

蔬菜根结线虫生防细菌的筛选

黄金玲¹, 刘纪霜², 刘志明^{1,3}, 陆秀红¹, 潘萍红³, 陆光艺³, 秦碧霞¹, 李国栋³,

(1 广西农业科学院 植物保护研究所, 广西 南宁 530007; 2 南宁市试验中心,
广西 南宁 530001; 3 广西大学 农学院, 广西 南宁 530005)

摘要:从广西蔬菜地分离到359株细菌菌株, 用其细菌菌悬液和发酵上清液对南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* 的二龄幼虫进行处理, 评价其对南方根结线虫的毒力. 结果显示, 有336株菌株的菌悬液对南方根结线虫二龄幼虫具有杀伤能力, 其中49株菌株对南方根结线虫的室内校正死亡率达60%以上; 用细菌发酵上清液处理二龄幼虫, 也表现出对幼虫活性的抑制作用, 48 h后有8株菌株发酵上清液原液校正死亡率达80.00%以上.

关键词:蔬菜根结线虫; 生防细菌; 筛选

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)03-0119-02

Screening Biocontrol Bacteria to Vegetable Root-Knot Nematodes

HUANG Jin-ling¹, LIU Ji-shuang², LIU Zhi-ming^{1,3}, LU Xiu-hong¹,

PAN Ping-hong³, LU Guang-yi³, QIN Bi-xia¹, LI Guo-dong³,

(1 Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;

2 Test Center of Nanning Municipality, Nanning 530001, China;

3 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: Three hundred and fifty-nine strains of bacteria were isolated from vegetable soil in Guangxi. Their antagonistic abilities to the second stage juvenile of *Meloidogyne incognita* (J2) were tested. Among them, Three hundred and thirty-six strains of bacteria showed nematicidal activity to J2 *in vitro* test after treatment in 48 h, and 49 strains caused more than 60% of corrected mortality. The fermentation filtrate of these strains also had a strong nematicidal activity to J2, while the ferment filtrates of 8 strains had more than 80% of corrected mortality after 48 h.

Key words: vegetable root-knot nematode; biocontrol bacteria; screening

近年来根结线虫 *Meloidogyne* spp. 在蔬菜上发生日趋严重, 给蔬菜生产造成巨大损失. 生产中主要以化学杀线剂来防治, 但目前杀线剂品种少, 且多为高毒、高残留农药, 不适合在蔬菜上使用. 因此生物防治受到广泛重视, 根结线虫生物防治天敌资源也在世界不同国家和地区被广泛调查和筛选^[1-6]. 细菌由于易于培养、定殖, 与植物根际具有较强的亲和力, 应用前景广阔. 本试验在广西开展了蔬菜根结线虫生防细菌的筛选, 以提供适合当地的生防菌株, 为开展无公害防治蔬菜根结线虫奠定基础.

1 材料与方法

1.1 根际细菌的采集与分离

在广西蔬菜产地采集番茄 *Solanum lycopersicum*、白菜 *Brassica pekinensis*、芹菜 *Apium graveolens*、豆角 *Vigna unguiculata* spp.、红薯 *Ipomoea batatas*、黄瓜 *Cucumis sativus*、丝瓜 *Luffa cylindrica*、南瓜 *Cucurbita moschata* 等作物的根际土壤样品(包括无根结线虫土、根结线虫土及根结线虫衰退土). 采用稀释分离法, 于NA培养基平板上进行根际细菌的分离, 所得

收稿日期: 2009-04-08

作者简介: 黄金玲(1981—), 女, 实习研究员; 通信作者: 刘志明(1963—), 女, 研究员, E-mail: liu0172@126.com

基金项目: 广西自然科学基金(桂科基 0575035)

分离物纯化后保存、备用.

1.2 供试根结线虫的繁殖与准备

供试根结线虫为南方根结线虫 *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White, 1919) Chitwood, 1949. 采用活体繁殖方法, 将番茄苗种到南方根结线虫病圃中繁殖. 从感病的番茄根部挑取南方根结线虫新鲜卵块, 用 φ 为 1% NaClO 溶液表面消毒后, 用灭菌水冲洗 3 次, 置 25 ℃ 恒温箱中孵化. 待孵化后收集幼虫, 并配制成约 100 条/mL 的线虫液, 备用.

1.3 生防菌室内筛选

细菌菌悬液对线虫的作用测定: 将分离到的菌株接种于 NA 固体培养基上, 28 ℃ 条件下培养 24 h 后用无菌水配成 10^9 CFU/mL 的菌悬液. 分别吸取 1 mL 菌悬液和 1.2 中配好的线虫悬浮液 0.5 mL, 加入到灭菌的培养皿中, 置 25 ℃ 下培养 48 h, 然后在体视显微镜下检测线虫的死亡率. 以 1 mL 无菌水加 0.5 mL 线虫悬浮液作为对照, 每个菌株 3 个重复.

细菌发酵液对线虫的作用测定: 将细菌菌悬液室内离体测定线虫校正死亡率达到 80% 以上的菌株接种于 NA 液体培养基中, 30 ℃ 条件下振荡培养 48 h 后, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液. 同时将上清液原液稀释成 2 倍液和 5 倍液, 然后分别将上清液原液、上清稀释液 1 mL 加入到灭菌的培养皿中, 加入 0.5 mL 配好的线虫悬浮液, 一起放在 25 ℃ 恒温箱中培养, 分别在 24、36 和 48 h 在体视显微镜下检测并计算线虫的死亡率, 无菌水培养作为对照, 3 次重复.

线虫校正死亡率 = $\frac{\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\%$.

2 结果与分析

2.1 细菌菌悬液对线虫的作用

从蔬菜地无根结线虫土、线虫衰退土、根结线虫土中采集和分离到 359 株细菌菌株, 有 336 株菌株

在一定程度上表现出杀死南方根结线虫二龄幼虫的能力(以虫体僵硬, 用针触不动的线虫视为已死亡的线虫). 用 10^9 CFU/mL 的菌悬液处理幼虫 48 h, 线虫校正死亡率在 90% 以上有 2 株菌株, 占 0.55%; 校正死亡率在 80% ~ 90% 有 7 株菌株, 占 1.95% (表 1); 校正死亡率在 70% ~ 80% 的有 21 株菌株, 占 5.85%; 校正死亡率 60% ~ 70% 的有 19 株菌株, 占 5.29%.

表 1 菌悬液处理 48 h 南方根结线虫二龄幼虫室内校正死亡率达到 80% 以上的菌株

Tab.1 Strains which the revised mortality of *M. incognita* J2 were over 80% in vitro condition after 48 h treatment

菌株编号	校正死亡率 ¹⁾ /%	来源	菌株编号	校正死亡率 ¹⁾ /%	来源
17	88.71a	无病土	333	88.46a	病土
104	91.84a	衰退土	335	92.09a	病土
109	80.79a	衰退土	343	87.75a	无病土
119	82.38a	衰退土	344	85.43a	无病土
155	81.27a	无病土			

1) 同列数据后凡是有一个小写字母相同者, 表示差异不显著 ($P \geq 0.05$, Duncan's 法).

2.2 细菌发酵液对线虫的作用

从表 2 可以看出, 处理后 24、36 和 48 h 后, 各发酵上清液原液及其不同稀释倍数液对南方根结线虫二龄幼虫均表现出一定的致死作用, 且大部分是随处理时间而逐渐增强, 48 h 后有 8 株菌株的发酵原液校正死亡率达到 80% 以上, 其中 17 号、119 号、155 号、333 号菌株的发酵液对南方根结线虫二龄幼虫的校正死亡率均比菌悬液处理高. 发酵液经过稀释后, 对幼虫的致死作用减弱, 稀释 5 倍液对幼虫的校正死亡率均低于 50%, 稀释 2 倍液还表现出较好的作用, 处理 48 h 有 6 个菌株对幼虫的校正死亡率仍可达到 50% 以上.

表 2 生防菌菌株发酵滤液及其不同稀释倍数液对二龄幼虫的校正死亡率¹⁾

Tab.2 The revised mortality of *M. incognita* J2 treated with ferment of strains in different concentrations %

菌株 编号	发酵原液			稀释 2 倍液			稀释 5 倍液		
	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h	24 h	36 h	48 h
17	73.48a	84.25ab	94.73abc	35.51bc	42.30ab	47.24ab	21.08a	27.76a	33.70c
104	61.05ab	68.69bc	89.61bc	30.03c	37.57b	38.79b	24.88a	32.35a	38.71abc
109	62.70ab	61.54c	76.87d	45.13abc	50.64ab	51.97ab	27.76a	34.05a	36.26bc
119	61.98ab	80.57ab	97.95a	51.09abc	60.59ab	69.89a	33.32a	37.13a	39.72abc
155	53.30b	71.06abc	96.47ab	46.50abc	50.63ab	60.99ab	36.34a	36.94a	41.57abc
333	66.69ab	72.22abc	91.75abc	57.57ab	62.33ab	67.83a	36.85a	44.78a	49.43a
335	74.32a	85.62a	90.63abc	61.43a	68.29a	72.29ab	28.62a	38.65a	47.67ab
343	63.76ab	73.39abc	83.21cd	46.23abc	51.57ab	56.82ab	27.73a	31.54a	33.04c
344	60.58ab	66.86bc	85.36cd	34.87bc	38.82b	39.83b	33.55a	28.57a	32.01c

1) 同列数据后凡是有一个小写字母相同者, 表示差异不显著 ($P \geq 0.05$, Duncan's 法).

缘区浅红色带黄色缘毛;后缘缘毛很长,褐色(图1).



图1 艳卷蛾成虫

Fig. 1 Adult of *Vellonifer doncasteri* Razowski

雄性外生殖器:爪形突发达,基部宽;背兜细长;尾突长且下垂;抱器背基突带状,骨化度高;抱器瓣基部宽,端部缢缩;抱器背骨化度非常高,大多数种类可达抱器瓣末端;抱器腹发达,常无明显特殊结构;阴茎宽,角状器具有球形突^[1].

雌性外生殖器:产卵瓣;表皮突较粗短,阴片宽,骨化度一般,交配孔杯状;导管端片骨化度高,囊导管较长,中部膨大,微骨化;囊体近球形,表面具微粒状突起;囊突1枚,表面具刺状突起(图2).

观察标本:4雌,广东韶关南岭,12-VIII-2003,辛德育、陈刘生采;2雌,广东韶关南岭,5-VII-2004,王敏采;1雌,江西武夷山,26-VII-2007,王敏采.



图2 艳卷蛾雌性外生殖器

Fig. 2 Female genitalia of *Vellonifer doncasteri* Razowski

分布:中国(广东,江西),印度^[2],尼泊尔^[3],文莱^[4].

参考文献:

- [1] RAZOWSKI J. A discussion of some groups of Tortricini (Lepidoptera: Tortricidae) with descriptions of new genera and species[J]. Acta Zoologica Cracoviensia, 1964, 9: 357-415.
- [2] RAZOWSKI J. World fauna of the Tortricini (Lepidoptera, Tortricidae) [M]. Krakó: Panstwowe Wydawnictwo Naukowe, 1966:1-576.
- [3] DIAKONOFF A. Tortricidae from Nepal 2[J]. Zoologische Verhandelingen, 1976, 144: 48.
- [4] ROBINSON G S, TUCK K R, SCHAFFER M. A field guide to the smaller moths of South-East Asia [M]. Malaysian: Malaysian Nature Society, 1994:1-244.

【责任编辑 周志红】

(上接第120页)

3 结论

本试验从无根结线虫病土壤、根结线虫衰退土和根结线虫病土3种不同的土壤分离生防细菌,扩大了筛选范围试验.以对生产造成严重危害的南方根结线虫二龄幼虫作为供试线虫,采用了收取卵块人工孵化的方式获取大量根结线虫二龄幼虫进行离体测定,来衡量生防菌毒力的高低,因在虫龄、食性等方面差异小,可比性较强.

室内离体拮抗测定结果表明:有336株菌株在一定程度上表现出对南方根结线虫二龄幼虫有致死作用,49株菌株对南方根结线虫的室内校正死亡率达60%以上;从线虫衰退土中分离到64个菌株,经室内毒力测定,校正死亡率在80%以上的有3个菌株.说明广西土壤富含大量对植物寄生线虫有抗性的根际细菌,是一类重要的线虫生防资源,而本地资源相对引进资源更易于定植,因此有待加强研究与开发利用.

研究结果还发现,有些菌株的发酵液对南方根

结线虫二龄幼虫表现出较好的致死作用,效果甚至比菌悬液处理还好,但发酵上清原液经过稀释后对幼虫致死作用均下降,这可能是由于有些细菌通过产生毒素代谢物或抗生素来毒杀线虫,而稀释后代代谢物浓度降低使效果降低,其作用机制及代谢物的主要成分,还有待进一步的研究.

参考文献:

- [1] 汪来发,杨宝君,李传道.华东地区根结线虫天敌真菌调查[J].菌物系统,2001,20(2):264-267.
- [2] 何胜洋,葛起新.南方根结线虫天敌真菌[J].植物病理学报,1987,17(1):14-21.
- [3] 王明祖,吴秋芳.根结线虫卵寄生真菌的研究[J].华中农业大学学报,1990,9(3):225-229.
- [4] 张克勤,高恩 S,巴巴拉 T.根结线虫天敌真菌极其高效菌株筛选[J].真菌学报,1993,12(3):240-245.
- [5] 杨秀娟,何玉仙,陈福如,等.福建省根结线虫卵囊真菌的分离与筛选[J].福建农业学报,2000,15(1):12-15.
- [6] 祝明亮,奚家勤.云南烟草根结线虫拮抗真菌分离鉴定初报[J].云南大学学报:自然科学版,2004,26(2):1741-78.

【责任编辑 周志红】