

文章编号:1001-7380(2018)02-0006-04

具杀松材线虫活性细菌的筛选和鉴定

曾丽琼,何学友,蔡守平,黄金水

(福建省林业科学研究院/国家林业局南方山地用材林培育重点实验室,福建 福州 350012)

摘要:为筛选出对松材线虫具有抑制作用的生物防治细菌,对马尾松内生细菌进行分离纯化,从中筛选出6株对松材线虫具有杀线虫活性的细菌,其中细菌Z11-2和细菌G36具有较强的杀线活性,用它们的培养滤液分别处理松材线虫24 h,松材线虫的死亡率分别达92%和89%,48 h后线虫消解率分别是87.4%和77.5%。通过细菌形态特征观察和16S rDNA测序及其系统发育分析,菌株Z11-2和G36与短小芽孢杆菌 *Bacillus pumilus* 处于同一分支,同源性分别为100%和99%,初步鉴定细菌Z11-2和G36为短小芽孢杆菌。

关键词:松材线虫;细菌;杀线虫活性;16S rDNA

中图分类号:S763.306.4;S767.3⁺2

文献标志码:A

doi:10.3969/j.issn.1001-7380.2018.02.002

Selection and identification of the bacterium with nematicidal activity to *Bursaphelenchus xylophilus*

ZENG Li-qiong, HE Xue-you, CAI Shou-ping, HUANG Jin-shui

(Fujian Academy of Forestry Sciences, The Key Laboratory of Timber Forest Breeding and
Cultivation for Mountainous Areas in Southern China, Fuzhou 350012, China)

Abstract: Six endophytic bacterial strains were separated from the *Pinus massoniana* twigs. The bioassay result showed that the mortality of *Bursaphelenchus xylophilus* treated for 24 h with Z11-2 strain and G36 strain were 92% and 89% respectively, with the decomposition rate 87.4% and 77.5% respectively for 48 h's treatment. By combination of the morphologic observation with 16S rDNA sequence analysis, according to the position in phylogenetic tree, we found that Z11-2 strain and G36 strain were identified as *Bacillus pumilus*, as showing 100% and 99% homology respectively.

Key words: *Bursaphelenchus xylophilus*; Bacterium; Nematicidal activity; 16S rDNA

松萎蔫病又名松材线虫病,是由松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)引发的一种森林病害,属国际重要检疫对象,列为森林病虫害之首^[1],被称为“松树的癌症”^[2-3]。该病靠媒介松墨天牛(*Monochamus alternatus*)携带传播,使用化学药剂可以有效控制松褐天牛,但化学药剂造成的环境污染对生态平衡带来越来越明显的负面影响。随着人们环境意识的增强,对植物寄生线虫生物防治细菌的研究逐渐兴起,应用细菌防治植物寄生线虫的工

作已经取得了诸多进展。研究人员对于利用细菌作为松材线虫防治制剂的报道,多见于对具有杀松材线虫活性细菌的筛选,如牛秋红、郑海营等^[4-5]分别从土壤和海水中分离筛选出对松材线虫具有较强杀线虫活性的细菌。内生细菌作为最具防病潜力与应用价值的一类生物防治细菌,是植物病害生物防治的天然资源菌,其广阔的理论研究价值和开发应用前景,成为许多学者研究的热点对象^[6-8]。马尾松作为松材线虫的寄主,从其本身分离筛选对

收稿日期:2018-01-23;修回日期:2018-03-29

基金项目:福建省自然科学基金计划项目“松材线虫病生防细菌的研究”(2015J01096);福建省林业科学研究项目“松材线虫生防细菌的筛选研究”(闽林科[2014]2号)

作者简介:曾丽琼(1984-),女,福建泉州人,工程师,硕士。从事森林病虫害防治与研究。

松材线虫活性有抑制作用的细菌,是理性控制松材线虫病的途径,但是对于从松树上分离的内生细菌的研究报道较少,仅见朱丽梅、邓海娟、李亮亮等^[9-11]的报道。本研究开展了对马尾松内生细菌分离和对松材线虫杀线活性的测定研究,筛选出具有较强抑制线虫活性的细菌,并对筛选到的菌株进行初步鉴定,以期为微生物防治和开发植物寄生线虫生物防治制剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

2014年11月,2015年3、6和9月分别选取在松材线虫疫区健康生长的马尾松枝条作为分离材料的来源。树龄为6—7年生,采样时将枝条放入灭菌的纸袋中带回实验室进行内生细菌分离。松材线虫来源于疫区枯死木,采用贝曼漏斗法分离后在多毛孢平板中培养备用。

1.2 内生菌分离

取松树嫩梢松针、枝条,依次用无菌水冲洗表面,75%乙醇消毒30 s、10%NaClO消毒5 min,再在无菌水中漂洗4次,用消毒枝剪剪成小段,放入装有2 mL无菌水和少许灭过菌的石英砂的无菌研钵,将其研磨成匀浆后,静置5 min。用移液枪吸取150 μ L于NA平板中涂板,28 $^{\circ}$ C下培养。待长出菌落后,观察生长细菌菌落的状况。同时检查检验表面消毒的效果,方法为吸取150 μ L第4次漂洗消毒材料的无菌水,涂平板,经培养后若无微生物长出,证明表面消毒彻底。3—7 d,待长出菌落后,对不同单菌落的颜色、大小、突起特征、边缘特征、表面光滑与否和透明度等的特征进行描述,并根据菌落的形态、颜色和大小选取分离到的菌株,在平板上进行纯化保存。

1.3 内生细菌杀线虫活性测定

将保存的菌株在NA平板上活化后接种到NA培养液中,28 $^{\circ}$ C条件下160 r/min培养48 h,取2 mL细菌发酵液至离心管中,经5 000 r/min离心5 min,取上清液,用滤膜孔径为0.22 μ m的细菌过滤器过滤,取900 μ L滤液分装到24孔细胞培养板的样品孔中,以不接菌的NA培养液滤液为对照,加入线虫悬液100 μ L(50 000条/mL)混匀,每个处理重复3次,25 $^{\circ}$ C下慢速振荡培养,分别在处理24和48 h后观察并统计线虫死亡数,观察时取100 μ L(观察的线虫总数不少于30头)点到载玻片上,在10倍

光学显微镜下计数死亡线虫数及线虫总数(线虫死亡标准是虫体僵直,用解剖针搅动或接触刺激时仍不活动视为死亡^[12-13])。毒力级别划分参照万树青^[14]方法,即I级:死亡率 $\geq 90\%$;II级:70% \leq 死亡率 $< 90\%$;III级:50% \leq 死亡率 $< 70\%$;IV级:30% \leq 死亡率 $< 50\%$;V级:10% \leq 死亡率 $< 30\%$;VI代表无杀线活性。

1.4 高活性菌株的鉴定

对得到的高活性菌株进行形态观察,革兰氏染色和KOH拉丝试验按照常规方法进行。细菌基因组的提取利用PCR技术,对待鉴定细菌的16S rDNA序列进行扩增,其中正向引物27F:5'-AGAG-TTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物1492R:5'-T-ACGGCTA CCTTGTTAC GACTT-3'。PCR反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性2 min,94 $^{\circ}$ C变性30 s,54 $^{\circ}$ C退火20 s,72 $^{\circ}$ C延伸20 s,循环33次,再在72 $^{\circ}$ C延伸5 min后终止反应。PCR产物通过1.0%琼脂糖胶电泳进行分析,缓冲液为TAE,委托福建省尚辰生物技术有限公司进行测序,将测序结果与NCBI上面进行BLAST同源性比对,选取同源性高的菌株模式菌株序列,用MEGA5.0的Neighbor-Joining构建系统发育树,Bootstrap值取1 000。

2 结果和分析

2.1 具杀线虫活性内生细菌分离及筛选

经分离得105株马尾松内生细菌,筛选到6株能够比较有效的抑制松材线虫活性。由表1中可知,具有杀线虫活性的细菌发酵滤液处理松材线虫24 h后,死亡率在50%及以上,活性级别均不低于III级,并且使线虫虫体渗漏或消解。6株细菌的杀线活性存在明显差异,细菌Z11-2培养滤液处理松材线虫24 h的致死率达到92%,与其他5株存在极

表1 6株细菌发酵液对松材线虫的杀线虫活性比较

菌株编号	24 h 死亡率/%	活性级别	48 h 消解率/%
Z11-1	77.6 Bb	II	55 Bb
Z11-2	92 Dc	I	87.4 De
Z35-1	85.2 BCbc	II	71.4 Cc
G31	58 Aa	III	50 Bb
G36	89 BCc	II	77.5 Cd
G42	50 Aa	III	27.6 Aa
CK	1.6	VI	0

同列数据后不同大、小写字母表示,应用Duncan法检验存在极显著性差异($p < 0.01$)、显著性差异($p < 0.05$)

显著差异,Z35-1 和 G36 处理也超过 85%;6 株细菌对松材线虫的消解率也存在差异极显著,其中 Z11-2 培养滤液的消解水平最高,48 h 后松材线虫虫体消解率为 87.4%,其次为 G36 菌株,其消解率为 77.5%,Z35-1 培养滤液对松材线虫的消解率也超过了 70%,说明这 3 株细菌培养液中含有较高的杀线虫活性物质,并可能含分解松材线虫体壁的物质。

2.2 具较高杀线虫活性内生细菌的鉴定

由表 2 可知,细菌 Z11-2 和 G36 菌体杆状,有芽孢形成,为革兰氏阳性。Z11-2 形成乳白色稍有光泽的圆形半透明菌落,菌落表面光滑稍有凸起,边

缘整齐;细菌 G36 菌落白色不透明,表面湿润光滑稍有凸起,边缘整齐。通过 PCR 技术,分别得到 2 株细菌 16S rDNA 的特异性扩增,将序列分别与 GenBank 中的序列进行比对,发现 2 株细菌与芽孢杆菌属的同源性都较高:菌株 Z11-2 与 *Bacillus pumilus* 的最大相似性达到 100%,菌株 G36 与 *B. pumilus* 的同源性为 99%。根据比对结果,选取芽孢杆菌属 20 种的模式菌株序列与细菌 Z11-2 和 G36 的 16S rDNA 序列构建系统发育树(见图 1),Z11-2 和 G36 与 *B. pumilus* (AY876289.1) 位于同一簇群,亲缘关系最近,初步鉴定其为短小芽孢杆菌。

表 2 2 株具较高杀线活性细菌形态特征

菌株编号	革兰氏染色	KOH 拉丝试验	细胞形状	芽孢	菌落特征				
					颜色	表面	透明度	隆起	边缘
Z11-2	+	-	杆状	+	乳白色	湿润光滑	半透明	+	整齐
G36	+	-	杆状	+	白色	湿润光滑	不透明	+	整齐

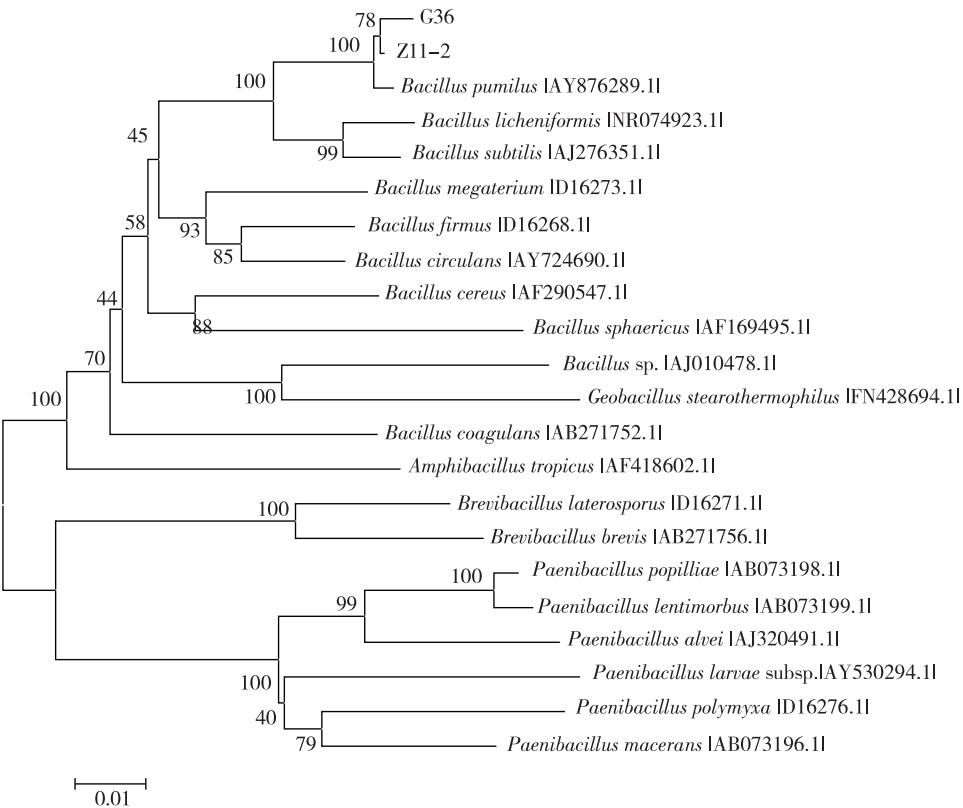


图 1 细菌 Z11-2 和 G36 的 16S rDNA 序列系统发育树

2 结论与讨论

在马尾松上分离得到 6 株对松材线虫活性具有

抑制作用的细菌 Z11-1, Z11-2, Z35-1, G31, G36, G42,其中细菌 Z11-2 和 G36 的杀线活性较强,其毒力级别在Ⅱ级以内,处理 24 h 的松材线虫死亡率分

别为 92% 和 89%, 48 h 线虫消解率分别为 87.4% 和 77.5%。通过形态特征观察, 结合 16S rDNA 序列分析, 初步鉴定这 2 株细菌为短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*)。

具杀线活性的微生物及其代谢产物为数不少, 但目前能够商品化的微生物制剂为数极少, 植物寄生线虫生物防治细菌的研究是控制线虫危害的一种重要防治途径。据有关报道, 至今已发现多种对松材线虫具有杀线虫活性的细菌, 如徐华潮等^[15]发现一些苏云金杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 的伴孢晶体蛋白对松材线虫有明显毒杀作用, Oliveira 等^[16]曾报道侧孢短芽孢杆菌 (*Brevibacillus laterosporu*) 对松材线虫具有杀线虫活性, 郝颖^[17]在腌制芥菜表面分离筛选得到 1 株具有杀松材线虫活性的蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) LZ-01, 朱丽梅、李亮亮等^[9-11]从松树体内分离筛选出对松材线虫具有较高杀线虫活性的解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens* JK-JS3) 和短小芽孢杆菌 (*B. pumilus* LYMC-3)。筛选有效的拮抗细菌, 对于开发新的植物寄生线虫生物防治细菌制剂有重要意义, 但现在对内生细菌的研究报道, 只是分离、纯化、种类鉴定、离体防治效果及室内防治效果测定, 因林间防治效果受到多种复杂因素的影响, 离体防治效果和室内防治效果的结果一般不能反映林间防治效果^[18]。本试验将继续开展内生细菌用于线虫的林间防治试验, 这对于保护森林资源, 尤其是一些受松材线虫病威胁的风景名胜区、重点生态区的安全有重要意义。

本试验中发现细菌 Z11-2 和 G36 培养滤液不但使松材线虫死亡, 还能造成线虫体壁被分解, 引起线虫内容物的泄漏, 最终使线虫虫体的消解, 这与前人研究报道^[9-10, 19]基本相同。试验筛选出的细菌发酵滤液之所以对松材线虫有较高杀线活性, 可能是产生了某种对松材线虫活性有抑制作用的物质, 但该类物质的性质及其作用途径等尚不明确, 不同菌株产生的物质是否相同也有待研究。

参考文献:

- [1] DWINELL L D. The Pinewood Nematode: Regulation and Mitigation[J]. Annual Review of Phytology, 1997, 35(1): 153-166.
- [2] 柴希民, 蒋平. 松材线虫病的发生和防治[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [3] 张星耀, 骆有庆. 中国森林重大生物灾害[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.
- [4] 牛秋红, 董冰雪, 黄思良, 等. 松材线虫生防细菌的筛选、鉴定及其毒性因子的初步研究[J]. 中国生物工程杂志, 2010, 30(8): 76-81.
- [5] 郑海营, 于洁, 李荣贵, 等. 两株具有杀松材线虫活性海洋细菌的筛选和鉴定[J]. 青岛大学学报(工程技术版), 2012, 27(1): 1-8.
- [6] 张晓美, 朴春根, 汪来发, 等. 细菌在植物病害生物防治中的研究进展[C]//生物防治——中国植物病理学会 2006 年学术年会论文集. 2006.
- [7] 黄金玲, 刘志明, 刘纪霜, 等. 植物寄生线虫生防细菌的研究进展[J]. 广西农业生物学, 2008, 27(3): 288-293.
- [8] 卢镇岳, 杨新芳, 冯永君. 植物内生细菌的分离、分类、定殖与应用[J]. 生命科学, 2006, 18(1): 90-94.
- [9] 朱丽梅, 吴小芹, 徐旭麟. 松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2008, 32(3): 91-94.
- [10] 邓海娟, 詹国辉, 陈云芳. 松材线虫拮抗细菌的筛选[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(4): 1528-1529.
- [11] 李亮亮, 谈家金, 陈凤毛. 两株松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2017, 41(4): 37-41.
- [12] 王明祖. 中国植物线虫研究: 1 版[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1998: 11-19.
- [13] DONG J Y, LI X P, LI L, et al. Preliminary results on nematocidal activity from culture filtrates of basidiomycetes against the pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Aphelenchoididae) [J]. Annals of Microbiology, 2006, 56(2): 163-166.
- [14] 万树青. 杀线虫剂生物活性测定[J]. 农药, 1994, 33(5): 10-11.
- [15] 徐华潮, 徐金华, 张立钦, 等. 苏云金芽孢杆菌对松材线虫的杀线活性[J]. 中国生物防治, 2010, 26(1): 85-89.
- [16] OLIVEIRA E J, RABINOVITCH L, MONNERAT R G, et al. Molecular characterization of *Brevibacillus laterosporus* and its potential use in biological control [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2004, 70(11): 6657-6664.
- [17] 郝颖. 具有杀松材线虫活性细菌的筛选和鉴定[D]. 山东: 青岛大学, 2014.
- [18] 易有金, 罗宽, 刘二明. 内生细菌在植物病害生物防治中的作用[J]. 核农学报, 2007, 21(5): 474-477.
- [19] HUANG X W, NIU Q H, ZHOU W, et al. *Bacillus nematocida* sp. nov., a novel bacterial strain with nematotoxic activity isolated from soil in Yunnan, China [J]. Systematic & Applied Microbiology, 2005, 28(4): 323-327.

[1] DWINELL L D. The Pinewood Nematode: Regulation and Mitiga-