

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(7):902-909; 4 July 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

黑龙江大豆胞囊线虫胞囊可培养细菌多样性

朱英波^{1,2}, 史凤玉², 王牛牛¹, 田建卿¹, 向梅春¹, 刘杏忠^{1*}

¹中国科学院微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

²河北科技师范学院生命科技学院, 秦皇岛 066600

摘要: 【目的】了解黑龙江省大豆田大豆胞囊线虫胞囊可培养细菌的多样性。【方法】运用稀释平板法和 16S rDNA 基因序列的系统发育分析对胞囊可培养细菌多样性进行研究。【结果】用 NA 培养基从胞囊上分离 90 株具有不同菌落形态的细菌。16S rDNA 序列分析结果表明:90 株菌株分属于 7 个属 22 个种。46 株属于变形菌门 γ 亚群 (Gammaproteobacteria), 32 株属于厚壁菌门 (Firmicutes), 10 株属于变形菌门 β 亚群 (Betaproteobacteria), 2 株属于变形菌门 α 亚群 (Alphaproteobacteria)。假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 为优势菌属。【结果】黑龙江省大豆胞囊线虫胞囊中存在丰富的细菌物种多样性, 这些细菌对大豆胞囊线虫可能具有一定的生理生态作用。

关键词: 大豆胞囊线虫, 胞囊, 可培养细菌, 多样性

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 07-0902-08

线虫在自然界广泛存在, 长期的演化导致与微生物形成了复杂的关系, 包括捕食、寄生或共生等关系^[1-5]。已有研究表明, 一些捕食或寄生微生物是植物寄生线虫潜在的生防菌^[6-9]。因此, 人们对线虫的天敌微生物进行了广泛的调查研究。研究较多是捕食线虫真菌如单顶孢霉属 *Monacrosporium*、节丛孢属 *Arthrobotrys* 和小隔指孢霉属 *Daetyrella* 真菌, 此类真菌是从营养菌丝上产生粘性球、粘性网和收缩环等捕食器官, 来捕食土壤中运动的线虫^[10]。早在上个世纪八十年代人们就对定殖于大豆胞囊线虫真菌开展了广泛地研究^[11-13], 发现了大量有潜力的重要生防菌如 *Pochonia chlamydosporium*、*Paecilomyces lilacinus* 等^[14-16], 其中 *Hirsutella rhossiliensis*、*H. minnesotensis* 和 *Pasteuria* sp. 是中国和美国大豆胞囊线虫二龄幼

虫优势寄生菌^[17-21], 这些研究结果说明大豆胞囊线虫胞囊内存在丰富的微生物区系和多样性。

近年来, 因根际细菌与植物根的亲性和而受到人们的广泛关注, 开展了大量研究^[6]。而线虫作为一类土壤生物, 与根际细菌有着密切关系, Nour 等^[4]从大豆胞囊线虫胞囊上就检测到 10^{4-5} 个细菌/胞囊, 这些细菌对大豆胞囊线虫胞囊在土壤中中长期存活具有重要的作用或为潜在的生防菌。大豆胞囊线虫主要以胞囊形式在土壤中存活, 获知大豆胞囊线虫胞囊细菌的多样性和细菌种属的分布规律, 可为后续生防细菌的筛选与大豆胞囊线虫的生物防治提供一定理论指导。然而, 目前相关细菌的研究较少尤其对大豆胞囊线虫相关细菌的物种组成及优势类群尚没有系统的研究。

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(20090304); 中国博士后科学基金(20100480028)

* 通信作者。Tel: +86-40-64807512; Fax: +86-40-64807505; E-mail: liuxz@im.ac.cn

作者简介: 朱英波(1974-), 男, 黑龙江拜泉人, 博士, 研究方向为资源微生物与植物病害生物防治。E-mail: xiaozhu_1688@126.com

收稿日期: 2012-01-30; 修回日期: 2012-04-19

大豆胞囊线虫 (soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*) 是一种重要的植物寄生线虫, 是中国、美国、巴西和阿根廷等大豆主产国大豆最重要的病原物, 据估计美国由大豆胞囊线虫侵染引起的大豆损失几乎等于大豆其它所用病害造成的损失的总和^[22-23]。自 Crump 等^[24] 发现大豆胞囊线虫雌虫的寄生真菌 *Nematophthora gynophila*、*Catenaria auxilaris* 和 *Verticillium chlamydosporium* 以来, 越来越多的研究表明微生物在大豆胞囊线虫病害防治方面起着不可忽视的作用。

本文报道了采用稀释平板法和基于 16S rDNA 基因序列的系统发育分析对黑龙江省大豆胞囊线虫胞囊中可培养细菌的系统发育多样性的研究结果, 为后续研究大豆胞囊线虫体内细菌的生理生态功能奠定基础, 为大豆胞囊线虫病的生物防治研究提供参考理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集和处理: 土壤样品于 2011 年 7 月采自黑龙江省哈尔滨市大豆胞囊线虫发生地 (45°40'N, 126°35'E), 采用 5 点取样法, 去除表层 5 cm 的土壤, 采集大豆根际 5-20cm 深度的土壤, 装入聚乙烯自封袋中, 封好后运回实验室, 于 4℃ 冰箱中保存待用。称取 200 g 置于 500 mL 烧杯中, 加水 300 mL 浸泡 2 h 并转移至 1000 mL 的塑料烧杯中, 450 r/min 搅拌 5 min, 用强水流冲洗土样悬浮液, 静止 20 s 后过 20 目和 60 目套筛, 收集 60 目筛上物于 50 mL 离心管中, 1975 × g 离心 5 min, 弃上清, 再加入 45 mL 的 75% 蔗糖溶液, 充分混匀, 1975 × g 离心 3 min, 上清液过 60 目筛, 用水轻轻冲洗筛上物, 洗去残留的蔗糖, 冲洗到放有滤纸的漏斗中, 过滤后取出滤纸。滤纸晾至半干后, 在解剖镜下挑出饱满的胞囊。取 25 个饱满的胞囊用 0.3% NaClO 表面消毒 5 min, 无菌水漂洗 5 次, 置入组织研磨器中研破, 加入 1 mL 无菌水制成胞囊研磨液^[4]。

1.1.2 主要试剂和仪器: Ex Taq DNA Polymerase 等扩增所用试剂均购自 TaKaRa 公司, PCR Purification Kit 购自 Omega 公司, 引物合成由上海生工生物工程技术服务公司完成。PCR 仪使用 Biometra 公司生产的 Tgradient, 凝胶成像分析仪为 Bio-Rad 公司

的 Gel-Doc2000。

1.2 胞囊细菌分离和计数

分离培养基采用 NA 培养基 (蛋白胨 10 g, 牛肉膏 3 g, NaCl 5 g, 琼脂 17 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.2-7.4)。胞囊研磨液经系列稀释后涂布在 NA 培养基上, 28℃ 倒置恒温培养, 2-3 d 后统计菌落数量。挑取表型有差异的单菌落, 纯化后转至 NA 斜面, 4℃ 保存。

1.3 细菌 DNA 提取和 16S rDNA 扩增

参照 Cui 等^[25] 的方法少量提取细菌基因组 DNA。室温干燥后溶于 50 μL TE Buffer 中, 1.0% 琼脂糖电泳检测 DNA 质量。将 DNA 浓度调至 70 ng/μL 左右, 备做 PCR 模板。

引物为细菌通用引物^[26], 正向引物为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物为 1495R: 5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3'。PCR 扩增体系: DNA 模板 1 μL; dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2.5 μL; 27F (20 μmol/L) 1.0 μL; 1495R (20 μmol/L) 1.0 μL; 10 × Ex Taq Buffer (Mg²⁺ plus) 5 μL; Ex Taq 酶 (5U/μL) 0.3 μL; 补足 ddH₂O 到 50 μL。

PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 52℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 5 min, 38 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.4 16S rDNA 序列分析

PCR 扩增产物经 PCR Purification Kit 纯化后, 送北京诺赛基因组研究中心测序。根据测序结果, 利用 BLAST 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) 与 GenBank 数据库中的序列进行比对分析, 获得相似性较高的相关菌株的 16S rDNA 序列。GenBank 数据库中调出相似性较高的相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 用 CLUSTAL X 进行多序列比对^[27], 系统进化距离矩阵根据 Kimura 模型估算, 用 MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 软件包采用邻接法构建系统进化树^[28], 重复取样 1000 次进行自展值分析来评估系统进化树的拓扑结构的稳定性^[29]。本研究得到的序列已提交 GenBank 数据库, 收录号分别为 JQ437416-JQ437437。

1.5 细菌多样性分析

定义 16S rDNA 序列同源性大于 97% 作为同一种^[30], 采用 Shannon-Wiener 指数 (H') 和均匀度指数 (E) 计算多样性^[31]。

$$\text{Shannon-Wiener, } H' = - \sum_i^S p_i \cdot \ln p_i$$

$$E = H' / \ln S$$

式中 S 为菌种数, P_i 为第 i 种的多度比例, 可以用 $P_i = n_i / N$ 求出。 n_i 是第 i 种的菌株数, N 是所有菌株数总和。

2 结果和分析

2.1 菌株分离

利用 NA 培养基对大豆胞囊线虫胞囊样品进行分离, 根据菌落大小、形态、颜色等特征, 挑取分离平板上的单菌落进行四分体划线纯化, 显微检查纯化情况, 共获得 90 株菌落表型差异的菌株, 菌落为白色、灰白色和深红色等。用平板菌落计数法得到细菌平均数量为 1.9×10^5 个/胞囊, 与 Nour (2003) [4] 对加拿大大豆胞囊线虫胞囊细菌数量的研究结果 (2.6×10^5 个/胞囊) 在同一个数量级。

2.2 大豆胞囊线虫相关细菌的类群多样性

对 90 株代表性菌株进行 16S rDNA 基因序列测

定, 将获得的序列通过在线比对引擎 BLAST 与 GenBank 数据库中已报道的 16S rDNA 序列进行相似性比对分析。相似性比对分析表明 (表 1), 它们分属于 7 个属 22 个种。Shannon-Wiener 多样性指数 (H') 为 2.80, 均匀度指数 (E) 为 0.91。结果表明, 多样性指数和均匀性指数均较高。

基于 16S rDNA 序列的系统发育分析结果 (图 1) 表明, 所得的 90 条有效序列主要分属于 4 大类群 (Gammaproteobacteria, Firmicutes, Betaproteobacteria, Alphaproteobacteria)、7 个科 (Pseudomonadaceae, Bacillaceae, Moraxellaceae, Rhizobiaceae, Oxalobacteraceae, Burkholderiaceae, Enterobacteriaceae)、7 个属 (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Rahnella*, *Duganella*, *Burkholderia*, *Rhizobium*, *Bacillus*)。其中 46 株属于变形菌门 γ 亚群 (Gammaproteobacteria) (51.1%) (按单元种类数计算百分比), 32 株属于厚壁菌门 (Firmicutes) (35.6%), 10 株属于变形菌门 β 亚群 (Betaproteobacteria) (11.1%), 2 株属于变形菌门 α 亚群 (Alphaproteobacteria) (2.2%)。

表 1 分离菌株的 16S rDNA 序列相似性分析

Table 1 Similarity analysis of partial 16S rDNA sequences of isolations from *Heterodera glycines* cysts

Genus	Representative isolate (accession no.)	No. of isolates in OTU*	Nearest type strain (accession no.)	Similarity /%
Pseudomonas	SCN502 (JQ437416)	1	<i>Pseudomonas grimontill</i> (JF700434)	100
	SCN1258 (JQ437417)	3	<i>Pseudomonas poae</i> (HQ406828)	99
	SCN1255 (JQ437418)	13	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (AB680977)	99
	SCN1260 (JQ437419)	10	<i>Pseudomonas azotoformans</i> (JF792088)	100
	SCN1248 (JQ437420)	4	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> (AY623931)	99
	SCN501 (JQ437421)	5	<i>Pseudomonas putia</i> (AB681349)	100
	SCN1251 (JQ437422)	2	Uncultured bacterium (AB579016)	100
	SCN122 (JQ437423)	1	<i>Pseudomonas koreensis</i> (HE588014)	100
	SCN2601 (JQ437424)	1	<i>Pseudomonas argentineasis</i> (AY691189)	99
	Acinetobacter	SCN2203 (JQ437425)	2	<i>Acinetobacter johnsoniic</i> (JN409466)
SCN24022 (JQ437426)		2	<i>Acinetobacter</i> sp. (JN571417)	100
Rahnella	SCN223 (JQ437427)	2	<i>Rahnella aquatilis</i> (AB675632)	100
Duganella	SCN37108 (JQ437428)	2	<i>Duganella</i> sp. (AM412134)	99
Burkholderia	SCN3723 (JQ437429)	2	<i>Burkholderia sediminicola</i> (GQ181033)	99
	SCN361 (JQ437430)	4	<i>Burkholderia</i> sp. (JN590378)	100
	SCN3724 (JQ437431)	2	<i>Burkholderia caledonica</i> (AB681827)	100
Rhizobium	SCN3721 (JQ437432)	2	<i>Rhizobium lusitanam</i> (FN646634)	100
Bacillus	SCN336 (JQ437433)	3	<i>Bacillus pumilus</i> (AB682185)	100
	SCN3329 (JQ437434)	5	<i>Bacillus subtilis</i> (HQ326783)	100
	SCN22108 (JQ437435)	6	<i>Bacillus aryabhatai</i> (JN252099)	99
	SCN3318 (JQ437436)	12	<i>Bacillus megaterium</i> (AB680229)	99
	SCN222 (JQ437437)	6	<i>Bacillus</i> sp. (JN9904434)	99

* The strains were clustered into operational taxonomic units (OTUs) at a level of sequence similarity $\geq 97\%$.

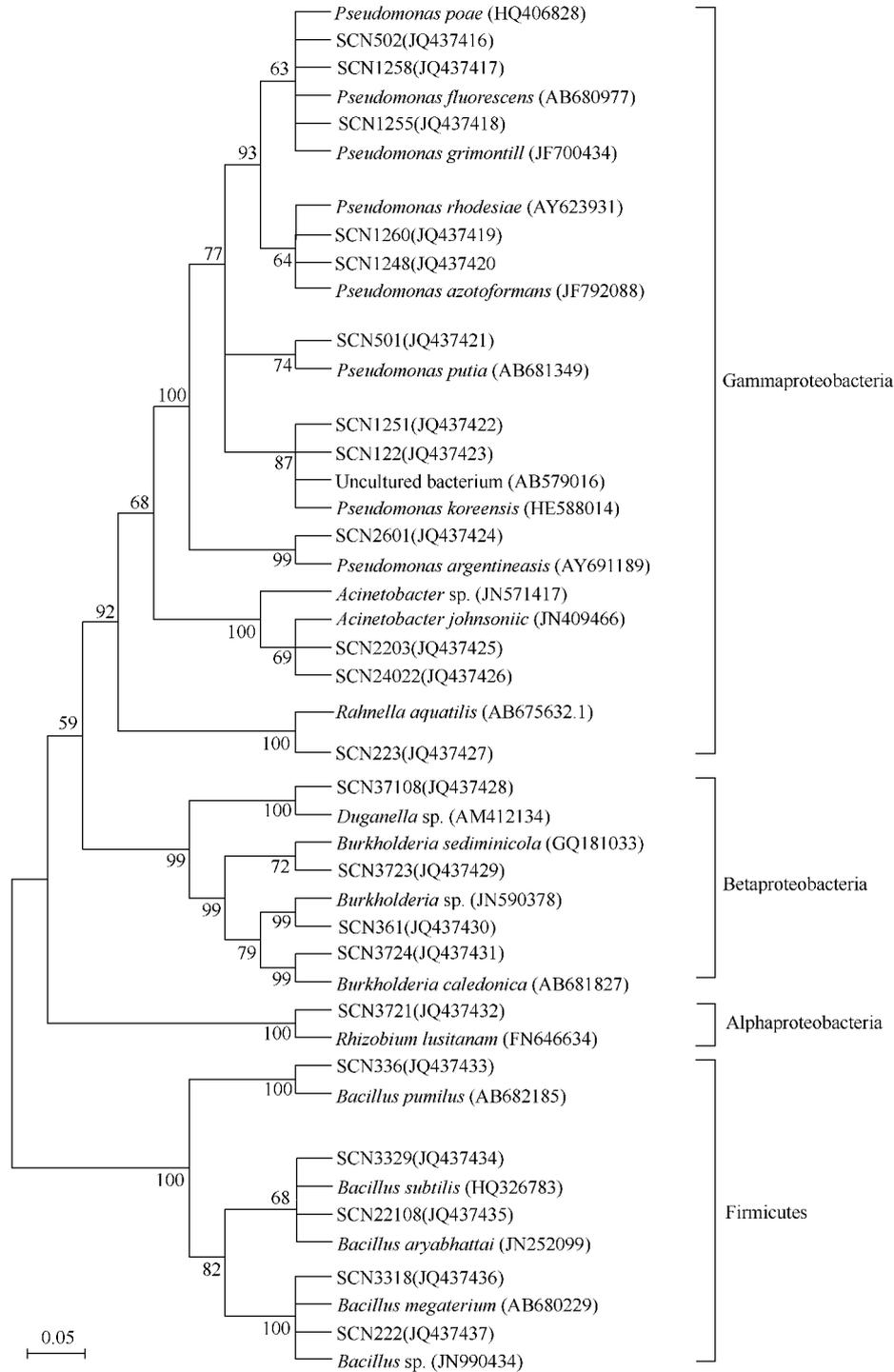


图 1 基于 16S rDNA 基因序列构建的大豆胞囊线虫相关可培养细菌的系统发育树

Fig. 1 Neighbor-Joining tree constructed based on 16S rDNA gene sequence analysis showing the phylogenetic relationships among strains isolated cysts of *Heterodera glycines* and related taxa. Numbers at nodes indicated the bootstrap values (> 50%) based on neighbor-joining analyses of 1000 resampled datasets. Strain in bold type were potential novel species.

变形菌门 γ 亚群在大豆胞囊线虫胞囊细菌种类中比例最高,成为分离获得的最优势类群。该类

群 40 株细菌(44.4%) 在细菌系统学与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 关系密切,代表菌株 SCN1255 与荧

光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 同源性较高, SCN1260 代表的分类单元与产氮假单胞菌 (*Pseudomonas azotofrans*) 关系密切, 代表菌株 SCN1521 以 100% 相似于分离自日本水稻根的一株未培养菌, 其余菌株与现有菌株 16S rDNA 序列相似性为 99 - 100%。此外, 4 株与不动杆菌属 (*Acinetobacter*) 关系密切, 其中代表菌株 SCN24022 与 *Acinetobacter* sp. 的相似性为 100%。2 株与拉恩氏属 (*Rahnella*) 的相似性为 100%。

Firmicutes 类群为分离得到的第二大优势类群, 32 株菌全部与芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 关系密切, 16S rDNA 序列相似性介于 99% - 100% 之间, 其中菌株 SCN222 代表分类单元与 *Bacillus* sp. 相似性为 100%。

Betaproteobacteria 类群的 10 株菌与杜榭氏菌属 (*Duganella*) 和伯克氏菌属 (*Burkholderia*) 关系密切。其中 2 株与 *Duganella* sp. 同源性较高, 8 株与 *Burkholderia* 的相似性达 98% - 100%。Alphaproteobacteria 的 2 株细菌与根瘤菌属 (*Rhizobium*) 系统关系密切。

3 讨论

本文采用稀释平板法和基于 16S rDNA 基因序列的系统发育分析对大豆胞囊线虫相关可培养细菌的多样性进行研究。用于系统发育分析的 90 个代表菌株归属于 4 个系统发育群、7 个科、7 个属, 可以分为 22 个物种, 而且, 大部分分离菌株与其系统发育关系最密切的已知物种典型菌株之间的 16S rDNA 基因序列都有一定差异。这些结果揭示了大豆胞囊线虫相关可培养细菌较丰富的多样性。

本研究中, 变形菌门 γ 亚群在大豆胞囊线虫胞囊细菌群落结构中, 占绝对优势。这与 Nour 等^[4] 以加拿大大豆胞囊线虫胞囊微生物为研究对象的结果相同, 变形菌门 γ 亚群为其细菌群落中的优势种群, 但其最优势属为溶杆菌属 (*Lysobacter*), 其次是贪食菌属 (*Variovorax*), 与本研究结果明显不同。此外, 已有研究表明, Alphaproteobacteria、Betaproteobacteria、Gammaproteobacteria 等类群的菌株是线虫相关细菌的常见类群^[32-34]。本研究中在大豆胞囊线虫胞囊样品中均分离到了较多的这些类群的菌株, 这些结果表明大豆胞囊线虫相关的细菌

类群组成与其它线虫具有相似之处。

已有报道, 松材线虫 (*Bursaphelenchus xylophilus*) 与假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 细菌之间存在着共生关系, 此类细菌能够促进松材线虫的生长和繁殖^[35]。在本研究中, 我们也发现假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 是黑龙江大豆胞囊线虫胞囊细菌群落中的最优势种群。考虑到胞囊内含有卵和胚胎卵, 我们目前尚不能确定所分离到假单胞菌属细菌是否为线虫肠道细菌, 与大豆胞囊线虫之间是否存在共生关系, 以及这些细菌是否有利于大豆胞囊线虫的存活和侵染, 但可以肯定的是胞囊内部明显为其提供合适的生存环境, 有利于这些细菌的生长和繁殖。因此可以推测, 胞囊所携带的假单胞菌属细菌对大豆胞囊线虫病的作用值得深入研究。

本研究中最有意义的发现是分离出的 Firmicutes 类群细菌均与芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 关系密切, 这类细菌的显著特征是产生脂肽类抗生物物质和水解酶, 其中一些芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 如 *Bacillus pumilus*、*B. subtilis*、*B. aryabhatai*、*B. megaterium* 和 *Bacillus* sp. 分离自大豆胞囊线虫的胞囊。有研究表明, *Bacillus* 属一些细菌种类对大豆胞囊线虫有较强的毒性作用, 具有作为生防菌株的潜力^[36-37]。值得注意的是, 巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 是一类植物促生根际细菌 (plant growth promoting rhizosphere, PGPR), 具有解磷、解钾、抑制植物寄生线虫生长和繁殖^[38] 等功能, 是生产生物菌肥常用菌种^[39]。在本研究中, 我们通过杀线活性评价实验, 也发现所分离的巨大芽孢杆菌 SCN3318 的胞外分泌物具有较强的杀线虫活性, 能够抑制大豆胞囊线虫卵孵化及毒杀二龄幼虫, 这表明大豆胞囊线虫胞囊可培养细菌种群中存在新的芽孢杆菌生防资源, 这些菌株具有潜在的进一步研究和利用的经济价值。但今后需要广泛地采集大豆胞囊线虫样品, 从中分离和筛选拮抗性强的芽孢杆菌类细菌, 并进行抑线物质分离鉴定和作用机制的研究, 为开发生物农药提供有益菌源和基础依据。此外, 一些根瘤菌科 (*Rhizobiaceae*) 的细菌也被检出, 但我们没有确定这些细菌是否大豆根瘤菌。

已有研究证实通过传统分离方法鉴定的微生物只占环境微生物总数的 0.1% - 10%, 不能充分展示微生物的多样性状况^[40-41]。此外, 一部分大豆胞囊线虫细菌同其他环境中的微生物一样由于难以模

拟其生长条件而未被分离出,这使得用传统培养方法研究大豆胞囊线虫细菌的种群结构及多样性受到一定的限制。本研究只分离得到 90 个可培养细菌样本,不同种类的部分细菌可能未被分离出,还需通过更广泛的采样才能分离到更多的种类。鉴于传统培养方法具有一定的局限性,后续研究的一项重要任务是应用分子生物学技术进一步识别未培养细菌的种类,并根据其所属种类的营养需求和生理生化特点,设计选择性培养基对未培养细菌进行分离培养。因此行之有效地结合传统培养方法与分子生物学技术将有助于阐明大豆胞囊线虫细菌多样性与线虫发育和繁殖、寄生植物以及调控线虫种群密度之间的相互关系,这些信息的获得可以使人类更好地利用可培养有益细菌减少大豆胞囊线虫的危害。

参考文献

- [1] Forst S, Dowds B, Boemare N, Stackebrandt E. *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* spp.: bugs that kill bugs. *Annual Review of Microbiology*, 1997, 51:47-72.
- [2] Taylor MJ, Bandi C, Hoerauf A. Wolbachia bacterial endosymbionts of filarial nematodes. *Advances in Parasitology*, 2005, 60:245-284.
- [3] Nussbaumer AD, Bright M, Baranyi C, Beisser CJ, Ott JA. Attachment mechanism in a highly specific association between ectosymbiotic bacteria and marine nematodes. *Aquatic Microbial Ecology*, 2004, 34:239-246.
- [4] Nour SM, Lawrence JR, Zhu H, Swerhone GDW, Welsh M, Welacky TW, Topp E. Bacteria associated with cysts of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*). *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69:607-615.
- [5] Haegeman A, Vanholme B, Jacob J, Vandekerckhove TT, Claeys M, Borgonie G, Gheysen G. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: member of a new Wolbachia supergroup. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39:1045-1054.
- [6] 陈立杰, 段玉玺, 范圣长, 秦博, 刘霆, 王媛媛. 大豆胞囊线虫病的生物因子研究进展. 西北农林科技大学学报(自然科学版) (*Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*), 2005, 33:190-194.
- [7] Bernard EC, Self LH, Tyler DD. Fungal parasitism of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines* (Nemata: Heteroderidae), in differing cropping-tillage regimes. *Applied Soil Ecology*, 1997, 5:57-70.
- [8] Chen SY, Dickson DW, Mitchell DJ. Pathogenicity of fungi to eggs of *Heterodera glycines*. *Journal of Nematology*, 1996, 28:148-158.
- [9] Sayre RM, Wergin WP, Schmidt JM, Starr MP. *Pasteuria nishizawae* sp nov., a mycelial and endospore-forming bacterium parasitic on cyst nematodes of genera *Heterodera* and *Globodera*. *Research in Microbiology*, 1991, 142:551-564.
- [10] 张颖, 李国红, 张克勤. 食线虫真菌资源研究概况. 菌物学报 (*Mycosystema*), 2011, 30(6):836-845.
- [11] Carris LM, Glawe DA, Smyth CA, Edwards DI. Fungi associated with populations of *Heterodera glycines* in two Illinois soybean fields. *Mycologia*, 1989, 81:66-75.
- [12] Morgan-Jones G, Rodriguez-Kab R, Tovar JG. Fungi associated with cysts of *Heterodera glycines* in the Cauca Valley, Colombia. *Nematropica*, 1984, 14:173-177.
- [13] 刘杏忠, 张东升, 武修英, 沈崇尧, 裘维蕃. 定殖于大豆胞囊线虫胞囊内真菌的初步研究. 中国农业大学学报 (*Journal of China Agricultural University*), 1991, 17:87-91.
- [14] 刘杏忠, 刘文敏, 张东升. 定殖于大豆胞囊线虫的淡紫拟青霉生物学特性研究. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 1995, 11(2):70-74.
- [15] 孙漫红, 刘杏忠, 晋治波. 淡紫拟青霉对大豆胞囊线虫卵及 2 龄幼虫的影响. 植物保护学报 (*Acta Phytomycolica Sinica*), 2002, 29(1):57-61.
- [16] 孙漫红, 刘杏忠, 缪作清. 大豆胞囊线虫病生物防治研究进展. 中国生物防治 (*Chinese Journal of Biological Control*), 2000, 16(3):136-141.
- [17] Li MZ, Yang E, Xiang MC, Liu XZ, Chen SY. Population dynamics and biocontrol efficacy of the nematophagous fungus *Hirsutella rhossiliensis* as affected by stage of the soybean cyst nematode. *Biological Control*, 2008, 47:244-249.
- [18] Liu XZ, Chen SY. Parasitism of *Heterodera glycines* by *Hirsutella* spp. In Minnesota soybean fields. *Biological Control*, 2000, 19:161-166.
- [19] Liu XZ, Chen SY. Screening isolates of *Hirsutella* species for biocontrol of *Heterodera glycines*. *Biocontrol Science and Technology*, 2001, 11:151-160.
- [20] Liu SF, Chen SY. Efficacy of the fungi *Hirsutella minnesotensis* and *Hirsutella rhossiliensis* from liquid culture for control of the soybean cyst nematode. *Nematology*, 2005, 7:149-157.

- [21] Ma R, Liu XZ, Jian H, Li SD. Detection of *Hirsutella* spp. and *Pasteuria* sp. parasitizing second-stage juveniles of *Heterodera glycines* in soybean fields in China. *Biological Control*, 2005, 33:223-229.
- [22] 刘维志. 植物病原线虫学. 北京:中国农业出版社, 2000, 281-293.
- [23] Wrather JA, Stienstra W, Koenning SR. Soybean disease loss estimates for the United States from 1996 to 1998. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2001, 23:122-131.
- [24] Crump DH, Sayre RM, Young LD. Occurrence of nematophagous fungi in cyst nematode populations. *Plant Disease*, 1983, 67:63-64.
- [25] Cui X L, Mao P, Zeng M, Li WJ, Zhang LP, Xu LH, Jiang CL. *Streptimonospora salina* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Nocardioseae. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, 51:357-363.
- [26] Stackebrandt E, Ludwig W, Fox GE. 16S ribosomal RNA oligonucleotide cataloging. *Methods in Microbiology*, 1985, 18:75-107.
- [27] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 (24) : 4876-4882.
- [28] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16 (2) :111-120.
- [29] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 1985, 39 (4) : 783-791.
- [30] Suzuki MT, Rappe MS, Haimberger ZW, Winfield H, Adair N, Ströbel J, Giovannoni SJ. Bacterial diversity among small-subunit rRNA gene clones and cellular isolates from the same seawater sample. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63, 983-989.
- [31] 陈梦. 对生态系统及生物多样性等理论问题的探讨. 南京林业大学学报(自然科学版) (*Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*), 2003, 27(5):1370-1374.
- [32] Tian XL, Cheng XY, Mao ZHCH, Chen GH, Yang JR, Xie BY. Composition of bacterial communities associated with a plant-parasitic nematode *Bursaphelenchus mucronatus*. *Current Microbiology*, 2010, 62 (1) : 117-125.
- [33] Martin FP, Harbison CH, Cavanaugh CM. Diversity and Heterogeneity of Epibiotic Bacterial Communities on the Marine Nematode *Eubostriechus diana*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (9) :4271-4275.
- [34] Proença DN, Francisco R, Santos CV, Lopes A, Fonseca L, Abrantes IM, Morais PV. Diversity of bacteria associated with *Bursaphelenchus xylophilus* and other nematodes isolated from *Pinus pinaster* trees with pine wilt disease. *PLoS One*, 2010, 5 (12) : e15191. doi:10.1371/journal.pone.0015191.
- [35] Zhao BG. Bacteria carried by the pine wood nematode and their symbiotic relationship with the nematode. In: Zhao BG, Futai K, Sutherland JR, Takeuchi Y (eds) Pine wilt disease, vol 1. Springer, Berlin, New York, 2008, pp 264-273.
- [36] Sharma RD. Efficiency of *Bacillus* spp. toxins to control *Heterodera glycines* on soybean. *Nematologia Brasileira*, 1995, 19:72-80.
- [37] Sharma RD, Gomes AC. Effects of *Bacillus* spp. toxins on oviposition and juvenile hatching of *Heterodera glycines*. *Nematologia Brasileira*, 1996, 20:53-62.
- [38] Padgham JL, Sikora RA. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. *Crop Protection*, 2006, 8:30
- [39] 王旭辉,丁亚欣,谈俊. 生物菌肥促生机制研究. 现代农业科技(*Modern Agricultural Science and Technology*), 2010,4:307-309.
- [40] Tholozan JL, Cappelier JM, Tissier JP, Delattre G, Federighi M. Physiological characterization of viable-but-nonculturable *Campylobacter jejuni* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999,65:1110-1116.
- [41] Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 1995, 59:143-169.

Diversity of bacteria isolated from cysts *Heterodera glycines* in Heilongjiang

Yingbo Zhu^{1,2}, Fengyu Shi², Niuniu Wang¹, Jianqing Tian¹, Meichun Xiang¹, Xingzhong Liu^{1*}

¹State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²College of Life Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, China

Abstract: [Objective] To understand the bacterial diversity isolated from the cysts of *Heterodera glycines* in the soybean field in Heilongjiang Province. [Methods] Bacteria were isolated from cysts on nutrient agar plates using dilution plate method and further identified by phylogenetic analysis based on 16S rDNA gene sequences. [Results] Totally 90 bacteria strains with different colony morphology were selected on nutrient agar plate and their phylogenetic features were analyzed based on the partial 16S rDNA sequences. In total 7 genera and 22 species were identified, including 46 strains in Gammaproteobacteria (51.1%), 32 in Firmicutes (35.6%), 10 in Betaproteobacteria (11.1%), and 2 in Alphaproteobacteria (2.2%). The dominant bacteria species were *Pseudomonas* and *Bacillus*. [Conclusion] There was abundant species diversity of bacteria isolated from cysts *Heterodera glycines* in Heilongjiang, and these bacteria may play a physical and ecological roles in nematodes.

Keywords: *Heterodera glycines*, Cyst, Culturable bacteria, Diversity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Department Public Benefit Research Foundation (200903040) and by the China Postdoctoral Science Foundation (20100480028)

* Corresponding author. Tel: +86-40-64807512; Fax: +86-40-64807505; E-mail: liuxz@im.ac.cn

Received: 30 January 2012 / Revised: 19 April 2012

《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件, 作者在修改时, 如果对“作者或单位的署名”进行变更, 与最初的投稿不同, 本刊要求: 作者必须再提供有关证明, 否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>), 在首页内, “常见问题”中有显示, 点开左侧的“署名”, 其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序, 需要原研究内容所属单位 (通常是第一署名单位) 的证明信, 证明内容: 原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序, 需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容: 原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部 (邮寄原件或扫描后 E-mail 发来), 新的变更即可生效。