

孙 科,王 萌,冯希勇.牛蒡根结线虫生防芽孢杆菌筛选及其生防机制研究[J].江苏农业科学,2022,50(19):117-123.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.19.018

牛蒡根结线虫生防芽孢杆菌筛选及其生防机制研究

孙 科,王 萌,冯希勇

(徐州生物工程职业技术学院药品食品学院,江苏徐州 221006)

摘要:芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)是一种重要的植物病虫害生防菌。为筛选防治牛蒡(*Arctium lappa* L.)南方根结线虫(*Meloidogyne incongnita*)的高效芽孢杆菌,并初步研究其生防机制。从牛蒡根结线虫病抑制性土壤中筛选出含有芽孢的细菌 72 株,通过检测不同菌株发酵滤液对南方根结线虫卵孵化的抑制作用和对二龄幼虫的致死作用,筛出孵化抑制率>75%和二龄幼虫校正死亡率>70%的菌株 4 株,然后进行盆栽灌根试验。结果表明,菌株 LB-16 发酵滤液处理的根结指数最小、防治效果最大。通过对菌株形态特征、生理生化特性和 16S rDNA 测定,将菌株 LB-16 鉴定为和短短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)亲缘关系接近的芽孢杆菌。通过不同浓度菌株 LB-16 发酵产物作用于南方根结线虫二龄幼虫,测定其总糖含量、总蛋白含量、乙酰胆碱酯酶活性、过氧化氢酶活性和羧酸酯酶活性等,研究短短芽孢杆菌防治南方根结线虫的机制。结果显示,菌株 LB-16 发酵产物浓度越大,南方根结线虫的总糖含量、总蛋白质含量、乙酰胆碱酯酶活性、过氧化氢酶活性和羧酸酯酶活性降幅越大,干扰线虫的正常代谢,从而达到致死目的。研究结果为阐明芽孢杆菌杀线虫的作用机制提供了理论支撑,为更好地开发芽孢杆菌杀线剂提供了依据。

关键词:牛蒡;南方根结线虫;短短芽孢杆菌;生物防治机制;酶活性

中图分类号:S182 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)19-0117-06

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是一种寄生性植物病原线虫^[1],能侵染 3 000 多种植物^[2],对世界农业危害严重,每年约造成 1 000 亿美元的损失^[3]。其中,南方根结线虫(*M. incongnita*)是危害我国农作物及蔬菜的优势种^[4],也是牛蒡种植中重要的虫害,亟需安全有效的防治措施。由于化学农药对生态环境的破坏越来越严重,我国对化学农药的使用限制也越来越严格,绝大多数杀线剂我国已经禁用^[5]。生物防治根结线虫病是减少化学农药危害实现绿色环保的重要途径。目前,许多学者做出了有意义的探索与研究,分离筛选得到多种拮抗根结线虫的生防菌,其中真菌比例最大,如哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)^[6]、厚垣轮枝孢菌(*Verticillium chlamydosporium*)^[7]、淡紫色拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)^[8]等。芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)是一类重要的植物病虫害生防菌,具有抗逆性强、功能多样、亲和性好等特性。目前,芽孢杆菌对

根结线虫的防治研究逐渐增多,Gao 等发现蜡质芽孢杆菌(*B. cereus*)S2 的发酵产物鞘氨醇对南方根结线虫以及秀丽杆线虫具有较强的致死性^[9]。史凤玉等研究发现,巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)以及解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)的次生代谢产物具有显著的杀灭根结线虫的能力^[10]。虽然筛选出的根结线虫的生防菌种类较多,但真正用于实际生产中极少,因此,挖掘新的根结线虫生防菌仍然具有重要意义。

随着时间的推移,植物病虫害发病严重的田块会出现病虫害减轻的现象,并成为自然衰退现象,研究学者把具有自然衰退现象的土壤成为抑制性土壤^[11]。研究者认为之所以会出现病虫害自然衰退现象,是因为土壤中存在大量病虫害天敌,特别是一些拮抗微生物^[12]。因此,利用牛蒡根结线虫自然衰退现象的抑制性土壤筛选根结线虫拮抗剂,为寻找根结线虫生物防治提供了一条新的途径。本研究从江苏省徐州市丰县、沛县牛蒡种植南方根结线虫病自然衰退的土壤中,筛选南方根结线虫生防菌,并研究生防菌发酵产物对南方根结线虫的作用机制,以期牛蒡根结线虫病的绿色防治提供理论和实践依据。

收稿日期:2021-11-23

基金项目:徐州市科技计划项目(编号:KC20051);江苏高校“青蓝工程”资助基金项目(编号:JS1111);江苏省高职院校专业带头人高端研修项目(编号:2021GRFX075)。

作者简介:孙 科(1977—),男,江苏睢宁人,硕士,副教授,主要从事生物发酵技术研究。E-mail:13912009992@139.com。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 样本来源 从徐州市丰县、沛县种植牛蒡的 9 个镇,选取根结线虫发病严重的牛蒡大田中采集生防菌芽孢杆菌样本。南方根结线虫由徐州市绿色植保工程技术研究中心提供。

试验时间为 2019 年 3 月至 2020 年 11 月,试验地点为徐州生物工程职业技术学院生物发酵研究中心和江苏省徐州市沛县牛蒡生产基地。

1.1.2 培养基 LB 固体培养基:NaCl 10 g,酵母提取物 5 g,胰蛋白胨 10 g,琼脂 18 g,去离子水 1 000 mL,pH 值为 6.8~7.2。121 ℃灭菌 20 min,培养基冷却到 50~55 ℃,加入过滤的放线菌酮 20 mg。

LB 液体培养基:LB 固体培养基配制过程中去掉琼脂和放线菌酮。

1.1.3 供试牛蒡品种 牛蒡品种为新林-徐州 1 号,由徐州山崎农产品技术研发有限公司提供。

1.1.4 检测试剂盒 总糖含量测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)活性检测试剂盒、总蛋白(TP)含量测定试剂盒、羧酸酯酶(CES)活性检测试剂盒、乙酰胆碱酯酶(ACh)活性检测试剂盒,均购自上海酶联生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-1FD 单人单面超净工作台,购自上海沪净医疗器械有限公司;FA1004B-2204B 万分之一电子分析天平,购自青岛聚创华业分析仪器有限公司;QM-QX-20L 行星球磨机,购自长沙米淇仪器设备有限公司;MS-3 漩涡混合仪,购自上海巴玖实业有限公司;SHP-80D 生化培养箱,购自上海森信实验仪器有限公司;SN5000SPlus 紫外可见分光光度计,购自青岛精诚仪器仪表有限公司;TG16G 离心机,购自常州市亿能实验仪器厂;HWY-2112B 立式双层恒温摇床,购自苏州威尔实验用品有限公司;G-12K 离心机,购自济南泰医生物技术有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 生防菌筛选 把采集的 9 份样品各取 10 g 加入装有 90 mL 无菌生理盐水的 250 mL 三角瓶中,80 ℃、180 r/min 水浴加热 60 min,取 1 mL 菌悬液加入装有 9 mL 无菌生理盐水的试管中,充分振荡,按此方法进行浓度梯度稀释。取 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 浓度的菌悬液 0.1 mL 进行平板涂布,每个浓度 3 次重复。在 28 ℃恒温箱中倒置培养 2 d,挑取平板上

细菌单菌落划线纯化,将纯化的单菌落接种于试管斜面,4 ℃保藏备用。

挑取分离纯化的试管菌种接种到 LB 液体培养基中,28 ℃、200 r/min 培养 18 h 制成种子液。以 2% 接种量进行发酵液制备,28 ℃、200 r/min 发酵 48 h。将发酵液在 12 000 r/min 离心 10 min,上清液用 0.22 μm 滤膜过滤,取上清液备用。

用 2% NaClO 溶液对根结线虫卵囊块消毒,25 ℃恒温箱中孵化 5 d 获得根结线虫二龄幼虫。在 96 孔板上每孔加入 30 头根结线虫二龄幼虫,同时滴入 200 μL 过滤发酵液,进行毒力测定,每株菌株进行 3 次重复,并用 LB 液体培养基对照。25 ℃恒温培养,24、48、72 h 后用显微镜观察根结线虫的存活状况。判断线虫死亡的标准为针触碰不动为死亡个体^[13]。死亡率计算公式^[14]如下:

死亡率 = 线虫死亡数/线虫总数 × 100% ;

校正死亡率 = (处理线虫死亡率 - 对照线虫死亡率)/(1 - 对照线虫死亡率) × 100% 。

1.3.2 盆栽试验 将牛蒡种子在 0.2% KMnO₄ 溶液种浸泡 30 min 后,用无菌水洗涤 5 次。放置于底层铺满吸水滤纸的培养皿中萌发。把发芽的牛蒡种子种植在装有无菌培养土的花盆中,当牛蒡长出 4 张真叶时,在距根 5 cm 处灌入 10 mL 发酵过滤液,5 d 后每盆接入含有约 3 000 头根结线虫悬液 3 mL,同时用 0.5% 阿维菌素进行比较,对照组接入 5 mL 无菌水,每个菌株设置 3 次重复。温室大棚中培养 50 d,拔出牛蒡植株,用无菌水反复冲洗根部,统计根结数量。根据文献^[14],确定根结指数和防治效果。

1.3.3 菌株鉴定 把筛选出的菌株在 LB 培养基平板上培养并观察菌落形态,革兰氏染色后进行显微观察,并进行生理生化试验。同时利用细菌总 DNA 提取试剂盒对筛出的菌株进行基因组提取,采用 16S 通用引物进行分析比对,利用系统进化分析及分子鉴定软件 Mega 7.0.14 进行系统发育进化树构建^[15]。

1.3.4 抗根结线虫菌株的生防机制研究 取根结线虫卵囊块,用 1% NaClO 溶液表面消毒 2 min,用无菌水冲洗 3~5 次,在 25 ℃恒温箱中培养孵化,用无菌生理盐水把孵出的二龄幼虫配成 2 万头/mL 悬浮液,备用。

发酵滤液用乙酸乙酯萃取、减压蒸馏、真空冷冻干燥,制成冻干粉。用去离子水配制成浓度为 5、

10、15 μg/mL 发酵产物溶液,保存于 4 ℃ 冰箱。

在 1.5 mL 离心管中加入 100 头南方根结线虫二龄幼虫,同时加入 500 μL 浓度为 5、10、15 μg/mL 的发酵产物溶液,在 25 ℃ 恒温箱中培养,分别于 12、24、36、48 h 后在离心管中加入 1 mL 缓冲液于冰浴中匀浆,对照组加入无菌 LB 液体培养基,4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min,取上清液。利用相关试剂盒测定发酵滤液对根结线虫二龄幼虫体内总糖、总蛋白降解情况,并检测发酵滤液对南方根结线虫体内羧酸酯酶、乙酰胆碱酯酶及过氧化氢酶等活性的影响,每个处理 3 次重复。

2 结果与分析

2.1 生防菌分离筛选结果

从 9 个镇牛蒡种植区共筛选出产芽孢的细菌 72 株,通过制备细菌发酵过滤液作用于南方根结线虫的卵囊及二龄幼虫,从表 1 可以看出,8 株细菌的发酵过滤液对南方根结线虫二龄幼虫校正死亡率大于 65%,其中 LB-16 菌株的发酵过滤液对线虫的校正死亡率最高,达到了 86.24%,菌株 LB-24、LB-07、LB-36、LB-59 发酵过滤液对线虫的校正死亡率 > 70%,分别达到了 80.19%、76.57%、74.83%、71.53%。同时测定了细菌发酵过滤液对南方根结线虫卵孵化的影响,可以看出,菌株 LB-16 对线虫卵孵化抑制率最高达到 82.24%,相对应的孵化率为 11.75%。孵化抑制率大于 75% 的菌株

还有 LB-24、LB-07、LB-36,抑制率分别为 76.83%、77.67%、79.96%,对应的孵化率分别为 15.37%、14.62%、13.67%。因此,挑选 LB-16、LB-24、LB-07、LB-36 等 4 株菌株进行盆栽试验。

表 1 不同细菌发酵滤液对南方根结虫卵孵化率和二龄幼虫死亡率的影响

组别	死亡率 (%)	校正死亡率 (%)	孵化率 (%)	孵化抑制率 (%)
LB-16	96.37 ± 1.15a	86.24a	11.75 ± 1.61g	82.24a
LB-24	92.46 ± 1.86ab	80.19ab	15.37 ± 2.13g	76.83a
LB-07	89.47 ± 2.41abc	76.57abc	14.62 ± 0.72g	77.67ab
LB-36	88.69 ± 1.73abcd	74.83abc	13.67 ± 1.61g	79.96a
LB-59	86.36 ± 2.24bcd	71.53abcd	22.52 ± 2.06ef	66.72bcd
LB-49	84.62 ± 0.72cde	68.36bcd	26.58 ± 1.73ef	62.47cd
LB-72	83.73 ± 2.16 de	66.43cd	32.37 ± 2.52cd	54.68de
LB-60	82.49 ± 1.58e	65.48d	22.17 ± 2.08de	69.62bcd
CK	54.03 ± 6.47f	—	66.47 ± 3.62a	—

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著 (P < 0.05)。表 2 同。

2.2 盆栽试验结果

从盆栽试验结果(表 2)可以看出,菌株 LB-16 发酵滤液灌根处理后牛蒡的根结指数较小,防治效果最好,高于 0.5% 阿维菌素的防治效果。菌株 LB-24 的防治效果为 63.58%,菌株 LB-07 的防治效果为 59.92%,防治效果都大于 50%。同时,菌株 LB-16 的株高和鲜质量与 CK 相比显著增加。由此可见,菌株 LB-16 的生防效果最好。

表 2 盆栽试验结果

组别	根结指数	防治效果 (%)	株高 (cm)	鲜质量 (g)
LB-16	26.47 ± 3.28cd	73.61	48.72 ± 4.26a	70.69 ± 1.73a
LB-24	32.49 ± 3.86c	63.58	44.86 ± 3.68ab	66.86 ± 2.16a
LB-07	39.74 ± 2.85ab	59.92	42.72 ± 5.39ab	63.47 ± 2.89ab
LB-36	43.64 ± 2.81b	46.79	35.57 ± 3.48ab	53.48 ± 2.24ab
0.5% 阿维菌素	24.89 ± 1.78d	68.47	43.71 ± 2.37ab	57.72 ± 1.89ab
CK	83.69 ± 2.24a		32.16 ± 3.28b	54.28 ± 2.26b

2.3 菌株 LB-16 鉴定

菌株 LB-16 在 LB 固体培养基上菌落呈白色、不透明,边缘为不规则圆形,革兰氏染色呈阳性。从表 3 可以看出,菌株 LB-16 与短短芽孢杆菌的生理生化反应具有相同的特征。将菌株 LB-16 的 16S rDNA PCR 扩增产物进行琼脂凝胶电泳检测,获得扩增片段大约约 1 500 bp,与原核生物的 16S rRNA 片段大小相符。把扩增产物回收纯化,进行

基因序列测定。测序结果在 NCBI 数据库中比对,选取重叠率大于 98% 的菌株构架系统发育树。从图 1 可以看出,短短芽孢杆菌 (*Brevibacillus brevis*) strain CanS-411 (KT580607.1) 与菌株 LB-16 的同源性最近,并处在同一分支中。结合菌株的形态特征、生理生化特征及 16S rDNA 基因分子鉴定结果,菌株 LB-16 是和短短芽孢杆菌亲缘关系较近的一种芽孢杆菌。

表 3 生防菌 LB-16 生理生化特性

试验项目	菌株 LB-16	短短芽孢杆菌
芽孢	+	+
革兰氏染色	+	+
明胶液化	+	+
接触酶	+	+
葡萄糖产酸	+	+
V-P 反应	-	-
厌氧生长	-	-
50℃生长	-	-
7% NaCl	-	-
淀粉水解	-	-
硝酸盐还原	-	-

注：“+”表示阳性反应；“-”表示阴性反应。

2.4 菌株 LB-16 生防机制的研究结果

2.4.1 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫体内总糖含量的影响 由图 2 可知,发酵产物处理过的线虫体内总糖含量明显低于对照组,并且随着发

酵产物浓度的增加总糖含量逐渐下降,随着作用时间的延长总糖含量也迅速降低,而对照组的总糖含量随着线虫的生长逐渐增加。48 h 时,对照组线虫的总糖含量达到 54.16 μg/mL,而 15 μg/mL 发酵产物处理的线虫总糖含量只有 4.78 μg/mL,前者是后者的 11.33 倍。说明菌株 LB-16 的发酵产物具有明显的抑制南方根结线虫糖代谢的作用,限制了线虫体内糖的积累,从而抑制了线虫的正常生命活动。

2.4.2 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫体内总蛋白含量的影响 由图 3 可知,经过发酵产物处理过的线虫总蛋白含量与对照相比明显降低,随着发酵产物浓度的增加,总蛋白含量降幅也在增加,随着作用时间的延长,总蛋白含量逐渐减少,且总蛋白含量变化趋势和总糖含量变化趋势基本一致。48 h 时,对照组的总蛋白含量达到了 118.24 μg/mL,而 15 μg/mL 发酵产物处理的总蛋白含量只有 4.58 μg/mL,前者是后者的 25.82 倍。对照组的总蛋白含量呈上升趋势,表明线虫蛋白质

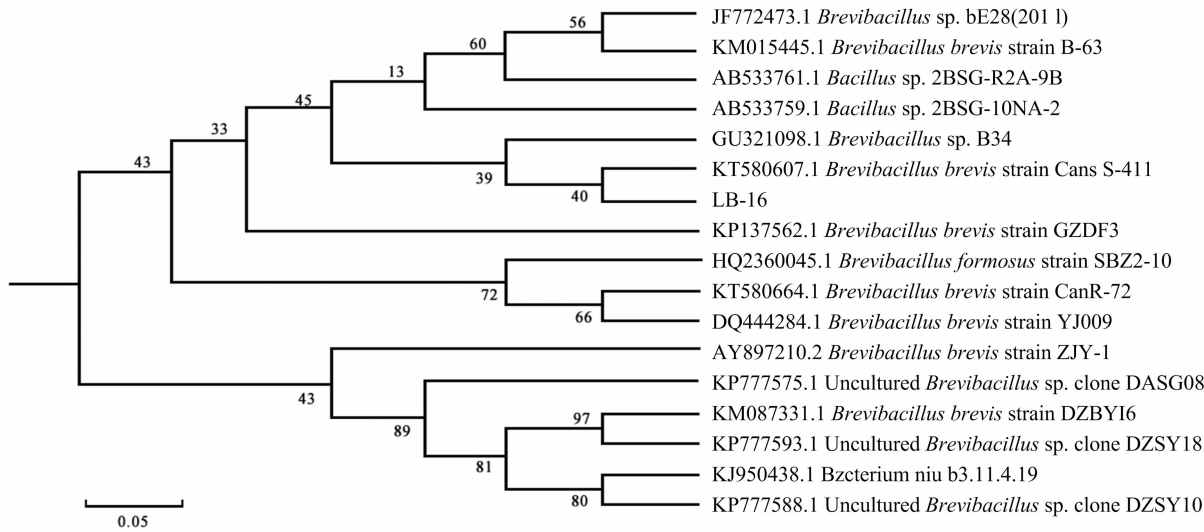


图1 菌株 LB-16 的 16S rDNA 系统进化树

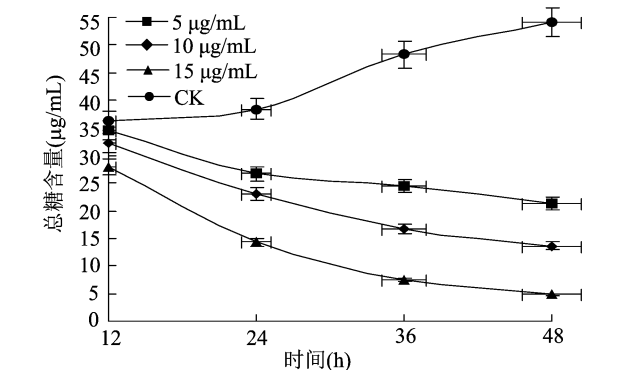


图2 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫体内总糖含量的影响

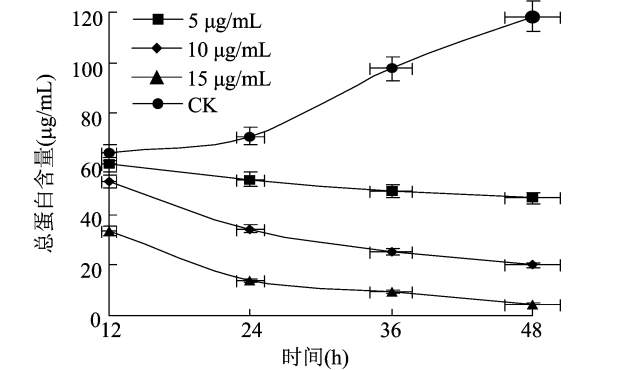


图3 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫体内总蛋白含量的影响

代谢正常,体内蛋白质不断积累,而试验组蛋白质代谢受到破坏,体内总蛋白积累明显减少,影响了线虫的正常生命活动。

2.4.3 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫体内乙酰胆碱酯酶活性的影响 由图 4 可知,发酵产物处理过的线虫体内乙酰胆碱酯酶活性相对于对照组受到明显抑制,随着发酵产物浓度的增高乙酰胆碱酯酶活性明显下降。 $15\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理的酶活性最低,基本没发生变化(24 h 时酶活性略有增加)。 $5\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理下酶活和对照组差异不明显, $10\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理的乙酰胆碱酯酶活性降幅最大。48 h 时, $15\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理组的酶活性比对照组下降了 77.24%,说明菌株 LB-16 发酵产物能明显抑制乙酰胆碱酯酶活性,造成根结线虫神经系统紊乱,从而影响线虫的正常生命活动。

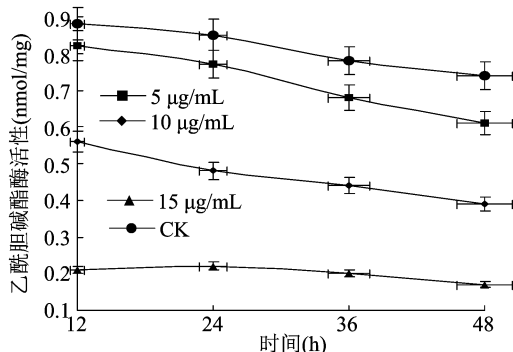


图4 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫乙酰胆碱酯酶活性的影响

2.4.4 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫体内过氧化氢酶活性的影响 由图 5 可知,对照组的过氧化氢酶活性随着时间的延长呈逐渐增加的趋势,但处理组的过氧化氢酶活性随着发酵产物浓度的增加和处理时间的延长呈现出明显的降低趋势,在 12~24 h 酶活性降幅较大。 $15\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理组的酶活性最低且基本不随时间变化而变化, $5\ \mu\text{g/mL}$ 、 $10\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理组酶活性下降幅度大致相同。48 h 时, $15\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理组的酶活比对照组下降了 84.07%,说明菌株 LB-16 发酵产物能明显抑制过氧化氢酶活性,干扰根结线虫正常代谢,影响线虫正常的生命活动。

2.4.5 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫体内羧酸酯酶活性的影响 由图 6 可知,对照组的羧酸酯酶活性呈逐渐增加趋势,且随着时间的延长,酶活性增幅也在增加。 $5\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理组羧酸酯酶活性比对照组略有降低,但变化幅度较小。 $10\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理组羧酸酯酶活性比对照组有较大

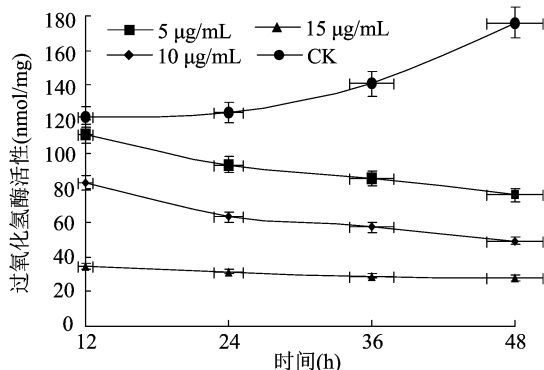


图5 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫过氧化氢酶活性的影响

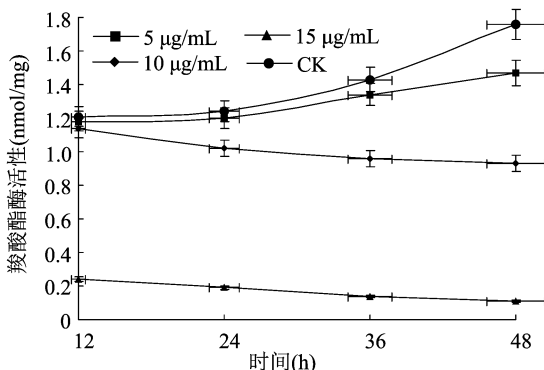


图6 菌株 LB-16 发酵产物对南方根结线虫羧酸酯酶活性的影响

幅度的降低,而 $15\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理组的羧酸酯酶活性最低,且随时间变化的幅度很小。48 h 时, $15\ \mu\text{g/mL}$ 浓度处理组酶活性比对照组下降了 93.75%,说明菌株 LB-16 发酵产物能明显抑制羧酸酯酶活性,降低线虫正常代谢功能,影响其正常的生命活动。

3 讨论

分离和筛选高效生防菌是进行南方根结线虫生物防治的关键,本试验从根结线虫发病严重并逐渐转轻的田块中筛选出 72 株产芽孢的细菌,通过制备发酵滤液进行根结线虫卵和二龄幼虫的毒力试验,筛选出 4 株毒力较强的细菌。用筛选出的 4 株细菌发酵滤液进行盆栽灌根试验,最终筛选出毒力最强的菌株 LB-16,经过形态特征、生理生化特征及基因检测鉴定为和短短芽孢杆菌亲缘关系接近的芽孢杆菌,研究结果丰富了南方根结线虫的生防资源。

目前,枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和解淀粉芽孢杆菌在根结线虫的防治中被广泛应用^[16],短短芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌亲缘关系较近,但短短芽孢杆菌在南方根结线虫防治研究中却鲜有报道。目前,对短短芽孢杆菌的研究主要集中在代谢产物抑菌性方面。王洁等以短短芽孢杆

菌为研究对象,采用 DEAE-52 阴离子交换层析等方法对其产生的蛋白进行分离纯化及鉴定,发现该蛋白的抑菌谱较广可抑制常见的植物病害真菌^[17]。龚国利等从美国黄石国家公园筛选出 1 株耐高温的短短芽孢杆菌,对其发酵产物进行初步研究,发现该物质具有良好的抑菌活性^[18]。本研究筛选出的芽孢杆菌 LB-16 发酵滤液通过盆栽灌根对牛蒡根结线虫病的防治效果达到 73.61%,比市售阿维菌素防治效果高出 5.14%,表现出较强的根结线虫生防潜力,同时显著增加了牛蒡的鲜质量和株高。下一步将对菌株 LB-16 的发酵产物用于牛蒡大田中根结线虫的防治进行研究,为开发该菌株的牛蒡生物有机肥提供理论及实践依据。

本研究结果表明,芽孢杆菌 LB-16 的发酵产物能够显著降低南方根结线虫二龄幼虫的乙酰胆碱酯酶、过氧化氢酶以及羧酸酯酶的活性。乙酰胆碱酯酶活性的降低,能够破坏根结线虫的神经传递,抑制了线虫的活动能力。同时,乙酰胆碱酯酶是一些农药如有机磷类的靶标酶,羧酸酯酶是许多药物的解毒酶,芽孢杆菌 LB-16 诱导的靶标酶和解毒酶与许多农药的靶标酶和代谢酶系是一致的,这与杨秀娟等研究的 3 种植物乙醇提取物对南方根结线虫卵囊酯酶活性影响的研究结果^[19]一致。过氧化氢酶是根结线虫体内重要的抗氧化保护酶,所以芽孢杆菌 LB-16 的发酵产物能够抑制抗氧化保护酶正常的酶促反应,进而导致南方根结线虫活性降低甚至死亡。同时,研究还发现,短短芽孢杆菌 LB-16 的发酵产物可以明显降低根结线虫二龄幼虫体内总糖和总蛋白含量。糖和蛋白质是根结线虫体内维持生命的重要组成物质和功能成分,糖类在根结线虫体内是重要的信息传递物质,线虫的化学感受器中含有大量的糖类,糖类含量的降低会影响线虫的趋化性^[20],而蛋白质是线虫身体的重要组成物质及生命过程调控物质,特别是线虫体表角质层的重要组成成分,增加了线虫的抗逆性^[21]。因此,芽孢杆菌 LB-16 的发酵产物可能通过干扰根结线虫糖和蛋白质代谢进而杀死线虫。接下来将把芽孢杆菌 LB-16 和其他根结线虫生防菌配合使用,以提高对南方根结线虫的防治效果,减少农药对生态环境的破坏。

4 结论

本研究从牛蒡种植根结线虫病高发田块中分

离筛选得到产芽孢的细菌,通过离体毒力测定和盆栽灌根试验获得高效生防菌株 LB-16,利用形态学、生理生化特性及基因检测方法将其鉴定为与短短芽孢杆菌(*B. brevis*)亲缘关系较近的一种芽孢杆菌,并初步研究了菌株 LB-16 对南方根结线虫的作用机制,结果表明,用菌株 LB-16 的发酵产物冻干粉溶液处理南方根结线虫,随着浓度的增加,明显降低了线虫体内总糖和总蛋白含量,同时明显降低了乙酰胆碱酯酶、过氧化氢酶和羧酸酯酶的活性,可以为牛蒡南方根结线虫病的生物防治提供依据。

参考文献:

- [1] Xiang N, Lawrence K S, Kloepper J W, et al. Biological control of *Meloidogyne incognita* by spore-forming plant growth-promoting rhizobacteria on cotton [J]. *Plant Disease*, 2017, 101 (5): 774-784.
- [2] 张洁,郭雪萍,夏明聪,等. 粉红螺旋聚孢霉 NF-06 固体发酵条件优化及对南方根结线虫的防治效果[J]. *中国生物防治学报*, 2020, 36(1): 105-112.
- [3] Engelbrecht G, Horak I, van Rensburg P J J, et al. *Bacillus*-based bionematicides: development, modes of action and commercialisation [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2018, 28(7): 629-653.
- [4] Ge B B, Liu B H, Nwet T T, et al. *Bacillus methylotrophicus* strain NKG-1, isolated from Changbai Mountain, China, has potential applications as a biofertilizer or biocontrol agent [J]. *PLoS One*, 2016, 11(11): e0166079.
- [5] Zhou L H, Yuen G, Wang Y, et al. Evaluation of bacterial biological control agents for control of root-knot nematode disease on tomato [J]. *Crop Protection*, 2016, 84: 8-13.
- [6] Xing Y X, Wei C Y, Mo Y, et al. Nitrogen-fixing and plant growth-promoting ability of two endophytic bacterial strains isolated from sugarcane stalks [J]. *Sugar Tech*, 2016, 18(4): 373-379.
- [7] 祝绍文. 骆驼蓬碱衍生物的杀线虫活性及作用机理研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [8] Affokpon A, Coyne D L, de Proft M, et al. *In vitro* growth characterization and biocontrol potential of naturally occurring nematophagous fungi recovered from root-knot nematode infested vegetable fields in Benin [J]. *International Journal of Pest Management*, 2015, 61(4): 273-283.
- [9] Gao H J, Qi G F, Yin R, et al. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematicidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28756.
- [10] 史凤玉, 武云鹏, 张瑞敬, 等. 野生大豆内生细菌多样性及其杀线虫活性分析[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(4): 327-332.
- [11] Radhakrishnan R, Lee I J. Foliar treatment of *Bacillus methylotrophicus* KE2 reprograms endogenous functional chemicals in sesame to improve plant health [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2017, 57(4): 409-415.

王 煜,赵远征,王 东,等. 西兰花水浸提液对野稷种子萌发和幼苗生长的影响[J]. 江苏农业科学,2022,50(19):123-129.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.19.019

西兰花水浸提液对野稷种子萌发和幼苗生长的影响

王 煜¹, 赵远征², 王 东¹, 东保柱¹, 周洪友¹

(1. 内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 内蒙古呼和浩特 010018;

2. 内蒙古自治区农牧业科学院植物保护研究所, 内蒙古呼和浩特 010031)

摘要:利用水溶液浸提法提取西兰花的化感物质,探究其对野稷种子萌发和生长的影响,并分析水浸提液处理后野稷幼苗抗氧化代谢系统的变化,揭示西兰花对野稷种子和幼苗的化感效应。结果表明,西兰花水浸提液对野稷种子萌发具有显著的抑制作用,0.28 g/mL 西兰花水浸提液处理下,野稷种子的萌发率仅为 15.00%。处理后的野稷幼苗芽长、根长变小,鲜质量显著降低,在低浓度条件下,野稷胚轴长未受影响,在浓度 0.28 g/mL 条件下,胚轴长被显著抑制。0.07 g/mL 西兰花水浸提液处理后的野稷幼苗过氧化氢 (H_2O_2) 含量为 16.40 $\mu\text{mol/g}$,对照为 7.87 $\mu\text{mol/g}$; 0.14 g/mL 西兰花水浸提液处理后野稷超氧阴离子 ($O_2^{\cdot-}$) 含量为 1 207.03 nmol/g,对照为 418.94 nmol/g; 丙二醛 (MDA) 在 0.14 g/mL 西兰花水浸提液的影响下含量达到 1.84 nmol/g,相比于对照含量 1.49 nmol/g 明显升高。过氧化氢酶 (CAT)、多酚氧化酶 (PPO) 的活性较对照组均下降,但过氧化物酶 (POD) 的活性并没有受到影响。该研究揭示了西兰花水浸提液对野稷种子萌发和幼苗生长表现出较强化感作用,并通过提高野稷幼苗活性氧的含量来干预野稷幼苗的抗氧化代谢系统,从而为恶性杂草野稷的防控提供理论依据。

关键词:化感作用; 西兰花; 野稷; 活性氧; 种子萌发; 幼苗生长

中图分类号:S476 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)19-0123-07

燕麦 (*Avena sativa* L.) 是禾本科 (Gramineae) 燕麦属 (*Avena*) 1 年生草本植物,是第七大禾谷类作

物,也是重要的粮、饲兼用型作物^[1]。目前我国对燕麦的研究多集中在育种与栽培技术方面,针对燕麦田杂草防除的研究还很少见^[2]。燕麦作为阴山北麓地区主栽作物之一,其产量低且不稳,杂草危害严重是造成燕麦产量低下的根本原因之一,严重制约了燕麦产业的发展。在内蒙古燕麦种植区,燕麦田间的常见杂草如藜 (*Chenopodium album* Linn.)、沙蓬 (*Agriophyllum squarrosum* Moq.)、猪毛菜

收稿日期:2021-11-16

基金项目:国家燕麦荞麦产业技术体系项目(编号:CARS-07-C-3)。

作者简介:王 煜(1996—),男,内蒙古巴彦淖尔人,博士研究生,研究方向为燕麦田杂草的生物防治。E-mail:1002856162@qq.com。

通信作者:周洪友,博士,教授,研究方向为植物病害防治及植物病理学。E-mail:hongyouzhou2002@aliyun.com。

[12] Dong H L, Wang H X, Zhang Z G, et al. Isolation and identification of nematicidal active substances from the soil fungus *Myrothecium verrucaria* [J]. Journal of Plant Protection, 2019, 46 (3): 721-722.

[13] 马文彬,姚 拓,王国基,等. 根际促生菌筛选及其接种剂对箭筈豌豆生长影响的研究[J]. 草业学报,2014,23(5):241-248.

[14] 谈 韞,樊 航,张紫瑶,等. 绿色木霉菌株发酵液及分生孢子悬液对南方根结线虫 2 龄幼虫活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(12): 114-120.

[15] Li R, Li H X, Xie B Y, et al. The control mechanism of fungus *Trichoderma longibrachiatum* TL16 against root-knot nematode *Meloidogyne incognita* [J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47 (2): 384-393.

[16] 李建宏,李雪萍,马文文,等. 东祁连山高寒草地几种禾本科牧草根际促生菌研究[J]. 草业学报,2016,25(11):173-177.

[17] 王 洁,田 露,闵建红,等. 短短芽孢杆菌 JH3 抗菌蛋白的分离纯化及其抗菌性能[J]. 陕西科技大学学报,2021,39(4): 51-55.

[18] 龚国利,王忠忠. 短短芽孢杆菌的鉴定及其抑菌物质的初步研究[J]. 陕西科技大学学报,2017,35(4):126-131,137.

[19] 杨秀娟,何玉仙,陈庆河,等. 3 种植物乙醇提取物对南方根结线虫卵囊酯酶活力影响及其成分预分析[J]. 生物技术通报, 2006(增刊1):476-479,489.

[20] Zhao D, Zhao H, Zhao D, et al. Isolation and identification of bacteria from rhizosphere soil and their effect on plant growth promotion and root-knot nematode disease[J]. Biological Control, 2018, 119:12-19.

[21] Li B Y, Wang B, Pan P, et al. *Bacillus altitudinis* strain AMCC 101304: a novel potential biocontrol agent for potato common scab[J]. Biocontrol Science and Technology, 2019, 29(10):1009-1022.