

植物根际拮抗线虫的细菌筛选

田红林 王寿华 武修英

(北京农业大学植物保护系, 北京 100094)

摘要: 从北京22个菜区的27种蔬菜植物根表和根际土壤中分离出883个细菌分离物, 在营养琼脂培养基(NA)平板上检测对目标线虫 *Panagrellus redivivus* 的致死率, 得到10个最有效菌株, 它们在接种24 h后(22℃下)对该线虫的致死率均在90%以上。这10个有效菌株对植物寄生线虫有很强的拮抗作用, 在NA平板上仅6 h后就使北方根结线虫二龄幼虫、*Xiphinema thornei*, *Trichodorus pakistanensis*, *Scutellonema clathricaudatum* 和 *Criconemoides profusus* 的致死率达100%。在营养肉汁培养基(NB)中培养48 h后的滤液及其2倍、6倍、和10倍的稀释液对根结线虫二龄幼虫有显著的致死作用。用 10^8 cfu·mL⁻¹的细菌悬浮液浸根后显著降低番茄的根结指数, 防效达35%~82.1%。经鉴定, 这10个有效菌株中8个属芽孢杆菌(*Bacillus* spp.), 2个为不动细菌(*Acinebacter* spp.)。

关键词: 根际细菌; 筛选; 线虫生物防治

中图分类号: S432.45

根际细菌属根系的微生态成员, 易于定殖和转移, 已较多的应用于多种土传病害的防治^[1,2], 并成为生物防治的一个新的生长点^[3], 显示出强大的生命力^[4]。在线虫生防方面, 大量的研究集中于捕食线虫真菌^[5]、专性寄生细菌^[6]和土壤细菌代谢产物^[7]等方面, 但这些生防因子在土壤定殖、人工培养或大田应用上受到很大限制^[8]。近年来, 少数学者^[9,10]已开始探讨根际细菌对线虫的生物防治, 这是个新的苗头。本研究也在此方面作了进一步尝试, 并力求从我国植物根际分离出有效的拮抗细菌, 用于植物寄生线虫的防治。

1 材料和方法

1.1 根际细菌的分离 1991年从北京22个菜区采集27种蔬菜植物的根及根际土壤样品共227份, 采用葡萄糖-土壤浸出液琼脂平板法^[11]分离其中的细菌。所得细菌纯化后用于筛选试验。

1.2 供试线虫的获取 以 *Panagrellus redivivus* 为筛选的目标线虫, 采用燕麦片培养法培养15天后用于试验。

所用植物寄生线虫有北方根结线虫二龄幼虫、*Xiphinema thornei*, *Scutellonema clathricaudatum*, *Criconemoides profusus*, 和 *Trichodorus pakistanensis* 五种。北方根结线虫采自北京中国农科院蔬菜温室, 其他4种采自北京南口农场苹果园。均以筛淘离心法获得。

1.3 拮抗线虫的有效菌株筛选及其对植物寄生线虫的拮抗作用 在NA培养基上培养供试细菌24~72 h(25℃下), 加入0.1 mL *P. redivivus* 悬浮液(200条·mL⁻¹), 移入22℃的恒温箱中保持24和48 h后检测线虫死活。以无菌的NA平板作对照。重复3次。

收稿日期: 1994-11-15

植物寄生线虫的拮抗试验采用平板和滤液两种检测法。平板检测同上。滤液检测采用 NB 培养基, 接入供试细菌, 培养 48 h, 过滤后获得原液。取部分原液稀释成 2 倍, 6 倍和 10 倍的溶液, 接入供试线虫, 22℃ 下放置 3, 6, 12, 24 和 48 h, 定期检测线虫死活。以 NB 培养基的滤液及其稀释液作对照。

1.4 有效菌株的温室防效试验 以温室大棚中普遍发生的北方根结线虫病为生防对象。共进行 3 次重复试验。具体方法如下: 取自然发生的根结线虫病土[采自北京中国农科院蔬菜温室, 用于第 1 次试验的土壤经过 4 个月休闲(过冬), 二龄幼虫密度 $400 \text{ 条} \cdot \text{L}^{-1}$ 土壤; 用于第 2 和第 3 试验的土壤未休闲, 二龄幼虫密度 $3600 \text{ 条} \cdot \text{L}^{-1}$], 分装 15 cm 直径花盆中。取生长一致的番茄苗(品种为特福 434)于菌液($10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$)中浸根 5 min, 然后移栽至花盆中。以无菌水浸根作对照。5 个重复。每次试验移栽的苗龄不同, 依次分别为 2, 4, 6 片真叶期。生长 15~30 d 检查结果。防治效果用下式计算:

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

2 结果

从根表和根际土壤中共分离到 883 个细菌分离物。这些分离物在 NA 平板上对目标线虫的校正致死率呈典型的正态分布(图 1), 表明大多数分离物对线虫的拮抗能力很弱或无影响, 而对线虫有很强拮抗力或益作用的分离物很少。所有菌中, 仅 10 个分离物对目标线虫的校正致死率达到 90% 以上, 占全部分离物的 1.13%。这 10 个分离物对目标线虫的拮抗作用很强, 24 h 内使虫体由最初的活跃状态到运动迟缓, 最后弯曲死亡、变形和腐解。

筛选出的 10 个最有效菌株在 NA 平板上 6 h 后对供试的 5 种植物寄生线虫的致死率均为 100%, 而对照为 0。其 NB 培养滤液及其 2 倍、6 倍和 10 倍稀释液对根结线虫二龄幼虫的校正死亡率随稀释倍数降低、随时间增加。3 h 后, 原液与稀释液对线虫的致死率差异小, 致死率低, 在 0~30.1% 之间。对照为 0。6 h 后, 对照死亡率为 0.99%, 而原液达 3.23%~99.44%, 稀释液 0~80.53%, 并随稀释倍数递减。12 h 后, 各原液的死亡率达 93.60%~100%, 2 倍稀释液除 HSC-S1

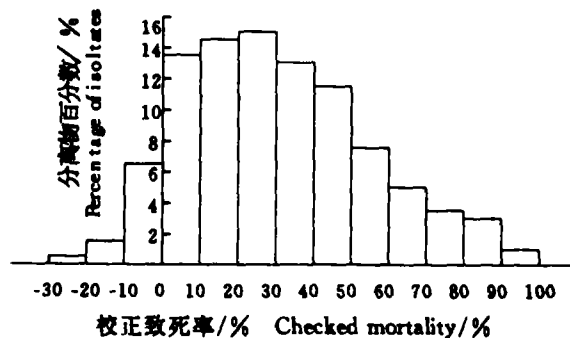


图 1 接种 24 h 后各分离物对目标线虫校正致死率的分布

Fig. 1 Distribution of checked mortality of the target nematode caused by different bacteria isolates after 24 h inoculation

(5.56%) 和 CBX-S2(73.08%) 外, 均达 80% 以上, 对照仅 5.73%。24 和 48 h 后, 原液全部为 100%, 稀释液的致死率大幅度增加, 部分达 100%, 对照死亡率分别为 9.62% 和 14.56%。这些结果说明细菌代谢物有很强的杀线虫能力。

温室盆栽试验表明, 有效菌株对番茄根结线虫病均有一定程度的防效(表 1), 其中 FX-R1 分离物之防效可达 82.1%。各处理平均株高也不同程度增加。

经鉴定, 筛选出的 10 个有效菌株中, 8 个为芽孢杆菌, 2 个为不动细菌(表 2)。

表1 10个有效菌株在温室盆栽试验中对番茄根结线虫病的防治效果

Table 1 Control results of the ten effective strains to tomato root-knot disease in greenhouse experiment

细菌菌株 Bacteria strain	试验1 Experiment 1 t=30 d			试验2 Experiment 2 t=30 d			试验3 Experiment 3 t=15 d		
	平均株高 Plant height /cm	根结指数 Root-knot index /%	防效 Control effect /%	平均株高 Plant height /cm	根结指数 Root-knot index /%	防效 Control effect /%	平均株高 Plant height /cm	根结指数 Root-knot index /%	防效 Control effect /%
CK	14.4	44.0		9.7	93.3		13.2	80.0	
FX-R1	15.2	30.0	31.8	10.3	16.7	82.1	14.7	62.0	22.5
CBX-S1	16.2	24.0	45.5	10.2	83.3	10.7	14.2	56.7	33.8
CBX-S2	15.8	32.0	18.2	10.7	33.3	64.3	15.3	53.3	33.4
HSC-S1	17.5	34.0	22.7	10.7	53.3	42.9	14.8	36.7	54.1
HSM-S1	17.7	14.0	68.2	11.8	76.7	17.8	11.8	56.7	29.1
CCS-R1	18.5	18.0	59.1	12.2	90.0	3.5	13.8	66.7	16.6
HWB-S1	16.5	18.0	59.1	11.0	56.7	38.9	14.0	60.0	25.0
FX-S1	16.8	34.0	22.7	11.2	76.7	17.8	12.3	16.7	79.1
DH-S1	19.2	10.0	77.3	10.5	83.3	11.0	15.3	73.3	8.4
HSQ-S1	20.9	20.0	54.4	15.3	86.7	7.1	17.5	46.7	41.6

表2 10个有效菌株的来源及校正致死率

Table 2 Sources of the ten effective strains and the checked mortality caused by each of them

菌株代号 Strain code	属名 Genus	来源 Source	校正致死率(24 h) / % Checked mortality (24 h) / %
FX-R1	<i>Bacillus</i>	芹菜根面	95.91
CBX-S1	<i>Acinebacter</i>	生菜根际土壤	99.30
CBX-S2	<i>Acinebacter</i>	韭菜根际土壤	90.03
HSC-S1	<i>Bacillus</i>	土豆根际土壤	99.30
HSM-S1	<i>Bacillus</i>	萝卜根际土壤	90.25
CCS-R1	<i>Bacillus</i>	辣椒根面	93.19
HWB-S1	<i>Bacillus</i>	莴苣根际土壤	98.04
FX-S1	<i>Bacillus</i>	韭菜根际土壤	95.56
DH-S1	<i>Bacillus</i>	大葱根际土壤	95.77
HSQ-S1	<i>Bacillus</i>	茄子根际土壤	95.83

3 讨论

植物寄生线虫很难人工培养,只能从土壤中分离,挑出所需要的线虫,因此直接用寄生性线虫筛选出生防菌费时费力,而且不能获得大量生长一致的无菌线虫群体,影响筛选质量。由于线虫生理功能与结构的相似性,筛选中可用易培养的吃细菌线虫代替寄生线虫(Kerry,私人通信)。本研究选用的目标线虫易于无菌培养,从而保证了无菌线虫来源。该线虫以细菌为食,可能会食掉某些细菌,而这些细菌可能对寄生线虫有拮抗作用,从而丢掉某

些有效菌株。不过,该类线虫在根际土壤中广泛存在,即便筛选出,在土壤中也会遇到这类线虫的捕捉。因此,丢失一些线虫食用菌不但无关紧要,而且是必要的。从致死率的正态分布图可以看出,少数分离物对线虫的致死率经与对照校正后为负值,说明这些菌是有益于线虫生长发育的益菌,其中一部分可能正是该线虫的食用菌。

细菌对线虫的拮抗意指对线虫生理功能以及侵染植株的抑制,本身并无致死之意。NA平板上高浓度的细菌产生的高强度抑制以及代谢物的作用导致线虫死亡,这种致死本身是高度拮抗的结果,因此致死率反映了拮抗的强弱。此外,抑制作用很难从量上加以比较,用致死率来比较不同菌株的拮抗力具有准确、客观的优越性。随着细菌浓度的降低,致死作用转为抑制效应。因此,筛选出的有效菌到达植物根际后往往维持一种自然的浓度水平,对线虫起抑制作用,这就是拮抗效应。

本研究中的三次温室试验所用之土壤和番茄苗龄不同,可能是结果不一致的主要原因。但从防效看,这10个菌株均不同程度地降低了根结指数。进一步研究这10个有效菌株对其它植物寄生线虫的拮抗作用以及在大田应用条件下的防效,将有助于早日在植物线虫病害防治中发挥效益。

参 考 文 献

- 1 Brown M E. Seed and root bacterization. *Ann Rev Phytopathol*, 1974, 12:181~187
- 2 Burr R J, Schroth M N, Sushow T. Increased potato yields by treatment of seed pieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology*, 1978, 68: 1377~1383
- 3 梅汝鸿. 植物微生物学. 见:中国微生态学会植物微生物学组编. 植物微生物学研究. 北京农业大学出版社, 1991, 1~4
- 4 梅汝鸿主编. 增产菌. 北京:农业出版社, 1989
- 5 Boosalis M G, Mankau R. Parasitism and predation of soil microorganisms. In: Baker K F, Snyder W C. *Ecology of Soil-borne Pathogens*. Univ Calif Press, 1965: 374~389
- 6 Mankau R, Imbriani J C. The life cycle of an endoparasite in some tylenchid nematodes. *Nematologica*, 1975, 21: 81~94
- 7 Iizuka H, Komagata K, Kawamura T, Kunii Y, Shibuya M. Nematocidal action of microorganisms. *Agric Biol Chem*, 1962, 26:199~200
- 8 Stirling G R. Biological control of plant-parasitic nematodes. In: Poinar G O Jr, Jansson H B. *Diseases of Nematodes*. Vol 1. Boca, Raton, Florida, CRC Press, 1988:93~139
- 9 Becker J O, Zavaleta-Mejia E, Colbert S F, Schroth M N, Weinhold A R, Hancock J G, Van Gundy S D. Effective of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. *Phytopathology*, 1988, 78: 1466~1469
- 10 Oostendorp M, Sikoram R A. Seed treatment with antagonistic rhizobacteria for the suppression of *Heterodera schachtii* early root infection of sugar beet. *Revue de Nematologie*, 1989, 12(1):77~83
- 11 Dhingra O D, Sinclair J B. *Basic Plant Pathology Methods*. Boca, Raton, Florida, CRC Press, 1985: 297

Screening of Rhizobacteria Antagonistic to Plant Parasitic Nematodes

Tian Honglin Wang Shouhua Wu Xiuying

(Dept. of Plant Protection, BAU, Beijing 100094)

Abstract: 883 isolates of bacteria were obtained from rhizoplane and rhizospheric soil of 27 vegetable crops in Beijing. Their antagonism to the bacteria-feeding nematode *Panagrellus redivivus* were tested in NA petri dish. Ten isolates that caused higher than 90% mortality of the nematode after 24 h inoculation at 22°C were obtained and therefore regarded as effective strains. The ten strains were further used to test their antagonism to plant-parasitic nematodes on NA petri dish: *Xiphinema thornei*, *Trichodorus pakistanensis*, *Scutellonema clathricaudatum*, *Crictonemoides profusus* and juveniles of northern root-knot nematode. The strains resulted in 100% death of the given nematode species after 6 h inoculation at 22°C. The fluid of each effective isolate cultured in NB medium at 28°C for 48 h was obtained by filtration and used to test its action to juveniles of the root-knot nematode. The result showed that the stock solutions and their dilutions of 2, 6 and 10 times killed the second-stage larvae in different degree. Greenhouse experiment also showed that the ten strains were effective in biocontrol of tomato root-knot disease caused by *Meloidogyne hapla*. The ten isolates were identified as eight *Bacillus* spp. and two *Acinebacter* spp.

Key words: rhizobacteria; screening; nematode biocontrol