

昆虫病原线虫共生细菌对植物寄生线虫卵的毒性研究

宋洁^{1,2}, 许艳丽¹, 姚钦¹

(1. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所/黑土区农业生态国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150081; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:为探讨昆虫病原线虫体内携带的共生细菌对植物寄生线虫卵的毒性,从实验室保存的4个品系昆虫病原线虫中分离出4个共生细菌菌株,分别为 *Photorhabdus luminescens*-NJ、*Photorhabdus luminescens*-Hb(USA)、*Xenorhabdus nematophilus*-Sc 和 *Xenorhabdus nematophilus*-Sc-All,检测了共生细菌对植物寄生线虫卵孵化的影响。结果表明:4个品系共生细菌对大豆胞囊线虫和根结线虫的卵孵化均表现出了明显的抑制作用,对大豆胞囊线虫和根结线虫卵孵化抑制率范围分别为74.1%~100%和57.8%~89.2%,但是不同品系所表现出的抑制作用不同,光杆菌属(*Photorhabdus* spp.)NJ菌株和Hb(USA)菌株对大豆胞囊线虫卵孵化的毒性明显强于致病杆菌属(*Xenorhabdus* spp.)Sc和Sc-All菌株,卵孵化抑制率分别为100%和89.7%,而对根结线虫卵孵化的毒性致病杆菌属(*Xenorhabdus* spp.)SC菌株和SC-All则表现出较好的效果,卵孵化抑制率分别达到89.2%和78.2%。证明了昆虫病原线虫共生细菌对植物寄生线虫卵具有毒性。

关键词:昆虫病原线虫;共生细菌;大豆胞囊线虫;南方根结线虫;卵孵化;毒性

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

DOI:10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0896

Toxicity of Entomopathogenic Nematode Symbiotic Bacteria Strains on Eggs of Plant Parasite Nematodes

SONG Jie^{1,2}, XU Yan-li¹, YAO Qin¹

(1. Key Laboratory of Mollisols Agroecology, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Toxicity of entomopathogenic nematodes with symbiotic bacteria on egg hatching of the plant parasitic nematodes was examined. Four strains of entomopathogenic nematode symbiotic bacteria were isolated from different entomopathogenic nematodes including *Photorhabdus luminescens*-NJ, *Photorhabdus luminescens*-Hb(USA), *Xenorhabdus nematophilus*-Sc and *Xenorhabdus nematophilus*-Sc-All. The effect of the four strains on the egg hatching of plant parasitic nematodes was investigated. The result indicated that the four strains significantly inhibited egg hatching of these plant parasitic nematodes. The inhibition range was from 74.1% to 100% with soybean cyst nematodes and from 57.8% to 89.2% with *Meloidogyne incognita*. But suppressive effects were variable with different strains. The suppression of NJ and Hb(USA) strains were better than Sc and Sc-All strains on soybean cyst nematode, and the percentage of inhibition was 89.7% and 100% respectively. But strains of Sc and Sc-All suppressed on *Meloidogyne incognita* better by 78.2% and 89.2%. It demonstrated that the symbiotic bacteria was showed toxicity on the plant parasitic nematodes.

Key words: Entomopathogenic; Symbiotic bacteria; *Heterodera glycines*; *Meloidogyne incognita*; Egg hatching; Toxicity

大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*, Soybean Cyst Nematode, 简称 SCN)和根结线虫(*Meloidogyne* spp., Root Knot Nematode, 简称 RKN)是农业生产中较为常见且危害十分严重的两种寄生线虫,在美国2003~2005年由大豆胞囊线虫造成的经济损失每年可达约4.6亿~8.18亿美元^[1],而根结线虫在我国大部分地区均有发生,侵染农作物达百种以上,致使寄主作物常年减产13%~25%,严重时可达70%以上^[2]。植物寄生线虫病害因其具有寄主范围广,危害程度大,传播途径多等特点使之成为一

种极难防治的作物病害。目前常用的防治方法主要有化学防治、种植抗病品种及作物轮作等。近年来,人们逐渐认识到农药残留对环境及农产品质量的严重危害,使植物病害生物防治受到广泛关注。目前报道的植物寄生线虫生防真菌有淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)、节丛孢属(*Arthrobotrys*)、指隔孢属(*Daetylella*)和单顶孢属(*Monacrosporium*)等^[3]。相对于真菌研究已报道的线虫生防细菌种类较少,主要有巴氏杆菌属(*Pasteuria* spp.)、假单胞菌属(*Pseudomonas* spp.)和芽胞杆菌属(*Bacillus*

收稿日期:2014-01-12

基金项目:国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD21B01-15)。

第一作者简介:宋洁(1985-),女,硕士,主要从事农田有害生物控制研究。E-mail: songjieyabaobao@163.com。

通讯作者:许艳丽(1958-),女,研究员,博导,主要从事植物线虫病害、作物病虫害生物生态控制和土壤微生态研究。E-mail: xyll@iga.cn。

spp.)等^[4-5]。昆虫病原线虫由于体内携带共生细菌具有较高毒性可以杀死多种害虫,有研究者从中国不同地点分离到的昆虫病原线虫上获得1株致病杆菌SY5,这种共生细菌对玉米螟、小菜蛾、粘虫、甜菜夜蛾和黄粉虫等农田重要害虫均表现出较高的杀虫活性^[6-9]。昆虫病原线虫共生细菌是一类寄生于昆虫病原线虫肠道内细菌,主要包括致病杆菌属(*Xenorhabdus* spp.)和光杆状菌属(*Photorhabdus* spp.)等,分别与斯氏属(*Steinernema* spp.)和异小杆属(*Heterorhabditis* spp.)线虫共生^[10-12]。马丽丽等^[13]研究证明了昆虫病原线虫共生细菌发光杆菌的代谢产物能够明显抑制大豆胞囊线虫病虫卵孵化,并对大豆胞囊线虫二龄幼虫(J2)具有较高的致死作用。致病杆菌属(*Xenorhabdus* spp.)和光杆状菌属(*Photorhabdus* spp.)的无菌滤液对根结线虫(*Meloidogyne incognita*)二龄幼虫和卵也具有毒性^[14]。但是,昆虫病原线虫致病杆菌属和发光杆菌属对不同植物寄生线虫的毒性差异研究报道较少。为了寻找对植物寄生线虫高毒性的共生细菌,选择在斯氏属(*Steinernema* spp.)和异小杆属(*Heterorhabditis* spp.)4个品系昆虫病原线虫上分离到的共生细菌,探讨共生细菌对植物寄生线虫卵孵化抑制作用,以期筛选出毒力较强菌株,为大豆胞囊线虫和根结线虫生物防治提供新资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 寄主线虫 嗜菌异小杆线虫-NJ(*Heterorhabditis bacteriophora*-NJ)、斯氏线虫-ALL(*Steinernema carpocapsea*-ALL)、斯氏线虫(*Steinernema carpocapsea*)及嗜菌异小杆线虫(*Heterorhabditis bacteriophora*)。

1.1.2 植物寄生线虫卵 大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)卵由中国科学院东北地理与农业生态研究所(哈尔滨)试验田分离胞囊破碎后获得,该线虫为大豆胞囊线虫3号生理小种。

根结线虫卵由大庆市蔬菜大棚提供的番茄根中获得,为南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)。

大蜡螟(*Galleria mellonella*)由天津葡萄蜜虫养殖场提供,用于繁殖昆虫病原线虫、分离共生细菌。

1.1.3 培养基 NBTA^[12](共生细菌培养):营养琼脂45 g,溴百里酚兰(BTB)0.0025 g,红四氮唑0.04 g,蒸馏水1 000 mL,pH7.2~7.4;

TSY^[12](共生细菌液体培养):胰大豆肉汤40 g,酵母提取物5 g,蒸馏水1 000 mL。

1.2 试验方法

1.2.1 共生细菌分离鉴定 用供试4个品系寄主线虫分别侵染大蜡螟,23℃侵染16~24 h后,将含有共生细菌的体液分别滴到NBTA培养基上,划线接种后,置于25℃恒温培养48 h。观察菌落形态,在黑暗条件下观察是否发出生物光,并结合寄主线虫的种类进行初步鉴定。

1.2.2 共生细菌发酵液制备 将上述初生型菌落挑出,纯化后接种到TSY培养液中,25℃恒温摇床上200 r·min⁻¹培养72 h,12 000 r·min⁻¹ 4℃离心20 min,离心2次,4℃保存备用。

1.2.3 大豆胞囊线虫卵悬液制备 将取回的大豆田新鲜耕层土,置于烧杯中浸泡1 h,用强水流冲洗后,过40目、80目标准检验套筛。63%蔗糖溶液收集80目筛上物于50 mL离心管中,2 500 r·min⁻¹离心5 min,将上清放入200目、500目套筛清水冲洗后研磨,收集500目筛上物,35%蔗糖溶液中,2 500 r·min⁻¹离心5 min,用1% NaClO溶液对卵消毒3 min,反复冲洗后,灭菌水制备卵悬液,将其浓度调整为5 000 卵·mL⁻¹。

1.2.4 根结线虫卵悬液制备 取被根结线虫侵染的番茄病根,剪成0.5~1.0 cm的小段,用1% NaClO消毒5 min,置于200目及500目标准检验套筛上反复冲洗后,研磨200目筛上物,反复冲洗后,用1% NaClO溶液对500目上卵消毒3 min,灭菌水制备卵悬液,将其浓度调整为5 000 卵·mL⁻¹。

1.2.5 植物寄生线虫卵孵化测定 在无菌24孔细胞培养板中加入上述4个品系共生菌发酵液各1 mL,然后分别加入根结线虫和胞囊线虫卵悬液40 μL(每孔约为200个)。以等量灭菌水为对照,每个处理3次重复。25℃恒温培养,15 d后计数孵化出的J2数量。计算孵化抑制率。试验重复3次。

孵化抑制率(%)=(对照孵化线虫数-处理孵化线虫数)×100/对照孵化线虫数

1.3 数据分析

采用Excel 2003进行数据处理,采用SPSS 17.0进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 昆虫病原线虫共生细菌的分离获得

昆虫病原线虫共生细菌在25℃条件下暗培养48 h后,初生菌落的形态特征为:菌落凸起,圆形,大小为1~3 mm,具有不规则边缘且不透明等独特的菌落形状,在NBTA培养基上由于吸收溴百里酚蓝染料时菌落呈现蓝色,且初生菌落在NA培养基上具有群游习性。发光杆菌属的初生菌落具有较

强的粘着性,且在黑暗条件下可以发出生物光。由于此类细菌与其宿主线虫之间为专一性寄生关系,

并结合其菌落形态特征将分离出的 4 种昆虫病原线虫共生细菌进行初步鉴定,鉴定结果见表 1。

表 1 昆虫病原线虫及其共生细菌

Table 1 Entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria

寄主线虫 Parasitic nematode	共生细菌 Symbiotic bacteria	品系 Strain
嗜菌异小杆线虫-NJ <i>Heterorhabditis bacteriophora</i> -NJ	<i>Photorhabdus luminescens</i>	NJ
嗜菌异小杆线虫 <i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Photorhabdus luminescens</i>	Hb(USA)
斯氏线虫 <i>Steinernema carpocapsea</i>	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Sc
斯氏线虫-ALL <i>Steinernema carpocapsea</i> -ALL	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>	Sc-All

2.2 昆虫病原线虫共生细菌发酵液对大豆胞囊线虫卵孵化的影响

大豆胞囊线虫卵在 4 个品系共生细菌发酵液中孵化 15 d 后调查结果显示,4 个品系共生细菌发酵液均表现出了较强的大豆胞囊线虫卵孵化抑制作用,孵化抑制率范围为 74.1%~100% (图 1)。不同品系共生细菌对大豆胞囊线虫卵孵化的抑制作用存在差异,光杆菌属 (*Photorhabdus* spp.) NJ 菌株对大豆胞囊线虫卵孵化的抑制作用最强,达到了 100%,致病杆菌属 (*Xenorhabdus* spp.) Sc-All 菌株孵化抑制率低于其他 3 种,为 74.1%,与光杆菌属 NJ 菌株相比差异显著 ($P \leq 0.05$)。光杆菌属 Hb(USA) 和致病杆菌属 Sc 两个品系共生细菌对大豆胞囊线虫孵化抑制率分别为 88.7% 和 83.3%。结果表明光杆菌属对大豆胞囊线虫卵孵化抑制作用好于致病杆菌属。

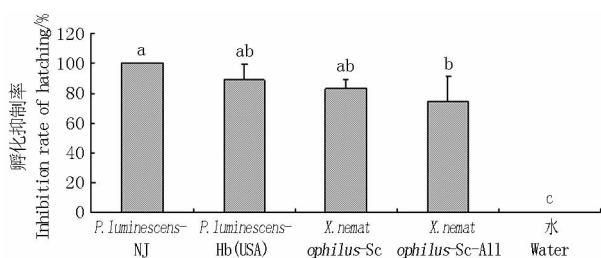


图 1 共生细菌发酵液对大豆胞囊线虫卵孵化的影响

Fig. 1 Effect of symbiotic bacteria metabolites on egg hatching of SCN

2.3 昆虫病原线虫共生细菌发酵液对根结线虫卵孵化的影响

如图 2 所示,共生细菌发酵液对根结线虫卵孵化的抑制率范围在 57.8%~89.2%。致病杆菌属 Sc 和 Sc-All 菌株对根结线虫卵孵化均表现出较强的抑制作用,孵化抑制率分别为 89.2% 和 78.2%。光杆菌属 NJ 菌株和 Hb(USA) 菌株卵孵化抑制率分别为 57.8% 和 66.4%,其中致病杆菌属 Sc 菌株孵化抑制率显著高于光杆菌属 NJ 菌株和 Hb(USA) 菌株 ($P \leq 0.05$)。这 4 个品系昆虫病原线虫共生细菌对根结线虫卵孵化都达到了较强的抑制作用,其中

致病杆菌属菌株对根结线虫卵孵化的抑制效果优于光杆菌属。

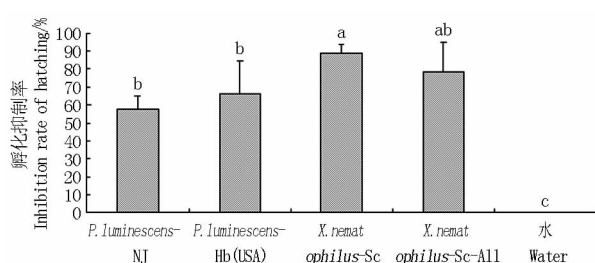


图 2 共生细菌发酵液对根结线虫卵孵化的影响

Fig. 2 Effect of symbiotic bacteria metabolites on egg hatching of RKN

3 结论与讨论

试验证明了致病杆菌属和光杆菌属共生细菌对大豆胞囊线虫和根结线虫卵的毒性,4 个品系共生细菌对植物寄生线虫卵孵化表现出了不同的抑制作用。抑制作用表明,光杆菌属共生细菌 NJ 和 Hb(USA) 菌株对大豆胞囊线虫卵孵化的抑制效果要好于两种致病杆菌属共生细菌,且 NJ 菌株对大豆胞囊线虫卵孵化的抑制率可以达到 100%;其对根结线虫卵孵化的抑制作用却表现不同,致病杆菌属菌株抑制作用明显高于光杆菌属。这可能是由于不同共生细菌产生了不同的杀线活性物质,而不同植物寄生线虫卵对这些毒性物质的耐受性也存在差异,以致这 4 种昆虫病原线虫共生细菌和不同的植物寄生线虫之间表现出不一致的作用。

近年研究发现,昆虫病原线虫共生细菌可以产生多种抑菌物质、杀虫蛋白和胞外酶等杀虫活性物质^[15],是一种具有潜力的生防因子。斯氏 (*Steinernema* spp.) 线虫和异小杆 (*Heterorhabditis* spp.) 线虫分别携带共生菌 *Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus*,能够释放抗生素物质^[16],并对线虫具有选择性灭杀作用^[17]。*Xenorhabdus* 和 *Photorhabdus* 的发酵滤液对南方根结线虫 J2、卵孵化和松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 的幼虫及成虫均能产生毒性作用^[18-19]。Samaliev 等^[20]研究 *Xenorhabdus nematophi-*

lus 对爪哇根结线虫 (*Meloidogyne javanica*) 的作用认为,其代谢产物能够降低根结线虫卵孵化率。致病杆菌属共生细菌主要产生以下 3 类抑菌物质:二硫吡咯类抑菌物、水溶性的苯并茛类和吡啶类衍生物^[21]。而光杆菌属共生细菌所产生的抑菌物质主要包括蒽醌类物质和羟化二苯乙烯^[22]。这些物质可能与共生细菌对植物寄生线虫的抑制作用有关,且这两个属的共生细菌由于其所含的活性物质不同,也可能会对线虫产生不同的抑制作用。有研究发现,从发光杆菌属共生细菌 MD 发酵滤液中提取到两种杀线虫活性物质:3,5-二羟基-4-异丙基氏(ST)和吡啶,其中 ST 能够抑制一些 *Steinernema* spp. 线虫,但对 *Heterorhabditis* spp. 无作用效果^[23]。Mathiu 等^[24]研究了 3 种昆虫病原线虫共生细菌 *Photorhabdus luminescens* 对秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的影响,结果表明不同共生细菌代谢产物对秀丽隐杆线虫的存活、发育、繁殖以及取食造成的影响存在差异。但致病杆菌属 (*Xenorhabdus* spp.) 和光杆菌属 (*Photorhabdus* spp.) 共生细菌对大豆胞囊线虫和根结线虫卵孵化抑制作用的差异,是否由于产生的抑菌物质不同造成还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Wrather J A, Koenig S R. Estimates of disease effects on yields in the United States 2003 to 2005 [J]. *Journal of Nematology*, 2006, 38:173-180.
- [2] 刘维志. 植物病原线虫学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2000: 281-294. (Liu W Z. Plant pathogenic nematology [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2000: 318-355.)
- [3] 李田田. 湖北蔬菜根结线虫的防治研究-品种抗性筛选及淡紫拟青霉防治研究效果评价 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2012. (Li T T. Study on the control of vegetable root-knot nematodes in Hubei--screening resistant cultivars and evaluation of biological control effect of *Paecilomyces lilomyces* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.)
- [4] Riggs R D, Wrather J A. Biology and management of the soybean cyst nematode [J]. *The American Phytopathological Society*, 1992, 3:30-35.
- [5] Oostendorp M, Sikora R A. *In-vitro* interrelationships between rhizosphere bacteria and *Heterodera schachtii*. [J]. *Revue Nematologica*, 1990, 13:269-274.
- [6] Smart G C. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects [J]. *Journal of Nematology*, 1995, 27(4S):529-534.
- [7] Juliana M S, Marina S D, Rodrigo L B, et al. Characterization of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria active against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) and contribution of bacterial urease to the insecticidal effect [J]. *Biological Control*, 2012, 63:253-263.
- [8] Thomas G M, Poinar G O. *Xenorhabdus* gen. nov. a genus of entomopathogenic nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae* [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1979, 29:352-360.
- [9] Boemare N E, Akhurst R J, Mourant R G. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (*Enterobacteriaceae*), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. [J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993, 43:249-255.
- [10] Bedding R, Akhurst R. Nematodes and the biological control of insect pests [J]. *Environmental Entomology*, 1995, 24(1):161-164.
- [11] Rahoo A M, Tariq M, Simon R, et al. Virulence of entomopathogenic bacteria *Xenorhabdus bovienii* and *Photorhabdus luminescens* against *Galleria mellonella* Larvae [J]. *Pakistan Journal of Zoology*, 2011, 43(3):543-548.
- [12] 马丽丽, 许艳丽, 李春杰, 等. 发光杆菌 NJ 代谢物对大豆胞囊线虫的作用研究 [J]. *中国油料作物学报*, 2008, 30(3):370-373. (Ma L L, Xu Y L, Li C J, et al. Effect of *Photorhabdus* sp. NJ metabolites on *Heterodera Glycines* [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2008, 30(3):370-373.)
- [13] 马丽丽, 许艳丽, 台莲梅. 昆虫病原线虫共生细菌对植物病原菌的抑制作用 [J]. *植物保护*, 2007, 33(4):7-11. (Ma L L, Xu Y L, Tai L M. Antimicrobial activity of the symbiotic bacteria of entomopathogenic nematode against plant pathogens [J]. *Plant Protection*, 2007, 33(4):7-11.)
- [14] Hua W, Hui D, Qian H T, et al. Isolation, Bioassay and characterization of *Xenorhabdus* sp. SY5, a highly virulent symbiotic bacterium of an entomopathogenic nematode isolated from China [J]. *Nematology*, 2013, 15(2):153-163.
- [15] Samaliev H Y, Anderoglou F I, Elawad S A, et al. The nematocidal effects of the *Pseudomonas Oryzihabitans* and *Xenorhabdus nematophilus* on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* [J]. *Nematology*, 2000, 2:507-514.
- [16] Samaliev H Y, Anderoglou F I, Elawad S A, et al. The nematocidal effects of the *Pseudomonas oryzae* and *Xenorhabdus nematophilus* on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* [J]. *Nematology*, 2000, 2:507-514.
- [17] Forst S, Neilson K. Molecular biology of the symbiotic pathogenic bacteria *Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus* spp. [J]. *Microbiological Reviews*, 1996, 60:21-43.
- [18] Grewal P S, Converse V, Georgis R. Influence of Production and bioassay methods on infectivity of two ambush foragers (*Nematoda*: *Steinernematidae*) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, 73:40-44.
- [19] Hu K, Li J, Webster J M. Mortality of plant-parasitic nematodes caused by bacterial (*Xenorhabdus* spp. and *Photorhabdus luminescens*) culture media [J]. *Journal of Nematology*, 1995, 27:502-503.
- [20] Grewal P S, Converse V, Georgis R. Influence of production and bioassay methods on infectivity of two Ambush Foragers (*Nematoda*: *Steinernematidae*) [J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1999, 73:40-44.
- [21] Li J X, Chen G H, Webster J M. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (*Enterobacteriaceae*) [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1997, 43:770-773.
- [22] Richardson W H, Schmidt T M, Neilson K H. Identification of an anthraquinone pigment and hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus Luminescens* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1988, 54:1602-1609.
- [23] Hu K, Li J, Webster J M. 3,5-dihydroxy-4-isopropylstilbene: a selective nematocidal compound from the culture filtrate of *Photorhabdus luminescens* [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1996, 18:104.
- [24] Sicard M, Hering S, Schulte R. The effect of *Photorhabdus Luminescens* (*Enterobacteriaceae*) on the survival, development, reproduction and behavior of *Caenorhabditis Elegans* (Nematoda: *Rhabditidae*) [J]. *Environmental Microbiology*, 2007, 9(1):12-25.