

象耳豆根结线虫 2 龄幼虫生防细菌的筛选及其促生特性评价

陈 梦^{1,2}, 尚嘉伟², 龙海波², 汪 军², 郭立佳², 周 游², 梁昌聪², 杨 扬²,
黄俊生², 杨腊英^{2*}

1. 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430007; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/热带作物生物育种
全国重点实验室/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室/国家肥料微生物种质资源库(海南)/海南省热带农业微
生物菌种资源库, 海南海口 571101

摘 要: 象耳豆根结线虫 (*Meloidogyne enterolobii*) 引起的作物根结线虫病是一种严重危害热带区农作物生产的土传病害, 每年造成的农业损失难以估量。对于根结线虫的防治, 传统的物理、化学的防治手段存在一些弊端, 而生物防治对环境友好、人畜安全, 因此逐渐成为研究热点。本研究采用浸渍法筛选出对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫具有抑杀活性的菌株, 对筛选出的高活性菌株的发酵条件以及处理时间进行优化, 利用 16S rRNA 序列及生理生化方法对菌株进行鉴定, 并分析其促生特性。结果表明: 有 3 株菌的发酵上清液杀线活性高于 65%, 分别为 BWLY1PSB-1、BWLY2X-4、BWLY3X-11。通过形态特征、生理生化特征以及分子生物学鉴定, 将 BWLY1PSB-1 鉴定为巴氏葡萄球菌 (*Staphylococcus pasteuri*), BWLY2X-4 鉴定为甲基营养芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*), BWLY3X-11 鉴定为芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 细菌; 利用各菌株的发酵上清液处理线虫 24 h 后, 其杀线活性即可达到最大, 优选发酵培养基均为 LB 培养基, 且培养 5 d 时上清液对线虫达到较好的致死率。BWLY1PSB-1 具有产生铁载体和吲哚乙酸的能力, BWLY2X-4 和 BWLY3X-11 具有产生蛋白酶、纤维素酶、铁载体和 IAA 的能力。本研究初步筛选出既能高效防控植物根结线虫又具有植物促生特性的优良菌株, 丰富了植物根结线虫生物防治的微生物资源。

关键词: 象耳豆根结线虫; 生物防治; 葡萄球菌; 芽孢杆菌; 促生特性

中图分类号: S432.4.5

文献标志码: A

Screening of Biocontrol Bacteria Against Second-stage Juveniles of *Meloidogyne enterolobii* and Evaluation of the Growth-promoting Characteristics

CHEN Meng^{1,2}, SHANG Jiawei², LONG Haibo², WANG Jun², GUO Lijia², ZHOU You², LIANG Changcong²,
YANG Yang², HUANG Junsheng², YANG Laying^{2*}

1. College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430007, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / National Key Laboratory for Tropical Crop Breeding / Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs / National Collection of Microbial Resource for Fertilizer (Hainan) / Collection of Tropical Agricultural Microbial Resource in Hainan Province, Haikou, Hainan 571101, China

Abstract: *Meloidogyne enterolobii* is a soil-borne disease that seriously harms crop production in tropical areas, and the agricultural losses caused by it are incalculable every year. For the control of root-knot nematodes, the traditional physical and chemical control methods have some disadvantages, while biological control is environmentally friendly and safe for people and livestock, so it has gradually become a research hotspot. This study used the impregnation

收稿日期 2023-12-12; 修回日期 2024-04-06

基金项目 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 1630042022008, No. 1630042022010); 中国热带农业科学院国家热带农业科学中心科技创新团队项目 (No. CATASCXTD202312)。

作者简介 陈 梦 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物资源研究与利用。*通信作者 (Corresponding author): 杨腊英 (YANG Laying), E-mail: layingyang@catas.cn。

method to screen strains with killing activity against the second instar larvae of *M. enterolobii*. The fermentation conditions and treatment time of the screened highly active strains were optimized. The strains were identified using 16S rRNA sequencing as well as physiological and biochemical methods, and growth promoting characteristics were analyzed. The research results indicated that the nematocidal activity of the fermentation supernatant of BWLY1PSB-1, BWLY2X-4 and BWLY3X-11 were more than 65%. Through morphological, physiological and biochemical characteristics, and molecular biology identification, BWLY1PSB-1, BWLY2X-4 and BWLY3X-11 were identified as *Staphylococcus pateurii*, *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus* sp., respectively; The nematocidal activity of the fermentation supernatant of each strain could reach the maximum after 24 h treatment of nematodes, and the optimal fermentation medium was LB medium, and the nematocidal activity of the supernatant reached relatively high when cultured for five days. The research results on the growth promoting characteristics of these strains indicated that BWLY1PSB-1 had the ability to produce iron carriers and IAA, while BWLY2X-4 and BWLY3X-11 had the ability to produce proteases, cellulases, iron carriers, and IAA. The preliminary screening of excellent strains that can effectively control plant root-knot nematodes and have growth promoting characteristics would enrich the microbial resources for the biological control of plant root-knot nematodes.

Keywords: *Meloidogyne enterolobii*; biological control; *Staphylococcus* sp.; *Bacillus* sp.; growth-promoting characteristics

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.019

根结线虫 (root-knot nematode) 是侧尾腺纲垫刃目异皮总科根结线虫科根结线虫属的动物, 是造成植物根结线虫病的罪魁祸首, 是危害世界各地粮食、蔬菜生产的主要病原之一, 每年都会对世界农作物造成巨大损失^[1]。根结线虫生活史包括卵-幼虫-成虫 3 个阶段, 在从卵中孵化出来到重新寄生植物这段时间其一直为 2 龄幼虫虫态, 2 龄幼虫也是它们唯一具备迁移能力的阶段, 也是从该阶段开始寄生植物, 线虫寄生植物后, 其吻针会刺伤宿主并吸取寄主营养, 并在作物根系上形成根结, 影响宿主对营养的吸收而造成植株矮小、发黄、减产甚至绝收; 此外, 线虫给宿主造成的伤口会增加作物感染其他病害的几率, 与其他病害形成复合侵染, 加重病害发生, 根结线虫种类超过 90 种, 其寄主范围广泛, 不同种类之间致病能力差异较大, 且分布在各地的优势种群不同, 所以在生产上造成的危害也有差别^[1-4]。象耳豆根结线虫 (*Meloidogyne enterolobii*) 是目前我国记录的根结线虫中值得关注的一种, 其对作物的危害与其他根结线虫类似, 此外, 象耳豆根结线虫繁殖水平高, 具有克服 *Mi*、*N* 和 *Rk* 等抗性基因的能力, 易对作物造成严重损害。目前在热带、亚热带和地中海地区已经发现有象耳豆根结线虫危害, 且一些国家已将其列为检疫性病原^[5-7]。据调查, 象耳豆根结线虫在我国海南岛已经广泛存在, 并且可以在海南岛的主要栽培作物, 如葫芦科作物、茄果类作物、南药植物、蔬菜作物以及一些热带水果上广泛寄生, 且有由南向北

逐渐扩展的趋势^[8-11], 因此研究适宜的象耳豆根结线虫防治方法对防止其继续扩散, 减轻其对作物威胁意义重大。

目前尚未发现方便、高效的植物根结线虫防治方法。在农业生产中, 主要采取物理防治、化学防治、农业防治、生物防治等方法。生物防治相较于传统的防治手段具有巨大的优势, 如降低农药残留, 减轻环境污染等, 此外生物防治还具有持效期长、改善土壤生态等优点^[12]。自然界中, 尤其是根结线虫病害高发地的土壤中存在大量具有杀线虫活性的细菌, 其中以芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 细菌的潜力尤为突出。芽孢杆菌属在自然界中广泛存在, 在许多土壤生态环境中占据优势地位, 也可在植物表面以及水体中存在, 可产生芽孢, 对高温、辐射化学药品等强烈的物理化学刺激有较强的抵抗能力^[13]。芽孢杆菌属种类繁多, 生理特性多样可产生多种抗生素, 包括脂肽类、肽类、磷脂类、多烯类、氨基酸类、核酸类物质, 对多种动、植物及人类病原菌起到很好的抑制作用^[14-16]。许多芽孢杆菌属已被报道具有良好的生防效果。2014 年至今, 我国有 116 种芽孢杆菌类生物农药在中国农药信息网中登记, 其中 4 种具有杀线虫作用, 分别为坚强芽孢杆菌、甲基营养型芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌以及杀线虫芽孢杆菌, 芽孢杆菌是一类极具开发潜力的细菌。

因此, 为遏制根结线虫对果蔬作物造成的危害, 亟需研发新的绿色安全的防治方法。本研究采用浸渍法筛选, 从海南霸王岭采集的土壤样品

中分离出的细菌中筛选出具有较高杀线活性的菌株并进行种类鉴定,同时开展菌株对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的致死条件优化筛选,研究结果将丰富植物根结线虫生物防治的微生物资源,并为后续研发高活性的生防杀线虫产品奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株与线虫 生防菌株由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所微生物资源与利用实验室分离、保存后提供;象耳豆根结线虫由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所蔬菜病害与线虫课题组分离、鉴定、扩繁保存后提供。

1.1.2 主要培养基及配方 LB 培养基:氯化钠 10 g,酵母粉 5 g,胰蛋白胨 10 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1000 mL(液体培养基不加琼脂)。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15 g,蒸馏水 1000 mL。

普通肉汤培养基:氯化钠 5 g,蛋白胨 20 g,牛肉粉 5 g,蒸馏水 1000 mL, pH 7.4~7.6。

羧甲基纤维素钠刚果红培养基:硫酸铵 0.5 g,羧甲基纤维素钠 5 g,磷酸氢二钾 0.25 g,七水硫酸镁 0.1 g,刚果红 0.4 g,琼脂 16 g,蒸馏水 1000 mL。

酪蛋白培养基:NaCl 2.5 g, Na₂HPO₄ 2 g,干酪素 10 g,牛肉膏 3 g,琼脂 10 g,蒸馏水 1000 mL。

以上培养基均在 121 ℃ 条件下灭菌 20 min。生理生化鉴定培养基的配制参照《微生物学实验》第 2 版^[17]。

1.2 方法

1.2.1 杀线活性菌株的筛选鉴定 (1) 象耳豆根结线虫 2 龄幼虫获取。供试象耳豆根结线虫分离自海南文昌患病番茄和辣椒的病根,经中国热带农业科学院环境与植物保护研究所植物线虫研究实验室鉴定确认种类^[9]。将病根洗净后剪碎,用清水浸没,按水:次氯酸钠溶液=200:1.5 加入次氯酸钠溶液,用绞肉机搅拌 2~4 下,再手摇 5~8 min。将 300、400、500 目的网筛从上到下依次叠放,将根系倒入筛网之后用水冲洗揉搓,将 500 目网筛收集的卵于清水中室温孵化,孵化后即 2 龄幼虫,每天收集备用。

(2) 细菌发酵液制备。将保存的细菌活化后接种于装有 50 mL LB 液体培养基的 150 mL 锥形瓶中,在 180 r/min, 37 ℃ 条件下培养 24 h。将培养液于 10 000 r/min, 离心 4 min, 上清液即为细

菌发酵液原液,于 4 ℃ 保存,备用。

(3) 生防菌发酵上清液对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的防效试验。吸取 900 μL 生防菌发酵液的 5 倍稀释液于 24 孔板中,再加入 100 μL 2 龄幼虫悬浮液(约含 100 头线虫),混匀后常温处理 24 h,每处理设置 2 个重复,以清水组为对照。处理完成后收集处理液以清水定容至 8 mL, 2000 r/min, 离心 2 min, 去上清,再定容至 8 mL 重悬 4 h 以上,然后在解剖镜下观察,统计死亡线虫数,线虫僵直不动且对机械触碰无反应的视为死亡。根据以下公式计算:

$$\text{线虫死亡率} = \frac{\text{死亡线虫数}}{\text{供试总线虫数}} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理组线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100\%$$

1.2.2 菌株鉴定 (1) 形态学鉴定。将生防菌株接种在 LB 固体培养基上培养 24 h 后观察其菌落大小、颜色、质地、形状和湿润程度等。

(2) 生理生化鉴定。菌株的糖发酵、甲基红、乙酰甲基甲醇、过氧化氢酶、苯丙氨酸脱氢酶试验参照《微生物学实验》第 2 版^[17]。

(3) 分子生物学鉴定。将菌株用 LB 液体培养基培养 12 h 后离心收集菌体,用 CTAB 法提取 DNA, -20 ℃ 保存备用。使用通用引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' 对菌株的 16S rRNA 序列进行扩增。反应体系为 50 μL, 2×PCRMix 25 μL, 引物各 2 μL, DNA 模板为 2 μL, ddH₂O 为 19 μL。PCR 扩增程序如下: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 50 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。反应结束后将产物回收,送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,返回的序列在 NCBI 上进行序列比对,同时用 MEGA 7.0 软件以邻接法构建系统发育树,结合形态学观察结果与生理生化鉴定结果确定生防菌株的种属。

1.2.3 菌株杀线条件优化 (1) 种子液制备。用牙签挑取 1.2.1 筛选获得的 3 株生防菌株的单菌落,分别接种于 10 mL 的 LB 液体培养基中,于 37 ℃、180 r/min 摇培过夜作为种子液,备用。

(2) 优势发酵培养基的筛选。分别吸取 100 μL 3 株生防菌株的种子液,接种于 LB、PDA 以及普通肉汤培养基中,于 37 ℃、180 r/min 培

养后对其发酵上清液进行杀线活性测定。

(3) 优势发酵时间的筛选。分别吸取 100 μL 3 株生防菌株的种子液, 接种于筛选出的优势培养基中, 于 37 ℃、180 r/min 进行摇培, 分别在第 3、5、7、10 天收集发酵上清液进行杀线活性测定。

(4) 对线虫处理时间的筛选。分别吸取 100 μL 3 株生防菌株的种子液, 在筛选出的优势发酵条件下, 于 37 ℃、180 r/min 进行培养, 将其发酵上清液分别处理线虫 24、48、72 h 后, 测定发酵上清液在不同处理时间的杀线活性。

1.2.4 促生特性评价 (1) 分别对菌株的产吲哚乙酸 (IAA) [18]、铁载体 [19]、蛋白酶 [20] 以及纤维素酶 [21] 能力进行测定。

(2) IAA 标准曲线绘制。IAA 标准曲线浓度依次为 0、10、20、30、40、50 mg/mL, 各吸取 2 mL 标准液加入试管中, 加入等体积的 Salkowski 试剂混合均匀, 在黑暗中静置 30 min, 于 535 nm 波长测定其吸光值 (OD 值), 记录数据并绘制 IAA 标准曲线 (图 1), $y=0.0338x$ ($R^2=0.9949$)。

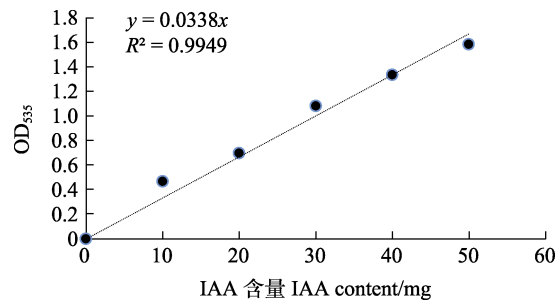


图 1 IAA 标准曲线
Fig. 1 Standard curve of IAA

1.3 数据处理

采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件对试验数据进行统计分析。采用 LSD 法进行多重比较, 采用 Pearson 法进行相关性分析, 利用 Excel 2010 软件制图。

2 结果与分析

2.1 生防菌株的筛选

通过对分离后的菌株进行杀线活性评价, 筛选到具有杀线活性的菌株: BWLY1PSB-1、BWLY1PSB-4、BWLY1X-9、BWLY2X-4、BWLY3X-11、QHY2X-18 (透明), 其中 BWLY1PSB-1、BWLY3X-11 和 BWLY2X-4 三个菌株的 5 倍稀释液对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率较高, 分别为 73.18%、71.92% 和 66.13%, 因此,

选取这 3 个菌株开展后续试验。

2.2 生防菌株的鉴定

2.2.1 形态观察及生理生化鉴定 形态学观察表明, 菌株 BWLY1PSB-1 的菌落 (图 2A) 乳白色, 不透明, 圆形, 边缘规则, 光滑, 表面凸起, 湿润, 革兰氏染色结果为阳性; 菌株 BWLY2X-4 的菌落 (图 2B) 白色, 不透明, 圆形, 边缘呈光滑齿状, 干燥, 革兰氏染色结果为阳性; 菌株 BWLY3X-11 的菌落 (图 2C) 白色, 不透明, 圆形或不规则, 干燥, 培养 3 d 后, 中间塌陷, 革兰氏染色结果为阳性。经形态特征鉴定, 可初步判断 3 株菌均为细菌。



图 2 菌株在 LB 平板的菌落形态
Fig. 2 Colony morphology of strains on LB agar plates

BWLY1PSB-1 的甲基红、蔗糖发酵、乳糖发酵、乙酰甲基甲醇 (V-P) 试验结果均呈阳性, 苯丙氨酸脱氢酶与过氧化氢酶试验为阴性。BWLY2X-4 与 BWLY3X-11 的蔗糖发酵、乳糖发酵、V-P、过氧化氢酶试验结果均呈阳性, 甲基红、苯丙氨酸脱氢酶试验为阴性 (表 1)。

表 1 菌株的生理生化特征
Tab. 1 Physiological and biochemical characteristics of strains

项目 Item	BWLY1PSB-1	BWLY2X-4	BWLY3X-11
甲基红	+	-	-
苯丙氨酸脱氢酶	-	-	-
蔗糖发酵	+	+	+
乳糖发酵	+	+	+
乙酰甲基甲醇 (V-P)	+	+	+
过氧化氢酶	-	+	+

注: + 为阳性; - 为阴性。
Note: + indicates positive; - indicates negative.

2.2.2 菌株 16S rRNA 序列测定及系统发育分析 菌株 BWLY1PSB-1、BWLY2X-4、BWLY3X-11 的 16S rRNA 长度分别为 1449、1451、1448 bp, 将所得序列分别在 NCBI 上进行比对, 运用 MEGA 7.0 软件构建进化树 (图 3, 图 4)。

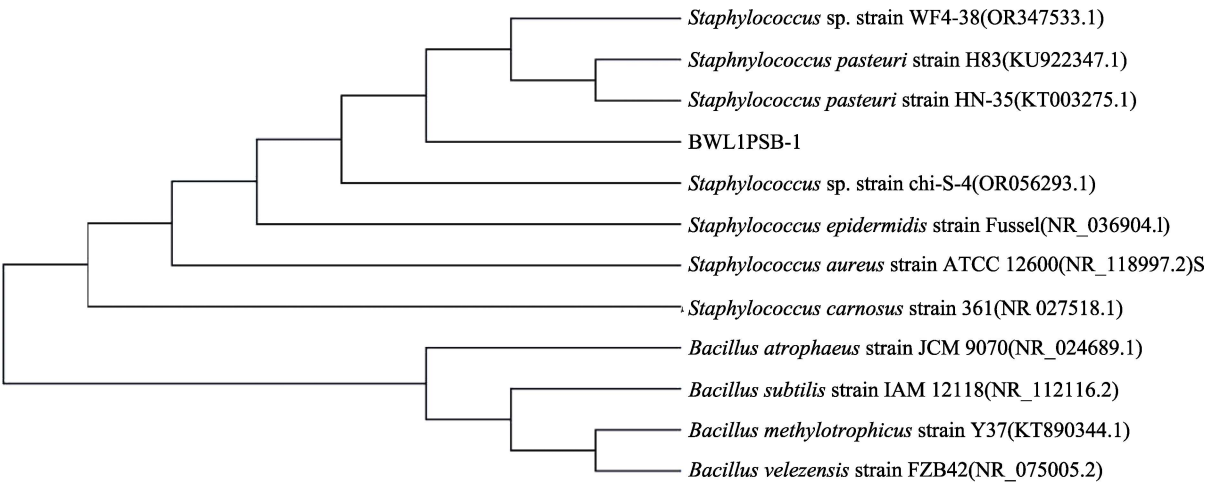


图 3 菌株 BWLY1PSB-1 基于 16S rRNA 序列构建的系统发育树
Fig. 3 Phylogenetic tree of strain BWLY1PSB-1 based on 16S rRNA sequence

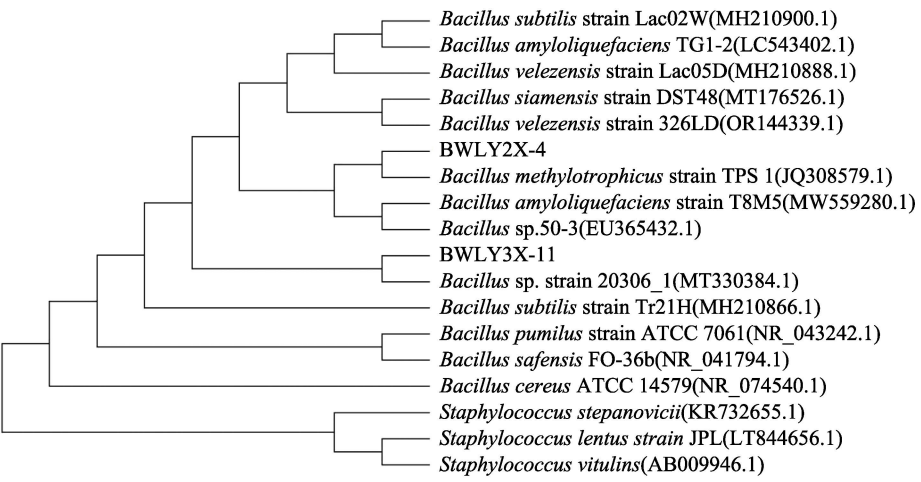


图 4 菌株 BWLY2X-4、BWLY3X-11 基于 16S rRNA 序列构建的系统发育树
Fig. 4 Phylogenetic tree of strain BWLY2X-4 and BWLY3X-11 based on 16S rRNA sequence

综合菌株的菌落特征、生理生化特性与系统发育树，将 BWLY1PSB-1 鉴定为巴氏葡萄球菌（*Staphylococcus pasteurii*），菌株 BWLY2X-4 鉴定为甲基营养芽孢杆菌（*Bacillus methylotrophicus*），BWLY3X-11 鉴定为芽孢杆菌属细菌（*Bacillus* sp.）。
2.3 3 株生防菌对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的致死条件优化

2.3.1 菌株不同培养基发酵上清液对象耳豆根结线虫的致死效果 菌株 BWLY1PSB-1、BWLY2X-4、BWLY3X-11 分别在 LB、PDB、普通肉汤培养基中培养后对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的致死率结果见表 2。菌株 BWLY1PSB-1、BWLY2X-4 的 LB、普通肉汤培养基的发酵上清液对线虫的杀线活性显著优于 PDB 培养基；而 BWLY3X-11 在 LB 和 PDB 培养基中的杀线虫活性显著优于普通肉汤。

表 2 菌株不同培养基发酵上清液对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率

Tab. 2 Corrected mortality rate of second instar larvae of the *M. enterolobii* of fermented supernatant of strains on different media

菌株编号 Strain No.	校正死亡率 Corrected mortality rate/%		
	LB	PDB	普通肉汤
BWLY1PSB-1	50.67±0.85 ^{Ab}	20.10±5.80 ^{Bb}	53.20±1.00 ^{Aa}
BWLY2X-4	65.83±3.35 ^{Aa}	22.30±3.50 ^{Cb}	58.57±2.35 ^{Ba}
BWLY3X-11	68.63±8.68 ^{Aa}	69.17±9.85 ^{Aa}	17.97±2.35 ^{Bb}

注：同行不同大写字母表示不同培养基间差异显著（ $P<0.05$ ）；同列不同小写字母表示不同菌株间差异显著（ $P<0.05$ ）。

Note: Different capital letters in the same row indicate significant difference between different culture media ($P<0.05$); Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between different strains ($P<0.05$).

同时，3 株菌株的 LB 培养基上清液对线虫的致死率无显著性差异，因此，选择 LB 培养基开展后

续的培养时间与处理时间的优化试验。

2.3.2 菌株不同培养时间发酵上清液对象耳豆根结线虫的致死效果 菌株 BWLY1PSB-1、BWLY2X-4、BWLY3X-1 在不同培养时间下发酵上清液对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的致死率见表 3。菌株 BWLY1PSB-1 在第 7 天达到最大杀线虫活性，并保持平稳；菌株 BWLY2X-4 在第 7 天达到峰值，但不同培养时间之间无显著性差异；菌株 BWLY3X-11 在培养到 5 d 时达到最大杀线虫活性，但第 7 天与第 10 天的发酵上清液的杀线虫活性会有所下降。3 个菌株均培养 5 d 后对线虫达到较好的致死率，因此选择培养 5 d 的生防菌液开展对线虫处理时间的优化试验。

表 3 菌株不同培养时间发酵上清液对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率

Tab. 3 Corrected mortality rate of second instar larvae of *M. enterolobii* of fermented supernatant of strains at different culture time

菌株编号 Strain No.	校正死亡率 Corrected mortality rate/%			
	3 d	5 d	7 d	10 d
BWLY1PSB-1	26.97±1.95 ^{Ab}	50.67±0.85 ^{Bb}	58.47±2.35 ^{Ca}	58.30±1.90 ^{Ca}
BWLY2X-4	59.63±3.35 ^{Aa}	65.83±3.35 ^{Aa}	66.17±2.15 ^{Aa}	61.50±7.50 ^{Aa}
BWLY3X-11	61.80±3.80 ^{ABa}	68.63±8.68 ^{Aa}	57.70±6.20 ^{ABa}	56.43±4.25 ^{Ba}

注：同行不同大写字母表示不同处理间差异显著（ $P<0.05$ ）；同列不同小写字母表示不同菌株间差异显著（ $P<0.05$ ）。

Note: Different capital letters in the same row indicate significant difference between different treatments ($P<0.05$); Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between different strains ($P<0.05$).

2.3.3 菌株发酵上清液不同处理时间对象耳豆根结线虫的致死效果 选择培养 5 d 的生防菌液开展对线虫处理时间的优化试验，3 株生防菌发酵上清液不同处理时间对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的致死率见表 4。3 株生防菌的杀线虫活性在处理 24 h 时均达到最大，随着处理时间的延长，3 株菌的杀线活性均逐渐下降。

2.4 生防菌株的促生特性评价

研究表明，3 株生防菌均具有产 IAA 的能力，向菌液中加入 Salkowski 试剂黑暗静置 0.5 h 后，与 CK 相比混合液产生明显的颜色变化，通过测定其吸光度，BWLY1PSB-1、BWLY2X-4 和 BWLY3X-11 的吸光度分别为 0.6828、0.4592、0.5586，将数值代入图 1 中的方程，计算出 BWLY1PSB-1、BWLY2X-4 和 BWLY3X-11 菌液中的 IAA 浓度分别为 20.20、13.58、16.53 mg/L，菌株 BWLY1PSB-1

表 4 菌株发酵上清不同处理时间对象耳豆根结线虫 2 龄幼虫的校正死亡率

Tab. 4 Corrected mortality rate of second instar larvae of *M. enterolobii* in fermented supernatant of strains at different treatment times

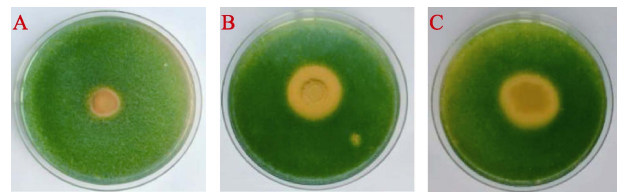
菌株编号 Strain No.	校正死亡率 Corrected mortality rate/%		
	24 h	48 h	72 h
BWLY1PSB-1	70.41±3.91 ^{Aa}	58.18±1.47 ^{Ba}	49.06±3.21 ^{Ba}
BWLY2X-4	65.85±4.70 ^{Aa}	56.73±8.16 ^{Aa}	53.48±2.80 ^{Aa}
BWLY3X-11	74.66±4.17 ^{Aa}	58.85±11.4 ^{Aa}	52.59±1.14 ^{Aa}

注：同行不同大写字母表示不同处理间差异显著（ $P<0.05$ ）；同列不同小写字母表示不同菌株间差异显著（ $P<0.05$ ）。

Note: Different capital letters in the same row indicate significant difference between different treatments ($P<0.05$); Different lowercase letters in the same column indicate significant difference between different strains ($P<0.05$).

的产 IAA 能力最强。

3 株生防菌均具有分泌铁载体的能力（图 5）。培养 1 d 后，BWLY2X-4、BWLY3X-11 菌落周围出现黄色晕圈；培养时间达到 3 d 时，BWLY1PSB-1 周围也出现黄色晕圈；而 BWLY3X-11 产生黄色晕圈的速度最快，现象更明显，其分泌铁载体的潜力更强。

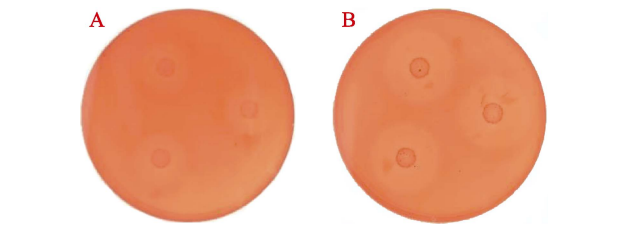


A: BWLY1PSB-1; B: BWLY2X-4; C: BWLY3X-11.

图 5 生防菌的铁载体分泌活性测定

Fig. 5 Identification of siderophores secretion activity of the strain

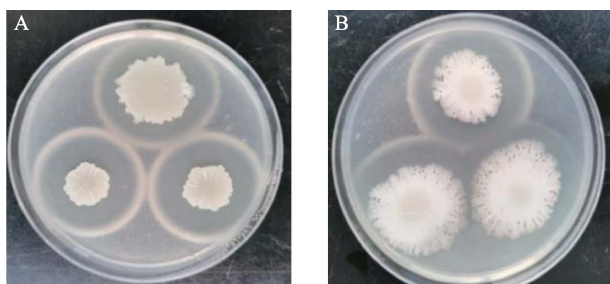
研究表明，菌株 BWLY2X-4、BWLY3X-11 均具有纤维素酶活性（图 6）和蛋白酶活性（图 7），而 BWLY1PSB-1 不具有这 2 种水解酶活性，且不能在酪蛋白培养基上生长。



A: BWLY2X-4; B: BWLY3X-11.

图 6 生防菌的纤维素酶活性测定

Fig. 6 Identification of cellulase activity of biocontrol bacteria



A: BWLY2X-4; B: BWLY3X-11.

图 7 生防菌的蛋白酶活测定

Fig. 7 Determination of protease activity of biocontrol bacteria

3 讨论

目前所采取的病虫害防治方法中生物防治具有巨大的优势,其对于环境和人类的损害最小,更加贴合绿色环保的理念。由于成本低,使用简单,具有杀线虫活性的微生物的筛选与应用成为防治植物根结线虫的一大研究热点^[22-23]。姚思敏等^[24]发现 1 株具有杀线虫活性的巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*),其盆栽试验和田间试验结果均显示出对拟禾本科根结线虫具有较好的防治效果,田间试验的防治效果最高可达 56.3%。NGUYEN 等^[25]从黑胡椒根际中分离出 20 株杀线活性较好的生防菌,经鉴定,其中有 14 株属于芽孢杆菌属细菌,史凤玉等^[26]从野生大豆中分离出 2 株对大豆孢囊线虫具有良好杀线活性的枯草芽孢杆菌和巨大芽孢杆菌,张立强等^[27]在海南尖峰岭热带雨林土壤中分离出 1 株苏云金芽孢杆菌,对松材线虫和南方根结线虫具有良好的杀线活性且效果稳定。中国农药信息网数据显示,近几年也有登记芽孢杆菌类的生物农药,陕西恒田生物农业有限公司 2018 年登记了一款以甲基营养型芽孢杆菌 LW-6 为主要成分的生物农药,可用于防治番茄根结线虫,此外还有坚强芽孢杆菌、蜡质芽孢杆菌、杀线虫芽孢杆菌等,说明生防芽孢杆菌在防治线虫上的应用具有巨大的潜力。而有关利用葡萄球菌防治根结线虫的研究较少,袁莉^[28]筛选出 1 株沃氏葡萄球菌,对拟禾本科根结线虫具较好的防效。于丰源^[29]筛选出 1 株杀线活性达 91.75% 的菌株,经鉴定确定为松鼠葡萄球菌,但葡萄球菌对人体的危害以及是否有应用于实际生产的潜力仍未知,需再进一步研究。

微生物对植物的促生作用包括产铁载体、分泌植物激素、产水解酶(蛋白酶、淀粉酶等)等

途径,IAA 是调控植物生长的重要信号物质,是促进植物生长的激素,铁载体又称为嗜铁素,是微生物产生的金属螯合物质,在低铁环境中,微生物产生的铁载体能够还原 Fe^{3+} 为 Fe^{2+} 供植物吸收^[30-31]。通过对 3 株生防菌的促生特性进行测定,发现 3 株菌均具有产 IAA 和铁载体能力,BWLY2X-4 和 BWLY3X-11 还能产生纤维素酶和蛋白酶,具有良好的促生潜力。程鑫宇等^[32]通过分离产 IAA 的根际促生菌并将其用于盐碱胁迫下的玉米和小麦,发现其对盐碱胁迫具有较好的缓解作用。朱森林等^[33]发现 1 株解淀粉芽孢杆菌对香蕉枯萎病 4 号生理小种具有较好的防效,同时也能促进香蕉的生长发育,通过测定发现该菌株为高产铁载体菌株且能分泌 IAA。本研究中的 3 株生防菌具有杀线活性的同时还具有一定的促生特性,推测其在防治象耳豆根结线虫的同时还能在一定程度上促进作物的生长发育。

4 结论

本研究通过浸渍法从本实验室分离的一批细菌中筛选出 3 株杀线活性较好的菌株(BWLY1PSB-1、BWLY2X-4 和 BWLY3X-11),并对其发酵的培养基、时间以及处理时间进行了优化;通过研究其促生特性发现 3 株菌均具有产 IAA 和铁载体的能力,BWLY2X-4、BWLY3X-11 还具有产蛋白酶和纤维素酶的能力,具有一定的促生特性。本研究初步筛选出既有高效防控植物根结线虫又具促生特性的优良菌株,丰富了植物根结线虫生物防治的微生物资源,但由于本研究仅进行了室内试验,仍需开展小区与大田试验验证 3 株生防菌对线虫的防控效果及对作物的促生能力。

参考文献

- [1] 刘维志. 植物病原线虫学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2000.
LIU W Z. Plant pathogenic nematology[M]. Beijing: China Agricultural Publishing House, 2000. (in Chinese)
- [2] 刘青娥, 曹鹏飞. 植物线虫的研究和防治[J]. 安徽农业科学, 2006(18): 4644-4645, 4664.
LIU Q E, CAO P F. Research progress in the control of plant nematode[J]. Anhui Agricultural Science, 2006(18): 4644-4645, 4664. (in Chinese)
- [3] 宋莉, 周培培, 李阳, 张立猛, 赵进龙, 张翠萍, 罗秀莲, 纳红艳, 刘芳, 谷星慧, 阮维斌. 云南玉溪地区烟田根结

- 线虫的 SCAR 鉴定、分布及其生物防治研究[J]. 农业资源与环境学报, 2019, 36(4): 546-552.
- SONG L, ZHOU P P, LI Y, ZHANG L M, ZHAO J L, ZHANG C P, LUO X L, NA H Y, LIU F, GU X H, RUAN W B. Distribution of *Meloidogyne* spp. in tobacco field of Yuxi, Yunnan province and biological control against *Meloidogyne* spp.[J]. Journal of Agricultural Resources and Environment, 2019, 36(4): 546-552. (in Chinese)
- [4] RALMI N, KHANDAKER M M, MAT N. Occurrence and control of root knot nematode in crops: a review[J]. Australian Journal of Crop Science, 2016, 11(12): 1649.
- [5] KIEWNICK S, KARSSSEN G, BRITO J A, OGGENFUSS M, FREY J E. First report of root-knot nematode *Meloidogyne enterolobii* on tomato and cucumber in Switzerland[J]. Plant Disease, 2008, 92(9): 1370.
- [6] ELLING A A. Major emerging problems with minor *Meloidogyne* species[J]. Phytopathology, 2013, 103(11): 1092-1102.
- [7] 鄢小宁, 郑服丛, 郑经武, 李锐. 利用少孢节丛孢 (*Arthrobotrys oligospora*)HNQ11 菌株控制象耳豆根结线虫危害[J]. 热带作物学报, 2007, 28(4): 98-101.
- YAN X N, ZHENG F C, ZHENG J W, LI R. Control of *Meloidogyne enterolobii* using HNQ11 strain of *arthrobotrys oligospora*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2007, 28(4): 98-101. (in Chinese)
- [8] 卓侃, 胡茂秀, 廖金铃, 崔汝强, 李迅东, 王彬, 周健勇. 广东省和海南省象耳豆根结线虫的鉴定[J]. 华中农业大学学报, 2008(2): 193-197.
- ZHUO K, HU M X, LIAO J L, CUI R Q, LI X D, WANG B, ZHOU J Y. Identification of *Meloidogyne enterolobii* in Guangdong and Hainan provinces[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2008(2): 193-197. (in Chinese)
- [9] 李周容, 龙海波, 孙燕芳, 裴月令, 陈园, 冯推紫. 海南省蔬菜根结线虫发生种类与分布[J]. 植物保护, 2020, 46(6): 213-216, 245.
- LI Z R, LONG H B, SUN Y F, PEI Y L, CHEN Y, FENG T Z. Occurrence and distribution of the root-knot nematode species vegetables in Hainan province[J]. Plant Protection, 2020, 46(6): 213-216, 245. (in Chinese)
- [10] 贾本凯, 王会芳, 陈绵才. 海南岛茄果类蔬菜根结线虫种类鉴定[J]. 广东农业科学, 2012, 39(7): 104-106.
- JIA B K, WANG H F, CHEN M C. Species identification of root-knot nematode on solanaceous vegetable in Hainan island[J]. Guangdong Agricultural Science, 2012, 39(7): 104-106. (in Chinese)
- [11] 黄伟明, 陈绵才, 肖彤斌, 王会芳. 海南岛葫芦科蔬菜根结线虫种类鉴定[J]. 植物保护, 2011, 37(1): 70-73.
- HUANG W M, CHEN M C, XIAO T B, WANG H F. Identification of root knot nematodes in Cucurbitaceae vegetables from Hainan Island[J]. Plant Protection, 2011, 37(1): 70-73. (in Chinese)
- [12] 高淋淋, 刘志明. 植物根结线虫生物防治研究进展[J]. 广西植保, 2015, 28(1): 32-35.
- GAO L L, LIU Z M. Research progress on biological control of plant root knot nematodes[J]. Guangxi Plant Protection, 2015, 28(1): 32-35. (in Chinese)
- [13] 刘秀花. 芽孢杆菌的应用研究及进展[J]. 商丘师范学院学报, 2005(5): 141-143.
- LIU X H. Research and progress on the application of *Bacillus*[J]. Journal of Shangqiu Normal University, 2005(5): 141-143. (in Chinese)
- [14] XIANG N, LAWRENCE K S, DONALD P A. Biological control potential of plant growth: promoting rhizobacteria suppression of *Meloidogyne incognita* on cotton and *Heterodera glycines* on soybean: a review[J]. Journal of Phytopathology, 2018, 166(7/8): 449-458.
- [15] 鲁红学, 周焱. 类芽孢杆菌在植物病害防治和环境治理中的应用研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008(30): 13244-13247.
- LU H X, ZHOU Y. Research advances in application of *Paenibacillus* in plant disease control and environment control[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008(30): 13244-13247. (in Chinese)
- [16] 林彬. 芽孢杆菌和类芽孢杆菌的鉴定及其对油菜菌核病生防作用的研究[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2017.
- LIN B. Identification of *Bacillus* and *Paenibacillus* and their biological control against *Sclerotinia sclerotiorum*[D]. Hefei: Anhui Agricultural University, 2017. (in Chinese)
- [17] 赵斌, 林会, 何绍江. 微生物学实验[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- ZHAO B, LIN H, HE S J. Microbiological experiments[M]. Second edition. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [18] HE D, SINGH S K, PENG L. Flavonoid-attracted *Aeromonas* sp. from the *Arabidopsis* root microbiome enhances plant dehydration resistance[J]. ISME Journal, 2022, 16(11): 2622-2632.
- [19] SCHWYN B, NEILANDS J B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores[J]. Analytical Biochemistry, 1987, 160(1): 47-56.
- [20] 张红, 张卫兵, 乔海军, 朱建宁, 温得林, 张智良, 赵丽红. 天祝传统藏曲中蛋白酶产生菌的筛选与酶学特性研究[J]. 食品与发酵科技, 2022, 58(4): 8-13.
- ZHANG H, ZHANG W B, QIAO H J, ZHU J N, WEN D L, ZHANG Z L, ZHAO L H. Research on screening of protease-producing strains from Tianzhu traditional Zangqu and enzymatic properties[J]. Food and Fermentation Science &

- Technology, 2022, 58(4): 8-13. (in Chinese)
- [21] 江学斌, 成雪鸿, 马苗鹏, 邓仲晴, 李嘉慧. 产纤维素酶芽孢杆菌的鉴定与酶活力比较[J]. 广东农业科学, 2022, 49(4): 116-122.
- JIANG X B, CHENG X H, MA M P, DENG Z Q, LI J H. Identification and enzyme activity comparison of cellulase producing *Bacillus*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2022, 49(4): 116-122. (in Chinese)
- [22] HASEEB A, SHARM A A, SHUKLA P K. Studies on the management of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*-wilifungus, *Fusarium oxysporum* disease complex of green gram, *Vignar adiata* cv ML-1108[J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2005, 6(8): 736-742.
- [23] CHINHEYA C C, YOBO K S, LAING M D. Biological control of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* (Chitwood) using *Bacillus* isolates, on soybean[J]. Biological Control, 2017, 109: 37-41.
- [24] 姚思敏, 丁中, 周建宇, 袁涛, 黄勇椿, 叶姗. 水稻拟禾本科根结线虫生防细菌的分离鉴定与防治效果评价[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(4): 606-615.
- YAO S M, DING Z, ZHOU J Y, YUAN T, HUANG Y C, YE S. Isolation and identification of biocontrol bacterium and its control effect against *Meloidogyne graminicola*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(4): 606-615. (in Chinese)
- [25] NGUYEN V B, WANG S L, NGUYEN T H, TRINH T H T, NONG T T, NGUYEN T U, NGUYEN V N, NGUYEN N D. Reclamation of rhizobacteria newly isolated from black pepper plant roots as potential biocontrol agents of root-knot nematodes[J]. Research on Chemical Intermediates, 2019, 45: 5293-5307.
- [26] 史凤玉, 武云鹏, 张瑞敬, 吴楠, 朱英波. 野生大豆内生细菌多样性及其杀线虫活性分析[J]. 植物保护学报, 2013, 40(4): 327-332.
- SHI F Y, WU Y P, ZHANG R J, WU N, ZHU Y B. Diversity and nematicidal activity of the endophytic bacteria in the wild soybean *Glycine soja*[J]. Journal of Plant Protection, 2013, 40(4): 327-332. (in Chinese)
- [27] 张立强, 黄惠琴, 崔莹, 邹潇潇, 刘敏, 鲍时翔. 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.
- ZHANG L Q, HUANG H Q, CUI Y, ZOU X X, LIU M, BAO S X. Separation, screening and identification of *Bacillus* sp. antagonistic to root-knot nematodes[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(9): 1825-1829. (in Chinese)
- [28] 袁莉. 植物线虫生防细菌的筛选及其防效[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- YUAN L. Screening of biocontrol bacteria and its control effect to plant nematode[D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [29] 于丰源. 杀线虫葡萄球菌 AMCC1020 的分离鉴定及其杀线虫活性物质的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2021.
- YU F Y. Screening and identification of *Staphylococcus* nematocides AMCC1020 and study of its active substance against nematode[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [30] 殷奥杰, 王齐, 葛森森, 鲁统壮, 任丽英. 微生物铁载体的应用研究进展[J]. 环境保护与循环经济, 2021, 41(7): 20-24, 69.
- YIN A J, WANG Q, GE M M, LU T Z, REN L Y. Research progress in the application of microbial siderophore[J]. Environmental Protection and Circular Economy, 2021, 41(7): 20-24, 69. (in Chinese)
- [31] 马雪晴, 冀傲冉, 郑娇莉, 曹春霞, 龚艳. 植物根际促生菌促生机制及其应用研究进展[J/OL]. 中国农业科技导报, (2023-12-20). [2024-01-13]. <https://doi.org/10.13304/j.nykjdb.2023.0654>.
- MA X Q, JI A R, ZHENG J L, CAO C X, GONG Y. Research progress on growth-promoting mechanism and application of plant growth-promoting rhizobacteria[J/OL]. Journal of Agricultural Science and Technology, (2023-12-20). [2024-01-13]. <https://doi.org/10.13304/j.nykjdb.2023.0654>. (in Chinese)
- [32] 程鑫宇, 王继莲, 麦日艳古·亚生, 李明源. 盐爪爪根际土壤产 IAA 菌株分离及促生特性分析[J]. 草业学报, 2024, 33(4): 110-121.
- CHENG X Y, WANG J L, MAIRIYANGU Y S, LI M Y. Isolation and growth-promoting characteristics of rhizobacteria producing indole-3-acetic acid from the rhizosphere soil of *Kalidium foliatum*[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2024, 33(4): 110-121. (in Chinese)
- [33] 朱森林, 刘先宝, 蔡吉苗, 陈奕鹏, 黄贵修. 内生细菌 BEB33 的分离、鉴定及对香蕉枯萎病的生防作用评价[J]. 热带作物学报, 2014, 35(6): 1177-1182.
- ZHU S L, LIU X B, CAI J M, CHEN Y P, HUANG G X. Isolation of endophytic bacterial BEB33 and its bio-control evaluation against banana *Fusarium* wilt[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2014, 35(6): 1177-1182. (in Chinese)