

具杀线虫活性植物内生细菌的筛选和活性产物

彭双, 闫淑珍*, 陈双林

江苏省微生物与功能基因组学重点实验室, 江苏省微生物资源产业化工程技术研究中心, 南京师范大学生命科学学院, 南京 210046

摘要:【目的】植物寄生线虫是危害植物的重要病原物, 为了筛选到能在植物体内稳定定殖并且对植物寄生线虫具有较高杀线虫活性的植物内生细菌生防菌。【方法】以松材线虫为靶标, 用直接接触杀法进行筛选。对高活性菌株采用正交实验优化发酵条件, 测定发酵液杀线虫活性的稳定性, 并对菌株进行鉴定。【结果】从 6 种植物中分离筛选出 13 株对松材线虫具有较高杀线虫活性的植物内生细菌菌株, 这些菌株的发酵上清液对松材线虫处理 24h 杀线虫率均达到了 100%; 其中 BCM2、SZ5、CCM7 和 DP1 这 4 个菌株的杀线虫活性较高, 发酵上清液稀释 3 倍处理 24h 杀线虫率均达到 95% 以上, DP1 和 SZ5 菌株达到了 100%; 并发现部分菌株发酵液能使线虫虫体发生渗漏或消解。发酵条件优化后能使发酵液杀线虫效果提高 4 倍。4 株高活性菌株产生的杀线虫物质均对蛋白酶稳定、耐热不耐酸碱且长时间保藏活性不下降。经过鉴定 DP1 和 CCM7 是枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), BCM2 和 SZ5 是蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)。【结论】经济作物体内存在一定数量的能产生杀线虫活性物质的内生细菌, 其中一些细菌产生的杀线虫物质具有较强的稳定性。认为杀线虫活性的植物内生细菌具有很大的生防潜力。

关键词: 植物寄生线虫, 植物内生细菌, 活性产物

中图分类号: **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011) 03-0368-09

植物寄生线虫是植物的主要病原物之一, 每年造成约 1000 亿美元的损失^[1]。根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 和胞囊线虫 (*Heterodera* spp.) 是两大类严重危害多种重要作物的线虫, 在全球分布广、危害重。松材线虫 (*Bursaphelenchus* spp.) 的危害引起疫区的恐慌被称为“无烟的森林火灾”^[2]。植物寄生性线虫病的防治目前多采用化学防治、轮作及抗病品种, 但效果均不太理想, 且存在弊端多。如目前使用的化学杀线虫剂多为剧毒或高毒、高残留农药, 对土壤微生物、植物、水源和大气层带来严重污染或破坏, 而且药物在植物体内残留会直接对人类造成危害^[3]。因此急需开发对环境友好, 对

人、畜无毒的防治植物寄生线虫的药剂。

植物寄生线虫生防细菌的研究是最近几年兴起的新的研究热点, 越来越多的细菌被分离, 不同的作用方式被报道^[4]。目前主要研究的有植物根围促生细菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)^[5]、穿刺巴氏杆菌 (*Pasteuria penetrans*)^[6]、假单胞杆菌 (*Pseudomonas* spp.)^[7-9]、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)^[10] 等, 它们在线虫生物防治中有着巨大的开发潜力, 其价值也为人们逐渐认识。如 PGPR 主要通过诱导作物的系统抗性来防治作物病虫害^[5]; 穿刺巴氏杆菌为线虫专性寄生菌, 对线虫防效显著; 但是该菌必须依靠线虫才能大量繁殖,

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2007222)

* 通信作者。Tel: +86-25-85891883; E-mail: yanshuzhen@njnu.edu.cn

作者简介: 彭双 (1986-), 女, 河南信阳人, 硕士研究生, 研究方向: 微生物的应用。E-mail: pengshuang125@126.com

收稿日期: 2010-09-28; 修回日期: 2010-12-10

而线虫的生长又必须通过寄主植物来实现;故大量生产受到限制^[6]。此外,铜绿假单胞菌^[7] (*P. aeruginosa*)和荧光假单胞菌^[8] (*P. fluorescens*)也具有防治根结线虫病的能力,而且荧光假单胞菌产生的一种胞外蛋白酶在防治南方根结线虫 (*M. incognita*)的过程中发挥了重要作用^[9]。苏云金芽孢杆菌在微生物防治病虫害方面占有极其重要的地位,其伴孢晶体蛋白具有杀线虫能力^[10]。

植物内生菌定殖在植物组织间,生存环境稳定不易受到外界环境的影响,是重要的植物病害防治菌种资源^[11],一些内生细菌的研究表明他们可以促进植物组织的健康生长和控制植物病害的发展^[12]。但是关于防治植物寄生线虫的植物内生细菌的研究却鲜见报道,植物内生细菌和植物寄生线虫同是生存在植物组织内的生物,所以可以推测:将具有杀线虫作用的植物内生细菌接种到植物寄生线虫的感病部位,使内生细菌直接到达感染寄生线虫的植物组织中发挥作用,不仅可以防治寄生线虫还能发挥内生细菌促进植物生长的作用。基于以上推测本文从多种经济作物中筛选到了多株对松材线虫有杀线虫活性的内生细菌。在测定这些细菌在植物体内能稳定定殖的基础上,对其中4株活性较高的菌株进行了鉴定和发酵条件优化,并对这些菌株发酵产生的杀线虫物质进行了初步研究。以期提高植物寄生线虫的生物防治效果和寻找到高效的杀线虫微生物菌种资源。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料:草莓、番茄、黄瓜、辣椒、香蕉、柿子6种不同植物的果实购自南京蔬菜市场;草莓、番茄、黄瓜、辣椒健康植株采自南京江心洲蔬菜地。

1.1.2 培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)和牛肉膏蛋白胨培养基(NA),配制方法参考文献[13]。

1.1.3 主要仪器和试剂:16SrDNA引物合成由上海生物工程技术服务有限公司完成;Taq酶购自天根生化科技有限公司;dNTP和SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒购自上海生物工程技术服务有限公司。PTC-100型PCR仪购自Bio-Rad公司。

1.2 植物内生细菌的分离

取植物材料流水清洗表面,用0.1%升汞浸泡

1 min,无菌水清洗5次后于1% NaClO中浸泡5 min,再用无菌水清洗5次,转移至无菌组织匀浆器中捣碎,加入10 mL无菌水,静置5 min后取上层汁液梯度稀释,各稀释度取0.1 mL分别涂布NA平板,28℃培养1-7d,挑取形态不同的单菌落纯化保存。取0.1 mL最后一次漂洗消毒材料的无菌水,涂平板,验证消毒是否彻底。

1.3 植物内生细菌定殖能力测定

取饱满的黄瓜种子清水浸泡2 h,表面消毒(方法同1.2所述),放到装有10 mL PDA的带盖试管中,25℃光照培养箱中培养7 d,取子叶展开生长状况良好的试管苗,将 $OD_{600} = 0.5 \pm 0.02$ (约 10^7 cell/mL)的待测菌株菌液用伤根法穿刺接种到试管苗茎基部,0.2 mL/株,每菌处理3株黄瓜无菌苗,无菌水处理为空白对照。置25℃光照培养箱中培养7 d,取出整株苗按照1.2方法分离内生细菌,并统计内生细菌定殖数量。

1.4 测试线虫及其培养方法

松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)和灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)菌种由南京林业大学森林保护学院赵博光教授惠赠。将灰葡萄孢菌接种到PDA平板,在25℃培养7-10 d,待菌丝长满整个平板后,在无菌条件下接入松材线虫悬液200 μ L,25℃培养7-10 d,待灰葡萄孢菌丝消失,线虫长满平板。用Berman漏斗法^[14-15]分离线虫,1986 \times g离心3 min浓缩线虫,用0.1%的链霉素对其进行表面消毒3 min后,无菌水换洗3次,制成线虫悬浮液备用,浓度约为2000条/mL。供试线虫即用即提。4℃冰箱保存线虫。

1.5 具杀线虫活性的内生细菌的筛选

将保存的菌株在NA平板上活化后接种到装有30 mL NA培养液的250 mL三角瓶中,28℃、150 r/min培养24 h,7942 \times g离心5 min除去菌体,取1 mL上清液到2 mL灭菌离心管中,加入线虫悬液200 μ L,每个处理重复3次,以无菌NA培养液处理为对照,25℃静置处理24 h,小心吸除1 mL上清,加入400 μ L浓度为2%的NaCl溶液,混匀,取70 μ L(观察的线虫总数不少于30头)点到单凹载玻片上,5 min后在4倍光学显微镜下计数死亡线虫数(线虫僵直不动视为死亡^[15])及线虫总数,计算3个处理的死亡率及校正死亡率并计算平均校正死亡率。

校正死亡率 (%) ^[16] = (处理死亡率 - 对照死亡率) / (1 - 对照死亡率) × 100

用筛选出的有杀线虫活性的菌株发酵上清液再次处理线虫进行复筛,缩短处理时间:分别在处理后3、6、12、18 h 观察线虫死亡率;再把发酵上清液分别稀释3倍、5倍处理线虫,24 h后观察处理结果。

1.6 培养条件优化

1.6.1 最佳发酵时间和碳氮源的筛选:选取高活性的菌株接种到30 mL NA培养液中,28℃、150 r/min 培养24 h 制成种子液,再按照5%接种量接种到NA培养液中,28℃、150 r/min 培养24、36、48、60、72、96、120 h 优化发酵时间;以甘氨酸、尿素、谷氨酸、硝酸铵、酵母膏替换NA培养液中的氮源;以葡萄糖、可溶性淀粉、蔗糖、乳糖、果糖、甘油替换NA培养液中的碳源;各培养液中碳源含量为2.0%,氮源含量为1.5%,NaCl含量为碳源含量的1/2。将发酵液7942 × g 离心5 min,取上清液分别稀释3倍、5倍、7倍,按1.5中的方法测定不同实验中发酵上清液的杀线虫活性,以相应的无菌培养液处理为对照。

1.6.2 正交实验:碳源分别设1.5%、2.0%、2.5%;氮源分别设1.0%、1.5%、2.0%;转速分别设120 r/min、150 r/min、180 r/min;温度分别设25℃、28℃、31℃,NaCl含量为碳源含量的1/2,培养72 h后取上清液分别稀释3倍、5倍、7倍测定不同发酵条件下发酵液上清的杀线虫活性,以相应碳氮源含量的无菌培养液处理为对照。

1.7 内生细菌杀线虫活性产物的稳定性测定

1.7.1 温度及酸碱稳定性:取发酵液上清稀释3倍后分别在60℃、80℃、100℃水浴锅中处理60 min, -20℃处理12 h,121℃处理30 min,测定处理后上清液的杀线虫活性。用1 mol/L NaOH和1 mol/L HCL将发酵液上清pH分别调节为2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,静置12 h后将pH调到pH7.0,分别稀释3倍后测定杀线虫活性,以稀释3倍未经处理的发酵液上清为对照。

1.7.2 有机溶剂稳定性:取发酵液上清,加入等体积甲醇、乙醇、正丁醇、三氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯等有机溶剂,混合摇匀并静置12 h,如有分层则分别将上层与下层溶液取400 μL滴加到滤纸片上,不分层则取800 μL滴加到滤纸片上,60℃烘干,加入与烘干前等体积的无菌水浸泡滤纸片2 h,取浸泡液测定杀线虫活性,以未经处理的发酵液上清为对照。

1.7.3 蛋白酶稳定性和耐储藏性:取发酵液上清,加入蛋白酶K使其反应浓度达到100 μg/mL,37℃水浴处理90 min后,80℃水浴处理1 h使蛋白酶K变性失活,冷却后测定杀线虫活性,以同等浓度的酶液和80℃水浴处理1 h的上清液为对照。将发酵液上清置于4℃冰箱中保存,每隔20 d取上清液稀释3倍检测杀线虫活性,共检测5次,每次检测3次重复,以4℃保存的无菌NA培养液为对照。

1.8 高活性菌株的鉴定

形态学及生理生化鉴定方法参考文献[17]。

采用菌落PCR方法^[18]提取细菌DNA和PCR扩增,正向引物:5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和反向引物5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。扩增产物回收纯化后送上海生工生物工程有限公司测序,将测序结果与GenBank数据库中的已知序列进行BLAST,确定菌株的分类地位。

2 结果和分析

2.1 具杀线虫活性植物内生细菌分离、定殖测定及筛选结果

从6种植物体内分离出112株植物内生细菌,其中有64株可以在黄瓜无菌苗中稳定定殖,接种7 d定殖量均能达到 1×10^5 cfu/株,其中DLJ1, DP24, H1, DLJ12菌株能达到 2×10^6 cfu/株,对照处理苗中未检测到细菌。从这64株内生细菌中筛选到18株对松材线虫具有杀线虫活性,其中有13株内生细菌的发酵上清液对松材线虫的24、18 h杀线虫率均达到了100%。对这13个菌株进行复筛结果(表1)表明,SZ5、DP1菌株发酵液上清的12、6 h和3倍稀释液及5倍稀释液杀线虫率较其他菌株发酵液上清的杀线虫率差异显著。BCM2、CCM7、DLJ12和CCM3发酵液能使线虫体渗漏或消解(图1),其中CCM7处理后线虫消解(死亡率为100%)水平最高,其次为BCM2。综合这13株细菌的短时杀线虫效果、稀释液杀线虫效果和消解线虫能力,选取SZ5、DP1、BCM2和CCM7进行后续试验。

2.2 培养条件优化

2.2.1 最佳培养时间分析:图2表明CCM7和DP1菌株在培养的最初24 h内就快速产生杀线虫物质,而且在该培养条件和5%接种量的情况下,CCM7菌株发酵液活性显著高于DP1菌株;在24 h之后两株内生细菌

发酵液中杀线虫物质累积速度减慢,分别在 96 h 和 72 h 达到最大值,之后开始下降。BCM2 和 SZ5 菌株随

着发酵时间的增加,杀线虫产物逐渐积累,60 h 达到高峰,维持时间较短,到 72 h 时开始下降。

表 1 植物内生细菌发酵液对松材线虫的致死结果

Table 1 Statistical results for fermentation broth of 13 endophytic bacterium causing death of *B. xylophilus*.

Strains	Source	Corrected mortality/%					Symptom of the dead nematodes
		Treating time			Dilution times		
		12 h	6 h	3 h	3	5	
SZ5	persimmon	100 ± 0.00a	100 ± 0.00a	97 ± 3.00a	100 ± 0.00a	63.4 ± 8.47a	rigid
DP1	tomato	100 ± 0.00a	96.9 ± 3.00a	21.2 ± 9.18cd	100 ± 0.00a	69.1 ± 4.86a	rigid
BCM2	strawberry	100 ± 0.00a	71.4 ± 0.41b	11.1 ± 0.90def	98.5 ± 1.45a	57.1 ± 5.09a	leakage
CCM7	strawberry	100 ± 0.00a	96.9 ± 2.41a	81.8 ± 4.58b	96.9 ± 0.50abc	28.4 ± 5.93bcd	digest
XG32	cayenne pepper	100 ± 0.00a	95.9 ± 2.67a	79.8 ± 4.38b	89.1 ± 3.51cd	35.8 ± 4.24bc	rigid
DLJ12	cayenne pepper	100 ± 0.00a	76.5 ± 1.57b	9.1 ± 2.50def	81.5 ± 7.53e	19.7 ± 6.40de	leakage
DP24	tomato	100 ± 0.00a	99.0 ± 1.00a	88.9 ± 1.82ab	97.3 ± 1.71ab	30.9 ± 11.19bcd	rigid
CCM3	strawberry	100 ± 0.00a	43.9 ± 4.37cd	7.1 ± 3.12ef	89.6 ± 2.84bcd	22.2 ± 3.75cde	leakage
YC1	cayenne pepper	99.4 ± 0.56ab	52 ± 5.94c	7.1 ± 7.38ef	79.7 ± 2.17e	10.5 ± 2.67ef	rigid
DLJ1	cayenne pepper	99.2 ± 0.83ab	98 ± 2.00a	79.8 ± 5.11b	94.4 ± 3.87abc	56.5 ± 10.02a	rigid
DP8	tomato	98.2 ± 1.78ab	31.6 ± 7.36d	2.0 ± 2.41f	85.5 ± 2.70de	41.1 ± 11.45b	rigid
DP14	tomato	98.4 ± 1.05ab	46.9 ± 8.41c	19.2 ± 6.67cde	98.6 ± 1.42a	40.1 ± 2.98b	rigid
DP12	tomato	97.1 ± 2.63b	41.8 ± 7.19cd	29.3 ± 2.22c	92.1 ± 5.22abc	21.0 ± 7.20de	rigid
CK		1.57 ± 1.06c	2.0 ± 0.38e	1.0 ± 1.00f	1.48 ± 1.48f	0.00 ± 0.00f	live

The lowercases letters represent the significance levels of difference at 5%.

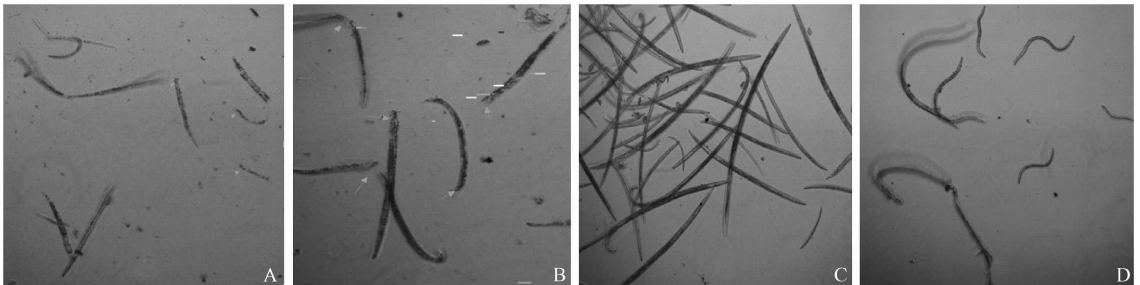


图 1 光学显微镜下死亡线虫虫体状态 (10 ×)

Fig. 1 Micrographs of dead nematodes under the light microscope (10 ×). A: Polypide fragment of the dead nematodes that were digested; B: Dead nematodes were leaked; C: Rigid dead nematodes; D: Live nematodes is twisting in the shape of "S" in the water.

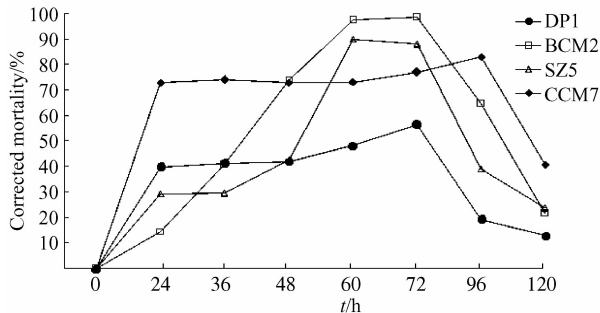


图 2 四株植物内生细菌发酵时间与发酵液杀线虫活性之间的关系

Fig. 2 Effect of different shaking time on the antinematode metabolite created by the four strains. (5 times dilution).

2.2.2 最佳培养基氮源筛选:图 3 结果显示,这 4 株内生细菌仅能利用甘氨酸、尿素、谷氨酸和硝酸铵产生少量的杀线虫物质。而都能利用酵母膏和蛋白胨产生大量杀线虫物质。将酵母膏和蛋白胨作为氮源的细菌发酵上清液分别稀释 5 倍杀线虫活性也达到了 100%,继续将发酵上清液稀释到 7 倍,杀线虫活性如图 4 所示;除 SZ5 活性差异较小外,DP1、BCM2 和 CCM7 菌株用蛋白胨产生杀线虫物质的效果要好于酵母膏,且差异显著,因此最佳氮源为蛋白胨。观察虫体死亡形态表明:BCM2 和 CCM7 菌株不能利用酵母膏产生使线虫消解的物质。

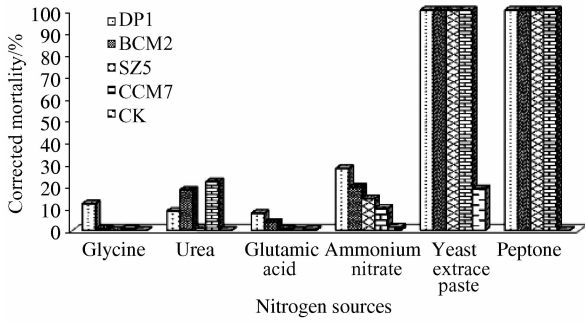


图3 六种氮源对4株植物内生细菌杀线虫物质积累量的影响

Fig. 3 Effect of different nitrogen sources on the antinematode metabolite created by the four strains. (no dilution).

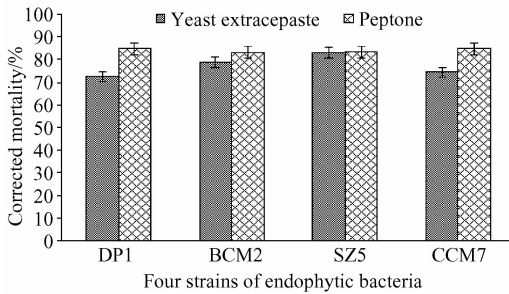


图4 四株植物内生细菌经两种不同氮源配制的培养液发酵后的杀线虫活性

Fig. 4 Effect of the two different nitrogen sources on the antinematode metabolite created by the four strains. (7 times dilution).

2.2.3 最佳培养基碳源的筛选:图5结果表明,4株植物内生细菌均不能利用蔗糖、果糖、甘油产生杀线虫的物质(DP1的杀线虫率小于20%,可以忽略不计);BCM2和SZ5可以利用乳糖和牛肉膏产生杀线虫物质,但是不能利用淀粉产生杀线虫物质。DP1和CCM7能利用淀粉、乳糖和牛肉膏产生杀线虫物质;且CCM7利用淀粉和利用牛肉膏产生的物质稀释5倍活性相等,都为100%,稀释7倍杀线虫率分别为40.52%和84.81%;但虫体死亡形态表明CCM7能够利用淀粉产生更多使线虫消解的物质。4株内生细菌用牛肉膏培养杀线虫活性最高,所以最佳碳源为牛肉膏。

2.2.4 正交优化:优化结果表明:DP1菌株产杀线虫物质最适营养组分为蛋白胨2.0%,牛肉膏2.5%;最适培养条件为180 r/min,28℃培养72 h。BCM2菌株最适营养组分为蛋白胨2.0%,牛肉膏2.0%;最适培养条件为180 r/min,25℃培养60 h。

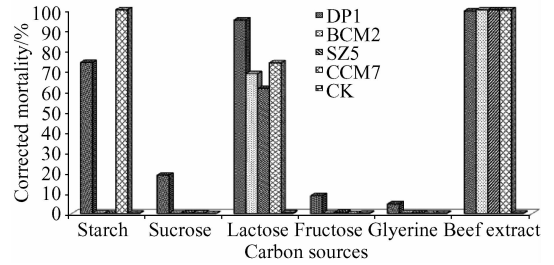


图5 六种碳源对4株植物内生细菌杀线虫物质积累量的影响

Fig. 5 Effect of different carbon sources on the antinematode metabolite created by the four strains. (5 times dilution).

SZ5菌株最适营养组分为蛋白胨1.5%,牛肉膏2.0%;最适培养条件为150 r/min,28℃培养60 h。CCM7菌株最适营养组分为蛋白胨2.0%,牛肉膏2.5%;最适培养条件为120 r/min,28℃培养96 h。经过培养基优化,4株内生细菌发酵液上清的杀线虫活性由优化前3倍稀释液100%的杀线虫效果提高到7倍稀释液接近或达到100%的杀线虫效果,约提高了4倍。

表2 培养条件优化的正交试验因素水平设置

Table 2 Orthogonal test factor levels for optimizing ferment conditions

Level	A: peptone/ %	B: beef extract/ %	C: rotary speed/ (r/min)	D: temperature/ ℃
1	1.0	1.5	120	25
2	1.5	2.0	150	28
3	2.0	2.5	180	

2.3 内生细菌杀线虫活性产物的稳定性测定

2.3.1 温度稳定性:经不同温度处理后,除CCM7菌株外其他3个菌株发酵液上清杀线虫效果没有较大变化,但是由经过热处理的BCM2和CCM7发酵液上清致死的线虫均无渗漏或消解现象,表明BCM2产生的使线虫渗漏或消解的物质没有或很少起到杀死线虫的作用,只是将已经死亡了的线虫表皮分解使线虫发生渗漏或消解;而CCM7发酵液经过热处理后杀线虫效果下降了1% - 12%,表明CCM7发酵液中存在的一些使线虫死亡或消解的物质不耐高温,初步认为这些不耐高温的物质是蛋白酶或几丁质酶等。

2.3.2 酸碱稳定性:图7结果表明经过酸或碱调节pH值的发酵液上清(原始pH为7.8左右)杀线虫效果显著下降,甚至完全丧失杀线虫活性。

DP1 和 CCM7 发酵液中的杀线虫物质不耐酸碱,只在 pH 值范围为 7.0-8.0 之间有较高的活性。而 BCM2 发酵液中的物质对酸有相对耐受力, SZ5 对

碱有相对耐受力,但是同不加酸碱的发酵液上清比较,4 株植物内生细菌发酵上清液杀线虫效果均有所降低。

表 3 四株植物内生细菌发酵条件正交试验因素水平结果(发酵上清液稀释 7 倍)

Table 3 Orthogonal test statistical results for optimizing ferment conditions of the four strains. (7 times dilution)

NO.	A	B	C	D	corrected mortality/%			
					DP1	BCM2	SZ5	CCM7
1	1	1	1	1	64.15 ± 7.29d	88.44 ± 1.48bc	84.10 ± 3.74bc	92.39 ± 2.52b
2	1	2	2	2	88.55 ± 7.19bc	91.99 ± 1.23abc	93.06 ± 1.98a	91.99 ± 1.38b
3	1	3	3	3	85.14 ± 2.96c	88.85 ± 6.98bc	85.19 ± 2.27abc	96.31 ± 2.77a
4	2	1	2	3	81.00 ± 1.41c	85.12 ± 1.55c	79.35 ± 1.76c	91.61 ± 3.13b
5	2	2	3	1	95.93 ± 0.74ab	97.62 ± 1.01a	91.53 ± 3.77ab	96.75 ± 1.15a
6	2	3	1	2	99.38 ± 0.62a	93.45 ± 2.82ab	91.67 ± 1.66ab	100.00 ± 0.00a
7	3	1	3	2	98.79 ± 1.21a	96.54 ± 1.87ab	84.40 ± 0.34bc	97.65 ± 2.35a
8	3	2	1	3	98.39 ± 1.61a	92.29 ± 2.93abc	86.20 ± 7.94abc	99.28 ± 0.72a
9	3	3	2	1	100.00 ± 0.00a	96.34 ± 1.60ab	91.33 ± 0.76ab	97.00 ± 2.00a
the order of effecton					A > B > D > C	D > A > B > C	B > D > C > A	A > B > C > D
best conditions					A3B3C3D2	A3B2C3D1	A2B2C2D2	A3B3C1D2

The lowercases letters represent the significance levels of difference at 5%.

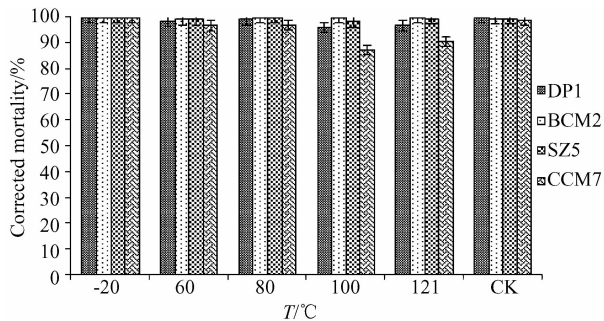


图 6 四株植物内生细菌产生杀线虫物质的热稳定性

Fig. 6 Heat stability of the antinematode metabolite created by the four strains.

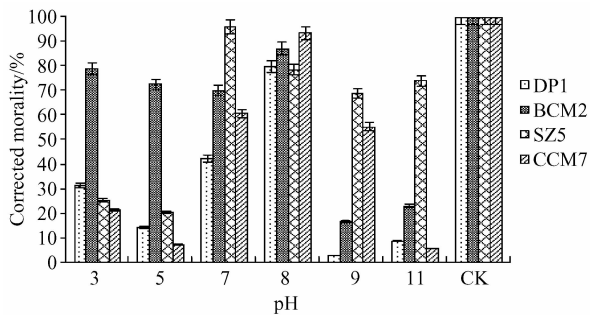


图 7 四株植物内生细菌产生杀线虫物质的酸碱稳定性

Fig. 7 Acid and alkali stability of the antinematode metabolite created by the four strains.

2.3.3 有机溶剂稳定性:4 株植物内生细菌的发酵液上清与等体积的甲醇、乙醇、正丁醇、三氯甲烷、石油醚、乙酸乙酯等有机溶剂混合后,杀线虫效果均明显降低甚至没有活性。表明发酵液中的杀线虫物质在有机溶剂的作用下不能保持稳定。结果证明这些

菌株产生的杀线虫物质只能溶解在水溶液中。

2.3.4 蛋白酶稳定性:先后经过蛋白酶 K 和热处理的发酵液与只经过热处理的发酵液杀线虫效果相同,均为 100%,说明 4 株内生细菌产生的杀线虫物质对蛋白酶 K 不敏感。用同等浓度的蛋白酶 K 处理线虫,结果线虫被完全分解,在显微镜下无法看到线虫或线虫碎片的存在,故蛋白酶 K 的杀线虫效果为 100%。该结果表明线虫表皮结构中有蛋白质成分,而且该成分可以被蛋白酶 K 分解。

2.3.5 耐储藏性:图 8 中结果表明,随着保存时间的延长,发酵液中的杀线虫物质保持稳定,与最初的杀线虫活性(0 天)无显著差别。而且实验结果还表明使线虫渗漏或消解的物质同样是稳定的。表明发酵液上清中的杀线虫物质和和使线虫渗漏或消解的物质都是耐储藏的。

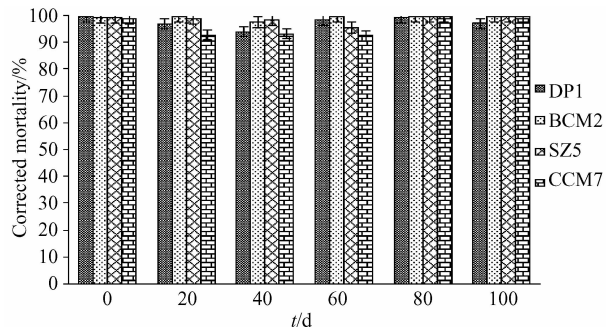


图 8 4 株植物内生细菌产生杀线虫物质的耐储藏性

Fig. 8 Storage stability of the antinematode metabolite created by the four strains.

2.3.6 四株植物内生细菌的鉴定结果:通过 PCR 得到菌株 1.5 kb 左右的 16SrDNA。16SrDNA 序列分析显示(表 4):DP1 与 CCM7 同属于枯草芽孢杆菌,BCM2 和 SZ5 同属于蜡样芽孢杆菌或苏云金芽孢杆菌。基础鉴定中 DP1 与 CCM7 菌落均为圆形,表面湿润凸起;兼性厌氧,接触酶、VP 测定、明胶水解、淀粉水解、柠檬酸盐测定及硝酸盐还原均为阳性,吡啉反应阴性;菌体细胞杆状,大小约 $0.8 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$,芽孢椭圆形。但 DP1 菌落为淡黄色透明,

边缘整齐;CCM7 菌落为乳白色不透明,边缘不整齐。根据以上结果鉴定 DP1 和 CCM7 为枯草芽孢杆菌。BCM2 和 SZ5 分别形成淡黄色和乳白色稍有光泽的圆形菌落(似蜡),边缘不规则,表面平滑;兼性厌氧,接触酶、VP 测定、明胶水解、淀粉水解、柠檬酸盐测定、硝酸盐还原及吡啉反应均为阳性;菌体细胞杆状,大小约 $1.0 \mu\text{m} \times 2.5 \mu\text{m}$,芽孢柱形,无伴孢晶体。根据以上结果鉴定 BCM2 和 SZ5 为蜡样芽孢杆菌。

表 4 具杀线虫活性的 4 株植物内生细菌菌株的分类从属关系

Table 4 Phylogenetic affiliations of the four isolates based on 16S rDNA gene sequence

Strain No.	GenBank accession number	Closest related type strains(Accession No.)	No. of bases	Similarity/%
DP1	HQ008364	<i>Bacillus subtilis</i> (AB201120)	1424	100
CCM7	HQ108184	<i>Bacillus subtilis</i> (EF563825)	1456	99
BCM2	HQ108182	<i>Bacillus cereus</i> (GU471752)	1464	99
		<i>Bacillus thuringiensis</i> (AB363741)		99
SZ5	HQ108183	<i>Bacillus cereus</i> (GU471752)	1474	98
		<i>Bacillus thuringiensis</i> (AB363741)		98

3 讨论

本文从 6 种不同经济作物中分离筛选到 13 株能够产生杀死松材线虫产物的内生细菌,而且 A. V. Sturz^[19]和 Zheng^[20]从抗线虫植物金盏菊(*Tagetes erecta*)和一品红(*Euphorbia pulcherrima*)的组织中分别分离到一株具有杀线虫功能的内生细菌。表明植物内生细菌中广泛存在具有杀线虫作用的菌种资源,可以从中筛选到产生物质活性强、产量高、遗传稳定且易于发酵生产的优良菌株。研究发现分离自不同作物的具有杀线虫活性的内生细菌均能在黄瓜无菌苗中稳定定殖,认为筛选的内生细菌中存在具有广谱定殖能力的菌株,为以后应用其防治不同作物的寄生线虫病打下基础。

4 株植物内生细菌经过发酵条件优化,发酵液的杀线虫效果有了大幅度提高,表明 4 株内生细菌产生的杀线虫产物可以通过培养条件优化和培养底物浓度的提高而提高。本研究仅从 C 源及 N 源含量、温度、转速 4 个主要方面优化了这 4 个菌株的发酵条件,培养液初始 pH、接菌量、无机盐含量等其他因素对菌体生长及杀线虫物质分泌量的影响有待于进一步的研究,目的在于使菌株最大程度上产生杀线虫物质,为菌株发酵产物的工业化生产提供试验依据。

文中仅对 4 株具杀线虫活性的植物内生细菌进行了鉴定。分属于枯草芽孢杆菌的 DP1 和 CCM7 菌株在菌落形态和颜色上有差异,并且 CCM7 菌株发酵液有消解线虫现象,DP1 无此现象;分属于蜡样芽孢杆菌的 BCM2 和 SZ5 菌株在菌落形态和颜色上也不相同,同时 BCM2 发酵液也存在消解线虫现象,而 SZ5 不存在。因此存在鉴定为同一种类的两个菌株是不同亚种的可能。而且在实验中还观察到:其他能够产生杀线虫产物的未鉴定菌株与这 4 株已鉴定菌株之间,或未鉴定菌株相互之间,在菌落形态和菌体形态上也有差别;表明这些具杀线虫活性的内生细菌并不仅限于枯草芽孢杆菌和蜡样芽孢杆菌两种类型,说明杀线虫植物内生细菌具有菌种多样性。芽孢杆菌作为一类潜在的生物农药资源已受到各国学者的广泛关注,目前已经商品化的细菌线虫生防制剂中有两种来源于芽孢杆菌属,一种是 Bio YieldTM (Gustafson LLC)另一种是以色列的 Bionem^[21]。

实验数据表明,研究的 4 株植物内生细菌产生的活性物质稳定性较相似。由于测定的 4 株细菌都属于芽孢杆菌,产生的杀线虫物质可能为同一种物质,但是该物质的性质及其作用途径等尚待研究,其他未鉴定菌株中是否存在与之不同的物质也需研究。

植物内生细菌与宿主植物长期协同进化过程

中,彼此构成了稳定的生态关系,且内生细菌生存微环境稳定,对植物细菌、真菌病害及寄生线虫等都具有防治作用^[22],成为化肥、农药和其它微生物生态制剂的最佳竞争者^[23],它的合理应用将减少化学药剂使用所造成的环境污染,提高农田生态系统的生物多样性,有利于保持生态平衡,因此植物内生细菌具有广阔的应用前景。该项研究证明植物内生细菌具有生物防治植物寄生线虫的应用潜力。

参考文献

- [1] 罗兰,谢丙炎,杨宇红,冯兰香,杨之为. 具杀线虫活性的苏云金杆菌筛选研究. 植物病理学报 (*Acta Phytopathologica sinica*), 2007, 37(3): 314-316.
- [2] 董锦艳,李国红,张克勤. 真菌杀线虫代谢物的研究进展. 菌物系统 (*Mycosystema*), 2001, 2(2): 286-296.
- [3] Dong LQ, Zhang KQ. Microbial control of plant-parasitic nematodes: a five-party interaction. *Plant and Soil*, 2006, 288: 31-45.
- [4] Tian BY, Yang JK, Zhang KQ. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61: 197-213.
- [5] Ramamoorthy V, Viswanathan R, Raguchander T, Prakasam V, Samiyappan R. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Protection*, 2001, 20: 1-11.
- [6] Davies KG, Opperman CH. A potential role for collagen in the attachment of *Pasteuria penetrans* to nematode cuticle. *Multitrophic Interactions in the Soil*, 2006, 29: 11-16.
- [7] Siddiqui IA, Shaikat SS. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* on the diversity of culturable microfungi and nematodes associated with tomato: impact on root-knot disease and plant growth. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 1359-1368.
- [8] Siddiqui IA, Shaikat SS. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35: 1615-1623.
- [9] Siddiqui IA, Haas D, Heeb S. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 5646-5649.
- [10] Wei JZ, Hale K, Carta L, Platzer E, Wong C, Fang SC, Aroian RV. *Bacillus thuringiensis* crystal proteins that target nematodes. *PNAS*, 2003, 100: 2760-2765.
- [11] 周盈,陈琳,柴鑫莉,喻子牛,孙明. 魔芋内生拮抗细菌的分离及其抗菌物质特性研究. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, 47(6): 1076-1079.
- [12] 黄静,盛下放,何琳艳. 具溶磷能力的植物内生促生细菌的分离筛选及其生物多样性. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2010, 50(6): 710-716.
- [13] 沈萍,范秀荣,李广武. 微生物学实验. 第三版. 北京: 高等教育出版社 (*Higher Education Press*), 1999: 214-215.
- [14] Gray NF. Ecology of nematophagous fungi: comparison of the soil sprinkling method with the Baerman funnel technique in the isolation of endoparasites. *Soil Biology and Biochemistry*, 1984, 16: 81-83.
- [15] 王明祖. 中国植物线虫研究. 第一版. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 11-19.
- [16] 陈立杰,刘彬,段玉玺,张国栋. 白僵菌发酵液对不同种类线虫生物活性的影响. 沈阳农业大学学报 (*Journal of Shenyang Agricultural University*), 2008, 39(3): 305-308.
- [17] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌鉴定手册. 第一版. 北京: 科学出版社, 2001.
- [18] Qiu FB, Huang Y, Sun L, Zhang XX, Liu ZH, Song W. *Leifsonia ginseng* sp. nov. isolated from ginseng root. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007(57): 405-408.
- [19] A. V. Sturz, J. Kimpinski. Endoroot bacteria derived from marigolds (*Tagetes* spp.) can decrease soil population densities of root-lesion nematodes in the potato root zone. *Plant and Soil*, 2004, 262: 241-249.
- [20] Zheng LJ, Li GH, Wang XB, Pan WZ, Li Lei, Lv Hua, Liu FF, Dang LZ, Mo MH, Zhang KQ. Nematicidal endophytic bacteria obtained from plants. *Annals of Microbiology*, 2008, 58(4): 569-572.
- [21] Giannakou IO, Prophetou-Athanasidou D, Karpouzias DG. A novel non-chemical nematicide for the control of root-knot nematodes. *Applied Soil Ecology*, 2004, 26: 69-79.
- [22] 闫梦红,蔡正求,韩继刚,孙磊,宋未. 植物内生细菌在防治植物病害中的应用研究. 生物技术通报 (*Biotechnology Bulletin*), 2004(3): 8-12.
- [23] 易龙,肖崇刚,马冠华,王万能,龙良鲲. 防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用. 微生物学报 (*Acta Microbiologica Sinica*), 2004, 44(1): 19-22.

Screening endophytic bacteria against plant-parasitic nematodes

Shuang Peng, Shuzhen Yan^{*}, Shuanglin Chen

Jiangsu Key Laboratory for Microbes and Functional Genomics, Jiangsu Provincial Engineering and Technology Research Center for Microbiology Re, Collage of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China

Abstract: [**Objective**] Plant-parasite nematode is one of the most important pathogens in plant. Our objective is to screen endophytic bacteria against plant-parasitic nematodes from plant. [**Methods**] Endophytic bacteria were isolated and screened by testing their metabolite against *Bursaphelenchus xylophilus* *in vitro*. Those strains inhibiting *B. xylophilus* were selected to culture in liquid medium and fermentation conditions were optimized by orthogonal test. The stability of the antinematode substances was evaluated by various. In addition, four strains were identified by 16SrDNA sequence analysis. [**Results**] In total 13 strains of endophytic bacteria secreting antinematode metabolite were isolated from 6 species of plant. The supernatant of the fermentation broth of these endophytic bacteria gave 100% mortality of nematodes after treated as the follows; 1ml each was mixed with 0.2ml of the suspension of nematodes (2000 nematodes/ml) then incubated at 25°C for 24 h, some of which could led to leakage or dissolution of nematodes. Among them, four strains, BCM2、SZ5、CCM7 and DP1, showed stronger activity than others. The supernatants diluted three times also gave not less than 95% mortality after 24 h treatment, and those from DP1 and SZ5 even gave 100% mortality. The fermentation conditions of the four strains were optimized and the antinematode activity grew up four times after optimization. The antinematode substances of these strains were found stable when treated with protease or heating or stored at 4°C after 100 days, while instable when treated with acid or alkali. DP1 and CCM7 were identified to be *Bacillus subtilis*, while SZ5 and BCM2 to be *Bacillus cereus*. [**Conclusion**] Endophytic bacteria secreting antinematode metabolite were found in economic crops. The metabolite of some strains showed strong and stable antinematode activity. Our results indicate the real potential of biocontrol by endophytic bacteria.

Keywords: plant-parasite nematode, endophytic bacteria, bioactive metabolites

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK2007222)

^{*} Corresponding author. Tel/Fax: +86-25-85891883; E-mail: yanshuzhen@njnu.edu.cn

Received: 28 September 2010/ Revised: 10 December 2010