

应用根际细菌防治植物寄生线虫的研究

郭荣君 刘杏忠 杨怀文

(中国农科院生物防治研究所, 北京 100081)

STUDY ON THE BIOCONTROL OF PLANT-PARASITIC NEMATODES BY RHIZOBACTERIA

GUO Rong-jun LIU Xing-zhong YANG Huai-wen

(Institute of Biological Control, CAA S, Beijing 100081)

[摘要] 本文从根际细菌的概念发展、特点, 对植物寄生线虫防治及其机理、研究方法等方面扼要介绍了根际细菌防治植物寄生线虫的研究进展。

对植物寄生线虫的防治, 通过轮作、改进栽培措施、使用抗性品种和杀线剂可以起到一定效果, 但都有其局限性。近几年来植物寄生线虫的生物防治受到重视 (O'Sullivan, O'Carra, 1992; Alabouvette, 1993; Baker, 1987; Hornby, 1990), 国内外对用食线虫真菌和寄生性细菌防治线虫研究较多。但食线虫真菌生长缓慢, 生产工艺复杂。寄生性细菌如 *Pasteuria penetrans*, 虽然研究较多, 但因其为专性寄生物, 难于人工培养, 大量生产受到限制。根际细菌则因其特点, 在最近十几年的研究工作中, 尤其对土传真菌和细菌的生物防治和促进植物生长方面有很大发展, 如 Fluorescent *Pseudomonas* 对马铃薯黑茎病病原细菌 *Erwinia carotovora* 有抑制作用 (Xu, Gross, 1986)。Fluorescent *Pseudomonas* RBT 13 使鹰嘴豆病害减轻 50%, 对大豆具有 37% 促生长作用。 *P. cepacia* 对 *Rhizoctonia* spp.、*Fusarium* spp.、*Pythium* spp. 等多种病原真菌有抑制作用 (Lambert, et al., 1987)。这使人们受到启发, 对用根际细菌防治植物寄生线虫进行了探索, 目前用根际细菌防治植物寄生线虫在国外已成为研究热点之一。防治线虫的 *Bacillus thuringiensis* 菌剂正在登记 (Roders, 1993)。

1 根际及根际细菌

根际 (rhizosphere) 一词首先由 Hiltner (1904) 用来专门描述细菌与豆科植物根的关系。Stirling (1992) 将根际定义为: 生物和物理特性受到根影响的紧密环绕着根的区域。根际与非根际土壤相比, 微生物数量多, 活动频繁。在这两个区域之间为过渡区, 离根越远, 受根的影响越弱 (Bruehl, 1987)。根际又可进一步划分为内外根际和根表。内根际 (endorhizosphere) 指构成根本身的各组分的细胞层, 根的周围区域则为外根际 (ectorrhizosphere), 根表 (rhizoplane) 是指根的表面本身 (Lynch, 1990)。微生物可以在内外根际和根表定殖。根际细菌 (rhizobacteria)

是从根际分离所得, 依据其对植物的反应将其划分为有益的、有害的和中性的三类。有益根际细菌又被称为促生根细菌(plant growth-promoting rhizobacteria 简称 PGPR), PGPR 最早由 Kloepper 和 Schroth (1978) 及 Suslow (1978) 提出, 指与根有密切关系并强定殖于根系, 能促进植物生长的根际细菌。但是, Sikora (1988) 在研究根际细菌对植物寄生线虫的作用时发现, 有些根际细菌并不引起产量增加, 所以 Sikora 提出用 PHPR (plant health-promoting rhizobacteria) 代替 PGPR 来定义那些对植物寄生线虫有抑制作用的根际细菌。现在人们研究的根际细菌多指在生防中具拮抗作用或促生作用的有益根际细菌。因根际细菌是从植物根际分离所得, 而具下列特点:

(1) 根际细菌与根具亲和力: Oostendorp 和 Sikora (1989) 认为 G-菌的细胞壁双层脂膜上具有与根表面外源凝聚素(lectin)相结合的结构, 较易在植物根部定居、繁殖, 对其占领空间和生长竞争是很有利的。根际细菌在根部的定殖, 对营养和根分泌物的优先利用, 使病原物的生长繁殖所需营养受到限制, 对根的侵染受到排斥。

(2) 拮抗性强: 根际是根防御病原侵染的第一线, 根际土壤比非根际土壤微生物数量多, 活动频繁, 尤其细菌数量最高。因此从根际或根表易分离到拮抗细菌, 且拮抗性强。

(3) 易于应用: 细菌大都可以人工培养, 便于控制, 尤其具防病增产作用的芽孢杆菌, 产生芽孢, 能抵抗不良环境, 易于保存, 适合加工成各种各样的菌剂。因而根际细菌在生物防治上应用具很大潜力。

2 根际细菌对植物寄生线虫的防治

用根际细菌防治植物寄生线虫的研究是近几年才开始的, 根际细菌 *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus sphaerius*, *Bacillus subtilis*, *Agrobacterium radiobacter* (Becker, et al, 1988; Oostendorp, Sikora, 1989; Sikora, 1988; Racke, Sikora, 1992) 及 *P. aureofaciens* (McInnis, 1990) 在温室和田间对植物寄生线虫有防效, 有些有效细菌尚未鉴定。1988年, Becker 报道根际细菌对南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 有防效, 减少了根结数, 根系增大, 根重增加。根际细菌 *Bacillus* sp.、*B. cereus* 和两株假单胞菌对防治南方根结线虫、木豆胞囊线虫 (*Heterodera cajani*)、玉米胞囊线虫 (*H. zea*) 和燕麦胞囊线虫 (*H. avenae*) 幼虫有效 (Oostendorp, Sikora, 1989; Sikora, 1988; Racke, Sikora, 1992)。Oostendorp 和 Sikora 等人则从1988年起, 从根际细菌的分离鉴定、对植物寄生线虫的温室和田间防效、根际细菌与植物寄生线虫的体外关系, 以及拮抗机理等方面作了系统研究 (Oostendorp, Sikora, 1990)。根际细菌在温室自然土中防效同田间效果一致, 大部分超过40% (Racke, Sikora, 1992)。

3 根际细菌对线虫的拮抗机理

关于根际细菌对线虫的拮抗机理, 目前还不是很清楚, 但认为涉及以下几个方面。

3.1 产生杀线物质 杀线物质可能是含氮物降解过程中产生的挥发性的 NH_3 和 NO_2 (Becker, 1988; 田红林, 1992), 但不是主要生防机制。

3.2 改变根分泌物与线虫相互作用方式 Sikora (1992) 认为从特定的根区分泌出来的根分泌物是影响线虫生活史中特定发育阶段的重要因素。根分泌物影响线虫卵孵化、线虫趋向于根的运动、线虫与寄主的识别及在根上的寄生。这些阶段被认为是线虫发育的薄弱环节而适用于

生防。特定根围的根际细菌,可消耗或改变根分泌物的分泌形式,从而影响根分泌物依赖型植物寄生线虫的发育,而不是产生抗生素或嗜铁素。

3.3 营养和空间位点竞争 Zuckerman 和 Jasson (1984) 认为线虫与根的相互识别是根表面的外源凝聚素与线虫体表糖类之间的相互识别。G-菌的细菌细胞壁双层脂膜上具结合植物外源凝聚素的结构(Oostendorp, Sikora, 1989)而优先占据线虫的侵染位点,并且在根部定居繁殖,消耗根围营养、占据空间位点而达到生防的目的。

4 研究方法

4.1 分离筛选

4.1.1 培养基 通常用 King's B 培养基(KMB)来分离荧光假单胞菌,用 TSA (Tryptic soy-bean agar) 或 NA (Nutrient agar) 来分离其它根际细菌(Onkar, Sinclair, 1985)。

4.1.2 分离 (1) 根际细菌分离: 取作物幼苗期根,轻轻抖去大块土,于无菌水中或磷酸缓冲液(pH 6.8)中振荡1小时,部分样品做系列稀释,涂布于 TSA 或 NA、KMB 培养基,部分样品进行加热处理(80℃, 20分钟或90℃, 10分钟,筛选芽孢菌),再系列稀释,涂布于 TSA 或 NA 平板上。(2) 根表细菌分离: 幼苗根用自来水充分冲洗,然后放入已加石英砂或0.025%吐温-80的无菌水中,充分振荡,系列稀释,涂布于 TSA 或 KMB 培养基上。但因根际和根表微生物很难区分,因此常将二者合并。(3) 根内细菌分离: 根用1.5%NaClO 表面消毒10分钟,研碎后,做系列稀释至 10^{-2} ,涂布于 TSA (NA) 培养基上。TSA (NA) 平板于28℃倒置培养24小时,挑单菌落,纯化,斜面保存。KMB 平板于25℃倒置培养24~48小时,在紫外灯下有荧光的,挑单菌落,纯化,于斜面和蒸馏水保存。

4.1.3 筛选 Becker 等(1988)曾用细菌培养物对线虫的致死率作为体外筛选具杀线能力 PGPR 的方法,大约有1%的根际细菌呈阳性,20%的初筛菌株在体外试验中有明显效果。但 Sikora (1992) 认为根际细菌是通过消耗或改变根分泌物的分泌形式而影响根分泌物依赖型植物寄生线虫的发育,从而打破线虫的生活循环来防治线虫,所以他认为应在非灭菌土中直接进行筛选。

4.2 定殖实验

因为根际细菌能否定殖,决定其生防能力,所以可将定殖实验作为筛选的有效辅助手段。目前,对定殖缺乏很好的研究方法,多采用抗生素标记法。在培养基中加一定量($50\mu\text{g}/\text{mL} \sim 100\mu\text{g}/\text{mL}$)利福平或氨基青霉素,诱导抗性菌株。用抗性菌株进行细菌化处理,种植,然后回收,回收同分离方法,但培养基需加入上述标记用抗生素。抗生素标记法的缺点是土壤中芽孢杆菌本身易发生突变,产生对抗生素的抗性,而荧光假单胞菌多次传代也易突变,因此用此方法测定其定殖能力,不是很准确。若无菌土中测其定殖,又不能反映其实际与根围固有微生物竞争能力。定殖研究方法尚需改进。

5 展望

缺乏高效拮抗菌株、防效不稳是目前防治植物寄生线虫的主要问题。要筛选高效拮抗菌株,需对其防病机制,根部定殖进行进一步的研究,以便于寻找快速有效的筛选方法(Xu, Gross, 1986; Toyota, Kimura, 1993; Stephens, et al, 1993; Oedjijono, et al, 1993)。防效

不稳定表明了寄主、病原、拮抗物和环境之间关系复杂,也与菌株生物学特性的变异、根部定殖能力差及生产、贮存不当有关,因此需要我们对菌株的动力学特点和生态联系等有更好的了解,改进剂型和田间应用技术以增强细菌在根部的定殖。根际细菌在生物技术方面的发展如:将对线虫有负作用的基因转移到易在植物根部定殖的细菌中,或直接转入植物以构建转基因植物可能成为防治植物寄生线虫的一条途径。

参考文献

- 田红林 1992 北京市蔬菜线虫种类研究及拮抗线虫的细菌筛选[研究生论文] 中国农业大学
- Alabouvette, C., et al 1993 Recent advances in the biological control of *Fusarium* wilts Pestic Sci 37: 365~ 373
- Baker, K. F. 1987. Evolving concepts of biocontrol of plant pathogens Annu. Rev. Phytopathol 25: 67~ 85
- Becker, J. O. 1988 Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gallformation Phytopathology, 78(11): 1466~ 1469
- Bruehl, G. W. 1987. The rhizosphere In: George W. Bruehl ed Soil-Borne Plant Pathogens Chapter 7, 104
- Hiltner, L. 1904 Uber neuere Erfahrungen und problem auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grudungung und Brache AmDtsch. Landwirt. Ges 98: 59~ 78
- Hornby, D. ed 1990 Biological Control of Soil-Borne Plant Pathogens Wallingford: CAB International
- Kloepper, J. W., M. N. Schroth 1978 In Proc 4th Int. Conf. Plant Pathog. Bact. Angers, Fr 1: 245~ 250
- Lambert, B., et al 1987. Rhizobacteria of maize and their antifungal activities Applied and Environmental Microbiology 53 (8): 1866~ 1871
- Lynch, J. M. 1990 Introduction: some consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil The Rhizosphere Chapter 1: P1. Wiley Series in Ecological and Applied Microbiology Series Editor: Ralph Mitchell John Wiley & Sons
- McInnis, I., et al 1990 Suppression of *Cricone mella xenoplax* on peach by rhizosphere bacteria Proc. 2nd Inter. Nematology Congr., Veldhoven, The Netherlands
- Oedijono, M. A., et al 1993 Isolation of bacteria antagonistic to a range of plant pathogenic fungi Soil Biol Biochem. 25(2): 247~ 250
- Onkar, D. D., J. B. Sinclair 1985 Basic Plant Pathology Methods CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida
- Oostendorp, M., R. A. Sikora 1989 Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet Revue Nematol 12(1): 77~ 83
- Oostendorp, M., R. A. Sikora 1990 In-vitro interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii* Revue Nematol 13(3): 269~ 274
- O'Sullivan, D. J., F. O'Gara 1992 Traits of Fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens Microbiological Reviews 56(4): 662~ 676
- Racke, J., R. A. Sikora 1992 Isolation, formulation and antagonistic activity of rhizobacteria toward the potato cyst nematode *Globodera pallida*. Soil Biology and Biochemistry, 24(6): 521~ 526
- Rodgers, P. B. 1993 Potential of biopesticides in agriculture Pestic Sci 39: 117~ 129
- Sikora, R. A. 1988 Interrelationship between plant health promoting rhizobacteria, plant parasitic nematodes and soil microorganisms Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent, 53/2b: 867~ 878
- Stephens, P. M., et al, 1993 Selection of *Pseudomonas* strains inhibiting *Pythium ultimum* on sugarbeet seeds in soil Soil Biol Biochem. 25(9): 1283~ 1288
- Stirling, G. R. 1992 Biological Control of Plant Parasitic Nematodes C. A. B. International P34
- Suslow, T. V., et al 1978 In Proc 4th Int. Conf. Plant Pathog. Bact. Angers, Fr 2: 885
- Toyota, K., M. Kimura 1993 Colonization of chlamydospores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *raphani* by soil bacteria and their effects on germination Soil Biol Biochem. 25(2): 193~ 197
- Xu, G. W., D. C. Gross 1986 Selection of fluorescent *Pseudomonas* antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. Phytopathology 76: 414~ 422
- Zuckerman, B. M., H. B. Jasson 1984 Nematode chemotaxis and possible mechanism of host/prey recognition Ann. Rev. Phytopathol 22: 95~ 113