

挥发性物质诱吸线虫的土壤细菌系统多样性特征及其活性挥发物鉴定

郝玉娥¹, 牟贵平², 何爱桃¹, 奚家勤³, 杨发祥⁴, 莫明和^{2*}

¹南华大学公共卫生学院, 衡阳 421001

²云南大学生物资源保护与利用重点实验室, 昆明 650091

³中国烟草总公司郑州烟草研究院, 郑州 450001

⁴云南云叶化肥股份有限公司, 昆明 650217

摘要:【目的】明确有机挥发物诱吸线虫的土壤细菌种群多样性及其活性挥发物, 有助于了解线虫与土壤微生物间的互作关系, 为利用诱吸性物质与杀线虫剂配合使用, 提高防治寄生线虫效果奠定基础。【方法】通过双培养皿倒扣法筛选我国 26 个省市的 187 份农业土壤中挥发性诱吸线虫的细菌资源, 测定其诱吸活性, 并结合 RFLP-16S rRNA 方法分析活性细菌的系统亲缘关系; 采用 SPME-GC/MS 方法鉴定其挥发物的类型, 并通过纯品进行诱吸功能验证。【结果】从分离自 187 份土样的 3800 株细菌中, 筛选出诱吸活性 (AN) $\geq 30\%$ 的细菌共 196 株, 占总数的 5.16%。其中 66 株显示强诱吸线虫活性 (AN) $\geq 70\%$, 占总数的 1.74%; 62 株显示中等活性 ($50\% \leq AN < 70\%$), 占总数的 1.63%; 68 株显示弱活性 ($30\% \leq AN < 50\%$), 占总数的 1.79%。系统发育分析结果表明, 196 株挥发物诱吸线虫的细菌分属于芽胞杆菌纲、 γ -变形菌纲、 α -变形菌纲、鞘脂杆菌纲和放线菌纲, 芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 的种类最多, 共 13 种。通过 SPME-GC/MS 分析及纯品验证, 确定了细菌产生的 11 种诱吸线虫的挥发性物质: 苯甲醛, 2-庚酮, 苯甲酸苄酯, 十六酸乙酯, 长叶烯, 苯醇, 对甲氧基苯甲醛, 4-羟基苯丙酮, 丁酸乙酯, 3-羟基-4-甲氧基苯甲醛, D-氨基丙醇。【结论】在农业土壤中存在某些细菌可以产生特定的有机代谢挥发物诱吸线虫。

关键词: 土壤细菌, 诱吸线虫挥发物

中图分类号: Q939 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2011)11-1454-07

线虫是土壤中的重要物种之一, 其中植物寄生线虫给农业带来了巨大危害, 仅根结线虫全球每年损失在 1000 亿美元以上^[1]。土壤微生物的代谢产物中蕴藏着丰富的功能性有机挥发物, 其中包括多种杀线虫物质和抗菌物质。细菌有机挥

发物在细菌与线虫的相互作用中扮演重要角色, 其功能之一是直接对线虫的毒杀作用。Gu 等^[2]在随机测定的 360 株细菌中, 273 株 (占 75.3%) 细菌有机挥发物对松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 有杀虫活性, 其中 14 株 (占 3.9%) 对多

基金项目: 国家重大水专项 (2009ZX07102-004, 2012ZX07102-003); 国家自然科学基金 (30970100, 31160376); 郑州烟草研究院科技项目 (122009CZ0420); 湖南省教育厅科技项目 (09C828); 国家发改委绿色农用生物产品专项; 云南省应用基础科研项目 (2011FA002)

* 通信作者。Tel: +86-871-5031396; Fax: +86-871-5034838; E-mail: minghemo@yahoo.com.cn

作者简介: 郝玉娥 (1978-), 女, 山西平遥人, 实验师, 从事功能及病原微生物研究。E-mail: haoyuhe@hotmail.com

收稿日期: 2011-05-05; 修回日期: 2011-09-01

种线虫显示了100%的活性。Huang等^[3]鉴定了巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的5种杀线虫挥发物。其功能之二是作为线虫嗅觉趋化性物质,诱吸线虫靠近或使线虫避让细菌。嗅觉趋化性是线虫中常见的一种行为^[4]。这些气味性物质被认为与线虫的趋化行为以及线虫对食物的选择和对其天敌的感知有关^[5-6]。细菌与其宿主线虫如何相遇并发生侵染作用,是阐明微生物侵染线虫过程的重要问题之一。Niu等^[7]从土壤中筛选出1株具有较强杀线虫活性的细菌B16,该菌株能释放苯甲醛和2-庚酮等芳香挥发性物质引诱线虫靠近,进而分泌毒力极强的胞外蛋白酶Bae16和Bac16侵染线虫,证实了肠道损伤是导致线虫死亡的主要原因,胞外蛋白酶很可能降解一些维持线虫生命的蛋白质,如肌球蛋白、ATP酶相关蛋白等,加速了线虫的死亡。

前人的上述研究结果显示挥发性物质在微生物与线虫间的互作关系中有特殊的功能,阐明微生物的类群及其产生的功能性挥发物有助于揭示微生物与宿主间的相互作用关系,然而目前这方面的系统性研究相对匮乏。本文针对挥发性物质诱吸线虫的土壤细菌及其活性挥发物进行研究,以期揭示挥发物介导的细菌与线虫的相互作用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集:于2007年采集了国内26个省市不同农作物的土壤样本187份。对每一样地,在约5 m²的范围内取表层2 cm-10 cm深度土壤约1 kg,记录采样地点、作物类型,室内凉干后用广口瓶盛装,室温保藏备用。

1.1.2 主要试剂和仪器:细菌DNA提取试剂盒(DP2001)购自北京百泰克生物技术有限公司,引物27F、1492R由上海生工生物工程有限公司合成,Taq酶、dNTP,限制性内切酶购自TaKaRa公司(Japan),PCR仪(Eppendorf),电泳仪(Bio-Rad),凝胶成像仪(Bio-Rad),气-质联用仪(GC:HP6890A,MS:HP5973),其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 土壤细菌的分离纯化

用牛肉膏蛋白胨培养基,按常规的稀释平板涂布法进行。

1.3 挥发物诱吸线虫的细菌筛选

在直径60 mm的牛肉膏蛋白胨培养基平板上划线培养供筛细菌,36℃,培养48 h。另取同样大小的无菌培养皿,在皿底内放入一无菌小棉球,并在棉球上滴加3 mL全齿复合线虫(*Panagrellus redivivus*)悬液(含线虫幼虫约200条)。把细菌平板的皿底倒扣在含线虫的平皿皿底之上,用parafilm封口膜密封两皿底缝隙。以无菌牛肉膏蛋白胨培养基为空白对照,每个样品设置三个重复。室温放置24 h后,统计由下一皿底趋化运动到上一皿底的线虫数量,并计算诱吸率。

诱吸率(%) = 到达上部皿底的线虫数 ÷ 加入下部皿底的线虫数 × 100%

1.4 挥发性物质诱吸线虫的细菌系统亲缘关系分析

将诱吸率≥30%的所有细菌菌株用于16S rRNA基因的序列测定与系统亲缘关系分析。

1.4.1 16S rRNA基因的PCR扩增:用试剂盒提取细菌基因组DNA后,采用通用引物27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'和1492R:5'-GGTACCTTGTTACGACTT-3'进行扩增。PCR反应程序:95℃ 5 min;95℃ 50 s,53℃ 1 min,72℃ 2 min,35个循环;72℃ 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。

1.4.2 16S rRNA基因的RFLP分析:将回收纯化的目的片段(约1.5 kb)用内切酶*Msp*I酶切。酶切体系(10 μL):PCR产物4 μL,T×Buffer 1 μL,*Msp*I(10 U/μL)1 μL,ddH₂O 4 μL。酶切产物用3%的琼脂糖凝胶电泳检测,用紫外凝胶成像分析系统进行观察并拍照,应用凝胶分析软件UV photo对照电泳照片进行RFLP谱带分析,用Excel 2007对酶切结果进行整理,最后用NTSYS-pc聚类软件(版本2.11a)进行聚类分析。

1.4.3 基于细菌16S rDNA序列的系统发育分析:将测序获得的16S rRNA基因序列利用BLAST软件与GenBank数据库中的序列进行同源性比对,下载最相似序列,并用MEGA 4.1软件进行分析。按照最大同源性原则,采用软件Clustal W进行排序,利用Kimura-2计算核苷酸差异值,然后利用Neighbor-Joining法构建系统发育树^[8],设定1000次重复。

1.5 诱吸线虫的细菌挥发物组份分析

细菌接种于牛肉膏蛋白胨液体培养基,36℃摇床(200 r/min)培养过夜,取9 mL细菌培养液加到

15 mL 的顶空收集瓶中。挥发物收集、GC/MS 检测和挥发物组份分析按照文献^[9]所述方法进行。用无诱吸活性的烟酸芽胞杆菌 (*Bacillus niacini*) M_39 菌株和培养基 BEPB 作对照。

1.6 细菌挥发物诱吸线虫的功能验证

依据 GC/MS 分析结果, 购买候选择挥发物的纯品试剂, 用浓度为 200 mg/L 的纯品试剂按上述的平板倒扣法测试其对线虫的诱吸活性。

2 结果

2.1 挥发物诱吸线虫的细菌筛选

从全国 26 个省市不同农作物的 187 份土样随机分离了 3800 株细菌用于其挥发物诱吸线虫的活性筛选, 结果表明这些细菌对全齿复活线虫表现出不同程度的诱吸活性 (图 1)。在 196 株 (占供试细

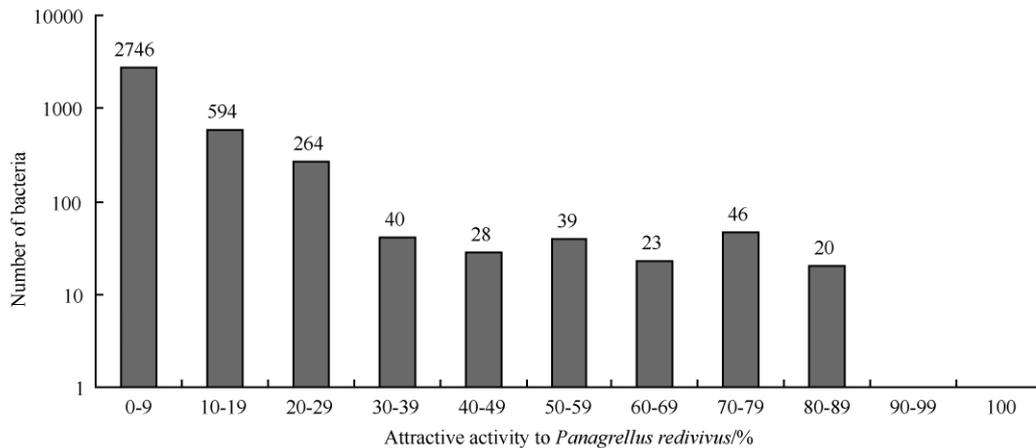


图 1 土壤细菌对全齿复活线虫的不同诱吸活性的菌株数统计

Fig. 1 Number of soil bacteria with different attractive activities to *Panagrellus redivivus*.

菌总数的 5.16%) 诱吸率 $\geq 30\%$ 的细菌中, 66 株的诱吸率 $\geq 70\%$, 62 株的诱吸率在 50% - 70% 之间, 68 株的诱吸率在 30% - 50% 之间。

2.2 挥发物诱吸线虫的细菌系统亲缘关系分析

选取诱吸率 $\geq 30\%$ 的 196 株细菌用于 RFLP 分析, 共产生 27 种酶切带型, 每种带型选取 1 - 3 株 (共 42 株) 进行 16S rRNA 序列测定并进行系统亲缘关系分析。结果显示, 挥发物诱吸线虫的菌株分属于 11 属的 26 种细菌 (图 2), 相似性在 98.01% - 100% 之间: *Arthrobacter crystallopoietes*, *A. oxydans*, *Bacillus acidiceler*, *B. cereus*, *B. cibi*, *B. infantis*, *B. idriensis*, *B. jeotgali*, *B. megaterium*, *B. niacini*, *B. novalis*, *B. pumilus*, *B. stratosphericus*, *B. thuringiensis*, *B. psychrodurans*, *Brevibacterium frigoritolerans*, *Brevundimonas diminuta*, *Ensifer adhaerens*, *Lysinibacillus fusiformis*, *L. sphaericus*, *Microbacterium oxydans*, *Paenibacillus barcinonensis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. panipatensis*, *Staphylococcus sciuri subsp. sciuri*, *Sphingobacterium composti*。其中, 芽胞杆菌属 (*Bacillus*) 的种类最多,

共 13 种。

2.3 细菌诱吸线虫的挥发物鉴定

根据细菌挥发物诱吸线虫活性, 选取 22 株强诱吸线虫活性 ($> 50\%$) 的细菌用于诱吸线虫的挥发物鉴定 (表 1)。以无诱吸线虫活性的细菌 *Bacillus niacini* M_39 和牛肉膏蛋白胨液体培养基 BEPB 的挥发物作对照。通过 GC/MS 分析, 在测定的 22 株细菌中, 每个菌株产生 19 - 39 种挥发物, 对照菌株 M_39 产生 24 种挥发物, 而 BEPB 中检出 17 种挥发物。挥发物种类的多少与菌株诱吸线虫活性之间无显著的相关性, 说明仅是其中的部分挥发物对线虫有诱吸活性。例如巨大芽胞杆菌 (*Bacillus megaterium*) M_20 产生 24 种挥发物, 对线虫的诱吸活性为 89.83%, 而耐寒短杆菌 (*Brevibacterium frigoritolerans*) M_29 产生 39 种化合物, 对线虫的诱吸活性仅为 52.86%。

在这 22 株细菌和 2 个对照中共检出挥发性化合物 97 种, 分别属于醛类、酮类、烷烃类、烯烃类、炔类、醇类、酯类、酸类、醚类、杂环类和酚类、胺类、硝基类物质 (表 1)。扣除对照中出现的挥发物以及峰

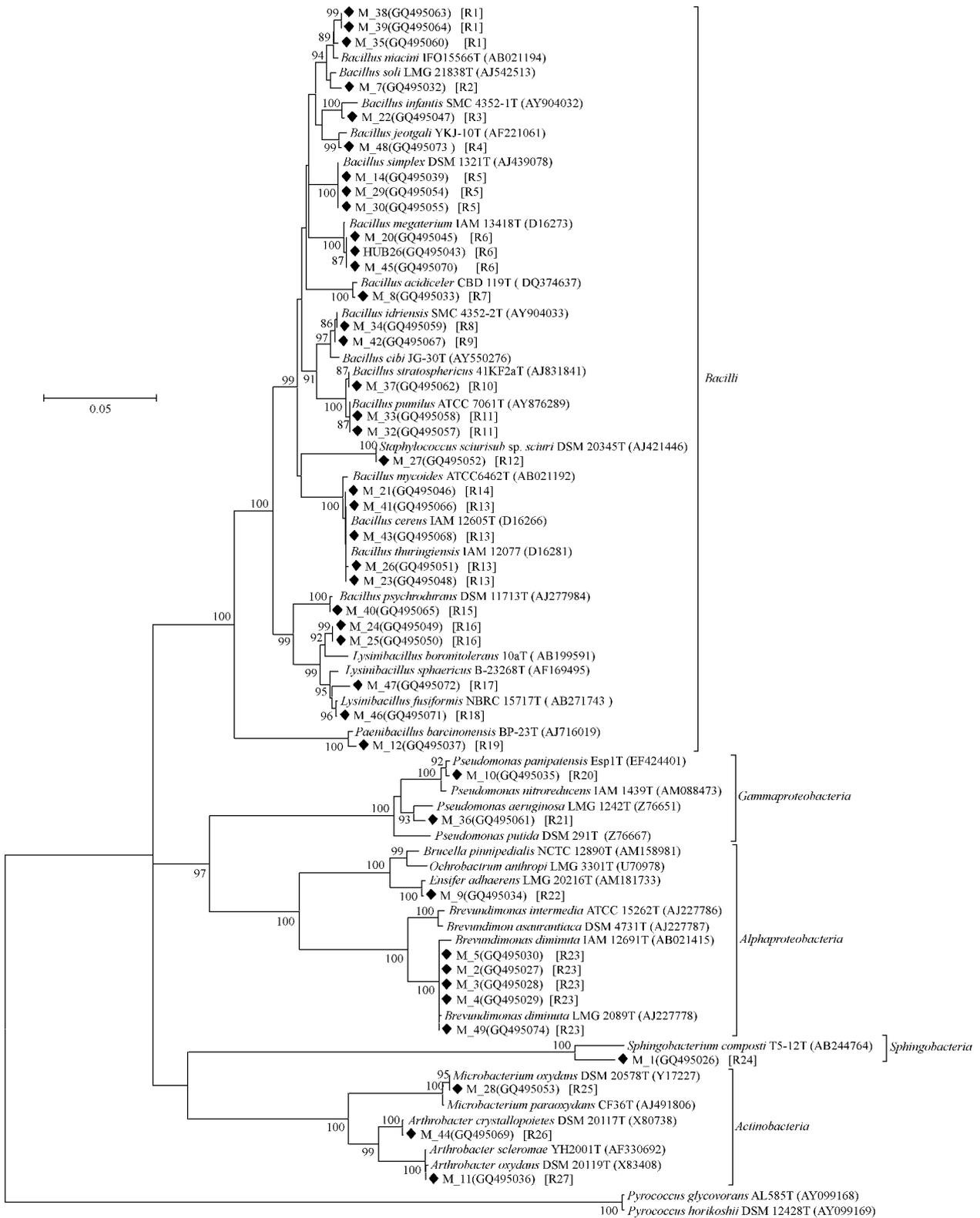


图2 基于 16S rDNA 基因序列的有机挥发物诱吸线虫的细菌分子系统发育树

Fig.2 16S rDNA-based dendrograms showing phylogenetic relationships of bacteria producing nematodes attractive volatiles. ◆ represents the strains included in this study. Letter and number in [] are the RFLP patterns. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The numbers at each branch point are the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence. *Pyrococcus glycovorans* and *P. horikoshii* are the outgroups.

表1 GC/MS 分析诱吸线虫的细菌及对照的挥发物组份

Table 1 Analysis on the volatiles of nematode-attracting bacteria and the controls by GC/MS

Bacteria and controls	peak value	volatile group												
		aldehyde	ketone	alkyl	alcohol	alkene	ester	alkene	acid	phenol	ether	hetero-cyclic	amine	nitril
BEPB	17		2	3	2	2	1		1		2	4		
<i>Bacillus niacini</i> M_39	24		1	4	1	2	1	2	1	6	2	4		
<i>Arthrobacter oxydans</i> M_11	25	3	5	2	3	2	3		2	1		4		
<i>Bacillus acidicer</i> M_8	30	2	5	2	2	3		1		4	3	3	4	1
<i>Bacillus cereus</i> M_21	20	1	6	2	1			1	2	2	1	1	3	
<i>Bacillus cibi</i> M_42	25	1		4	3	2	3		1	3	2	6		
<i>Bacillus idriensis</i> M_34	24		2	3	4		4	2	1	1	2	2	3	
<i>Bacillus infantis</i> M_22	22	1	1	5	1	1	2	1		2	1	4	1	2
<i>Bacillus jeotgali</i> M_48	25	4	4	2	1		1		3	4	1	2		
<i>Bacillus megaterium</i> M_20	24	3	2	1	3	1	2		2	1	2	5	1	1
<i>Bacillus psychrodurans</i> M_40	19	1		2		4	2		1	4	1	3		1
<i>Bacillus pumilus</i> M_33	24	1		3	1	2	2		2	5		3	3	1
<i>Bacillus soli</i> M_7	20		1	2	1	1	2	1	2	3		3	4	
<i>Bacillus stratospheric</i> M_37	25	2	4	3		2	1	1		7		4		1
<i>Bacillus thuringiensis</i> M_43	21		6	5	1		1			3	1	2	1	1
<i>Brevibacterium frigoritolerans</i> M_29	39	1		6	2	2	6	1		8	1	10	1	1
<i>Brevundimonas diminuta</i> M_2	24	1	1	3	3	3	2	2	1	1	3	4		
<i>Ensifer adhaerens</i> M_9	33	2	1	3	2	1	6	1	1	8	1	7		
<i>Lysinibacillus fusiformis</i> M_24	23	2	5		2	2	3			2	2	4	1	
<i>Microbacterium oxydans</i> M_28	28	2		3	1	2	2	1	2	7	3	2	3	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> M_36	21	1	2	3		2	3		1	6	1	3		2
<i>Pseudomonas panipatensis</i> M_10	30	1	2	6	1	1	5	2	2	3	3	2		2
<i>Sphingobacterium composti</i> M_1	31	3	5	4	1	1	5	2	2	3	3	2		
<i>Staphylococcus sciuri</i> M_27	28	2	3	1	1	2	1	2		6	2	5	2	1

值较弱的挥发物种类,选定了24种挥发物作为诱吸线虫的候选挥发物,用其纯品进行功能验证。除7种未获得纯品试剂外,验证了17种挥发物的诱吸线虫活性,其中6种无活性:甲苯酸丁酸酯、L-丙氨酸、正十六烷、2-甲基戊醛、2,5-二甲基苯甲醚、正十三

烷;11种化合物表现出诱吸线虫活性:苯甲醛、2-庚酮、苯甲酸苄酯、十六酸乙酯、长叶烯、苄醇、对甲氧基苯甲醛、4-羟基苯丙酮、丁酸乙酯、3-羟基-4-甲氧基苯甲醛、D-氨基丙醇(表2)。

表2 诱吸线虫的细菌挥发物纯品验证

Table 2 Confirmation of the nematode-attracting function of bacterial volatiles by using pure agents

volatile	nematode-attracting activity	volatile	nematode-attracting activity
Benzaldehyde	+	L-alanine	-
2-heptanone	+	n-hexadecane	-
Benzyl benzoate	+	2-methyl valeraldehyde	-
Ethyl palmitate	+	2,5-dimethylanisole	-
(+)-longifolene	+	n-tridecane	-
Benzyl alcohol	+	Tetrahydrofurfuryl propionate	×
p-anisaldehyde	+	4-β-di-tertbutyl-o-cresol	×
Vanatone	+	Brallobarbital	×
Ethyl butyrate	+	Phytone	×
Isovanilin	+	Tebucarb	×
d-alaninol	+	2,6,10-trimethyltetradecane	×
Butyleret hydroxytoluen	-	Cembrene	×

“+”: active; “-”: inactive; “×”: not confirmed.

3 讨论

线虫和细菌均是土壤环境中的重要生物类群。在自然界中,细菌和线虫的关系因种类不同而非常复杂^[10]。对于某些线虫,细菌是其很好的食物来源;对于某些线虫,细菌是其侵染真核宿主所必须的伙伴;对于某些线虫,细菌是其致病菌。本研究着重对具挥发性诱吸线虫的土壤细菌进行研究。研究表明,分离到的3800株细菌中,5.16%的细菌对全齿复活线虫显示出30%以上的挥发物诱吸活性,16S rRNA系统亲缘关系分析表明,诱吸率 $\geq 30\%$ 的196株细菌归属于10个属的25种细菌,其中,除*Bacillus*属细菌诱吸线虫曾被报道过外^[11],另外9个属(*Arthrobacter*、*Brevibacterium*、*Brevundimonas*、*Ensifer*、*Lysinibacillus*、*Microbacterium*、*Paenibacillus*、*Pseudomonas*、*Staphylococcus*)为本研究首次报道。这些结果揭示在土壤中有有机挥发物诱吸线虫的细菌资源非常丰富,且具有丰富的多样性,为今后研究挥发物诱吸线虫细菌及其与线虫的相互作用提供了新资源,为揭示挥发物介导的细菌与线虫的相互作用奠定基础。

细菌代谢物的生物活性是由其化合物的结构和性质所决定^[12-14]。土壤细菌产生的诱吸线虫挥发物包括醛类、酮类、烷烃类、烯烃类、炔类、醇类、酯类、酸类、醚类、杂环类和酚类、胺类、硝基类等物质。在本研究中,经过纯品验证,首次报道了11种具有诱吸线虫活性的细菌挥发物:苯甲醛、2-庚酮、苯甲酸苄酯、十六酸乙酯、长叶烯、苜蓿醇、对甲氧基苯甲醛、4-羟基苯丙酮、丁酸乙酯、3-羟基-4-甲氧基苯甲醛和D-氨基丙醇。Bargmann^[4]等曾报道苯甲酸苄酯对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)具有逐退作用。这可能是由于苯甲酸苄酯同许多化学试剂一样,在某一浓度时具诱吸作用,而在另一浓度时具逐退或排斥作用,或由于线虫利用嗅觉去尝试学习——熟悉——识别某些细菌产生的挥发物,从而避开^[15-16]。所以,确定不同浓度的细菌挥发物发挥不同作用和这些诱吸性挥发物是否被线虫熟悉后成为排斥性挥发物很有意义,值得我们进一步探讨。另外,本研究分离到的诱吸线虫细菌在土壤环境中极有可能通过这些挥发性物质调控线虫种群,且细菌产生的有机挥发性物质通常包含多种有效成分,这些混合物可能对不同种类的线虫比单一的成分更有效,也不易被线虫所熟悉成为排斥性挥发物。因而,这些诱吸性挥发物若混合引诱线虫靠近,再通过毒杀线虫的挥发性物质或蛋白进而杀死线虫,可达

到生物防治寄生线虫的目的。

参考文献

- [1] Oka Y, Shuker S, Tkachi N. Nematicidal efficacy of MCW-2, a new nematicide of the fluoroalkenyl group, against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Pest Management Science*, 2009, 65: 1082-1089.
- [2] Gu YQ, Zhou JP, Zou CS, Mo MH, Zhang KQ. Evaluation and identification of potential organic nematocidal volatiles from soil bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39: 2567-2575.
- [3] Huang Y, Xu CK, Ma L, Zhang KQ, Duan CQ, Mo MH. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 126: 417-422.
- [4] Bargmann CI, Hartwig E, Horvitz HR. Odorant-selective genes and neurons mediate olfaction in *C. elegans*. *Cell*, 1993, 74: 515-527.
- [5] Zhang Y, Lu H, Bargmann CI. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2005, 438: 179-184.
- [6] Pradel E, Zhang Y, Pujol N, Matsuyama T, Bargmann CI, Ewank JJ. Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *The National Academy of Sciences of the USA*, 2007, 104: 2295-2300.
- [7] Niu QH, Huang XW, Zhang L, Xu JP, Yang DM, Wei KB, Niu XM, An ZQ, Bennett JW, Zou CG, Yang JK, Zhang KQ. A Trojan horse mechanism of bacterial pathogenesis against nematodes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 2010, 107: 16631-16636.
- [8] Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596-1599.
- [9] Xu CK, Mo MH, Zhang KQ. Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36: 1997-2004.
- [10] Cooper VS, Carlson WA, LiPuma JJ. Susceptibility of *Caenorhabditis elegans* to *Burkholderia* infection depends on prior diet and secreted bacterial attractants. *Plos one*, 2009, 4: e7961.
- [11] 牛秋红. 致病细菌 *Bacillus nematocida* B16 引诱并杀死线虫的新机制. 云南大学, 博士学位论文, 2009.
- [12] Fernando WGD, Linderman R. Effect of substrate on the production of antifungal volatile from *Bacillus subtilis*. *Journal of Applied Bacteriology*, 1994, 76: 395-405.
- [13] Andersen RA, Hamilton-Kemp TR, Hildebrand DF, McCracken JCT, Collins RW, Fleming PD. Structure-

- antifungal activity relationships among C6 and C9 aliphatic aldehydes, ketones and alcohols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42: 1563-1568.
- [14] Archibold DD, Hamilton-Kemp TR, Barth MM, Langlois BE. Identifying natural volatile compounds that control gray mold (*Botrytis cinerea*) during postharvest storage of strawberry, blackberry and grape. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45: 4032-4037.
- [15] Zhang Y, Lu H, Bargmann CI. Pathogenic bacteria induce aversive olfactory learning in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2005, 438: 179-184.
- [16] Beale ELG, Li G, Tan MW, Rumbaugh KP. *Caenorhabditis elegans* senses bacterial autoinducers. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72: 5135-5137.

Phylogenetic diversity characteristics of soil bacteria producing nematode-attracting volatiles and identification of their active compounds

Yu'e Hao¹, Guiping Mou², Aitao He¹, Jiaqin Xi³, Faxiang Yang⁴, Minghe Mo^{2*}

¹College of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China

²Key Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources, Yunnan University, Kunming 650091, China

³Zhengzhou Tobacco Research Institute of CNTC, Zhengzhou 450001, China

⁴Yunnan Yunye Fertilizer Co., Ltd, Kunming 650217, China

Abstract: [Objective] This study characterized the phylogenetic diversity of soil bacteria producing nematode-attracting volatiles and their nematode-attracting compounds. Results would enhance our understanding on the interaction between nematodes and soil microorganisms and potentially enhance the biocontrol efficiency when combined the attractants with nematocides. [Methods] Bacteria producing volatiles with functions of nematode-attracting activities were isolated from 187 agricultural soil samples collected in 26 provinces of China with the method of double-Petri dishes. The phylogenetic diversity of these bacteria was characterized by RFLP-16S rRNA gene sequence analysis. The nematode-attracting volatiles of bacteria were detected using the SPME-GC/MS, and volatile compounds with attractive activity were determined by confirming with individual commercial compounds. [Results] Among the 3800 bacteria isolated from the 187 soil samples, 196 isolates (5.16% of the total) showed attractive activity (AN) more than 30% to *Panagrellus redivivus*. Of the 196 isolates, 66 (1.74%) showed AN \geq 70%, 62 isolates (1.63%) showed AN between 50% and 70%, and 68 isolates (1.79%) showed AN less than 50%. Phylogenetic analysis revealed that the 196 bacteria were clustered into 5 groups: Bacilli, Gammaproteobacteria, Alphaproteobacteria, Sphingobacteria and Actinobacteria. But, *Bacillus* were the dominant, which covered 13 species. And 11 volatiles with nematode-attracting activity were determined, including benzaldehyde, 2-heptanone, benzyl benzoate, ethyl palmitate, (+)-longifolene, benzyl alcohol, p-anisaldehyde, vanatone, ethyl butyrate, isovanillin and d-alaninol. [Conclusion] Some species of bacteria in agriculture soil can produce volatiles to attract nematodes.

Keywords: soil bacteria, nematode-attracting volatile

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Projects of the National Key Sciences and Technology Program for Water Solutions (2009ZX07102-004, 2012ZX07102-003), by the NSFC (30970100, 31160376), by the Zhengzhou Tobacco Research Institute (122009CZ0420), by the Educational Commission of Hunan Province (09C828), by the Special Fund of Green Agricultural Biotechnology Products of National Development and Reform Commission and by the Applied Basic Research Project of Yunnan Province (2011FA003)

* Corresponding author. Tel: +86-871-5031396; Fax: +86-871-5034838; E-mail: minghemo@yahoo.com.cn

Received: 5 May 2011 / Revised: 1 September 2011