

黄瓜南方根结线虫病生防芽孢杆菌的筛选鉴定及防效

吴蔚然¹, 朱晓峰¹, 王媛媛², 刘晓宇³, 赵迪⁴, 杨宁¹, 段玉玺¹, 范海燕^{1*}, 陈立杰^{1*}

1 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳

2 沈阳农业大学 生命科学与技术学院, 辽宁 沈阳

3 沈阳农业大学 理学院, 辽宁 沈阳

4 沈阳农业大学, 分析测试中心, 辽宁 沈阳

吴蔚然, 朱晓峰, 王媛媛, 刘晓宇, 赵迪, 杨宁, 段玉玺, 范海燕, 陈立杰. 黄瓜南方根结线虫病生防芽孢杆菌的筛选鉴定及防效[J]. 微生物学报, 2025, 65(8): 3748-3764.

WU Weiran, ZHU Xiaofeng, WANG Yuanyuan, LIU Xiaoyu, ZHAO Di, YANG Ning, DUAN Yuxi, FAN Haiyan, CHEN Lijie. Screening, identification, and efficacy evaluation of *Bacillus* strains for biocontrol of cucumber root-knot nematodes[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2025, 65(8): 3748-3764.

摘要: 根结线虫(*Meloidogyne* spp.)分布范围广泛、破坏能力强, 给农业生产带来巨大的经济损失。生物防治被认为是一种防治该病害的有效措施。【目的】发掘高效稳定、绿色安全防治根结线虫病的生防资源至关重要。【方法】采用系列稀释法从土壤中分离芽孢杆菌, 以南方根结线虫为靶标, 通过离体试验筛选对二龄幼虫具有较强毒杀性的芽孢杆菌。通过形态学、生理生化特征和分子生物学方法对菌株进行鉴定, 并通过抑制卵孵化试验、溶磷解钾及产酶活性能力测定、拮抗广谱性评价、温室盆栽和田间试验进一步评价菌株的生防潜力。【结果】从16份土壤样品中分离获得189株细菌, 筛选获得2株对南方根结线虫二龄幼虫具有较强毒杀性的细菌 Sneb2550 和 Sneb2556, 其24 h校正死亡率分别为95.64%和95.36%。通过形态学特征、生理生化特性结合16S rRNA基因和*gyrB*序列分析, 鉴定菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 分别为解蛋白芽孢杆菌(*Bacillus proteolyticus*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。菌株 Sneb2550 具有产蛋白酶的能力, 菌株 Sneb2556 具有产蛋白酶、淀粉酶和溶磷的能力。菌株 Sneb2550 对甜瓜果腐病病原菌、苹果霉心病病原菌、番茄早疫病病原菌具有显著抑制作用; 菌株 Sneb2556 对甜瓜果腐病病原菌、马铃薯早疫病病原菌、苹果轮纹病病原菌、苹果霉心病病原菌、辣椒炭疽病病原菌和番茄早疫病病原菌具有显著抑制作用。相比之下, 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 不影响黄瓜种子萌

资助项目: 中国博士后科学基金特别资助(站中)项目(2022T150442); 国家寄生虫资源库项目(NPRC-2019-194-30); 辽宁省自然科学基金面上项目(2024-MS-091); 中国博士后科学基金(2021M692234)

This work was supported by the Special Funding Project of China Postdoctoral Science Foundation (Station) (2022T150442), the National Parasitic Resource Bank Project of China (NPRC-2019-194-30), the Liaoning Provincial Natural Science Foundation General Project (2024-MS-091), and the China Postdoctoral Science Foundation (2021M692234).

*Corresponding authors. E-mail: FAN Haiyan, fanhaiyan2017@syau.edu.cn; CHEN Lijie, chenlj-0210@syau.edu.cn

Received: 2025-02-16; Accepted: 2025-04-10; Published online: 2025-05-29

发, 且都显著促进黄瓜种子胚根生长。盆栽结果表明, 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 能显著减少黄瓜植株根结数, 根结减退率分别为 56.02% 和 50.19%, 并且促进黄瓜生长。田间试验结果表明, 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 灌根处理黄瓜幼苗后能有效防治黄瓜南方根结线虫病, 防效分别为 60.90% 和 52.63%, 且促进黄瓜植株生长。【结论】芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 能够有效防治黄瓜南方根结线虫病并促进黄瓜植株生长, 为南方根结线虫病的生物防治提供新的潜在资源。

关键词: 南方根结线虫; 芽孢杆菌; 鉴定; 生物防治; 黄瓜

Screening, identification, and efficacy evaluation of *Bacillus* strains for biocontrol of cucumber root-knot nematodes

WU Weiran¹, ZHU Xiaofeng¹, WANG Yuanyuan², LIU Xiaoyu³, ZHAO Di⁴, YANG Ning¹, DUAN Yuxi¹, FAN Haiyan^{1*}, CHEN Lijie^{1*}

1 College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning, China

2 College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning, China

3 College of Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning, China

4 Analysis and Testing Center, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning, China

Abstract: Root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) are widely distributed and highly destructive, causing substantial economic losses in agricultural production. Biocontrol has been considered as an effective measure for managing these pathogens. **[Objective]** To explore efficient and eco-friendly biocontrol resources for controlling root-knot nematodes. **[Methods]** *Bacillus* strains were isolated from soil via the serial dilution method. Strains with strong nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* second-stage juveniles (J2) were screened by *in vitro* bioassays. The selected strains were identified based on morphological, physiological, and biochemical characteristics, as well as molecular biological evidence. The biocontrol potential of these strains was further evaluated by egg hatching inhibition assays, phosphorus/potassium solubilization tests, enzymatic activity profiling, and antagonistic spectrum analysis. Additionally, pot and greenhouse experiments were conducted to validate the biocontrol efficacy of strains. **[Results]** Among 189 bacterial strains isolated from 16 soil samples, strains Sneb2550 and Sneb2556 demonstrated strong nematocidal activity against *M. incognita* J2, inducing the corrected mortality rates of 95.64% and 95.36%, respectively, after 24 h. Based on morphological features, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene and *gyrB* sequences, strains Sneb2550 and Sneb2556 were identified as *Bacillus proteolyticus* and *B. amyloliquefaciens*, respectively. Functional characterization showed that strain Sneb2550 produced protease and inhibited *Fusarium asiaticum*, *Trichothecium roseum*, and *Alternaria solani*. Strain Sneb2556 produced protease and amylase, solubilized phosphate, and suppressed *F. asiaticum*, *Aternaria alternata*, *Botryosphaeria dothidea*, *T. roseum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *A. solani*. Moreover, both strains did not adversely affect cucumber seed germination and significantly promoted the radicle growth. Under

pot conditions, *Bacillus* Sneb2550 and Sneb2556 significantly reduced root galls formation, with the reduction rates of 56.02% and 50.19%, respectively, while promoting plant growth. Field experiments showed that root irrigation with *Bacillus* Sneb2550 and Sneb2556 effectively controlled cucumber root-knot nematodes, with the control effects of 60.90% and 52.63%, respectively, while promoting plant growth. **[Conclusion]** *Bacillus* Sneb2550 and Sneb2556 effectively controlled cucumber root-knot nematodes and promoted plant growth, providing new potential resources for the biocontrol of root-knot nematodes.

Keywords: *Meloidogyne incognita*; *Bacillus* spp.; identification; biocontrol; cucumber

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是世界上危害最严重的植物寄生线虫之一,可侵害粮食作物、蔬菜等 5 500 多种植物,且分布范围广泛、破坏能力强,给农业生产带来巨大的经济损失^[1]。据统计,全球已报道的根结线虫属线虫达 105 种。截至目前,根结线虫病已在我国 27 个省(市)发生,其中北京、辽宁、湖北、海南和黑龙江等地均有根结线虫病大面积发生和流行的报道^[2]。根结线虫病的发生一般使作物减产 10%–20%,发病严重时造成的损失可达 80%,甚至绝产。其中,危害黄瓜的根结线虫主要有 4 个种:南方根结线虫(*M. incognita*)、爪哇根结线虫(*M. javanica*)、北方根结线虫(*M. hapla*)和花生根结线虫(*M. arenaria*)^[3]。根结线虫通过寄生在黄瓜植株根系,形成根结,进而严重干扰黄瓜的营养吸收能力,不仅导致植株生育期异常缩短,更显著降低果实品质并造成严重减产,这已成为制约黄瓜产业可持续发展的重要生物胁迫因素^[4]。

目前,根结线虫病的防治仍以化学防治为主。然而,化学防治存在成本高、农药残留、产生抗药性,以及对人、畜生命安全和土壤环境造成严重污染等问题^[5]。因此,如何高效环保地防治根结线虫病仍是一个亟待解决的问题。生物防治具有操作简便、高效、安全、环保、不易产生抗性等特点,是近年来发展较为迅速的一种防治线虫病的有效措施^[6]。芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)普遍存在于自然环境中,具有繁殖快、耐热性好和稳定性高等特点,是应用和研

究最广泛的生防资源之一。例如,解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) B1619 沟施时,对黄瓜根结线虫病害的防效达到了 87.77%^[7];短小芽孢杆菌(*B. pumilus*) Y26 发酵液通过盆栽灌根法,使黄瓜根结数量减少了 78.45%^[8];贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) BZR 86 发酵液能够有效触杀根结线虫,具有较高的杀线活性,并显著减少番茄和黄瓜根部的根结数^[9]。然而,防治南方根结线虫病的生防资源仍然有限。因此,发掘高效稳定、绿色安全防治南方根结线虫病的生防资源至关重要^[10]。

本研究以南方根结线虫为靶标,筛选对南方根结线虫二龄幼虫(second-stage juveniles of *Meloidogyne incognita*, J2)有较强毒杀能力的细菌,测定其对卵孵化的抑制作用、产酶活性和对其他病原菌的拮抗作用,评价其对黄瓜种子萌发及幼苗生长的影响,以及在盆栽和田间条件下对黄瓜根结线虫病的防治效果和对黄瓜生长的影响,旨在为黄瓜根结线虫病害防控提供新型生防菌株资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤样品

从山东省泰安市(2 份)、辽宁省沈阳市(4 份)、新疆维吾尔自治区阿勒泰市(3 份)、河北省邯郸市(1 份)、贵州省毕节市(2 份)、浙江省温州市(2 份)和广西壮族自治区河池市(2 份)等地采集健康皂荚、红松、胡桃、榆树、紫薇、苹果、

芡芡草、美洲红栲、蒲草、玉米、茄子、辣椒、黄金串钱柳、荷花玉兰、辣椒和萝卜等作物的根际土壤样品, 共 16 份, 以分离获得潜在具有生防意义的细菌菌株。

1.1.2 植物

黄瓜品种为‘中农 6 号’, 该品种是南方根结线虫的感病品种, 购自中蔬种业科技(北京)有限公司。

1.1.3 病原菌

供试病原菌包括甜瓜果腐病病原菌(*Fusarium asiaticum*)、马铃薯早疫病病原菌(*Alternaria alternata*)、苹果轮纹病病原菌(*Botryosphaeria dothidea*)、苹果霉心病病原菌[*Trichothecium roseum* (Bull.) Link]、辣椒炭疽病病原菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)和番茄早疫病病原菌[*Alternaria solani* (Ellis & Martin) Jones & Grout]。上述病原菌均保存在沈阳农业大学线虫研究所-80 °C 冰箱中。

1.1.4 培养基

本研究所用的培养基包括肉膏蛋白胨培养基(LB)^[11]、LB 肉汤^[11]、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)^[12]、蒙金娜培养基^[13]、硅酸盐培养基^[13]、淀粉酶检测培养基^[14]、磷酸酯酶检测培养基^[14]、几丁质酶检测培养基^[15]、纤维素刚果红培养基^[16]、蛋白酶培养基^[17]。

1.2 南方根结线虫 J2 和卵悬液的制备

本研究所用的南方根结线虫(*M. incognita*)分离自辽宁省沈阳市辽中区四方台镇八音台村(122.996°E, 41.588°N)南方根结线虫病发生严重的温室的黄瓜根系。在沈阳农业大学北方线虫研究所温室大棚中, 通过黄瓜植株繁殖培养。试验前选取卵囊多且密集的黄瓜根系, 用清水冲洗去除表面附着的土壤后, 用 75% 乙醇消毒后的镊子挑取饱满的卵囊。将挑好的卵囊浸泡在 0.5% NaClO 溶液中消毒 2 min, 再用无菌水冲洗 5 次。将消毒后的卵囊放置于底部为无纺布的小皿中, 并将小皿放置在盛有无菌水的无

菌培养皿($d=90$ mm)内, 置于 25 °C 黑暗培养。每天收集南方根结线虫 J2 悬浮液并用无菌水调节至 300 条/mL 和 500 条/mL, 分别用于触杀活性测定试验和温室盆栽条件下的防效测定试验。用昆虫针戳破饱满的新鲜卵囊以获得卵, 并加入无菌水调节至 3 000 粒/mL, 用于卵孵化抑制试验^[18]。

1.3 芽孢杆菌菌株的分离纯化

取 5 g 土壤样品放入装有 45 mL 无菌水的 250 mL 锥形瓶中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 10 min。将土壤悬浮液在 85 °C 水浴 10 min, 之后采用稀释涂布法稀释至 10^{-3} , 取 50 μ L 悬浮液涂布于 LB 平板上, 每个浓度重复 3 次, 将平板倒置在 37 °C 恒温培养箱培养。12 h 后观察并挑取培养基上大小、颜色和边缘形状不一致的单菌落进行纯化, 并制备发酵液, 将纯化后的菌株保存于沈阳农业大学北方线虫研究所-80 °C 冰箱中^[19]。

1.4 芽孢杆菌菌株发酵液和发酵上清液的制备

采用平板划线法将待测定细菌菌株活化于 LB 培养基平板, 37 °C 倒置培养 12 h。用灭菌后的牙签挑取生长良好的新鲜单菌落接种于装有 5 mL LB 肉汤的灭菌试管中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h (浓度为 1×10^8 CFU/mL), 获得细菌菌株发酵液。细菌发酵液 8 000 r/min 离心 5 min 后, 将含有少量菌体的发酵上清液倒入灭菌后的 1.5 mL 离心管, 用 0.22 μ m 水系滤膜过滤至新的灭菌后的 1.5 mL 离心管中, 获得细菌发酵上清液^[20]。

1.5 南方根结线虫生防芽孢杆菌的筛选

以南方根结线虫 J2 为靶标, 以分离获得的细菌为材料, 进行南方根结线虫生防芽孢杆菌的初筛。将待测定的不同芽孢杆菌菌株发酵上清液 400 μ L 加入至 24 孔板的小孔中, 随后每个小孔加入 100 μ L (约含有 30 条 J2) 的含有较高活性的南方根结线虫 J2 悬浮液, 以加入等量的 LB

肉汤为对照(CK)。将 24 孔板避光置于 25 °C 恒温培养箱中, 培养 24 h 时取出 24 孔板, 使用体视显微镜(沈阳宁远技术服务有限公司)观察并记录每个小孔中线虫的死亡数和存活数。虫体完全僵直呈直线状, 且用挑针拨动无反应的线虫记为死亡。计算线虫死亡率和校正死亡率^[21]。线虫死亡率(nematode mortality rate, NMR)和校正死亡率(corrected nematode mortality rate, CNMR)的计算分别如公式(1)和公式(2)所示。

$$\text{NMR} = \text{DN} / \text{TN} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{CNMR} = (\text{NMR}_T - \text{NMR}_{\text{CK}}) / (1 - \text{NMR}_{\text{CK}}) \times 100\% \quad (2)$$

式中: DN 为死亡线虫数, TN 为线虫总数, NMR_T 为处理线虫死亡率, NMR_{CK} 为对照线虫死亡率。

复筛试验时, 每个处理重复 3 次, 每个重复 1 个孔, 其余方法同初筛。选择 24 h 时校正死亡率最高的芽孢杆菌菌株用于后续试验。

1.6 菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 的鉴定

1.6.1 形态学鉴定

使用平板划线法将菌株活化在 LB 平板上, 放入 37 °C 恒温培养箱倒置培养 12 h, 观察菌株单菌落的大小、颜色、气味和边缘形状等形态特征, 并挑取单菌落进行革兰氏染色。

挑取生长良好的细菌单菌落于 1 mL 无菌水中制得菌悬液, 吸取 30 μL 样品滴加到铜网上, 10 min 后用无菌滤纸吸干, 静置 15 min, 滴加磷钨酸染色 10 s, 自然晾干。用透射电镜(Hitachi 公司)观察菌体大小、形态、鞭毛等。

1.6.2 生理生化鉴定

对菌株进行果糖、山梨醇、肌醇、葡萄糖、蛋白胨水(色氨酸肉汤)、鼠李糖、棉子糖、硫化氢和明胶液化特性的检测。在超净台内将生理生化管(青岛高科技工业园海博生物技术有限公司)的颈部掰开, 挑取新鲜单菌落接种至管内, 用封口膜封口, 放置于 37 °C 恒温培养箱培养, 并按照说明书滴加相应试剂, 观察颜色变化, 并根据《常见细菌系统鉴定手册》^[22]进行菌株鉴定。

1.6.3 分子鉴定

参照 Sutyak 等^[23]的方法, 提取细菌的基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板, 采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')/1492R (5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3') 和 *gyrB*-F (5'-GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA-3')/*gyrB*-R (5'-AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNCACRTCNGCRTCNGTCAT-3') 分别进行 16S rRNA 基因和 *gyrB* 序列扩增。PCR 扩增体系(25 μL): 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , DNA 模板 2 μL , 2 $\times$ Taq Master Mix (Dye Plus) 12.5 μL , ddH₂O 8.5 μL 。PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 1.5 min; 94 °C 变性 0.5 min, 58 °C 复性 0.5 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。

PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 观察到与目标片段大小一致的单一条带后, 将 PCR 产物进行测序[生工生物工程(上海)股份有限公司]。将测序结果拼接后, 与 NCBI 中 BLAST 数据库进行比对分析, 使用 MEGA 7.0 软件中 neighbor-joining 法构建系统发育树。同时, 将菌株的 16S rRNA 基因和 *gyrB* 序列提交至 NCBI 的 GenBank 中, 获取登录号。

1.7 菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 发酵上清液对南方根结线虫卵孵化的抑制能力测定

取菌株 Sneb2550 和菌株 Sneb2556 的发酵上清液 400 μL , 加入到 24 孔板的小孔中, 再向每孔中加入 100 μL 的南方根结线虫卵悬液(约含 300 粒卵), 以加入等量无菌水和 LB 处理为对照, 每个处理重复 3 次, 每个重复 1 个小孔。将 24 孔板避光置于 25 °C 恒温培养箱中培养, 24 h 和 48 h 时分别使用体视显微镜(沈阳宁远技术服务有限公司)观察并记录每个小孔中孵化出的线虫数, 计算卵孵化率和相对抑制率^[21]。卵孵化率(egg hatch rate, EHR)和相对抑制率(relative

inhibition rate-egg hatch, RIR-EH)的计算分别如公式(3)和公式(4)所示。

$$EHR=HE/TE\times 100\% \quad (3)$$

$$RIR-EH=(EHR_{CK}-EHR_T)/EHR_{CK}\times 100\% \quad (4)$$

式中： HE 为孵化线虫数， TE 为供试卵数， EHR_{CK} 为对照孵化线虫数， EHR_T 为处理孵化线虫数。

1.8 菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 溶磷解钾和产酶活性检测

分别取 1.5 μ L 菌株 Sneb2550 和菌株 Sneb2556 发酵液(浓度为 1×10^8 CFU/mL)滴在待检测的产酶检测培养基的中央，放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱倒置培养 3–5 d，观察菌落周围是否产生透明圈，若周围产生透明圈则说明该菌株具有产生该酶的能力，若不出现透明圈说明该菌株不具备产该酶的能力。

分别使用蒙金娜培养基和硅酸盐培养基检测菌株 Sneb2550 和菌株 Sneb2556 的溶磷能力和解钾能力，方法同上。

1.9 菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 发酵液对其他病原菌的抑制能力检测

分别将甜瓜果腐病病原菌、马铃薯早疫病病原菌、苹果轮纹病病原菌、苹果霉心病病原菌、辣椒炭疽病病原菌和番茄早疫病病原菌菌株接种于 PDA 平板，28 $^{\circ}$ C 条件下倒置培养 5–7 d。用灭菌的打孔器($d=5$ mm)分别在上述病原真菌菌落外侧打孔以获取新鲜菌饼，置于 PDA 培养基平板正中央位置，在距离菌饼 2.0 cm 处分别对称滴加 2 μ L 菌株 Sneb2550 和菌株 Sneb2556 发酵液(浓度为 1×10^8 CFU/mL)，以只接种病原真菌菌饼不接种细菌发酵液的平板为对照，每个处理 3 次重复，每个重复 1 个平板。将平板放于 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 3–5 d 至对照处理病原菌菌落长满培养皿，观察并记录各处理中病原真菌菌落半径，计算抑菌率。抑菌率(pathogen control inhibition rate, PCIR)的计算如公式(5)所示。

$$PCIR=(R_{CK}-R_T)/R_{CK}\times 100\% \quad (5)$$

式中： R_{CK} 为对照病原菌菌落半径， R_T 为处理病原菌菌落半径。

1.10 菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 发酵液对黄瓜种子萌发的影响

选择饱满的黄瓜种子，放于 55 $^{\circ}$ C 浸泡 30 min 后晾干。将晾干的黄瓜种子分别放于 5 mL 菌株 Sneb2550 和菌株 Sneb2556 的发酵液(浓度为 1×10^7 CFU/mL)中浸泡 5 min，取出黄瓜种子并晾干。将晾干的黄瓜种子放于铺有灭菌湿润滤纸的无菌培养皿($d=90$ mm)中，分别以浸泡在等量无菌水和培养基处理为对照，每个处理 3 次重复，每个重复 20 粒种子。将培养皿放在 28 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱中进行遮光培养。处理 24 h 后开始统计每皿中发芽种子数量，每 24 h 统计 1 次，培养 3 d 后统计每皿中发芽种子数，计算发芽率，并测量其胚根长度，计算活力指数。发芽率(germination rate, GR)和种子活力指数(seed vigor index, SI)的计算分别如公式(6)和公式(7)所示。

$$GR=GS/TS\times 100\% \quad (6)$$

$$SI=RL\times \Sigma(DGS/DG) \quad (7)$$

式中： GS 为发芽种子数， TS 为供试种子数， RL 为胚根长度， DGS 为该天发芽数， DG 为相应发芽天数。

1.11 菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 发酵液对温室条件下黄瓜植株生长及黄瓜南方根结线虫病的影响

选择饱满的黄瓜种子，置于 55 $^{\circ}$ C 浸泡 30 min 后晾干。将处理后的黄瓜种子播种于装有育苗基质(土壤:蛭石:基质=1:2:2)的育苗盘(长 4 cm $\times$ 宽 4 cm $\times$ 高 9 cm)中。播种前育苗基质需经干热灭菌处理(165 $^{\circ}$ C、120 min)。待黄瓜幼苗生长至两叶一心期后，将其移栽至装有灭菌育苗基质的花盆(9.5 cm $\times$ 11.5 cm)中，每个花盆移入 1 棵黄瓜苗。移入花盆 5 d 后，进行如下试验设置：一部分，分别以灌根 10 mL 菌株 Sneb2550 和菌株 Sneb2556 发酵液(浓度为 1×10^8 CFU/mL)

为处理组,以等量无菌水、LB培养基灌根为对照组,每个处理设3次重复,每个重复3株苗;另一部分,分别以灌根10 mL菌株Sneb2550和菌株Sneb2556发酵液(浓度为 1×10^8 CFU/mL),并在3 d后接种南方根结线虫J2悬浮液1 mL(约500条南方根结线虫J2)为处理,分别以等量无菌水、LB培养基和稀释1 000倍液的1.8%阿维菌素乳油灌根,并在3 d后接种南方根结线虫J2悬浮液1 mL(约500条南方根结线虫J2)为对照组,每个处理重复5次,每个重复1株苗。将花盆置于温室中培养,温度为25 °C、光照16 h,黑暗8 h,花盆完全随机摆放,并进行常规肥水管理。培养30 d后,调查黄瓜植株的株高、根长、根鲜重和植株鲜重,以及根结数量,计算根结减退率。根结减退率(reduction of gall, RG)的计算如公式(8)所示。

$$RG = (G_{CK} - G_T) / G_{CK} \times 100\% \quad (8)$$

式中: G_{CK} 为对照组根结数, G_T 为处理组根结数。

1.12 菌株Sneb2550和Sneb2556对黄瓜南方根结线虫病的田间防效试验

温室试验于2024年5月16日在辽宁省鞍山市海城市温香镇(122.518°E, 41.039°N)的温室大棚中进行,该温室大棚前茬作物为辣椒,且根结线虫病发生严重。

黄瓜种子的消毒、播种和移栽方法见1.11节。移苗当天,对黄瓜幼苗进行灌根处理。分别以菌株Sneb2550和菌株Sneb2556发酵液(浓度为 1×10^7 CFU/mL)灌根为处理组,以等量无菌水、LB培养基和稀释1 000倍液的1.8%阿维菌素乳油灌根为对照组,每株苗灌根200 mL,每个处理设3次重复,每个重复5株苗,各处理随机分布。移栽后30 d将黄瓜苗整株铲出,测量株高、株鲜重、根长、根鲜重,调查根结指数并计算田间防效。本研究采用Bridge等^[24]的分级标准统计病情:0级,根系整体无根结存

在;1级,须根区域存在少量小型根结;2级,须根部位可见明显小根结,主根完整无根结;3级,须根分布显著大型根结,主根仍无根结形成;4级,须根系统大范围被大型根结占据,主根持续无结;5级,50%根系出现根结,主根开始产生根结;6级,主根表面呈现密集根结分布;7级,主根超过80%区域被根结覆盖;8级,主根完全被根结包裹;9级,全根系(含主根和须根)均产生根结;10级,主根根结异常膨大,须根系统完全消失。根结指数(gall index, GI)和防效(control efficacy, CE)的计算分别如公式(9)和公式(10)所示。

$$GI = \sum (Nd \times Cd) / (Ts \times Ad) \times 100 \quad (9)$$

$$CE = (GI_{CK} - GI_T) / GI_{CK} \times 100\% \quad (10)$$

式中: Nd 为各级病株数, Cd 为各级代表值, Ts 为调查总株数, Ad 为最高级代表值, GI_{CK} 为对照根结指数, GI_T 为处理根结指数。

1.13 数据统计与分析

使用Microsoft Office Excel 2010软件进行数据统计,运用SPSS statistics 22.0软件对试验数据进行统计分析,借助GraphPad Prism 10.1.2软件进行作图。试验采用Duncan氏新复极差法($P < 0.05$)进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 南方根结线虫生防芽孢杆菌的分离和筛选

以从全国各地采集的16份土壤样品为材料,采用稀释涂布法进行芽孢杆菌的分离与纯化,共获得189株芽孢杆菌分离物。获得的芽孢杆菌菌株均保存于沈阳农业大学北方线虫研究所的-80 °C冰箱中。

以分离获得的189株芽孢杆菌为材料,以南方根结线虫J2为靶标,筛选对J2有高毒杀能力的菌株。试验结果表明,芽孢杆菌发酵上清液处理24 h后,对南方根结线虫J2校正死亡率大于90.00%的菌株有40株,81.00%–90.00%的

菌株有 19 株, 71.00%–80.00% 的菌株有 8 株, 61.00%–70.00% 的菌株有 17 株, 51.00%–60.00% 的菌株有 14 株, 41.00%–50.00% 的菌株有 12 株, 15.00%–40.00% 的菌株有 27 株, 15.00% 以下的菌株有 52 株。选取细菌发酵上清液处理后对南方根结线虫 J2 的 24 h 校正死亡率大于 90.00% 的 40 株细菌菌株进行复筛。结果表明, 8 株细菌菌株发酵上清液对南方根结线虫 J2 的 24 h 校正死亡率大于 90.00%, 即对南方根结线虫 J2 有较高的杀线虫活性。其中, 菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 处理对 J2 的杀线虫活性最高, 24 h 校正死亡率分别为 95.64% 和 95.36% (表 1)。因此选取菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 进行后续研究。

2.2 菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 的鉴定

2.2.1 菌落形态鉴定

菌株 Sneb2550 在 LB 培养基上生长情况良好, 菌落为乳白色, 圆形; 革兰氏染色呈紫色, 判定为革兰氏阳性菌; 菌体为杆状, 周生鞭毛 (图 1A–1C)。菌株 Sneb2556 在 LB 培养基上生长情况良好, 菌落为白色, 椭圆形; 革兰氏染色呈紫色, 判定为革兰氏阳性菌; 菌体为杆状, 周生鞭毛 (图 1D–1F)。

2.2.2 生理生化鉴定结果

生理生化特征检测结果显示, 菌株 Sneb2550 对果糖、葡萄糖和明胶液化表现为阳性, 对山梨醇、肌醇、蛋白胨水 (色氨酸肉汤)、

表1 细菌菌株发酵上清液对南方根结线虫J2的触杀效果

Table 1 The nematocidal effect of fermentation filtrate of selected strain against *Meloidogyne incognita* J2

Strain	Mortality in 24 h (%)	Corrected mortality in 24 h (%)	Strain	Mortality in 24 h (%)	Corrected mortality in 24 h (%)
CK	4.18±2.15n	–	16P	84.43±4.64fghijklm	83.75±4.84fghijklm
Sneb2550	95.83±1.64a	95.64±1.71a	9E	84.13±2.93fghijklm	83.44±3.06fghijklm
Sneb2556	95.56±1.28a	95.36±1.33a	8G	84.11±1.49fghijklm	83.42±1.56fghijklm
16G	93.92±0.37ab	93.66±0.39ab	15D	83.80±3.61fghijklm	83.09±3.77fghijklm
15B	93.60±2.83abc	93.32±2.95abc	16X	83.79±0.95fghijklm	83.08±0.99fghijklm
15A	93.26±2.94abc	92.96±3.07abc	8H	83.78±3.79fghijklm	83.07±3.95fghijklm
13I	91.24±2.74abcd	90.85±2.86abcd	16E	83.53±5.03ghijklm	82.81±5.25ghijklm
8P	90.58±3.18abcde	90.17±3.32abcde	15C	83.26±3.05hijklm	82.53±3.19hijklm
9C	90.58±0.81abcde	90.17±0.85abcde	16J	83.13±2.07hijklm	82.39±2.16hijklm
16H	89.27±3.68bcdef	88.80±3.84bcdef	6L	82.14±6.35ijklm	81.36±6.63ijklm
14L	89.13±3.73bcdefg	88.65±3.89bcdefg	16T	82.03±1.78ijklm	81.25±1.86ijklm
2A	88.69±3.14bcdefgh	88.20±3.28bcdefgh	16Q	81.79±3.12ijklm	81.00±3.26ijklm
16D	88.23±3.34cdefgh	87.72±3.49cdefgh	14J	81.70±3.42jklm	80.90±3.57jklm
16O	87.44±1.00defghi	86.90±1.04defghi	16L	81.67±1.01jklm	80.87±1.05jklm
5E	87.35±3.02defghij	86.80±3.15defghij	15E	81.63±0.17klm	80.82±0.18jklm
16K	87.20±0.98defghijk	86.64±1.02defghijk	16M	81.58±1.52klm	80.78±1.58klm
16W	86.96±2.94defghijkl	86.39±3.07defghijkl	16U	81.45±3.74lm	80.64±3.90klm
16F	85.45±3.95efghijklm	84.81±4.12efghijklm	16N	81.29±3.06lm	80.47±3.19lm
16R	85.44±1.25efghijklm	84.80±1.30efghijklm	16Z	81.09±2.42m	80.27±2.53m
16I	85.08±1.54efghijklm	84.43±1.60efghijklm	16Y	81.00±1.22m	80.17±1.27m
16C	84.99±1.06fghijklm	84.33±1.11efghijklm			

Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's test. The same as below.

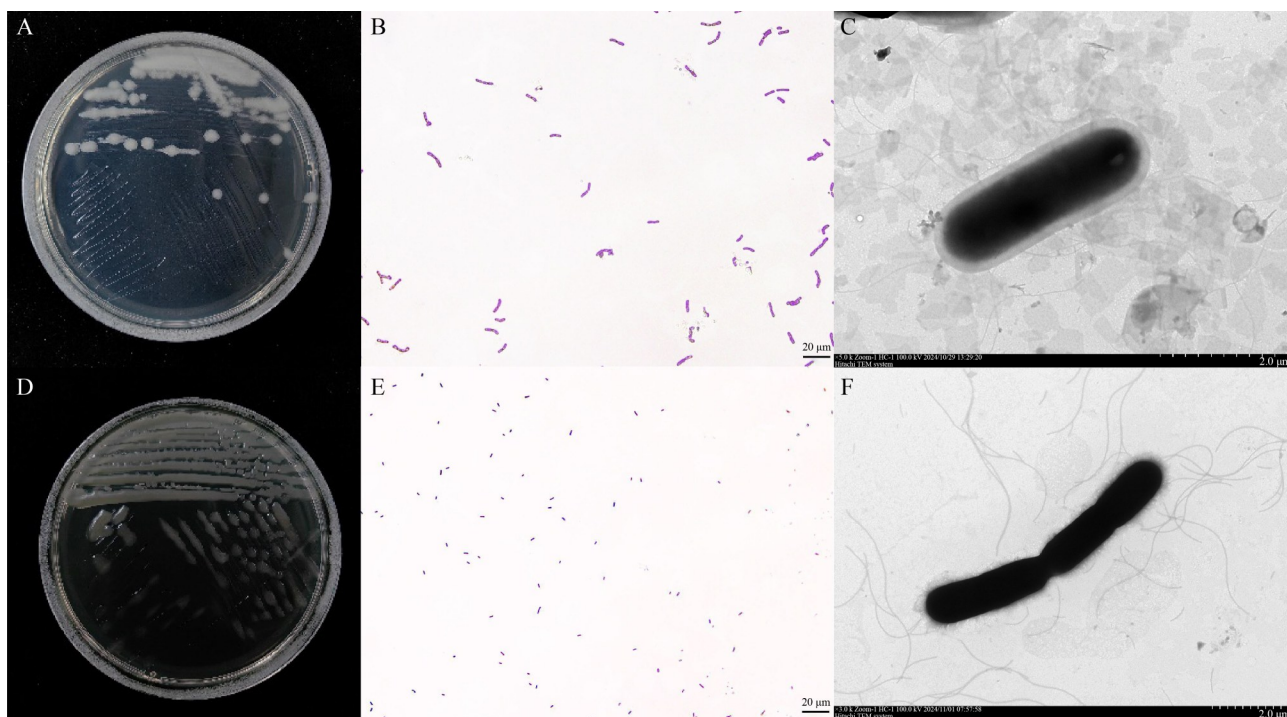


图1 菌株Sneb2550和Sneb2556的形态特征。A: 菌株Sneb2550在LB培养基上的形态; B: 菌株Sneb2550革兰氏染色(40×); C: 菌株Sneb2550透射电镜形态; D: 菌株Sneb2556在LB培养基上的形态; E: 菌株Sneb2556革兰氏染色(40×); F: 菌株Sneb2556透射电镜形态。

Figure 1 Morphological characteristics of strains Sneb2550 and Sneb2556. A: Morphology of Sneb2550 on LB medium; B: Gram staining (40×) of Sneb2550; C: Transmission electron microscopy morphology of Sneb2550; D: Morphology of Sneb2556 on LB medium; E: Gram staining (40×) of Sneb2556; F: Transmission electron microscopy morphology of Sneb2556.

鼠李糖、棉子糖和硫化氢为阴性。菌株Sneb2556对明胶液化表现为阳性,对果糖、山梨醇、肌醇、葡萄糖、蛋白胨水(色氨酸肉汤)、鼠李糖、棉子糖和硫化氢表现为阴性。菌株Sneb2550和Sneb2556的生理生化特征均与《常见细菌系统鉴定手册》中关于芽孢杆菌的描述相符合。

2.2.3 分子鉴定结果

为了进一步明确菌株Sneb2550和Sneb2556的分类地位,对菌株的16S rRNA基因序列进行测序分析并构建菌株Sneb2550和Sneb2556的系统发育树。结果显示,与菌株Sneb2550同源性最高的为解蛋白芽孢杆菌(*Bacillus proteolyticus*),

登录号为OR077583.1、OM371062.1。与Sneb2556同源性最高的为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),登录号为PP236930.1、OR856022.1(图2A)。同时,对菌株Sneb2556的*gyrB*基因扩增进行序列分析并构建系统发育树。结果显示,与菌株Sneb2556同源性最高的为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*),登录号为KP900934.1、MT793724.1(图2B)。菌株Sneb2550和Sneb2556的16S rRNA基因序列、*gyrB*基因序列已分别提交GenBank数据库。菌株Sneb2550的16S rRNA基因序列号为PV093913;菌株Sneb2556的16S rRNA基因序列号为PV093914,*gyrB*基因序列号为PV104451。

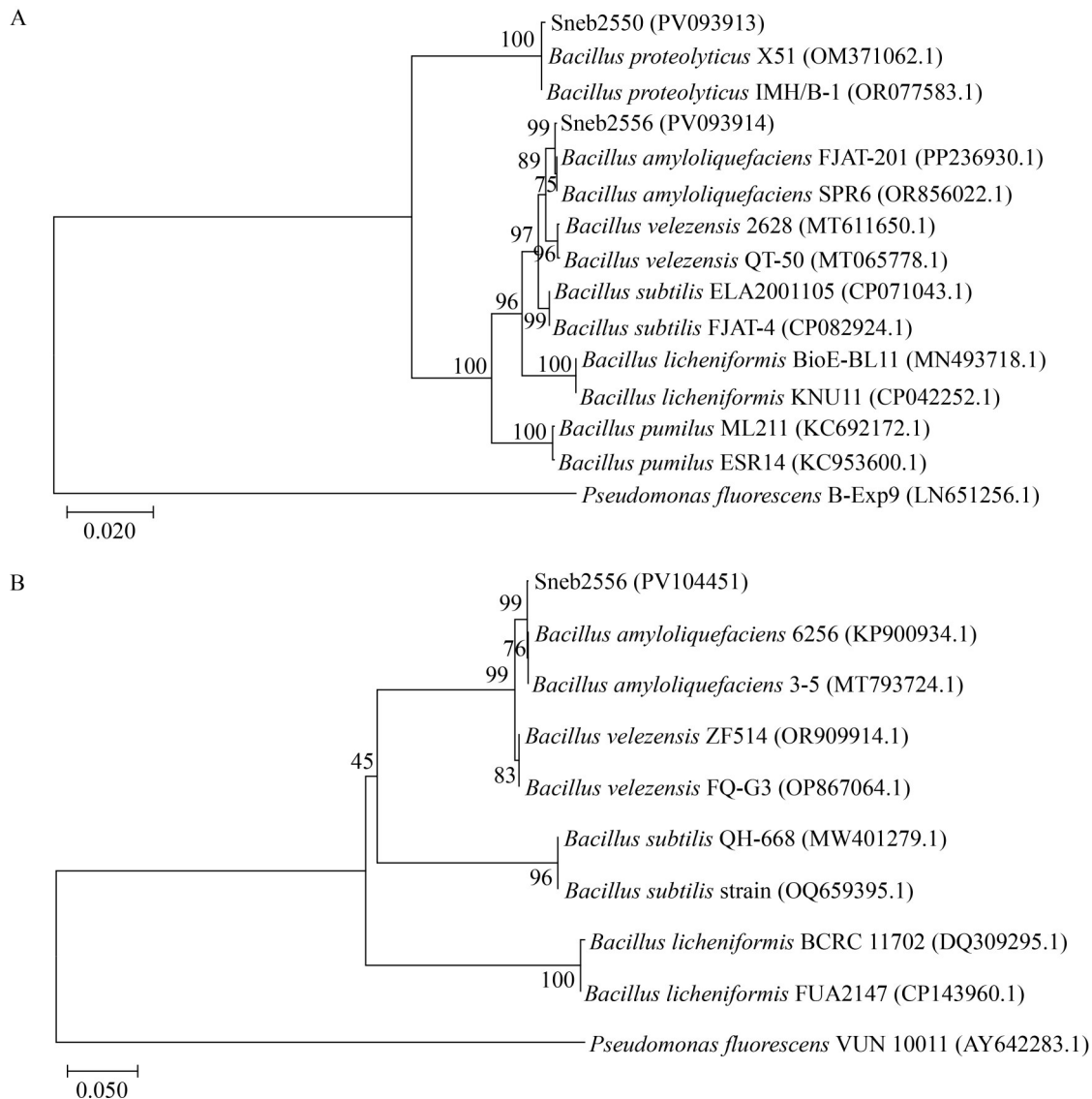


图2 菌株Sneb2550和Sneb2556基于16S rRNA基因序列(A)和 $gyrB$ 基因序列(B)的系统发育树。采用MEGA 7.0软件中的邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树, 并通过1 000次重复抽样计算自展值(bootstrap values)。菌株基因登录号标注于括号内。标尺表示每个核苷酸位点的替换数。

Figure 2 Phylogenetic tree of Sneb2550 and Sneb2556 was constructed based on 16S rRNA gene sequence (A) and $gyrB$ sequence (B). Phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining method in MEGA 7.0 with bootstrap values based on 1 000 replications. Gene accession numbers of bacterial strains are indicated in parentheses. The scale bar represents the number of substitutions per base position.

因此, 通过形态学特征(图 1)和生理生化特性鉴定, 结合分子生物学分析(图 2), 鉴定菌株Sneb2550 为解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*), 菌株Sneb2556 为解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

2.3 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 发酵上清液对南方根结线虫卵孵化的抑制效果

抑制卵孵化试验结果表明, 处理 24 h 后

ddH₂O 和 LB 处理的卵孵化率分别为 11.55% 和 11.23% (图 3)。芽孢杆菌 *Sneb2550* 和 *Sneb2556* 菌株发酵上清液对南方根结线虫卵孵化的相对抑制率分别为 76.92% 和 80.77%; 处理 48 h 时, 解蛋白芽孢杆菌(*Bacillus proteolyticus*) *Sneb2550* 和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) *Sneb2556* 菌株发酵上清液对南方根结线虫卵孵化的相对抑制率分别为 83.63% 和 84.80% (图 3)。综上所述, 芽孢杆菌 *Sneb2550* 和 *Sneb2556* 能

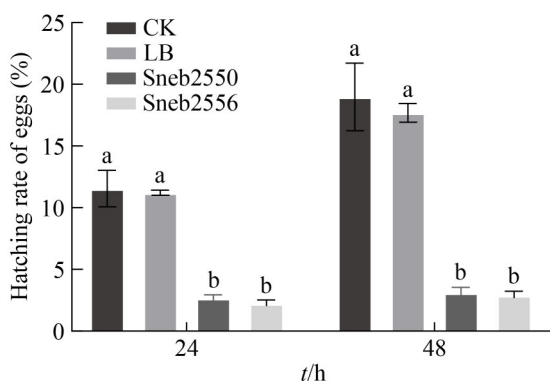


图3 芽孢杆菌*Sneb2550*和*Sneb2556*发酵上清液对南方根结线虫卵孵化率的影响

Figure 3 The effect of fermentation filtrate of *Bacillus* *Sneb2550* and *Sneb2556* on eggs hatching rate of *Meloidogyne incognita*.

有效抑制南方根结线虫卵孵化, 且抑制效果随处理时间的延长而增加。

2.4 芽孢杆菌 *Sneb2550* 和 *Sneb2556* 溶磷解钾和产酶活性检测

溶磷解钾和产酶活性检测试验结果表明, 菌株 *Sneb2550* 可以在蛋白酶检测培养基上产生透明圈, 菌株 *Sneb2556* 可以在溶磷检测培养基、淀粉酶检测培养基和蛋白酶检测培养基上产生透明圈(图 4)。因此, 菌株 *Sneb2550* 具有产蛋白酶的能力, 菌株 *Sneb2556* 具有溶磷和产淀粉酶、蛋白酶的能力, 但不具有解钾, 产生磷酸酯酶、几丁质酶和纤维素酶的能力。

2.5 芽孢杆菌 *Sneb2550* 和 *Sneb2556* 对其他病原菌的抑制作用

平板对峙试验结果表明, 菌株 *Sneb2550* 对苹果霉心病菌和番茄早疫病菌具有显著的拮抗作用, 抑菌率均大于 50.00%, 菌株 *Sneb2556* 对马铃薯早疫病菌、苹果霉心病菌、辣椒炭疽病菌、甜瓜果腐病菌、苹果轮纹病菌和番茄早疫病病原菌具有较强的拮抗作用, 抑菌率均大于 53.87%, 其中菌株 *Sneb2556* 对苹果霉心病菌抑菌率最高为 91.26% (表 2)。解蛋白芽孢杆菌

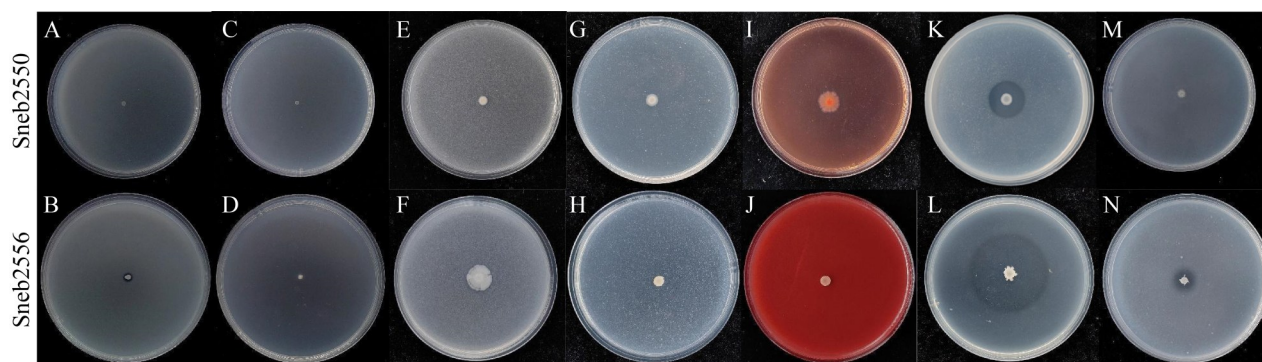


图4 芽孢杆菌*Sneb2550*和*Sneb2556*溶磷解钾和产酶活性检测。A-B: 溶磷; C-D: 解钾; E-F: 磷酸酯酶; G-H: 几丁质酶; I-J: 纤维素酶; K-L: 蛋白酶; M-N: 淀粉酶。

Figure 4 Detection of phosphorus-solubilizing potassium solubilizing and enzyme-producing activity of *Bacillus* *Sneb2550* and *Sneb2556*. A-B: Phosphorus hydrolysis; C-D: Potassium hydrolysis; E-F: Phosphatase; G-H: Chitinase; I-J: Cellulase; K-L: Protease; M-N: Amylase.

(*Bacillus proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) Sneb2556 对其他病原真菌具有不同程度的拮抗作用。

2.6 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 对黄瓜种子萌发的影响

种子萌发试验结果表明, 处理 3 d 后与 LB 对照相比, 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 发酵液显著促进胚根生长, 分别增长了 27.92% 和 36.36%。与对照相比, 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 处理后, 黄瓜种子的发芽率和种子活力指数无显著性差异(表 3)。综上所述, 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 对黄瓜种子的萌发无抑制作用, 且均显著促进黄瓜种子胚根生长。

表2 芽孢杆菌Sneb2550和Sneb2556对其他病原菌的抑制作用

Table 2 Inhibitory effect of *Bacillus* Sneb2550 and Sneb2556 on other phytopathogens

Phytopathogen	Inhibition rate (%)	
	Sneb2550	Sneb2556
<i>Fusarium asiaticum</i>	35.53±3.06	71.33±0.85
<i>Alternaria alternata</i>	0.00±0.00	71.66±2.94
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	0.00±0.00	69.79±0.39
<i>Trichothecium roseum</i>	75.74±1.94	91.26±1.98
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0.00±0.00	80.70±2.99
<i>Alternaria solani</i>	56.72±4.58	53.87±1.16

表3 芽孢杆菌Sneb2550和Sneb2556对黄瓜种子萌发及生长的影响

Table 3 The effect of fermentation broth of *Bacillus* Sneb2550 and Sneb2556 on the germination and growth of cucumber seeds

Treatments	Germination rate (%)	Seed vigor index	Radicle length (cm)
ddH ₂ O	83.33±10.41a	3.06±0.44a	1.58±0.17b
LB	81.67±11.55a	2.92±0.33a	1.54±0.04b
Sneb2550	80.00±5.00a	3.46±0.18a	1.97±0.11a
Sneb2556	83.33±5.77a	3.57±0.51a	2.10±0.20a

2.7 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 对黄瓜植株生长的影响和防治黄瓜南方根结线虫病的盆栽效果

盆栽试验结果表明, 处理 30 d 后与 LB 对照相比, 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 发酵液灌根处理黄瓜幼苗后, 黄瓜植株株高、植株鲜重、根长、根鲜重均显著增加, 分别增加了 41.44% 和 31.79%、147.69% 和 142.88%、42.62% 和 20.41%、33.18% 和 93.36% (表 4)。此外, 与对照 LB 相比, 菌株 Sneb2550 发酵液、Sneb2556 发酵液和阿维菌素分别灌根处理黄瓜幼苗后, 根结个数显著降低, 根结减退率分别为 56.02%、50.19% 和 60.53% (表 5)。因此, 盆栽条件下芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 可有

表4 温室盆栽条件下芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556灌根处理对黄瓜植株生长的影响

Table 4 Effect of fermentation broth of *Bacillus* Sneb2550 and Sneb2556 on cucumber plant growth in pot experiments

Treatments	Shoot length (cm)	Shoot fresh weight (g)	Root length (cm)	Root fresh weight (g)
ddH ₂ O	20.86±0.98c	8.55±0.50b	15.48±0.70d	2.39±0.17c
LB	18.75±0.96d	5.41±0.64c	18.37±0.93c	2.11±0.33c
Sneb2550	26.52±2.13a	13.40±1.20a	26.20±1.08a	2.81±0.52b
Sneb2556	24.71±2.12b	13.14±1.01a	22.12±1.40b	4.08±0.38a

表5 温室盆栽条件下芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556防治黄瓜南方根结线虫病的效果

Table 5 Effect of fermentation broth of *Bacillus* Sneb2550 and Sneb2556 on cucumber root knot nematode disease in pot experiments

Treatments	Root galls	Reducing rate of root galls (%)
ddH ₂ O	106.40±5.18a	—
LB	98.00±4.95b	7.89±4.65c
Avermectin	42.00±4.47c	60.53±4.20a
Sneb2550	46.80±2.28d	56.02±2.14a
Sneb2556	53.00±3.24d	50.19±3.05b

效防治黄瓜南方根结线虫病并促进植株生长。

2.8 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 对黄瓜南方根结线虫病的田间防治效果

田间试验结果表明, 黄瓜移栽至田间 30 d 后, ddH₂O 与 LB 对照的根结指数分别为 92.36 和 89.58, 阿维菌素处理的根结指数为 54.17 (表 6)。芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 发酵液灌根处理黄瓜幼苗后, 根结指数分别为 36.11 和 43.75, 根结指数显著下降, 防效分别为 60.90% 和 52.63%, 且显著高于阿维菌素处理(41.35%) (表 6)。与 LB 对照相比, 经芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 发酵液灌根后, 黄瓜植株的根长、根鲜重、植株鲜重和株高均显著增加, 分别增加了 87.16% 和 85.19%、58.07% 和 27.14%、12.98% 和 58.75%、7.54% 和 51.15% (表 6)。因此, 田间条件下, 芽孢杆菌 Sneb2550 和 Sneb2556 可有效防治黄瓜南方根结线虫病, 并促进植株生长。

3 讨论与结论

近年来, 生防微生物因其良好的杀线虫效果和对环境的安全性极具发展前景^[25]。目前仍然缺乏能够有效预防和控制根结线虫病的生防微生物资源, 当前迫切需要找到既稳定又高效的生防微生物应对根结线虫带来的作物危害。本研究从健康作物根际土壤中分离筛选出 2 株对南方根结线虫 J2 具有较强杀线活性的细菌 Sneb2550 和 Sneb2556。通过形态学特征和生理生化分析结合 16S rRNA 基因和 *gyrB* 基因序列

分析, 将菌株 Sneb2550 和 Sneb2556 分别鉴定为解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*)和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。同时, 2 个菌株对南方根结线虫卵孵化具有显著的抑制效果, 不影响黄瓜种子的萌发, 促进胚根生长, 具有产酶和拮抗多种病原菌的能力。解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556 在温室和田间条件下不仅能有效防治黄瓜南方根结线虫病, 而且显著促进黄瓜植株的生长。本研究结果为黄瓜南方根结线虫病的生物防治提供潜在的生防资源。

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)在防治植物病害、改良土壤环境、修复农化污染环境及促进植物生长等方面展现出其绿色高效环保的特点, 并带来可观的经济、生态、食品安全等效益, 已广泛用于植物线虫病害的生物防治中^[26]。解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) HJ03 对南方根结线虫 J2 的 24 h 校正死亡率可达 77.3%, 并且可以显著抑制卵的孵化; 在盆栽试验中可显著抑制根结形成, 并抑制卵囊形成, 处理 60 d 后的抑制率为 75.7%^[27]。坚强芽孢杆菌(*B. firmus*) YB-1503 对南方根结线虫 J2 的 48 h 校正死亡率可达 70.0%, 在盆栽条件下的防效为 65.8%^[28]。贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) TB-68 发酵滤液原液对根结线虫 J2 的校正死亡率达 91.7%, 卵孵化抑制率达 81.8%, 对烟草根结线虫病的室内盆栽防治效果达 64.4%^[29]。甲基营养型芽孢杆菌

表6 芽孢杆菌Sneb2550和Sneb2556发酵液对黄瓜南方根结线虫病的田间防效

Table 6 Effect of fermentation broth of *Bacillus* Sneb2550 and Sneb2556 on cucumber root knot nematode disease in field experiments

Treatments	Root length (cm)	Root fresh weight (g)	Fresh weight (g)	Shoot length (cm)	Gall index	Control effect (%)
CK	8.49±0.83c	2.24±0.49d	150.50±11.26d	139.17±3.25c	92.36±1.20a	—
LB	9.04±0.38c	2.82±0.09c	165.67±7.45c	159.00±6.03c	89.58±2.08a	3.01±2.26a
Avermectin	8.52±0.32c	2.53±0.16cd	160.33±8.66c	146.33±4.63d	54.17±2.08b	41.35±2.26b
Sneb2550	16.91±4.49a	4.46±1.10a	187.17±11.13b	171.00±10.12b	36.11±4.34d	60.90±4.70d
Sneb2556	16.73±1.00b	3.58±0.50b	263.00±8.02a	240.33±3.50a	43.75±2.08c	52.63±2.26c

(*B. methylotrophicus*) NB-04 在离体试验中对根结线虫 J2 的校正死亡率为 84.9%，对卵孵化的抑制率达 78.6%，对番茄根结线虫病的盆栽防治效果为 61.6%^[30]。本研究发现解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556 对南方根结线虫具有较好的触杀活性以及对卵的孵化能力具有显著的抑制作用，并且在温室盆栽条件下根结减退率超过 50.00%，田间条件下防效高于 50.00%。因此，解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556 可用于黄瓜南方根结线虫病害的生物防治。

芽孢杆菌可产生多种代谢物质，不仅能够触杀线虫、抑制卵孵化，而且能够诱导植物产生抗性而防治根结线虫病害^[31]。独岛枝芽孢杆菌(*Virgibacillus dokdonensis*) MCCC 1A00493 产生的 4-乙烯基苯酚对线虫具有触杀、熏杀、卵孵化抑制作用，并且在高浓度下对根结线虫具有趋避作用，低浓度下对根结线虫具有诱杀作用^[32]。多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) KM2501-1 产生的环二肽类物质 cyclo(Pro-Phe) 是一个具有杀线虫活性物质，其可能通过破坏线虫肠道杀死线虫^[33]。蜡质芽孢杆菌(*B. cereus*) AR156 能够调控一些与脱落酸、乙烯、热激蛋白相关的基因，诱导植物抵抗根结线虫的侵染^[34]。枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*) RB.DL.28 产生的磺胺醋酰与羟基甲硝唑在触杀根结线虫 J2 时起着至关重要的作用^[35]。本研究发现解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556 对南方根结线虫 J2 具有较强的触杀活性并显著抑制卵的孵化，并与处理时间呈正相关。因此，还需深入探索解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556 产生的代谢产物、鉴定杀线虫活性物质并解析防治黄瓜南方根结线虫病的机制。

芽孢杆菌既可以有效防控植物病害，又对植物的生长具有促进作用^[36]。种子萌发试验和

盆栽试验表明，贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) WB 对西瓜植株的生长有促进作用，且具有产生生长素与纤维素酶及解磷、解钾和固氮的能力^[37]。贝莱斯芽孢杆菌(*B. velezensis*) ZF513 灌根处理黄瓜苗后，植株株高、茎粗、地上鲜重及干重、地下鲜重及干重、根冠比和壮苗指数均显著增加，有效提升了幼苗的生物量^[38]。暹罗芽孢杆菌(*B. siamensis*) G19-1 能够显著增加辣椒植株的地上部鲜重、根鲜重、地上部干重、根干重以及株高，且菌株的溶磷、解钾、固氮、产赤霉素和 IAA 能力与辣椒植株地上鲜重、地上干重以及根干重之间呈显著正相关^[39]。特基拉芽孢杆菌(*B. tequilensis*) YB-1145 具有分泌 β -1,3-葡聚糖酶、蛋白酶、IAA 和溶解无机磷的能力，可有效提高小麦根长、株高、鲜重^[40]。本研究发现，在温室和田间条件下，解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556 显著增加黄瓜植株的株高、鲜重等生长指标。然而，解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556 促进黄瓜植株生长产生的活性物质以及机制还需进一步研究。

使用生防菌剂灌根处理植株是防治植物病害的有效方法之一^[41]。解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb709 通过灌根处理，在室内盆栽和田间环境下对番茄根结线虫的防效分别为 66.85% 和 52.94%，且能促进番茄植株生长以及提高果实数量与质量^[42]。坚强芽孢杆菌(*B. firmus*) WP 通过灌根处理，在盆栽和田间条件下均能促进番茄的生长，并且有效防治番茄根结线虫病，防效大于 45.00%^[43]。解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) GHt-q6 通过灌根处理，在田间条件下对黄瓜根围土壤中线虫的虫口密度都有不同程度的抑制作用，防效达到 43.42%，比对照药剂防效高 7.61%^[44]。本研究发现，解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556

灌根处理黄瓜植株后,在温室和田间条件下均能有效防治黄瓜南方根结线虫病,且防效高于药剂处理。因此,在生产实践中,灌根的方法是解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556 防治根结线虫病的可选择施用方法之一。

本研究筛选并鉴定出对南方根结线虫 J2 具有较高触杀活性的 2 株菌株解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556。它们不仅能够有效抑制卵孵化,不影响黄瓜种子萌发,促进胚根生长,且在盆栽和田间条件下有效防治黄瓜南方根结线虫病并促进黄瓜植株生长。解蛋白芽孢杆菌(*B. proteolyticus*) Sneb2550 和解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*) Sneb2556 不仅为黄瓜根结线虫病提供了新的生防微生物资源,而且为开发生物农药奠定了理论基础。

作者贡献声明

吴蔚然: 试验操作、调查研究、数据分析与可视化呈现、写作初稿与修改; 朱晓峰: 协助试验操作; 王媛媛: 参与论文讨论; 刘晓宇: 提供技术支持; 赵迪: 样品采集; 杨宁: 协助调研; 段玉玺: 研究构思和设计; 范海燕: 获取基金、提供技术支持; 陈立杰: 提供技术支持、协助试验操作、参与论文讨论、提供资源。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] JAOUANNET M, PERFUS-BARBOECH L, DELEURY E, MAGLIANO M, ENGLER G, VIEIRA P, DANCHIN EGJ, da ROCHA M, COQUILLARD P, ABAD P, ROSSO MN. A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei[J]. *New Phytologist*, 2012, 194(4): 924-931.
- [2] 卢志军. 蔬菜根结线虫病生物熏蒸控制作用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.
- LU ZJ. Control efficiency of biological fumigation against vegetable root-knot nematodes[D]. Beijing: China Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [3] 王艳飞, 孟攀奇, 张有为. 黄瓜根结线虫病的发生与防治[J]. *北方园艺*, 2007(5): 222-223.
- [4] 路洪宝. 滴灌施用氟吡菌酰胺防治黄瓜根结线虫病应用技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- LU HB. Study on the drip irrigation application of fluopyram against *Meloidogyne incognita* on cucumber[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [5] GINÉ A, SORRIBAS FJ. Effect of plant resistance and BioAct WG (*Purpureocillium lilacinum* strain 251) on *Meloidogyne incognita* in a tomato-cucumber rotation in a greenhouse[J]. *Pest Management Science*, 2017, 73(5): 880-887.
- [6] BARRATT BIP, MORAN VC, BIGLER F, van LENTEREN JC. The status of biological control and recommendations for improving uptake for the future[J]. *BioControl*, 2018, 63(1): 155-167.
- [7] 蒋盼盼, 陈志谊, 甘颖, 刘永锋, 陆凡. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 对设施蔬菜根结线虫病的防治效果[J]. *江苏农业科学*, 2017, 45(12): 81-84.
- [8] 梅凤珍, 周明超, 杨丹, 李香凤, 孔令安, 刘建斌, 史凤玉. 生防菌 Y26 的鉴定、发酵优化及其杀线虫活性测定[J]. *中国生物防治学报*, 2024, 40(2): 424-434.
- MEI FZ, ZHOU MC, YANG D, LI XF, KONG LA, LIU JB, SHI FY. Identification, fermentation optimization and determination of nematicidal activity of biocontrol bacterium Y26[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2024, 40(2): 424-434 (in Chinese).
- [9] MIGUNOVA VD, TOMASHEVICH NS, KONRAT AN, LYCHAGINA SV, DUBYAGA VM, D'ADDABBO T, SASANELLI N, ASATUROVA AM. Selection of bacterial strains for control of root-knot disease caused by *Meloidogyne incognita*[J]. *Microorganisms*, 2021, 9(8): 1698.
- [10] ENGELBRECHT G, HORAK I, van RENSBURG PJJ, CLAASSENS S. *Bacillus*-based bionematicides: development, modes of action and commercialisation[J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2018, 28(7): 629-653.
- [11] 马瑞. 解淀粉芽孢杆菌 Sneb709 生物膜形成能力相关基因的鉴定及功能研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2023.
- MA R. Identification and functional study of genes related to biofilm formation ability of *Bacillus amyloliquefaciens* Sneb709[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [12] 张春秋, 马光恕, 廉华, 李梅, 蒋细良, 宿晓琳, 刘明鑫, 曲虹云. 木霉对黄瓜幼苗生理特性及枯萎病防治效果的影响[J]. *植物保护*, 2018, 44(5): 238-246.
- ZHANG CQ, MA GS, LIAN H, LI M, JIANG XL, SU XL, LIU MX, QU HY. Effect of *Trichoderma* on physiological characteristics of cucumber seedlings and control effect against *Fusarium wilt*[J]. *Plant Protection*, 2018, 44(5): 238-246 (in Chinese).
- [13] 韩玉竹, 赵建军, 曾兵, 明晓燕, 朱全伟. 多花黑麦草根际解磷菌的分离及解磷能力测定[J]. *草地学报*, 2011, 19(5): 766-770.
- HAN YZ, ZHAO JJ, ZENG B, MING XY, ZHU QW. Isolation and the phosphate solubilizing capacity of

- Italian ryegrass rhizosphere phosphate-solubilizing microorganism[J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2011, 19(5): 766-770 (in Chinese).
- [14] 要雅倩, 成娜娜, 李培根, 卢毅, 王彦刚, 林榕珊, 周波, 王冰. 解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* T-6 的分离鉴定及抗病促生潜力[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(9): 202-210.
- YAO YQ, CHENG NN, LI PG, LU Y, WANG YG, LIN RS, ZHOU B, WANG B. Isolation and identification of *Bacillus amyloliquefaciens* T-6 and its potential of resisting disease and promoting growth[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(9): 202-210 (in Chinese).
- [15] 李正风, 朱杰, 唐丽, 董高峰, 吴涛, 廖头根, 张伟, 夏玉珍, 王奕权, 李岩. 烟草秸秆中产纤维素酶细菌筛选、鉴定及酶活测定[J]. *西南农业学报*, 2020, 33(3): 645-650.
- LI ZF, ZHU J, TANG L, DONG GF, WU T, LIAO TG, ZHANG W, XIA YZ, WANG YQ, LI Y. Isolation, identification and cellulase enzyme activity determination of cellulase-producing bacteria from tobacco straw[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2020, 33(3): 645-650 (in Chinese).
- [16] SOUI A, GUESMI A, OUERTANI R, CHERIF H, CHOUCANE H, CHERIF A, NEIFAR M. Carboxymethyl cellulase production by extremotolerant bacteria in low-cost media and application in enzymatic saccharification of *Stevia biomass*[J]. *Waste and Biomass Valorization*, 2020, 11(5): 2111-2122.
- [17] 卢超, 陈景鲜, 王国霞, 李春阁, 林展, 苏芳谊, 张苗. 一株高产中性蛋白酶菌株的筛选与诱变[J]. *中国饲料*, 2022(11): 30-35.
- LU C, CHEN JX, WANG GX, LI CG, LIN Z, SU FY, ZHANG M. Screening and mutation of a strain with high-yield neutral protease[J]. *China Feed*, 2022(11): 30-35 (in Chinese).
- [18] FAN HY, YAO ML, WANG HM, ZHAO D, ZHU XF, WANG YY, LIU XY, DUAN YX, CHEN LJ. Isolation and effect of *Trichoderma citrinoviride* Sneb1910 for the biological control of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 299.
- [19] 刘银坤, 李昊, 李子昕, 李知新, 张玉彦, 李文财, 任建军, 唐姝. 牦牛源短小芽胞杆菌 TS1 的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. *南京农业大学学报*, 2024, 47(1): 69-77.
- LIU YK, LI H, LI ZX, LI ZX, ZHANG YY, LI WC, REN JJ, TANG S. Isolation, identification and biological characterization of a strain of *Bacillus pumilus* TS1 from yak cattle[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2024, 47(1): 69-77 (in Chinese).
- [20] 李佳娣, 赵劲捷, 范海燕, 朱晓峰, 王媛媛, 刘晓宇, 段玉玺, 陈立杰. 杀线虫解淀粉芽胞杆菌 Sneb709 与费氏中华根瘤菌 Sneb183 共培养发酵条件优化[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(4): 771-784.
- LI JD, ZHAO JJ, FAN HY, ZHU XF, WANG YY, LIU XY, DUAN YX, CHEN LJ. Optimization of fermentation conditions for co-culture of nematocidal *Bacillus amyloliquefaciens* Sneb709 and *Sinorhizobium fredii* Sneb183[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2021, 37(4): 771-784 (in Chinese).
- [21] 赵惠, 范海燕, 赵丹, 赵迪, 王媛媛, 朱晓峰, 段玉玺, 陈立杰. 芽胞杆菌 Sneb709 控制番茄根结线虫病及其促生效果研究[J]. *中国植保导刊*, 2018, 38(7): 13-19.
- ZHAO H, FAN HY, ZHAO D, ZHAO D, WANG YY, ZHU XF, DUAN YX, CHEN LJ. Controlling efficiency of *Bacillus Sneb709* against root-knot nematode and its growth-promoting effect on tomato[J]. *China Plant Protection*, 2018, 38(7): 13-19 (in Chinese).
- [22] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG XZ, CAI MY. *Manual of Systematic Determination of Bacteriology*[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [23] SUTYAK KE, WIRAWAN RE, AROUTCHEVA AA, CHIKINDAS ML. Isolation of the *Bacillus subtilis* antimicrobial peptide subtilisin from the dairy product-derived *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 104(4): 1067-1074.
- [24] BRIDGE J, PAGE SLJ. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart[J]. *Tropical Pest Management*, 1980, 26(3): 296-298.
- [25] FRAVEL DR. Commercialization and implementation of biocontrol[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2005, 43: 337-359.
- [26] MAUGHAN H, van der AUWERA G. *Bacillus taxonomy* in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading[J]. *Infection, Genetics and Evolution*, 2011, 11(5): 789-797.
- [27] 刘雅洁, 罗书介, 蒋晓惠, 张清霞, 魏霜. 两株芽胞杆菌的分离鉴定及其对根结线虫病的防治效果[J]. *植物病理学报*, 2024, 54(3): 625-637.
- LIU YJ, LUO SJ, JIANG XH, ZHANG QX, WEI S. Identification and biocontrol effect of two *Bacillus* strains against root-knot disease[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2024, 54(3): 625-637 (in Chinese).
- [28] 付艳艳, 张洁, 朱文倩, 夏明聪, 孙润红, 徐文, 郎剑锋, 潘娅梅, 武超, 杨丽荣, 吴艳兵, 李东梅. 南方根结线虫生防菌 YB-1503 菌株鉴定及作用机理研究[J]. *中国生物防治学报*, 2023, 39(2): 429-437.
- FU YY, ZHANG J, ZHU WQ, XIA MC, SUN RH, XU W, LANG JF, PAN YM, WU C, YANG LR, WU YB, LI DM. Identification and mechanism of strain YB-1503 for biological control of *Meloidogyne incognita*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2023, 39(2): 429-437 (in Chinese).
- [29] 付博, 张洁, 张蒙蒙, 都亚飞, 王静, 彭建斐. 烟草根结线虫病生防菌株 TB-68 的鉴定及室内防效测定[J]. *烟草科技*, 2021, 54(7): 17-22.
- FU B, ZHANG J, ZHANG MM, DU YF, WANG J, PENG JF. Identification of biocontrol strain TB-68 and its control efficiency against tobacco root knot nematode in greenhouse[J]. *Tobacco Science & Technology*, 2021, 54(7): 17-22 (in Chinese).
- [30] 张洁, 夏明聪, 朱文倩, 梁娟, 孙润红, 徐文, 武超, 杨丽荣. 蔬菜根结线虫生防芽胞杆菌的筛选及作用机理研究[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(7): 175-182.
- ZHANG J, XIA MC, ZHU WQ, LIANG J, SUN RH, XU W, WU C, YANG LR. Screening of *Bacillus* sp. against vegetable root-knot nematode and study on its biocontrol mechanism[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(7): 175-182 (in Chinese).

- [31] PANDIT MA, KUMAR J, GULATI S, BHANDARI N, MEHTA P, KATYAL R, RAWAT CD, MISHRA V, KAUR J. Major biological control strategies for plant pathogens[J]. *Pathogens*, 2022, 11(2): 273.
- [32] 黄典, 余豪, 陈稳, 程万里, 邵宗泽, 张吉斌. 独岛枝芽胞杆菌 MCCC 1A00493 产生的 4-乙烯基苯酚鉴定和作用南方根结线虫特性研究[J]. *微生物学报*, 2022, 62(1): 346-356.
HUANG D, YU H, CHEN W, CHENG WL, SHAO ZZ, ZHANG JB. Identification and characteristics of 4-vinylphenol from *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493 against *Meloidogyne incognita*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 346-356 (in Chinese).
- [33] 程万里, 陈珍, 杨雪, 黄典, 张吉斌. 多粘类芽胞杆菌 KM2501-1 杀南方根结线虫活性产物研究[J]. *微生物学报*, 2020, 60(8): 1629-1637.
CHENG WL, CHEN Z, YANG X, HUANG D, ZHANG JB. Inhibition of *Meloidogyne incognita* by active compound from *Panbacillus polymyxa* KM2501-1[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(8): 1629-1637 (in Chinese).
- [34] 蒋春号. 蜡质芽胞杆菌 AR156 诱导植物对丁香假单胞菌及南方根结线虫抗性机理研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016.
JIANG CH. Study on the mechanism of plant resistance to *Pseudomonas syringae* and southern root knot nematode induced by *Bacillus cereus* AR156[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [35] NGUYEN VB, WANG SL, NGUYEN TH, NGUYEN TH, TRINH THT, NONG TT, NGUYEN TU, NGUYEN VN, NGUYEN AD. 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(11): 5293-5307.
- [36] O'BRIEN PA. Biological control of plant diseases[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2017, 46(4): 293-304.
- [37] 陈忠男, 王志刚, 徐伟慧. 贝莱斯芽胞杆菌 WB 对西瓜植株的促生效应和机制[J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(10): 2228-2242.
CHEN ZN, WANG ZG, XU WH. Promoting effects and mechanism of *Bacillus velezensis* WB on watermelon (*Citrullus lanatus*) plants[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2024, 32(10): 2228-2242 (in Chinese).
- [38] 闫丽霞, 李磊, 丁常宗, 石延霞, 柴阿丽, 范腾飞, 谢学文, 李宝聚. 生防菌株贝莱斯芽胞杆菌 ZF513 的分离鉴定及其对黄瓜猝倒病的防治效果[J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(11): 2627-2639.
YAN LX, LI L, DING CZ, SHI YX, CHAI AL, FAN TF, XIE XW, LI BJ. Isolation, identification and control effect of *Bacillus velezensis* ZF513 against damping-off of cucumber (*Cucumis sativus*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2024, 32(11): 2627-2639 (in Chinese).
- [39] 张琳, 余红凤, 毕钰, 王志刚, 徐伟慧, 刘桂林. 辣椒根际促生菌的筛选及促生效应分析[J]. *农业生物技术学报*, 2024, 32(9): 2124-2136.
ZHANG L, YU HF, BI Y, WANG ZG, XU WH, LIU GL. Screening of rhizosphere growth-promoting bacteria of pepper (*Capsicum annuum*) and analysis of their beneficial effects[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2024, 32(9): 2124-2136 (in Chinese).
- [40] 刘青祥, 徐文, 董迁迁, 夏明聪, 张洁, 孙润红, 武超, 吴坤, 杨丽荣. 特基拉芽胞杆菌 YB-1145 的分离鉴定及其对小麦茎基腐病的生防效果评价[J]. *中国生物防治学报*, 2024, 40(4): 884-893.
LIU QX, XU W, DONG QQ, XIA MC, ZHANG J, SUN RH, WU C, WU K, YANG LR. Isolation and identification of *Bacillus tequilensis* YB-1145 and evaluation of its biocontrol effects on wheat crown rot[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2024, 40(4): 884-893 (in Chinese).
- [41] RAYMAEKERS K, PONET L, HOLTAPPELS D, BERCKMANS B, CAMMUE BPA. Screening for novel biocontrol agents applicable in plant disease management: a review[J]. *Biological Control*, 2020, 144: 104240.
- [42] 赵惠. 杀线虫活性生防细菌筛选鉴定及脂肽的初步分离[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2018.
ZHAO H. Screening and identification of active biocontrol bacteria against nematodes and preliminary isolation of lipopeptides[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [43] TEREFE M, TEFERA T, SAKHUJA PK. Effect of a formulation of *Bacillus firmus* on root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infestation and the growth of tomato plants in the greenhouse and nursery[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2009, 100(2): 94-99.
- [44] 郑婷婷. 生防菌 GHt-q6 对黄瓜根系土壤微生态及根结线虫的影响[D]. 太谷: 山西农业大学, 2019.
ZHENG TT. The effect of biocontrol bacterium GHt-q6 on soil microecology and root knot nematodes of cucumber roots[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2019 (in Chinese).