡率均达 80% 以上。将生防菌接种于 NA 固体培养基上, 28 ℃ 条件下培养 24 h 后用无菌水配成 10<sup>9</sup> cfu/mL 的菌悬液待用。阿维菌为生物杀线剂, 由北京中农达生物技术股份有限公司生产。

### 1.2 根结线虫的繁殖与接种

供试根结线虫为南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*), 接种于感病的番茄植株, 采用活体繁殖方法扩繁。接种虫源的准备: 将病根切碎连同病土按 V/V=1/3 的比例与无病土混合均匀待用。

### 1.3 供试番茄

供试番茄品种为大明星(市售)。将番茄种子播于灭菌土中备用。

### 1.4 单菌株的盆栽试验

将供试的根结线虫病土混匀分装于盆钵(直径 20 cm, 高 15 cm)中, 取 5 叶龄的番茄苗移栽至盆钵中, 每盆 3 株, 然后浇灌 100 mL (10<sup>9</sup> cfu/mL) 菌悬液。每个处理 3 个重复, 以无菌水灌根作对照。将接种后的盆钵置于温室内, 常规管理。30 d 和 60 d 后, 分别调查番茄根结级数、株高和植株鲜质量, 计算防治效果。

### 1.5 混配菌的盆栽试验

将供试的根结线虫病土分装于盆钵中, 取 5 叶龄的番茄苗移栽至盆钵中, 每盆 3 株, 将单个菌株处理效果比较好的 119 号、333 号、335 号菌株的菌悬液(10<sup>9</sup> cfu/mL) 两两混配, 然后取 100 mL 浇灌于盆钵中。每个处理 3 个重复。30 d 后调查番茄根结指

收稿日期: 2010-04-06; 修回日期: 2010-06-28

\* 广西自然科学基金项目(桂科基 0991017, 0575035)资助

\*\* 通讯作者. E-mail: liu0172@126.com

黄金玲, 女, 1981 年生, 硕士, 助理研究员. 研究方向: 植物线虫病害防治. E-mail: huangjinling08@126.com

数、株高和植株鲜质量，计算防治效果。

### 1.6 病害分级标准及防效计算公式

参考肖炎农等<sup>[7]</sup>的分级标准：0 级，无根结；Ⅰ级，根结占全根系的 1%~24%；Ⅱ级，根结占全根系的 25%~49%；Ⅲ级，根结占全根系的 50%~74%；Ⅳ级，根结占全根系的 75%~100%。

$$\text{根结指数} = \frac{\sum(\text{各病级植株数} \times \text{该级数值})}{\text{调查总株数} \times \text{最重病级数值}} \times 100$$

$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照根结指数} - \text{处理根结指数}}{\text{对照根结指数}} \times 100\%$$

### 1.7 拮抗细菌的鉴定

拮抗细菌菌株的鉴定主要参照一般细菌常用鉴定方法<sup>[8]</sup>，测定菌株的形态、培养性状和生理生化特性。同时将细菌菌株的 16S rDNA 进行 PCR 扩增后，委托上海鼎安生物科技有限公司将 PCR 产物回收纯化后测序。序列测定采用双向法并进行同源性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 单菌株的盆栽防效

试验结果表明，9 个供试菌株对番茄根结线虫病都有一定抑制作用。番茄经菌株菌悬液灌根处理 30 d 后，119 号、333 号和 335 号菌株防治效果最好，平均防效分别达到 57.75%、57.82% 和 53.92%；60 d 后，平均防效分别为 55.88%、44.09% 和 38.10%，其中 119 号防治效果比较稳定。同时，9 个菌株对番茄植株的株高和鲜质量都有一定的促进作用。30 d 后，333 号菌株处理的番茄植株生长最好，株高达 43.00 cm，株鲜质量达 11.17 g，分别比对照提高了 37.25% 和 76.46%；其次为 119 号菌株，处理后番茄平均株高和株鲜质量分别为 42.00 cm 和 11.00 g，分别比对照提高了 34.06% 和 73.78%。

表 1 单菌株对番茄上南方根结线虫的盆栽防治效果<sup>1)</sup>

Table 1 Control effect of single strain to *M. incognita* of tomato plant on potted experiment

菌株 Strains	处理后 30 d After 30 d treated			处理后 60 d After 60 d treated		
	防效/% Control efficacy	株高/cm Plant height	株鲜质量/g Plant weight	防效/% Control efficacy	株高/cm Plant height	株鲜质量/g Plant weight
17	42.31 abcd ABC	38.67 a ABC	10.60 a AB	20.09 c CD	49.33 abc AB	14.33 c B
104	38.24 bcd ABC	42.00 a A	10.83 a AB	20.59 c CD	53.00 ab AB	16.50 abc AB
109	34.52 cd ABC	39.67 a AB	10.00 a AB	0.33 d E	49.67 abc AB	15.67 bc AB
119	57.75 a A	42.00 a A	11.00 a AB	55.88 a A	55.67 ab A	16.50 abc AB
155	46.14 abc ABC	40.33 a AB	10.17 a AB	35.23 b BC	52.00 ab AB	15.83 bc AB
333	57.82 a A	43.00 a A	11.17 a A	44.09 ab AB	57.00 a A	19.67 ab AB
335	53.92 ab AB	41.67 a A	10.67 a AB	38.10 b AB	52.67 ab AB	20.67 a A
343	30.77 cd BC	37.67 ab ABC	9.83 a AB	17.43 c D	47.67 bc AB	15.67 bc AB
344	26.32 d C	32.33 bc BC	6.47 b AB	1.31 d E	51.33 ab AB	17.50 abc AB
CK	—	31.33 c C	6.33 b B	—	42.67 c B	14.17 c B

1)表中数据为 3 个重复的平均值，同列数值后相同小写或大写字母表示在 0.05 或 0.01 水平上差异不显著(表 2 同)。

Data in the table are three repetitive average, figures followed by common letter within the same column are not significant at 0.05 or 0.01 level(the same as in Table 2).

### 2.2 混配菌株的盆栽防效

试验结果表明，不同菌株混配处理 30 d 后并没有取得很好的效果，特别是 119 号菌株和 333 号菌株一起施用的防治效果比菌株单独处理的效果还差，119 号菌株和 335 号菌株混合施用后防治效果也有所下降；只有 333 号菌株和 335 号菌株一起混合处理后与 333 号菌株单独处理的防效不变。各菌株处理的防治效果没有阿维菌素好，但 333 号菌株和 335 号菌株混合与阿维菌素在平均株高上的差异不显著，而平均株鲜质量比阿维菌素处理要大，各菌株处理后番茄的平均株高和平均株鲜质量均与对照差异显著(表 2)。

表 2 混配菌株对番茄上南方根结线虫的盆栽防治效果

Table 2 Control effect of strains applied in combination to *M. incognita* of tomato plant on potted experiment

菌株 Strains	防效/% Control effect	株高/cm Plant height	株鲜质量/g Plant mass
119	32.63 b B	28.00 d C	7.56 b B
333	44.43 b AB	32.67 abc AB	9.83 a AB
335	21.78 b B	31.22 c BC	8.61 ab AB
119+333	24.19 b B	32.11 bc AB	7.78 b B
119+335	28.70 b B	31.11 c BC	7.89 b AB
333+335	44.43 b AB	34.33 ab AB	10.22 a A
阿维菌素 Avermectins	72.30 a A	34.78 a A	9.83 a AB
对照 CK	—	24.00 e D	5.22 c C

### 2.3 拮抗细菌的鉴定结果

观察和测定结果表明,119 号菌株菌体杆状,革兰氏染色阳性;芽孢中生或偏生,椭圆形,比菌体略宽,无鞭毛;在 NA 平板上,菌落乳白色,边缘整齐,培养 24 h 菌落表面光滑,48 h 后现微皱,不透明,有粘性,在 10~46 °C 下都能生长;过氧化氢酶、淀粉水解、吡啶试验、柠檬酸盐利用、苯丙氨酸脱氨酶反应均为阳性;甲基红(M. R.)、乙酰甲基甲醇(V-P)、硝酸盐还原、亚硝酸盐还原、硫化氢、3-酮基乳糖测定为阴性,葡萄糖氧化产酸不产气。根据文献资料检索结果,初步将 119 号菌株鉴定为巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium*<sup>[8-9]</sup>。

另外,测定结果表明,119 号菌株的 16S rDNA PCR 扩增片段长分别为 1 420 bp。序列经 BLAST 检索对比,结果显示 119 号菌株与芽孢杆菌属中的模式株 *Bacillus megaterium* strain 095004、*Bacterium* CWISO15 16S、*Bacillus* sp. LMG 20240 的 16S rDNA 序列同源性很高,其序列相似性为 99%,测序鉴定结果与形态、生理生化特征鉴定结果一致。

## 3 讨 论

根际细菌是根系微生态重要的组成部分,已有的研究结果显示有些细菌具显著的促进植物生长和防病潜能<sup>[10]</sup>,近来也有不少关于细菌拮抗线虫的报道<sup>[11]</sup>,这为寻找既拮抗根结线虫又促进植物生长的根际细菌提供了依据。本试验的 9 个菌株中,有些菌株不仅对根结线虫有一定的抑制作用,而且对植株生长有较好的促进作用。但是否对其他病害有抑制作用还需进一步研究。本试验结果也说明了这些菌株的作用是有差异,可能跟菌株的抗病机制有关。

盆栽试验中不同菌株混配的防治效果不太理想,混配处理 30 d 后番茄根结指数比单菌株处理都高,这可能是由于菌株间有抵制作用。另外,试验采用病土进行盆栽试验,在进行菌株混配试验时,由于接种的病土比单个菌株试验时重,导致整体防效比较差。据 Imran 等<sup>[12]</sup>的研究结果表明,生防菌在根部定殖和生防效果受 2 个因素影响:细菌初接种密度和线虫严重度。因此在进行盆栽试验时,除考虑生防菌的接种密度以外,线虫密度更应该慎重选择,以便能更好地评价生防菌的生防效果。在大田中若线虫密度很大,则首先要用化学药剂压低虫口密度,然后再进行生物防治。

本试验采用 16S rDNA 序列同源性分析与生理

生化反应相结合对 119 号菌株进行了鉴定,初步将其鉴定为巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)。芽孢杆菌是对腐生线虫和植物寄生线虫都具有作用的一大细菌类群。Neipp 等<sup>[13]</sup>从瑞士的甜菜胞囊线虫(*Heterodera schachii*)的衰退土中分离到 150 个根际细菌菌株,这些菌株绝大多数为芽孢杆菌,而且一些大田和室内试验也证明了单独施用 *Bacillus* 或与有机体、有机肥混合施用都能使作物产量增加并能抑制线虫。

目前关于巨大芽孢杆菌防治植物寄生线虫的报道很少。本试验中,119 号菌株对番茄上南方根结线虫幼虫校正死亡率达 80% 以上,盆栽试验对番茄上南方根结线虫也表现出一定的防效,但效果不是很理想。这也是目前大多生物防治研究中遇到的难题,要提高根际细菌对植物寄生线虫病害防治效果,还需对其防病机制和根部定殖作深入研究,进一步弄清生防细菌的接种密度、根结线虫种群密度和土壤湿度等因素对防治根结线虫的影响。

### 参 考 文 献

- [1] NIU Q H, HUANG X W, TIAN B Y, et al. *Bacillus* ssp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 722-730.
- [2] DAVIDAS P, CIBULSKY R J, REHBER L. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* exotoxin from nematode control [J]. *J Nematologica*, 1988, 34: 249-251.
- [3] 茆振川, 唐文华, 王汝贤, 等. 苏云金杆菌 B24-14 及其  $\beta$ -外毒素对植物寄生线虫的作用[J]. *中国农业大学学报*, 2004, 9(6): 34-37.
- [4] ROBIN D, AMADOU M B, THIERRY M. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans* [J]. *Nematology*, 1999, 1(1): 95-101.
- [5] KOKALIS-BURELLE N, VAVRINA C S, ROSSKOPF E N, et al. Field evaluation of plant growth-promoting rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida[J]. *Plant and Soil*, 2002, 238(2): 257-266.
- [6] AILEEN R N, PETER J. The ability of rhizosphere bacteria isolated from nematode host and non-host plants to influence the hatch *in vitro* of the two potato cyst nematode species, *Globodera rostochiensis* and *G. pallida* [J]. *Nematology*, 2004, 6(3): 375-387.
- [7] 肖炎农, 王明祖. 蔬菜根结线虫病病情分级方法比较[J]. *华中农业大学学报*, 2000, 19(4): 336-338.

- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [9] 戈登 R E, 海恩斯 W C, 帕格 C H N. 芽孢杆菌属[M]. 蔡妙英, 刘聿太, 战立克, 译. 北京: 农业出版社, 1983.
- [10] 李社增, 刘杏忠. 利用拮抗细菌防治棉花黄萎病[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 422-425.
- [11] 孙建华, 齐军山, 冯欣, 等. Sr18 生物杀线虫制剂防治黄瓜根结线虫病研究[J]. 华北农学报, 2005, 20(4): 74-78.
- [12] IMMRAN A S, SYED E H. Suppression of the root rot-root knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: the influence of inoculum density, nematode populations, moisture and other plant-associated bacteria [J]. Plant and Soil, 2001, 237(1): 81-89.
- [13] NEIPP P W, BECKER J O. Evaluation of biocontrol activity of rhizobacteria from *Beta vulgaris* against *Heterodera schachtii* [J]. Journal of Nematology, 1999, 31(1): 54-61.

## Control Effect of 9 Strains of Rhizobacteria to *Meloidogyne incognita* of Tomato Plant on Potted Experiment

HUANG Jin-ling<sup>1</sup> LIU Zhi-ming<sup>1,2</sup> LU Xiu-hong<sup>1</sup> LIU Ji-shuang<sup>3</sup> QIN Bi-xia<sup>1</sup> QIAO Li-ya<sup>2</sup>

1. Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530007, China;

2. College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China;

3. Test Center of Nanning Municipality, Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530001, China

**Abstract** Through the potted experiments of tomato in greenhouse, the biocontrol ability of 9 strains of rhizobacteria to root knot nematodes (*Meloidogyne incognita*) was studied. The results showed that these strains could reduce the formation of the galls; the control efficiency of strain 119 was the greatest at 57.75% after 30 days, and 55.88% after 60 day. These 9 strains could also promote the growth of tomato plants too; strain 333 showed best growth promotion ability, the plant height and mass were 43.00 cm and 11.17 g respectively, and were increased by 37.25% and 76.46% compared to those of CK. However, the application of a mixture of the strains did not provide significant disease suppression compared to the application of a single strain, but could significantly promote the growth of tomato plants. Strain 119 was classified as *Bacillus megaterium*, based on the analysis of their 16S rDNA sequences, and the morphological and biochemical tests.

**Key words** *Meloidogyne incognita*; biocontrol; rhizobacteria; tomato

(责任编辑:陈红叶)