

根结线虫放线菌及其生物防治活性研究

罗红丽<sup>1,2</sup>, 孙漫红<sup>1\*</sup>, 谢建平<sup>2</sup>, 刘志恒<sup>1</sup>, 黄 英<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(<sup>2</sup> 西南师范大学生命科学学院 现代生物医药研究所 重庆 400715)

摘 要 :从感染植物根部的根结线虫卵和雌虫中 ,分离得到放线菌 20 株。形态、细胞壁氨基酸组分和 16S rRNA 基因序列分析表明 ,分离菌株分属于链霉菌属( *Streptomyces* )、诺卡氏菌属( *Nocardia* )和假诺卡氏菌属( *Pseudonocardia* ) ,其中链霉菌占 80.0%。分离菌株对根结线虫 *Meloidogyne* spp. 卵的平均寄生率、卵的孵化率、幼虫死亡率分别为 54.1%、40.4%和 26.2%。根据体外测试的结果 ,选择具有高效致病力的 3 株链霉菌( 1-17、2-6、9-47 )和 1 株诺卡氏菌( 5-1 )进行温室番茄防效测试 ,其生防效率分别为 31.4%、37.7%、56.4%和 42.4%。

关键词 :放线菌 ;多样性 ;根结线虫 ;防效

中图分类号 :Q938.2 文献标识码 :A 文章编号 :1001-6209 ( 2006 ) 04-0598-04

根结线虫( *Meloidogyne* spp. )是一类广泛寄生于植物根部的病原生物 ,对蔬菜、果树和药用植物等经济农作物造成严重危害<sup>[1]</sup>。过去对根结线虫的防治多采用化学杀虫剂<sup>[2]</sup> ,不但生产成本高 ,而且毒性大、残留多 ,对环境造成了极大污染<sup>[3]</sup>。

放线菌被认为是抗生素的主要产生菌。近几十年来 ,陆续发现了由放线菌产生的莫比霉素( Milbemycin )、南昌霉素( Nanchangmycin )和阿维菌素( Avermectins )等高活性杀线虫抗生素 ,其中阿维菌素的应用已取得良好效果<sup>[4,5]</sup>。但较高的生产成本和线虫对其产生的抗药性问题引起了人们的关注 ,因此寻找一类理想的杀线剂 ,将是一项相当必要的工作。一直以来 ,对于控制植物寄生线虫的研究主

要集中在真菌 ,对放线菌的研究仅仅在其代谢产生的活性物质方面 ,真正把放线菌作为活体菌剂来防治植物寄生线虫的研究却很少 ,且尚未见成功报道<sup>[6~8]</sup>。本文从根结线虫放线菌的分离、鉴定到生防测试作了比较系统的工作 ,以期探索放线菌在根结线虫中的种群分布并找寻有应用前景的生防菌株。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 采样 :从北京、河北、山东、湖北、云南、海南的 9 个不同地点 ,采集被根结线虫寄生的植物根部 ,塑料袋密封于 4℃ 保藏 ,一周内处理样品( 表 1 )。

表 1 根结线虫采集样品概况

Table 1 Sampling description of root-knot nematodes

Sample No.	Sampling site	Crop-host plant	Number of isolates	
			From egg	From female
1	Fengtai ,Beijing	Cucumber	0	1
2	Danzhou ,Hainan	Bean	0	1
3	Ledong ,Hainan	Tomato	1	0
4	Ledong ,Hainan	Cucumber	1	0
5	Shanya ,Hainan	Balsam pear	0	1
6	Shijiazhuang ,Hebei	Peanut	3	0
7	Yongnian ,Hebei	Cucumber	3	0
8	Yongnian ,Hebei	Tomato	1	0
9	Qingzhou ,Shandong	Peanut	3	0
10	Qingzhou ,Shandong	Tobacco	2	0
11	Eshan ,Yunnan	Tobacco	4	0

基金项目 :国家“ 863 计划”( 2004AA227100、2001AA246011 )

\* 通讯作者。Tel 86-10-62658587 ;E-mail :sunmh@im.ac.cn ;86-10-62553628 ;E-mail :huangy@im.ac.cn

作者简介 :罗红丽( 1975 - ) ,女 ,重庆北碚人 ,硕士研究生 ,主要从事放线菌系统学研究。E-mail :luohl2005@eyou.com

收稿日期 :2005-09-22 ;接受日期 :2005-11-16 ;修回日期 :2005-11-25

**1.1.2 培养基:**ISP2 培养基每升水含 4g 葡萄糖、4g 酵母提取物、10g 麦芽提取物、2g  $\text{CaCO}_3$  和 15g 琼脂。液体培养基每升水含 10g 葡萄糖、10g 可溶性淀粉、15g 大豆粉、1g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ 、0.5g  $\text{MgSO}_4$ 、0.5g  $\text{NaCl}$ 、0.01g  $\text{FeSO}_4$  和 1g  $\text{CaCO}_3$ 。

**1.1.3 主要试剂和仪器:**PCR 试剂购于上海申能博彩公司,倒置显微镜。

## 1.2 病根采集和卵、雌虫收集

根据植物地上部分的症状,将采集的病根和土一起放入塑料袋中。用  $30\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$  孔径筛网分别收集病根中的卵和雌虫,用 1% 的次氯酸钠( $\text{NaClO}$ )处理 1min 后,无菌水冲洗 3 次去掉残留的  $\text{NaClO}$ <sup>[9]</sup>。经过以上消毒步骤,附生在虫卵或幼虫上的细菌或真菌均不能存活。

## 1.3 菌株的分离、纯化和保藏

将一定浓度的卵悬液涂布于 PDA(Potato dextrose agar)培养基上(约 300 个/皿);将消毒的雌虫夹碎,在 PDA 平板上多处点接,28℃ 培养。待长出放线菌落后,将其挑至 ISP 2(yeast extract-malt extract agar)培养基上纯化,并刮取纯培养物于 20% 甘油中 -20℃ 保藏。

## 1.4 形态培养特征观察

使用 ISP2 培养基和插片法。显微镜观察形态,肉眼观察培养特征,记录气丝、基丝和色素情况<sup>[10]</sup>。

## 1.5 细胞壁氨基酸分析

采用 Hasegawa 的薄层层析法<sup>[11]</sup>(Thin layer chromatography)进行细胞壁二氨基庚二酸(DAP)组分分析。

## 1.6 16S rRNA 的 PCR 扩增和序列分析

按 Chun 等<sup>[12]</sup>报道的方法提取总 DNA 和 PCR 扩增 16S rRNA 基因,引物为通用保守引物 27f 和 1495r。测序由北京诺赛基因组研究中心完成。测序结果与 GenBank 数据库中的已知序列进行 BLAST,确定分离菌株的分类地位。

## 1.7 分离菌株对虫卵的致病力试验

**1.7.1 菌株孢子悬液的制备:**将平板上生长的菌落移入装有 5mL 无菌 0.05% Tween-80 的离心管内,漩涡震荡 1min 即得孢子悬液。使用显微镜和血球计数板调整孢子浓度为  $10^5$  个/mL。

**1.7.2 虫卵悬液的制备:**从被 *Meloidogyne hapla*(北方根结线虫)感染的温室盆栽烟草根部收集虫卵,并悬浮于蒸馏水中,浓度约为 6000 个/mL。

**1.7.3 放线菌孢子对根结线虫卵的作用:**取

0.05mL 卵悬液和 1mL 孢子悬液,滴入 24 孔细胞培养板中,28℃ 共培养 4d 后,在倒置显微镜下随机观察 100 个卵,将从卵里或卵外长出菌丝的卵再培养 3d 后,确定卵的孵化率和幼虫死亡率。

## 1.8 室温盆栽试验

**1.8.1 生防试剂(Biocontrol Agents, BCAs)的制备:**选出卵寄生率和幼虫死亡率相对较高的 4 株菌(1-17, 2-6, 5-1, 9-47),制成  $10^5$  个/mL 的孢子悬液,取 5mL 接种于 150mL 的液体培养基中,28℃ 培养 3~7d 后,加入吸附剂:草炭:硅藻土 = 1:1)与液体培养基等体积混合,室温避光干燥制成粉末。

**1.8.2 盆栽试验:**将 BCAs 加入无菌土壤(0.08mg/g 土)混合均匀后,装入 72 孔塑料盘中。将两粒番茄种子撒入每个小孔培育 3 周后,幼苗移栽到  $\Phi 10\text{cm}$  塑料钵里,其内装有 5000 个 *Meloidogyne hapla* 卵和 5g BCAs 混合的土壤,30℃ 培养两月后,取出植物根部确定病情指数。

# 2 结果

## 2.1 分离菌株的形态特征

从 11 份根部样品中共分离得到形态或培养特征各异的放线菌 20 株。其中 16 株具有柔曲或螺旋的孢子链,基丝无横隔、不断裂;3 株气丝稀少不形成孢子链,或基丝、气丝断裂;1 株顶向出芽、气丝缢缩断裂形成孢子。

## 2.2 胞壁氨基酸分析

分离菌株有两种不同的二氨基庚二酸组成:① 16 株(1-4, 1-6, 1-12, 1-16, 1-17, 1-18, 1-19, 1-25, 2-1, 2-2, 2-6, 2-8, 3-4, 6-14, 9-47, 12-92)只含 LL-DAP;② 4 株(1-1, 2-4, 2-11, 5-1)只含 meso-DAP。结合形态和 DAP 组成,可以确定①为链霉菌②为稀有放线菌。

## 2.3 16S rRNA 基因序列分析

序列分析结果显示(表 2),分离菌株中 16 株为链霉菌、3 株为诺卡氏菌、1 株为假诺卡氏菌。

## 2.4 分离菌株对根结线虫卵的致病力测试

选取 14 株分离菌进行卵寄生率、卵孵化率、幼虫死亡率测试。结果表明:绝大多数分离菌株对卵表现出了较高的寄生率并抑制了卵的孵化,所有菌株对幼虫都有致死作用(表 3)。

## 2.5 分离菌株的防效

所有分离菌株中,3 株链霉菌(1-17, 2-6, 9-47)和 1 株诺卡氏菌(5-1)具有较高的防效,分别为 31.4%、37.7%、56.4% 和 42.4%(表 3)。

表 2 分离菌株的分类从属关系

Table 2 Phylogenetic affiliations of isolates based on 16S rRNA gene sequence

Strain No.	The closest species	Sequence similarity/%
1-1	<i>Pseudonocardia antarctica</i>	99.6
1-4	<i>Streptomyces thernocarboxydus</i>	100.0
1-6	<i>S. rubrogriseus</i>	99.6
1-12	<i>S. coeruleorubidus</i>	99.0
1-16	<i>S. griseus</i>	100.0
1-17	<i>S. griseus</i>	99.8
1-18	<i>S. flavogriseus</i>	100.0
1-19	<i>S. flavogriseus</i>	99.5
1-25	<i>S. tauricus</i>	99.8
2-1	<i>S. griseus</i>	100.0
2-2	<i>S. albus</i>	99.8
2-4	<i>Nocardia nova</i>	100.0
2-6	<i>S. capoamus</i>	99.6
2-8	<i>S. flavogriseus</i>	100.0
2-11	<i>Nocardia nova</i>	98.7
3-4	<i>S. canescens</i>	99.3
5-1	<i>Nocardia carnea</i>	98.9
6-14	<i>S. capoamus</i>	99.7
9-47	<i>S. rubrogriseus</i>	98.9
12-92	<i>S. albogriseolus</i>	99.2

表 3 分离菌株对虫卵致病力及生物防效测试

Table 3 Nematode pathogenicity and biocontrol efficacy tests of actinomycetes isolates against *Meloidogyne hapla*

Strain No.	Egg parasitism /%	Egg hatching /%	Juvenile mortality/%	Control efficacy/%
1-1	20.3	72.7	12.5	
1-4	55.8	26.8	11.5	
1-6	67.0	32.3	30.5	
1-12	2.1	22.9	28.1	
1-17	100.0	42.0	49.2	31.4
1-18	6.1	100.0	14.3	
2-2	00.0	9.7	20.0	
2-4	58.0	34.2	14.8	
2-6	100.0	56.9	42.7	37.7
2-8	41.8	32.0	33.3	
2-11	11.3	40.8	10.0	
5-1	100.0	17.9	24.6	42.4
6-14	95.0	36.8	13.5	
9-47	100.0	41.1	61.5	56.4
Average %	54.1	40.4	26.2	
PC				94.8

PC(pesticide control)=1.8% avermectin.

3 讨论

目前,对于定殖或寄生于根结线虫和胞囊线虫雌虫和卵上的真菌进行了大量研究,但对于定殖或寄生于线虫卵和雌虫的放线菌的研究还很少。我们对其进行研究,一方面是为了了解放线菌在线虫和虫卵中的种群分布情况,另外还希望从土壤以外的生境中,找到产生新生物活性物质和具有生防潜能

的放线菌菌株。

放线菌在自然环境中的分布非常广泛,其中链霉菌在许多生物环境中都是优势菌群。本实验从植物病根的根结线虫中,分离得到3个不同属的放线菌20株,其中链霉菌的数量同样占绝对优势,但分离菌株的数量和种类都不如自然环境多。推测这可能与分离方法、培养时间和两类生物间的互作有一定关系。

放线菌作为一类控制植物病原传播的重要微生物资源,对病原生物有很高的拮抗作用和寄生性<sup>[8,13]</sup>。我们测定分离菌株对卵的寄生率、卵孵化率和幼虫死亡率,是为了筛选生防效果较好的菌株。研究表明,大多数链霉菌和诺卡氏菌对卵的寄生率和幼虫死亡率都比较高,假诺卡氏菌较低。链霉菌和诺卡氏菌都是重要生物活性物质的产生菌<sup>[14~16]</sup>,所以我认为:分离菌株与根结线虫的拮抗机制可能与菌株的代谢产物有关。

放线菌作为根结线虫的生防菌株具有巨大的潜能<sup>[2]</sup>,从温室盆栽试验结果看,和 *Streptomyces rubrogriseus*(红灰链霉菌)、*Streptomyces capoamus*(上升岛链霉菌)、*Streptomyces griseus*(灰色链霉菌)和 *Nocardia carnea*(肉色诺卡氏菌)4个种亲缘关系较近的菌株生防效率相对较高。灰红链霉菌和肉色诺卡氏菌的活性产物先前未见报道;灰色链霉菌和上升岛链霉菌已报道产生多种活性物质,但我们的分离菌株对线虫的防效并未达到预期结果。我们推测引入的分离菌株对根结线虫进行生物防治受到诸多因素的影响。一方面,作物、线虫和生防菌之间相互作用,在很大程度上影响了生防菌对线虫的寄生;另一方面,生防菌与土壤微生物间的拮抗作用、土壤的温度、湿度和质地等外界因素也将制约生防效果。所以进一步弄清生防菌株与影响因素的相互关系和作用机制,将成为提高生防效率的关键。

致谢 感谢中国科学院微生物研究所刘杏忠研究员对本文的建议和指正。

参 考 文 献

[1] Hickey KD. Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens. St. Paul, Minn: The American Phytopathological Society Press, 1986: 283.  
[2] 刘杏忠, 张克勤, 李天飞, 等. 植物寄生线虫生物防治. 北京: 中国科学技术出版社, 2004.  
[3] 杨树军, 雷丽萍, 祝明亮, 等. 烟草根结线虫生物防治方法应用研究. 西南农业学报, 2004, 17: 151-154.  
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [ 4 ] Schulman MD , Valentino D , Hensens O. Biosynthesis of the avermectins by *Streptomyces avermitilis*. Incorporation of labeled precursors. *J Antibiot* ,1986 **39**( 4 ) 541 – 549.
- [ 5 ] 蒋琳,马承铸.生物农药研究进展.上海农业学报,2000 **16**: 73 – 77.
- [ 6 ] Mishra SK ,Keller JE ,Miller JR ,et al. Insecticidal and nematicidal properties of microbial metabolites. *Journal of Industrial Microbiology* ,1987 **2** 267 – 276.
- [ 7 ] Dicklow MB ,Acosta N ,Zuckerman BM. A novel *Streptomyces* species for controlling plant-parasitic nematodes. *Journal of Chemical Ecology* ,1993 **19** :159 – 173.
- [ 8 ] Park JO ,El-Tarabily KA ,Ghisalberti EL ,et al. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Lett Appl Microbiol* ,2002 , **35** 361 – 365.
- [ 9 ] Hussey RS ,Barker KR. A comparison of methods of collecting inocula for *Meloidogyne* spp. , including a new technique. *Plant Dis Rep* ,1973 **57** :1025 – 1028.
- [ 10 ] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组.链霉菌鉴定手册.北京:科学出版社,1975.
- [ 11 ] Hasegawa T ,Takizawa M ,Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *J Gen Appl Microbiol* ,1983 **29** : 319 – 322.
- [ 12 ] Chun J ,Goodfellow M. A phylogenetic analysis of the genus *Nocardia* with 16S rRNA gene sequence. *Int J Syst Bacterial* ,1995 **45** :240 – 245.
- [ 13 ] Nishimura T ,Meguro A ,Hasegawa S ,et al. An endophytic actinomycete , *Streptomyces* sp. AOK-30 , isolated from Mountain Laurel and its antifungal activity. *J Gen Plant Pathol* ,2002 **68** :390 – 397.
- [ 14 ] Goodfellow M ,Simpson KE. Ecology of *Streptomyces* . *Frontiers in Applied Microbiology* ,1987 **2** :97 – 125.
- [ 15 ] Aoki H ,Sakai H ,Kohsaka M ,et al. Nocardicin A , a new monocyclic beta-lactam antibiotic I Discovery ,isolation and characterization. *J Antibiot* ,1976 **29** :492 – 500.
- [ 16 ] Tanaka Y ,Komaki H ,Yazawa K ,et al. Brasilinolide A , a new macrolide antibiotic produced by *Nocardia brasiliensis* : producing strain ,isolation and biological activity. *J Antibiot* ,1997 **50** :1036 – 1041.

## Diversity of actinomycetes associated with root-knot nematode and their potential for nematode control

LUO Hong-li<sup>1,2</sup> ,SUN Man-hong<sup>1\*</sup> , XIE Jian-ping<sup>2</sup> ,LIU Zhi-heng<sup>1</sup> ,HUANG Ying<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Microbiology ,Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China)

(<sup>2</sup> College of Life Science ,South-West Normal University ,Chongqing 400715 ,China)

**Abstract** :Twenty actinomycetes were isolated from root-knot nematode eggs and females collected from 11 plant root samples infested by *Meloidogyne* spp. . The isolates were assigned to the genera *Streptomyces* , *Nocardia* and *Pseudonocardia* respectively , based on analysis of morphological characteristics , cell-wall DAPs and 16S rRNA gene sequences. 80% of them were streptomycetes. Biocontrol potential of the isolates against *Meloidogyne* hapla was evaluated in liquid culture in vitro. The average percentages of egg parasitism , egg hatching , and juvenile mortality were 54.1 , 40.4 and 26.2 , respectively. Three *Streptomyces* strains and one *Nocardia* strain with high pathogenicity in vitro were selected to determine their ability to reduce tomato root galls in greenhouse. The results demonstrated good biocontrol efficacy ( 31.4% ~ 56.4% ) of the strains.

**Keywords** : Actinomycetes ; Diversity ; Root-knot nematode ; Biocontrol efficiency

Foundation items :National Programs for High Technology Research and Development of China ( 2004AA227100 & 2001AA246011 )

\* Corresponding author. Tel : 86-10-62658587 ;E-mail : sunmh@im.ac.cn & 86-10-62553628 ; huangy@im.ac.cn

Received 22 September 2005 /Accepted :16 November 2005 /Revised 25 November 2005