

生防细菌 YC-10 的杀线虫活性及其鉴定

成飞雪^{1,2}, 张德咏^{2,3}, 刘勇^{2,3*}, 王忠勇², 程菊娥², 何明远², 肖启明¹

(¹湖南农业大学生物安全学院, 长沙 410128; ²湖南省植物保护研究所, 长沙 410125;

³中南大学研究生院隆平分院, 长沙 410125)

摘要: 从烟草中分离出 1 株对根结线虫和胞囊线虫有较高生物活性的内生细菌菌株—YC-10。将该细菌发酵滤液原液及 5、10、20 和 40 倍稀释液处理南方根结线虫, 96 h 后线虫死亡率均达到 100%, 处理大豆胞囊线虫 96 h, 致死率大于 90%, 在植物线虫生物防治上显示出巨大的应用前景。通过形态特点、理化特征以及 16SrDNA 序列同源性分析将菌株 YC-10 鉴定为苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)。对发酵液活性成分理化性质研究表明, 活性成分对热稳定, 高温、蛋白酶 K 处理不影响其杀虫活性, 而酸性条件下杀线虫活性比碱性中更强。为后续杀线虫活性成分的分离及杀线虫机理研究奠定基础。

关键词: 生防细菌; 杀线虫活性; 鉴定; 苏云金芽孢杆菌

nematicidal activities and identification of a biocontrol bacterium YC-10 strain

CHENG Fei-xue^{1,2}, ZHANG De-yong^{2,3}, LIU Yong^{2,3}, WANG Zhong-yong², CHENG Ju-e², HE Ming-yuan², XIAO Qi-ming¹ (¹College of Bio-safety Science and Technology, HAU, Changsha 410128, China; ²Hunan Plant Protection Institute, Changsha 410125, China; ³Long-Ping Institute of Graduate School, Changsha 410125, China)

Abstract: A biocontrol bacterium YC-10 was isolated from tobacco and tested for the nematicidal activity. The bacterium culture diluted 1, 5, 10, 20 and 40 times all showed high nematicidal activity to *Meloidogyne incognita* and *Heterodera glycines* Ichinohe. After the nematodes were treated with the culture for 96 hours, the lethal rate of the *M. incognita* attained 100% and the *H. glycines* Ichinohe over 90%. The results indicated the potential application of biocontrol to nematode. The bacterium YC-10 was identified as *Bacillus thuringiensis* according to its 16S rDNA sequence and morphological, cultural, physiological and biochemical features. Study on the active substances of physical and chemical properties could showed that the substances were heat-stable and high temperature or the Proteinase K digestion not affect its nematicidal activity. The study also showed that nematicidal activity was stronger in acidic solution than in alkaline solution. The study is the foundation for separating the active ingredient and its mechanism of nematicidal activity.

Key words: biocontrol bacterium; nematicidal activity; identification; *Bacillus thuringiensis*

中图分类号: S432.45

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2011)02-0203-07

植物寄生线虫病是农作物的重要病害之一。它的危害超过细菌和病毒, 仅次于真菌病害。全球每年由植物寄生线虫所造成的作物损失超过千亿美元, 线虫病害已成为农业生产上的一个突出问

题^[1]。生产上常采用化学杀线虫剂来防治植物寄生线虫病害, 但目前市场上杀线虫剂品种少、毒性高, 且长期单一的施用高毒、高残留化学杀线虫剂, 不仅对环境造成了严重的污染, 农产品中农药残留

收稿日期: 2009-12-04; 修回日期: 2010-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(3080717); 行业科技专项资助项目(nyhyz07050; 200903040); 国家“863”计划资助项目(2006AA10Z401); 国家“十一五”科技支撑计划资助项目(2006BAD17B08; 2006BAD08A08)

通讯作者: 刘勇, 研究员, 博士生导师, 主要从事蔬菜病害防治研究; E-mail: haoasliu@163.com

第一作者: 成飞雪(1973-), 女, 湖南长沙人, 博士生, 副研究员, 主要从事植物线虫生物防治研究; E-mail: cfx937207@126.com.

严重超标,同时线虫抗药性问题也日益突出^[2]。近些年来随着绿色农业口号的提出,化学农药的使用越来越受到限制,除了继续探索低毒、低残留、高选择性的化学农药外,人们更关注开发生防制剂以作为化学农药的补充或替代品^[3]。杀线虫微生物作为植物病原线虫的重要天敌,是自然界中控制、平衡和调节线虫种群数量的重要生物因子^[4]。因此,利用线虫天敌微生物开发生物杀线虫剂,具有巨大的经济效益与环境效益。不断开发新的生物防治菌体和研制生物农药是一条提高防效、减少线虫抗药性的有效途径^[5]。线虫天敌微生物种类繁多,有真菌、细菌、放线菌等。而细菌由于易于培养、定殖,且对植物寄生线虫的致死性强,展现出广阔的应用前景和市场开发潜力^[6]。

作者从烟草中分离筛选到 1 株对植物寄生线虫具有较强毒杀作用的内生细菌菌株,初步命名为 YC-10。通过室内生测测定了 YC-10 细菌菌株对南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)的杀线虫活性,并采用形态学、生理生化分析以及 16S rDNA 序列分析等方法对其进行了种类鉴定。为将其研制开发成杀线虫微生物产品奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试菌种与虫源

细菌菌株 YC-10 采用稀释平板法分离烟草,分离方法参见文献[7],将根结线虫发病田块采回的健康烟草样品在自来水下冲洗干净,用 1% 的次氯酸钠消毒 10 min,灭菌水冲洗 3 次,在灭菌水中捣碎,将液体稀释后涂布在 NA 培养基中。28℃ 下培养 48 h 后,挑取培养特征相异的单菌落,重复在新的平板培养基上划线纯化培养。-20℃ 甘油保存待用。

南方根结线虫(*M. incognita*)采自湖南湘西,烟草室内盆栽培养方式保存。当烟草根系上有大量卵囊出现时,取出根系,用水轻轻冲洗,小心取下卵囊,放在 0.5% 的次氯酸钠中消毒 3 min、用灭菌水冲洗 3 次,放在有灭菌水的培养皿中,25℃ 恒温培养,3 d 后每 24 h 收集新孵化的南方根结线虫 J2 备用;大豆胞囊线虫(*H. glycines*)为中国农科院植保所彭德良研究员实验室赠送并盆栽保存,通过淘洗过筛法收集胞囊,将胞囊放在 0.5% 的次氯酸钠中消毒 3 min,用灭菌水冲洗 3 次,放在含有少量灭

菌水的培养皿中,25℃ 恒温箱中培养,7 d 后开始收集孵化的 J2。

1.2 YC-10 细菌菌悬液对南方根结线虫和大豆胞囊线虫的作用

利用南方根结线虫进行初步活性筛选,获得对根结线虫具有活性的菌株。将活性最强的 YC-10 菌株活化培养后,挑取菌落在 1 mL 灭菌水中混匀成菌悬液(菌液浓度 $> 10^9$ cfu/mL),再加入 50 μ L (内含 50 条以上南方根结线虫)线虫液,25℃ 的恒温箱中培养,48 h 后观察南方根结线虫的死亡情况,并计算死亡率。以灭菌水作对照,3 次重复。大豆胞囊线虫试验方法同上。

1.3 YC-10 细菌发酵滤液对南方根结线虫和大豆胞囊线虫的作用

1.3.1 YC-10 细菌发酵滤液的制备 将分离获得的 YC-10 细菌菌株接种到 LB 发酵培养基中,30℃ 摇床 220 r/min 培养 5 d 获得细菌发酵液,以 10 000 r/min 离心 10 min 取上清液即为发酵滤液。

1.3.2 发酵滤液对线虫的毒力测定 将发酵液依次用灭菌水稀释成 1(原液)、5、10、20 和 40 倍,分别处理南方根结线虫和大豆胞囊线虫 J2 幼虫,以培养基处理作为空白对照。每处理重复 3 次。挑取消毒后的根结线虫或胞囊线虫 J2 幼虫放于已灭菌的 24 孔酶标板的小孔中,分别加入 2 mL 不同稀释倍数的发酵滤液或培养基,放入 25℃ 恒温培养箱中培养,于 24、48、72 和 96 h 进行观察计数,采用针触法判断并记录线虫死亡情况。

1.3.3 发酵滤液对南方根结线虫卵孵化的影响 参考 Coolen 等^[8]方法,制得浓度为 5 000 粒/mL 的卵悬浮液。将发酵液原液 1 mL 加入到 1 mL 卵悬浮液中,以灭菌水作对照,3 次重复。置 25℃ 恒温培养箱中培养孵化。7 d 后观察卵的孵化情况。

1.3.4 发酵滤液对大豆胞囊线虫胞囊孵化率的影响 取新鲜饱满的胞囊,灭菌水冲洗,0.5% NaClO 表面消毒 3 min,灭菌水冲洗 3 次,放入灭菌培养皿中的擦镜纸上,在培养皿中加入细菌发酵液 3 mL,以灭菌水处理作为空白对照,3 次重复,25℃ 恒温培养箱中孵化。7 d 后统计孵化出的 J2 数量。

1.4 菌株 YC-10 的种类鉴定

1.4.1 形态观察 在 LB 琼脂平板上划线,30℃ 恒温培养 2 d 后观察菌落形态。革兰氏染色及芽

孢染色后镜检,染色方法参照文献 [9]。同时进行扫描电镜观察,电镜样品制备方法参见文献 [10]。

1.4.2 菌株的生理生化试验 生理生化试验方法参见文献 [11]。

1.4.3 生防菌株 16SrDNA 序列测定及比对 利用细菌 16S rDNA 通用引物对序列进行扩增。引物序列: P1 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 P2 (5'-ACGGTTACCTTGTACGACTT-3')。20 μ L 扩增反应体系所加试剂参照文献 [12],反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后割胶回收,送至华大测序。测序结果在 GenBank 中进行 blast,并选取相似性较高的几株菌株的 16S rDNA 序列,用 DNAMAN 软件进行同源性分析。

1.5 生防菌株 YC-10 活性成分理化性质研究

利用 pH 计对发酵液酸碱度进行测定,同时利用 12.5% SDS-PAGE 凝胶电泳检测发酵液中是否有蛋白产生。通过利用不同温度处理和调节发酵液 pH 方法,检测活性成分对热和酸碱度的稳定性。将发酵液分别用 40、60、80 和 100 $^{\circ}$ C 处理 15 min 后进行杀线虫活性测定。酸碱度对发酵液

中活性成分稳定性的影响研究,采用将发酵液 pH 调节到 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0 后,检测其杀线虫活性。用蛋白酶 K 处理发酵液,65 $^{\circ}$ C 处理 1 h 后,检测发酵液对线虫 J2 的生物活性。

2 结果与分析

2.1 细菌 YC-10 菌悬液对南方根结线虫和大豆胞囊线虫的作用

试验结果表明,细菌 YC-10 菌悬液处理南方根结线虫 J2 48 h 后,其校正死亡率达到了 82.1%,大豆胞囊线虫的校正死亡率较南方根结线虫稍低,为 77.5%,但差异不显著 ($P > 0.05$)。说明菌株 YC-10 菌悬液对南方根结线虫和大豆胞囊线虫都表现出很高的活性(表 1)。

2.2 细菌 YC-10 发酵滤液对南方根结线虫 J2 幼虫的活性测定结果

YC-10 细菌发酵滤液原液及不同稀释倍数对南方根结线虫 J2 都具有较强的毒杀作用。当稀释倍数小于 10 倍,处理 24 h 对南方根结线虫的致死率达到 100%。40 倍稀释液在 96 h 内也使南方根结线虫全部死亡。与对照相比都达到了极显著的差异水平 ($P < 0.05$) (表 2)。

Table 1 Effect of bacteria suspension on J2 root-knot and cyst nematode

Nematode	Treatment	Mortality of J2/%	Revised mortality/%
<i>Meloidogyne incognita</i>	bacteria suspension	82.1	82.1
	CK	0	-
<i>Heterodera glycines</i>	bacteria suspension	85.2	77.5
	CK	7.7	-

Note: Data are the averages of three replicates.

Table 2 Effect of different diluted fermentation filtrate of bacteria on root-knot nematode J2

Dilution	24 h	48 h	72 h	96 h
	Mortality / (%)	Mortality / (%)	Mortality / (%)	Mortality / (%)
CK	0 Dd	0 Dd	0 Cc	0 Bb
1	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
5	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
10	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
20	87.0 Bb	90.9 Bb	100 Aa	100 Aa
40	66.2 Cc	75.0 Cc	85.3 Bb	100 Aa

Note: The letters in table were the results of Duncan's test. Capital and small letter indicated $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.05$, separately.

2.3 YC-10 细菌发酵滤液对胞囊线虫 J2 幼虫的活性测定结果

细菌发酵液对大豆胞囊线虫也具有很好的杀虫活性,原液 24 h 内使胞囊线虫全部致死,40 倍稀释液 96 h 后对胞囊线虫的致死率也超过 90%,与对照差异显著(表 3)。

2.4 YC-10 细菌发酵滤液对根结线虫卵及胞囊线虫胞囊孵化的影响

发酵滤液不仅对南方根结线虫 J2 有很高的生物活性,而且对根结线虫卵的孵化也存在很明显的抑制作用。发酵滤液处理根结线虫卵 5 d 后对根结线虫卵孵化抑制率达到 71.7%,而对大豆胞囊线虫胞囊的孵化率也存在显著的抑制作用(表 4)。

2.5 菌株 YC-10 的鉴定结果

2.5.1 菌株 YC-10 形态及生理生化特征鉴定结果

菌株 YC-10 生长对培养基要求不高,在普通培养基上即可生长。LB 培养基平板上生长良好,30℃ 下恒温培养 2 d 菌落直径可达到 0.2 ~ 0.5 cm,菌落圆形或椭圆形、不透明、边缘不齐。液体培养基中菌液淡黄色,无菌膜和菌环。好氧、G +、短杆状或形成短链,大小为 (1.0 ~ 1.2) μm \times (3.0 ~ 4.0) μm ,产椭圆形芽孢、中生。菌株及芽孢形态见图 1 和图 2。芽孢对高温、抗生素、紫外线抗性强。最适生长温度 30℃,最高生长温度 45℃,最低生长温度 10℃。该菌株过氧化氢酶反应、V. P 反应均为阳性,水解淀粉、明胶、卵磷脂,不能水解酪氨酸,不能将苯丙氨酸氧化脱氨,含有脲酶,葡萄糖发酵产酸,利用木糖、甘露醇不产酸,有棱形和不规则形晶体产生。

菌株形态及生理生化特征研究结果表明菌株 YC-10 与苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 特征相符。

Table 3 Effect of different diluted fermentation filtrate of bacteria on cyst nematodes J2

Dilution	24 h	48 h	72 h	96 h
	Mortality / (%)	Mortality / (%)	Mortality / (%)	Mortality / (%)
CK	0 Ee	0 Dd	0 Dd	1.2 Cc
1	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
5	100 Aa	100 Aa	100 Aa	100 Aa
10	93.8 Bb	100 Aa	100 Aa	100 Aa
20	73.3 Cc	82.5 Bb	93.0 Bb	100 Aa
40	59.5 Dd	71.5 Cc	80.4 Cc	90.4 Bb

Note: The letters in table were the results of Duncan's test. Capital and small letter indicated $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.05$, separately.

Table 4 Effect of bacteria fermentation filtrate on hatching of eggs and cysts

Treatment	<i>Meloidogyne incognita</i>		<i>Heterodera glycines</i>	
	Fermentation filtrate	CK	Fermentation filtrate	CK
Hatched J2 numbers	502.3	1 773.7	28.7	75.7
Relative restrained rates / %	71.7		62.1	

Note: Data are the averages of three replicates.

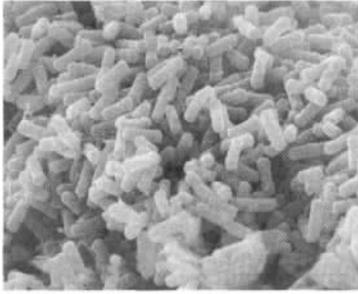


Fig. 1 Morphology of strain YC-10

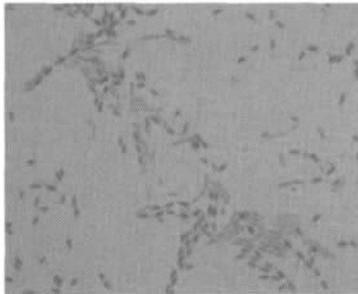


Fig 2 Spore-positive of strain YC-10

2.5.2 菌株 YC-10 16S rDNA 序列测定及比对结果 以通用引物进行菌落 PCR,产物经 PCR Product Purification kit 纯化后进行序列测定,获得 1 458 bp 的片段(图 3)。将序列在 GenBank 中进行 blast,发现与苏云金芽孢杆菌及蜡状芽孢杆菌的相似性都超过 98%。选取相似性较高的几株苏云金芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌的 16S rDNA 序列,经 DNAMAN 软件做同源性比较,结果表明与菌株 *B. thuringiensis* TSH67 (AB508858) 以及菌株 *B. cereus* NA10(FJ462699) 同源性都是 100%。

根据形态特征以及生理生化特点,参考 16S rDNA 序列分析结果,认为生防菌株 YC-10 为苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)。

2.6 生防菌株 YC-10 活性成分理化性质研究结果

通过对发酵液 pH 测定结果表明,细菌菌株 YC-10 发酵培养后,发酵液的 pH 值由发酵前的 6.9 变成 8.9,表明有碱性物质产生。SDS-PAGE 凝胶电泳检测结果表明细菌有胞外蛋白的产生,分别在 97、66、24 kD 左右共有 4 条蛋白条带产生(图 4)。

```

1 TATACATGCAAGCTCGAGCCGAATGCATTAAAGAGCTTGCTCTTATGAACTTAGCGGCGGACG
61 GGTGAGTAACACGTTGGTAACCTGCCATAAAGACTGGGATAAATCCGGGAAACCGGGGCT
121 AATACCGGATAACATTTTGAAGTGCATGCTTCGAAATGAAAAGCGGGCTTCGGCTGTCTAC
181 TTATGGATGGACCCCGCTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC AAGGCAACG
241 ATCGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC
301 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAAGTCTGACGGAGCAACGCC
361 CGGTGAGTGATGAAAGCTTTCGGGTCTGTAAGACTCTGTTCTTAGCGGAACAAAGTCTTA
421 GTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
481 GCAGCCCGGTAATACGTAGGTGGCAACCGTTATCCGGAATTAATGGCGTAAAAGCCGCG
541 GCAGGTGGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGGTCAATTGGA
601 AACTGGGAGACTTGAGTGCAGAACAGGAAAAGTGAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCG
661 TAGAGATATGGACGAAACACCAAGTGGCGAAGGCGACTTCTGGTCTGTAAGTGAACACTGAG
721 CGCGAAAAGCGTGGGAGCAAACAGGATTATATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGAT
781 GAGTGTAAAGTGTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGTGAAAGTTAACGCATTAAGCACTC
841 CCCTGGGGAGTACCGCCGCAAGGCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAAG
901 CGGTGGAGCATGTGCTTTAAATTCGAAGCAAACCGGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCC
961 TCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTCGGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGT
1021 TGTCGTACGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCCGAACCCCTTGAT
1081 CTTAGTTGCCATCATTAAAGTGGGCACTCTAAGGTGACTGCCGGTGACAAAACCGGAGGAA
1141 GGTGGGATGACGTCBAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAT
1201 GGACGCTACAAAGACTGCAAGACCCGAGGTGGAGCTAATCTCATAAAAACCGTTCTCAG
1261 TTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCA
1321 GCATGCCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCACGAGAGT
1381 TTGTAACACCCGAAGTCCGTTGGGTAACCTTTTTGGAGCCAGCCGCTAAGGTGGGACAG
1441 ATGATTGGGGTGAAGTCC

```

Fig. 3 16S rDNA of sequence

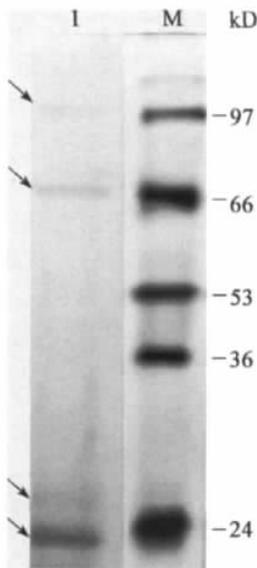


Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis of fermentation broth

M: protein marker, lane 1 the protein of fermentation broth.

发酵液分别用 40、60、80 和 100℃ 处理 15 min 后,杀线虫活性测定结果显示,对南方根结线虫作用活性没有发生明显改变,表明活性成分具有较高的热稳定性。呈碱性的发酵液 pH 调到 3.0、5.0、7.0、9.0 和 11.0 后处理南方根结线虫,试验结果显示活性成分在酸性环境中杀线虫作用最强,pH 为 3.0、5.0 的发酵液处理南方根结线虫 2 h 后线虫全部死亡,且部分开始解体,而呈中性和碱性的发酵液的作用稍弱,但当在 8 h 时也全部死亡。利用蛋白酶 K 处理过的发酵液对根结线虫的生物活性没有太大影响。说明蛋白酶 K 不能水解发酵液中的杀线虫活性物质。

3 结论与讨论

随着人们环保意识的加强以及大量高毒、高残留农药的禁用,人们对植物寄生线虫病害的防治研究也有了极大的转变。由于长期大量高毒、高残留化学农药的使用,不仅对环境造成了严重的污染,线虫抗药性也成倍地增加,使得防治越来越困难^[13]。线虫学家们力图通过利用真菌、细菌以及放线菌等微生物及生物农药代替化学农药来防治线虫病害^[14]。本研究筛选得到的内生菌株 YC-10

的菌悬液、发酵液对根结线虫、胞囊线虫的 J2 幼虫都具有较强的生物活性,能显著抑制根结线虫卵的发育以及胞囊线虫胞囊的孵化,表现出在植物寄生线虫生物防治上的巨大潜力。但该芽孢菌株产生的生物活性物质的分离及结构鉴定以及菌株对线虫的作用机理和田间防治效果等方面还有待于进一步的研究。

芽孢杆菌在植物病害防治中是一类重要的微生物资源^[15],但很少用于植物线虫的防治。仅有穿刺芽孢杆菌(*B. penetrans*)在线虫病害防治上发挥了较大的作用。但穿刺芽孢杆菌的难培养一直成为产业化的技术瓶颈,从而不能广泛应用于生产实践^[16-19]。因此,研究和开发易于培养的其他杀线虫的芽孢杆菌对于植物线虫病害防治具有十分重要的意义。本研究中苏云金芽孢杆菌菌株 YC-10 易于培养、活性高,适宜于产业化生产,具有极大的应用前景。苏云金芽孢杆菌能杀死的鳞翅目、双翅目、鞘翅目和直翅目等多个目的昆虫幼虫,1961 年 Giordia 等^[20]首次发现 Bt 苏云金亚种对线虫有杀灭作用。后来 Prasad 等^[21]报道了 Bt 外毒素对根结线虫有较高的毒力。但具有杀线虫活性的苏云金芽孢杆菌菌株并不多,Bravo 等^[22]在墨西哥全国范围内采集分离的 496 株苏云金芽孢杆菌中没有发现带有合成杀线虫毒素基因的菌株。本研究中筛选获得的苏云金芽孢杆菌表现出对植物线虫很强的毒杀活性,对开发研制新的杀线虫 Bt 生防制剂具有非常重要的意义。

农业上最重要的植物线虫是根结线虫和胞囊线虫^[5]。南方根结线虫是引起我国作物根结线虫病的主要病原种,对我国农业生产造成了严重的损害。尤其在蔬菜生产上,根结线虫病已经成为制约我国蔬菜生产的重大病害之一,在南方各省以及北方大棚蔬菜区均有发生,常年造成减产 15% ~ 20%,严重时 70% 以上甚至绝收。而大豆胞囊线虫病是我国连作大豆的主要病害,成为大豆生产的主要障碍^[23]。利用农业生产上造成严重损失的根结线虫、胞囊线虫等病原线虫开展杀线虫微生物的筛选以及获得对植物线虫具有毒杀作用的活性物质,这对加快我国杀线虫微生物制剂以及生物制剂的研发、丰富杀线虫剂的种类具有非常重要的作用。

参考文献

- [1] Liu W Z. Plant pathogenic nematodes (in Chinese) [M]. Beijing: China Agricultural Press (北京: 中国农业出版社), 2000. 1 - 429.
- [2] Sasser J N, Eisenback J D, Carter C C, *et al.* The international *Meloidogyne* project its goals and accomplishments [J]. Annual Review of Phytopathology, 1983, 21: 271 - 288.
- [3] Lin M S. Biocontrol of plant nematode diseases (in Chinese) [J]. World Pesticide (世界农药), 1992, 1: 43 - 44.
- [4] Kloepper J W, Rodriguez K R, Mcinroy J A, *et al.* Rhizosphere bacteria antagonistic to soybean cyst (*Heterodera glycines*) and root-knot (*Meloidogyne incognita*) nematodes: identification by fatty acid analysis and frequency of biological control activity [J]. Plant and Soil, 1992, 139: 75 - 84.
- [5] Yang X L, Zhang L L, Chen P S. New strategies to plant-parasitic nematodes (in Chinese) [J]. World Pesticide (世界农药), 2001, 23(5): 26 - 29.
- [6] Guo R J, Liu X Z, Yang H W. Study on the biocontrol of plant-parasitic nematodes by rhizo bacteria (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Biological Control (中国生物防治), 1996, 12(3): 134 - 137.
- [7] Fang Z D. Plant pathology research methods (in Chinese) [M]. China Agriculture Press, 2004.
- [8] Coolen W A, D'Herde C J. A method for the quantitative extraction of nematodes from plant tissue [J]. Chent, Beigium: Minist, State Agric. Res. Centre, 1972: 77.
- [9] Huang X L, Xin M X. Microbiology experimental guide (Second Edition) (in Chinese) [M]. Beijing: Higher Education Press (北京: 教育出版社), 2008. 20 - 289.
- [10] Xie J Y, Dong G J, Liu Z Y. Method of preparation of mircrobiological specimen for scanning electron microscope (in Chinese) [J]. Journal of Chinese Election Microscopy Society (电子显微学报), 2005, 24(4): 440.
- [11] Buchanan R E., Gibbens N E. Bergey's manual of systematic bacteriology (Eighth Edition) [M]. Beijing: Science in China Press (北京: 中国科学出版社), 1984, 729 - 753.
- [12] Sambrook J, Russell D. Molecular cloning: a laboratory manual (Third Edition) [M]. Beijing: Science Press (北京: 科学出版社), 2002.
- [13] Abawi G S, Widmer T L. Impact of soil health management practices on soilborne pathogens, nematode and root diseases of vegetable crops [J]. Applied Soil Ecology, 2000, 15: 37 - 47.
- [14] Wang L F, Yang B J, Li C D, *et al.* A review of biological control of root-knot nematodes (in Chinese) [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Science Edition) [南京林业大学学报(自然科学版)], 2002, 26(1): 64 - 68.
- [15] Siddiqui Z A, Mahmood I. Role of bacteria in the management of plant nematodes: a review [J]. Bioresource Fechnology, 69(2): 167 - 179.
- [16] Sayre R M. Biocontrol: *Bacillus penetrans* and related parasites of namatodes [J]. Nematol., 1980, 12(4): 260 - 270.
- [17] Mankau R, Prasad N. Infectivity of *Bacillus penetrans* in plant-parasitic nematodes [J]. Nematol., 1977, 9(1): 40 - 45.
- [18] Sun M H, Liu X Z. *Pasteuria* spp. - a new and potential bacteria for biological control of plant-parasitic nematodes [J]. Chinese Journal of Biological Control, 1994, 10(4): 178 - 182.
- [19] Dong W B, Shi Y M, Chi Y C. Status and prospect of biocontrol of plant root-knot nematode diseases by *Pasteuria penetrans* (in Chinese) [J]. Chinese Journal of Biological Control (中国生物防治), 1999, 15(2): 89 - 93.
- [20] Ciordia H, Bizzeli W E. A prelinary report of the effects of *Bacillus thuringiensis* var. Berliner on the development of the free-living stages of some cattle nematodes [J]. Journal of Parasitology, 1961, 47: 411 - 416.
- [21] Prasad S V, Tilakv B R, Gollakota K G. Role of *Bacillus thuringiensis* vat, thuringiensis on the larval survival and egg hatching of *Meloidogyne* spp. the causative agent of root-knot disease [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 1972, 20: 377 - 378.
- [22] Bravo A, Sarabia S, Lopez L, *et al.* Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection [J]. Appl. Environ. Microbiol., 1998, 64(12): 4965 - 4972.
- [23] Chen L J, Duan Y X, Wang Y Y, *et al.* Bio-effect of different bacterial strains on soybean root rot pathogens and *Heterodera glycines* (in Chinese) [J]. Journal of Shenyang Agricultural University (沈阳农业大学学报), 2006, 37(6): 831 - 834.

责任编辑:曾晓葳