

## 贝莱斯芽孢杆菌 TMQ-KSL-1 分离鉴定 及其发酵液对番茄根结线虫的生防作用

罗利艳<sup>1</sup>, 江志阳<sup>2\*</sup>, 孙翠焕<sup>3\*</sup>, 尹 微<sup>1</sup>, 陈 欣<sup>2</sup>, 齐鹰博<sup>1</sup>, 刘晓洁<sup>1</sup>, 钟玉君<sup>2,4</sup>

(1. 辽宁土木启生物科技有限公司, 辽宁 沈阳 110000; 2. 中国科学院 沈阳应用生态研究所, 辽宁 沈阳 110016;

3. 辽宁省微生物科学研究院, 辽宁 朝阳 122000; 4. 中国科学院大学, 北京 100049)

**摘 要** 镰刀菌 (*Fusarium* spp.) 和根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 都是植物的重要病原物, 这两种病原物在寄主植物中存在着非常复杂的互作关系, 可导致严重的植物土传病害。为探寻对番茄根结线虫病害具有高效防治作用的优良菌株, 本研究以禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 为靶标病菌, 采用平板稀释涂布法从多年种植番茄的设施大棚土壤中分离和筛选到一株抑菌效果较好的生防细菌菌株 TMQ-KSL-1, 根据形态特征、生理生化特性和 16S rRNA 基因测序对该菌株进行鉴定; 测定不同浓度的发酵液及发酵上清液对根结线虫卵孵化率以及根结线虫二龄幼虫死亡率的影响, 通过盆栽实验分析其发酵液对根结线虫病害的防治效果。结果表明, 菌株 TMQ-KSL-1 具有较强的杀线虫活性, 其发酵液和发酵上清液处理 48 h 线虫卵孵化抑制率分别为 94.76% 和 90.72%; 处理 24 h 番茄根结线虫二龄幼虫的校正死亡率分别为 100% 和 97.37%; 菌株 TMQ-KSL-1 发酵液 100 倍稀释液、200 倍稀释液对番茄根结线虫病害防治效果分别为 59.54% 和 12.14%, 且 100 倍液处理防效与阿维菌素 500 倍液处理防效 (61.56%) 相当; 地下鲜重分别提高了 90.95%、19.65%。因此, 菌株 TMQ-KSL-1 具有防控番茄根结线虫病害的能力, 具有市场开发应用前景。

**关键词** 贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*); 植物病害; 番茄; 根结线虫; 生物防治

**中图分类号** Q939.96 **文献标识码** A **文章编号** 1005-7021(2024)02-0062-09

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2024.02.006

## Isolation and Identification of *Bacillus velezensis* TMQ-VKSL-1 and Its Use for Biocontrol of *Meloidogyne Incognita* Infection of Tomato

LUO Li-yan<sup>1</sup>, JIANG Zhi-yang<sup>2\*</sup>, SUN Cui-huan<sup>3\*</sup>, YIN Wei<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>,

QI Ying-bo<sup>1</sup>, LIU Xiao-jie<sup>1</sup>, ZHONG Yu-jun<sup>2,4</sup>

(1. Liaoning Civil Engin. Biotech. Co. Ltd., Shenyang 110000;

2. Shenyang Inst. of App. Ecol., Chinese Acad. of Sci., Shenyang 110016; 3. Liaoning Acad. of Microbiol., Chaoyang 122000;

4. Uni. of Chinese Acad. of Sci., Beijing 100049)

**Abstract** *Fusarium* spp. and *Meloidogyne* spp. are important plant pathogens, and the complex interaction between these two pathogens in the host plant that can lead to serious soil borne plant diseases. In this study, *F. graminearum* was used as the target pathogen to explore highly effective strains for biocontrolling of root knot nematode (RKN) diseases in tomatoes. A bacterial strain TMQ-KSL-1 with good antibacterial effect was isolated and screened from a long-term tomato monoculture greenhouse soil using dilution plating method. The strain was classified based on its morpho-

基金项目: 国家重点研发计划“黑土地保护与利用科技创新”重点专项 (2023YFD150050402); 中国科学院战略性先导科技专项 (XDA28070304); 辽宁省科协科技型中小微企业扶持计划项目 (2022)

作者简介: 罗利艳 女, 助理工程师。主要从事农用微生物肥料研究。E-mail: cch121208@126.com

\* 通讯作者: 江志阳, 男, 硕士, 高级工程师。主要从事微生物农用及绿色肥料研发。E-mail: jiangzhiyang@iae.ac.cn

孙翠焕, 女, 研究员。主要研究方向为应用微生物研究。E-mail: sch6812@163.com

收稿日期: 2024-02-01

logical, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA gene sequence. The effects of different concentrations of TMQ-KSL-1 fermentation broth and fermentation supernatant on the RKN eggs hatching rate and the lethal rate of the second instar larvae of RKN were determined. The inhibition effect of the fermentation broth on RKN diseases was also analyzed through pot experiments. The results showed that strain TMQ-KSL-1 had strong nematocidal activity, and the inhibition rates of nematode egg hatching were 94.76% and 90.72% after 48 hours of treatment with its fermentation broth and fermentation supernatant, respectively. The corrected mortality rates of the second instar larvae of tomato RKN after 24 h treatment of fermentation broth and supernatant were 100% and 97.37%, respectively. The 100 and 200-fold fermentation broth of strain TMQ-KSL-1 reduced tomato RJN disease by 59.54% and 12.14%, respectively, and the biocontrol effect of 100-fold fermentation broth was equivalent to that of 500-fold fermentation broth of avermectin (61.56%). Both the fermentation broth and supernatant increased underground fresh weight by 90.95% and 19.65% respectively, indicating that the strain has a growth promoting effect on tomato roots. Therefore, strain TMQ-KSL-1 has the ability to prevent and control tomato RKN diseases, and has market development and application prospects.

**Keywords** *Bacillus velezensis*; plant diseases; tomato; root knot nematode; bio-control

辽宁省因其适宜的地理位置及冬季光照条件,设施农业在全省农业发展中占有重要的位置。截至 2018 年末,全省的温室总面积已达到 18 万  $\text{hm}^2$ ,成为北方地区最重要的设施农业栽培生产区域<sup>[1]</sup>。设施蔬菜种植品种包括黄瓜、番茄、辣椒、豆角、茄子、韭菜等,近年来设施栽培发展到包括花卉、果树、食用菌及养殖等多个领域,成为农村经济的支柱产业和实现农民创收致富的重要手段<sup>[2]</sup>。根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是一类重要的植物寄生线虫,寄主范围广泛,受害作物多达 3 000 多种<sup>[3]</sup>。番茄属于茄科,番茄属(*Solanum*),是根结线虫的易感作物,其主根及侧根极易受到根结线虫侵染,形成根结,造成根系发育受阻、腐烂,导致植株地上部分衰弱甚至枯死,造成减产<sup>[4]</sup>。根结线虫病害是土传病害之一,由于设施蔬菜栽种年限延长,重茬种植严重,使得土壤中的根结线虫大量繁殖,作物根结线虫病害发生及区域逐年扩大,给农业生产带来巨大的经济损失,成为危害设施农作物生产的重要病害<sup>[5-7]</sup>。如何安全且高效的防治根结线虫病害,逐渐成为人们的研究重点。目前根结线虫病害防治虽然综合了繁育抗病品种、物理防治、化学防治、生物防治及科学规范化田间作业等多种手段<sup>[8-9]</sup>,但是依然以化学防治为主,应用最多的是土壤熏蒸剂和触杀性杀线剂<sup>[10-12]</sup>,但是由于根结线虫抗药性的增加,效果并不理想,同时也对食品安全造成隐患。大量研究表明,生物防治对根结线虫病害可以达到良

好的防治效果。生物防治方法包括利用天敌、生防微生物以及植物抗性等。生防微生物作为生物防治的核心,目前以真菌、细菌研究的较多,主要包括枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)及阿维菌素链霉菌(*Streptomyces avermectin*)等,对线虫都有很好的防治作用<sup>[13-16]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)是芽孢杆菌属的一个新种,因其能够产生多种次级代谢产物,并且具有广谱抑菌活性和促生长作用,被广泛应用于抗虫杀菌剂、表面活性剂、生物制剂、增味剂和营养保健剂等方面<sup>[17-20]</sup>。有研究表明,镰刀菌(*Fusarium* spp.)和根结线虫(*Meloidogyne* spp.)都是植物的重要病原物,这两种病原物之间在寄主植物中存在着非常复杂的互作关系,可导致严重的植物病害<sup>[21]</sup>。本研究以禾谷镰刀菌作为指示菌,在保护地种植番茄根部土壤中分离纯化得到一株贝莱斯芽孢杆菌 TMQ-KSL-1,开展其发酵液对番茄根结线虫活性的研究,通过盆栽试验验证生物防治效果,为贝莱斯芽孢杆菌对番茄根结线虫病害的生物防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 土壤样品 采用五点法在辽宁省沈阳市苏家屯区番茄保护地块采集番茄根际深 10 cm 土壤样品,共计 30 份。

1.1.2 番茄苗 番茄品种“园艺-L402”,购自辽宁省农业科学院蔬菜研究所。育苗土为 V 草炭土:V 蛭石=2:1,待幼苗长到 3 叶 1 心备用。

1.1.3 番茄根结线虫 2 龄幼虫 由辽宁土木启生物科技有限公司实验室自行培育,扩繁材料为番茄。

1.1.4 培养基 NA 培养基;LB 培养基;PDA 培养基;发酵培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 10 g,酵母浸粉 20 g,氯化钠 6 g,水 1 000 mL,pH 值 7.2。

1.1.5 主要试剂与仪器设备 DNA 提取试剂盒(生工生物工程上海股份有限公司);阿维菌素(乳油 1.8%,山东金农华药业有限公司)。生化培养箱(HPS-200,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);全温振荡器(HZQ-Q,哈尔滨市东联电子技术开发有限公司);立式压力蒸汽灭菌器(BXM-30R,上海博迅实业有限公司);离心机(H1750R,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);生物显微镜(BK6000,重庆奥特光学仪器有限责任公司);电子分析天平(FA224,上海舜宇恒平科学仪器有限公司)。

## 1.2 方法

1.2.1 菌株分离 采用平板稀释涂布法,分别将每份待测土壤样品按照 10 倍比依次稀释制成  $10^{-3}$ ~ $10^{-6}$  系列梯度悬浮液,取 100  $\mu$ L 悬浮液涂布在 NA 培养基上,35  $^{\circ}$ C 培养 48 h,挑取形态、颜色特征不同的菌落进行纯化,纯化后的单一菌落转接 LB 斜面,保存于 4  $^{\circ}$ C 冰箱备用。采用对峙培养法筛选,以禾谷镰刀菌为指示菌,用 5 mm 的灭菌打孔器打取已活化好的指示菌菌饼,先将菌饼接在新鲜的 PDA 平板中央作指示菌,再将待测菌点接在离菌饼 2.5 cm 处,以仅接菌饼的平板为对照。28  $^{\circ}$ C 倒置培养 4 d,测量菌落直径并按照公式计算抑菌率<sup>[5]</sup>:抑菌率(%)=((对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-菌饼直径)) $\times$ 100%。

1.2.2 菌株鉴定 ①形态观察:通过平板划线观察菌落形态。取活化的菌株进行革兰染色,通过光学显微镜观察菌体形态。②生理生化鉴定:根据《伯杰氏细菌鉴定手册》(第 9 版)<sup>[22]</sup>、《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[23]</sup>对菌株进行初步形态学鉴定及生理生化鉴定。③分子鉴定:采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 TMQ-KSL-1

的基因组 DNA,用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R<sup>[24]</sup>,*gyrB* 基因引物 UP-1 和 UP-2R<sup>[25]</sup>进行 PCR 扩增,PCR 产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序分析。测定序列提交至 GenBank,利用 BLAST 软件对所测的 16S rDNA 基因和 *gyrB* 基因序列与 GenBank 中已有的模式菌株进行序列比对,最后使用 MEGA7.0 软件的 Neighbor Joining 法构建系统发育树。

1.2.3 菌株 TMQ-KSL-1 对番茄根结线虫卵孵化的抑制作用测定 用接种环挑取保藏斜面菌苔进行 NA 平板划线,35  $^{\circ}$ C 培养 24 h 后,挑取 4~5 个单菌落接种于装有 100 mL LB 液体培养基的 500 mL 三角瓶中,35  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 8 h 得到摇瓶种液;以 6%(体积分数)接种量接种到装有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 三角瓶中,35  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 72 h 得到摇瓶发酵液,发酵液 12 000 r/min 离心 10 min 得发酵上清液。发酵液及上清液置于 4  $^{\circ}$ C 冰箱备用。采用 96 孔培养板进行线虫卵孵化抑制试验,每孔加入发酵液( $1.0 \times 10^9$  cfu/mL)及上清液 200  $\mu$ L,随后加入 100 粒虫卵,以无菌水及发酵培养基上清为对照,每个处理 3 次重复,28  $^{\circ}$ C 放置 48 h,每隔 12 h 统计番茄根结线虫卵孵化率,连续观察记录 48 h,计算卵孵化抑制率<sup>[5]</sup>:抑制率(%)=((对照孵化率-处理孵化率)/对照孵化率) $\times$ 100%。

1.2.4 菌株 TMQ-KSL-1 杀番茄根结线虫活性测定 96 孔培养板每孔分别加入不同浓度的稀释发酵液及上清液各 200  $\mu$ L,浓度分别为原液、150 倍稀释液和 300 倍稀释液,随后每孔加入 100 条 2 龄期番茄根结线虫,用无菌水设置阴性对照,阿维菌素 500 倍稀释液为阳性对照,每个处理重复 3 次。28  $^{\circ}$ C 温箱培育,24 h 后统计死亡根结线虫数量,线虫弯曲视为存活,僵直不动视为死亡<sup>[26]</sup>,按公式计算根结线虫校正死亡率<sup>[5]</sup>:校正死亡率(%)=((实验组线虫死亡率-对照组线虫死亡率)/(1-对照组线虫死亡率)) $\times$ 100%。

1.2.5 菌株 TMQ-KSL-1 对番茄根结线虫的盆栽防效测定 番茄苗定植于实验盆中,盆土为灭菌处理后的草炭土+蛭石,定植缓苗 7 d 后进行实验。分别向种植盆中灌入 100 mL TMQ-KSL-1 发酵液 100 倍稀释液( $1.0 \times 10^7$  cfu/mL)及 200



倍稀释液( $0.5\times 10^7$  cfu/mL),以清水为阴性对照,阿维菌素 500 倍稀释液为阳性对照,处理 24 h 后,每盆在番茄近根部 5 点接入 10 000 条 2 龄幼虫,每个处理 10 次重复,盆栽番茄在温室(25 ℃)正常管理。接种线虫 60 d 后,将番茄植株连根拔出,自来水冲洗至无基质颗粒,统计番茄主根系根结数,地下鲜重,按公式计算防治效果<sup>[5]</sup>:防治效果(%)=((平均每株对照根结数-平均每株处理根结数)/平均每株对照根结数)×100%。

1.2.6 试验数据处理及分析 试验数据处理利用 SPSS(20.0 版)软件进行统计分析( $P<0.05$ )。

2 结果与分析

2.1 菌株的筛选

实验共分离纯化出 154 株菌株,其中真菌 41 株,放线菌 27 株,细菌 86 株,经过筛选对禾谷镰刀菌有拮抗效果的共 23 株,抑菌率在 20.00% 以上的有 8 株(表 1),其中抑菌带最宽的为菌株 TMQ-KSL-1,抑菌率达 45.09%(图 1)。

表 1 不同拮抗细菌的抑菌率

Table 1 The antibacterial rate of different antagonistic bacteria		
编号	禾谷镰刀菌落直径/mm	抑菌率/%
对照	78.34±0.328 5	
TMQ-KSL-1	45.27±0.148 1	45.09
TMQ-KSL-2	51.02±0.562 9	37.26
TMQ-KSL-3	62.88±0.425 5	21.08
TMQ-KSL-5	52.15±0.076 4	35.71
TMQ-KSL-8	50.38±0.433 3	38.11
TMQ-KSL-11	60.02±0.033 3	24.98
TMQ-KSL-12	54.50±0.173 2	32.51
TMQ-KSL-16	48.97±0.066 6	40.05

2.2 菌株形态与生理生化鉴定

菌株 TMQ-KSL-1 革兰染色呈阳性,细胞杆状,大小( $0.6\sim 0.8$ )  $\mu\text{m}\times(2.0\sim 4.0)$   $\mu\text{m}$ 。芽孢中生或偏端生,芽孢囊不膨大,芽孢柱形。在 LB 培养基上,菌落圆形,白色,隆起,表面较干燥,边缘整齐(图 2)。生理生化检测结果显示该菌株接触酶、氧化酶、水解淀粉反应阳性;厌氧生长、卵磷脂酶反应为阴性;能利用麦芽糖、海藻糖、纤维二糖、

蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘露糖、果糖、山梨醇、甘露醇、甘油,不利用丙酸盐、蜜二糖、半乳糖、阿拉伯醇(表 2)。

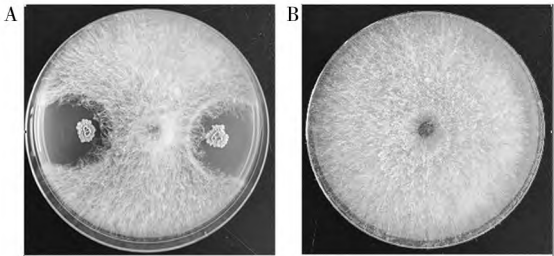


图 1 TMQ-KSL-1 对禾谷镰刀菌的拮抗作用

Fig.1 Antifungal activities of TMQ-KSL-1 against *F.graminearum* in plate tests  
A:TMQ-KSL-1;B:对照  
A:TMQ-KSL-1;B:CK

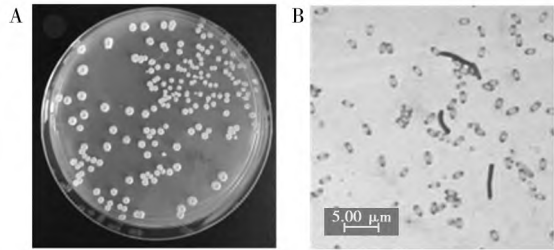


图 2 菌株 TMQ-KSL-1 形态特征

Fig.2 Morphological characteristics of strainTMQ-KSL-1  
A:NA 培养基 35 ℃ 培养 48 h 菌落形态;B:显微菌体形态  
A:Colony morphology was cultured in NA medium at 35 ℃ for 48 h;B:Microscopic cell morphology

表 2 菌株 TMQ-KSL-1 生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain TMQ-KSL-1			
生理生化指标	结果	生理生化指标	结果
接触酶	+	麦芽糖	+
氧化酶	+	蜜二糖	-
卵磷脂酶	-	甘露糖	+
水解淀粉	+	半乳糖	-
丙酸盐	-	果糖	+
海藻糖	+	山梨醇	+
纤维二糖	+	甘露醇	+
蔗糖	+	甘油	+
乳糖	+	阿拉伯醇	+
葡萄糖	+	厌氧生长	-

注:“+”阳性;“-”阴性

2.3 分子鉴定

用细菌通用引物测定 16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列,分别获得 1 450 bp 和 1 260 bp 的基因片段。将测序结果在 GenBank 进行序列比对,下载相似模式菌株 16S rDNA 与 *gyrB* 基因序列,分别构建系统发育树。图 3 进化树 A 中菌株 TMQ-KSL-1 与 *B. velezensis* CBMB205 (登录号:NR 116240.1) 聚在一枝,种间分歧自展值 96;进化树 B 中菌株 TMQ-KSL-1 与 *B. velezensis* NN95 (登录号:MT119763.1)、*B. velezensis* SDTB022 (登录号:OK094681.1)、*B. velezensis* NN05 (登录号:MT119758.1)、*B. velezensis* HS-3 (登录号:OR365761.1) 聚在一枝,自展值 98,因此将该菌株鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。

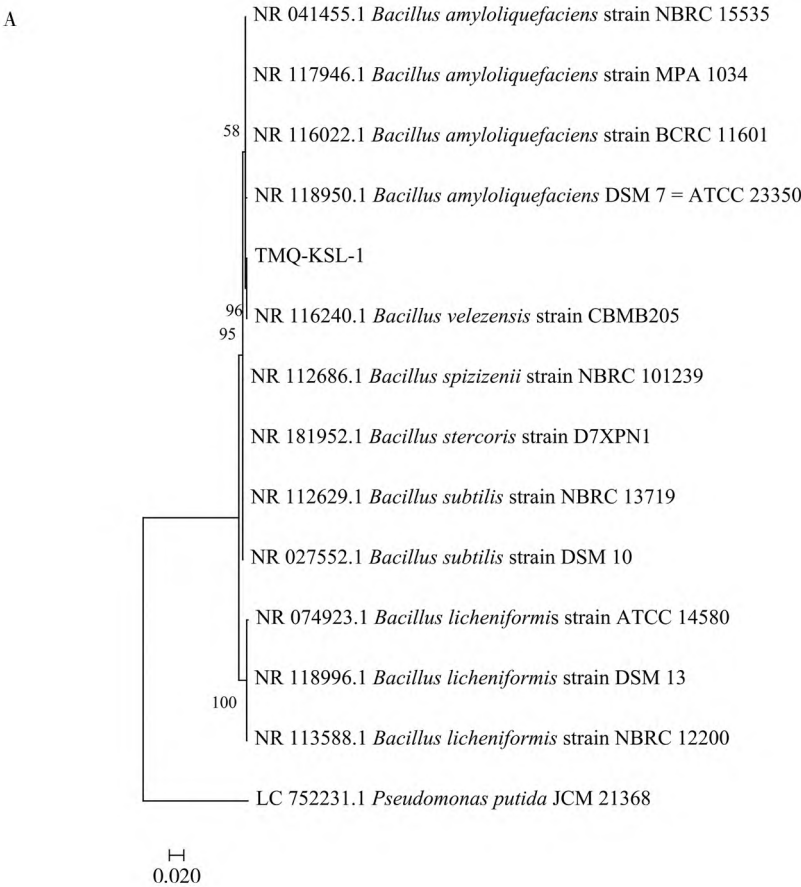
2.4 菌株 TMQ-KSL-1 对番茄根结线虫卵孵化的抑制作用

由图 4 可知,无菌水和培养基上清处理后,番茄根结线虫卵孵化率随着时间的延长而提高,处理 24 h 线虫卵孵化率分别为 20.33% 和 18.33%,

处理 48 h 线虫卵孵化率分别为 82.67% 和 58.33%。发酵液和发酵上清液处理 24 h 线虫卵孵化率分别为 2.67% 和 3.33%,处理 48 h 线虫卵孵化率分别为 4.33% 和 7.67%,显著低于无菌水对照,48 h 线虫卵孵化抑制率分别为 94.76% 和 90.72%。以上数据表明菌株 TMQ-KSL-1 发酵液和发酵上清液能有效抑制番茄根结线虫卵孵化。

2.5 菌株 TMQ-KSL-1 杀番茄根结线虫活性

无菌水阴性对照线虫死亡率为 11.00%,如图 5 所示,菌株 TMQ-KSL-1 发酵液和阿维菌素 500 倍稀释液对番茄根结线虫的校正死亡率为 100% 和 99.25%,高于其他处理,发酵液与阿维菌素 500 倍稀释液比较差异达到显著水平。150 倍稀释发酵液、300 倍稀释发酵液处理线虫校正死亡率分别为 98.50%、96.63%;上清液、150 倍稀释上清液和 300 倍稀释上清液线虫校正死亡率分别为 97.37%、94.01% 和 89.51%。以上结果表明菌株 TMQ-KSL-1 发酵液对番茄根结线虫具有较强的杀虫活性。



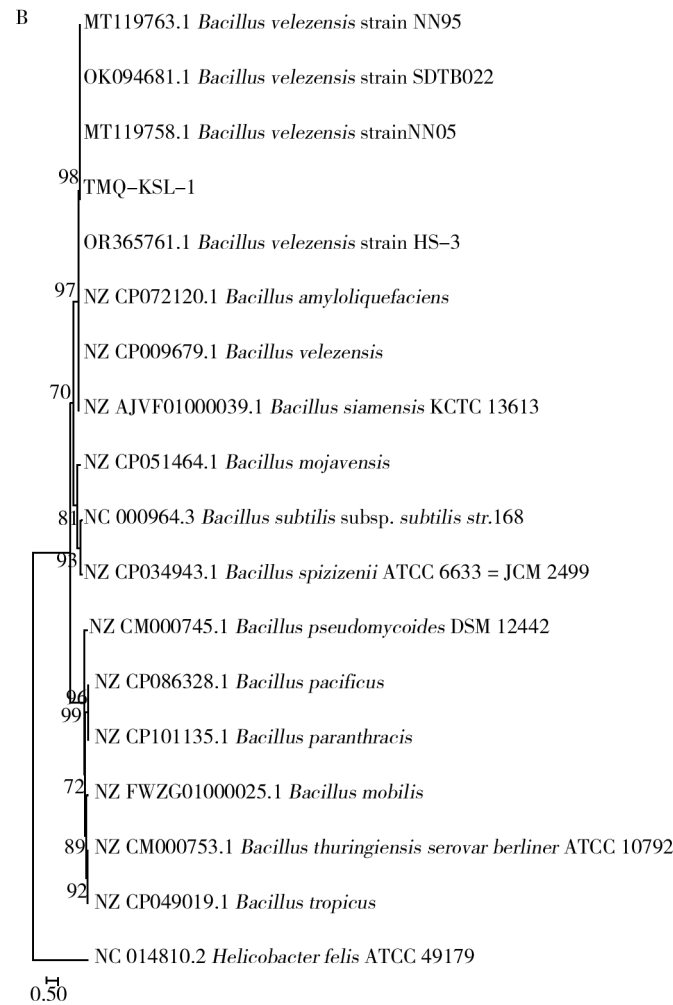


图 3 TMQ-KSL-1 的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic trees of TMQ-KSL-1

A: 基于 16S 序列;B: 基于 *gyrB* 序列

A: for 16S; B: for *gyrB*

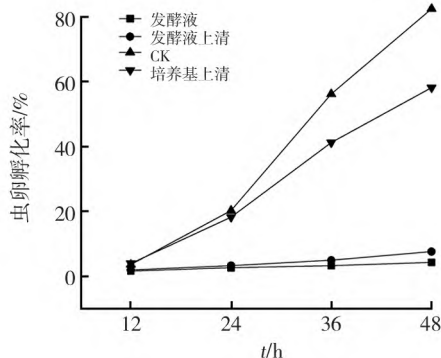


图 4 菌株 TMQ-KSL-1 对番茄根结线虫卵孵化率的抑制作用

Fig.4 Inhibition effect of strain TMQ-KSL-1 on the hatching rate of tomato root knot nematode eggs

## 2.6 菌株 TMQ-KSL-1 对番茄根结线虫的盆栽防效

如图 6 所示,清水阴性对照番茄平均每株根瘤数为 69.20 个,与清水对照比较, TMQ-KSL-1 100 倍稀释发酵液、200 倍稀释发酵液及阿维菌素 500 倍稀释液处理的番茄根系具有更少的根瘤,平均每株根瘤数分别为 28.00 个、60.80 个和 26.60 个。菌株 TMQ-KSL-1 100 倍稀释发酵液、200 倍稀释发酵液及阿维菌素 500 倍稀释液对番茄根结线虫病害的防治效果分别为 59.54%、12.14%和 61.56%,100 倍稀释发酵液与单剂阿维菌素防效相当。清水阴性对照平均每株地下鲜重 4.53 g,菌株 TMQ-KSL-1 100 倍稀释发酵液、200

倍稀释发酵液及阿维菌素 500 倍稀释液处理平均每株地下鲜重分别为 8.65、5.42、8.84 g,与清水对照比较,地下鲜重分别提高了 90.95%、19.65%、95.14%,差异均达到显著水平。以上结果表明菌株 TMQ-KSL-1 发酵液具有防治番茄根结线虫病害的能力。

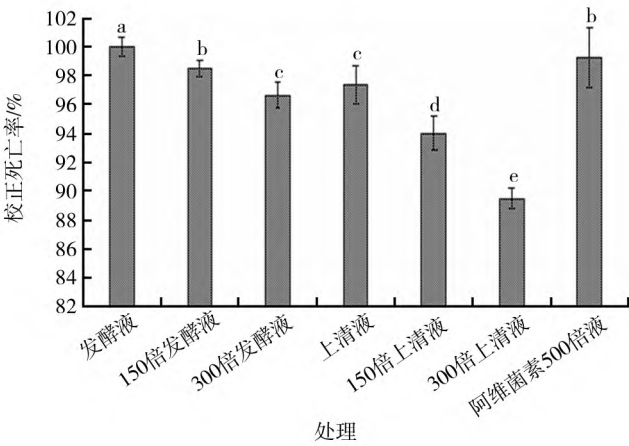


图 5 菌株 TMQ-KSL-1 离体杀线虫活性

Fig.5 *In vitro* nematocidal activity of strain TMQ-KSL-1

不同小写字母表示不同处理间的差异显著 ( $P<0.05$ ), 下图同

Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments ( $P<0.05$ ), the same below

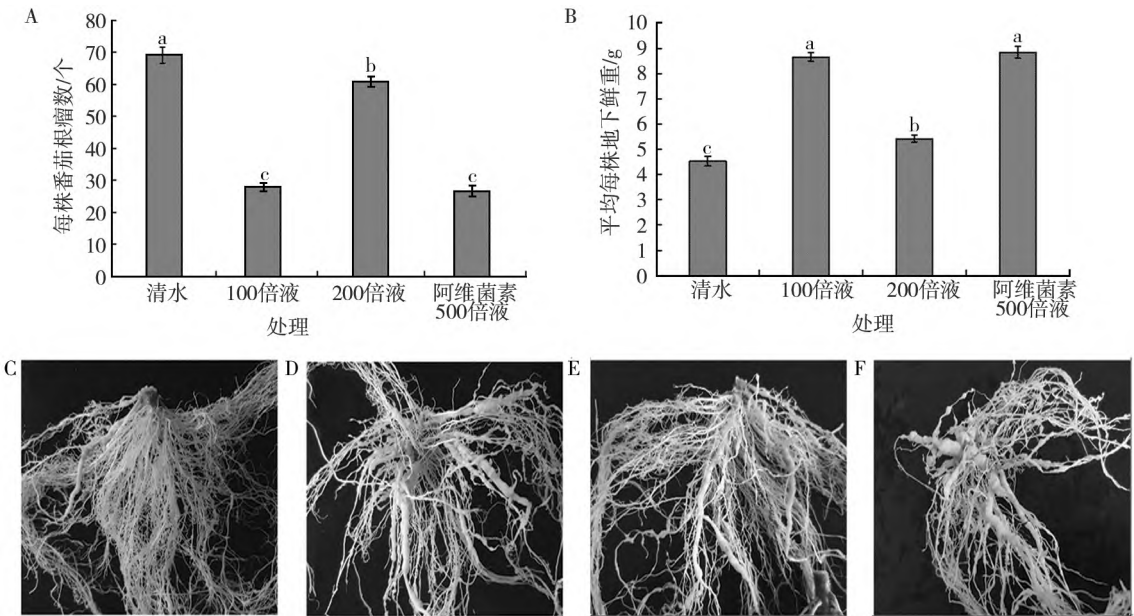


图 6 菌株 TMQ-KSL-1 盆栽试验结果

Fig.6 Pot experiment results of strain TMQ-KSL-1

A: 菌株 TMQ-KSL-1 对番茄根结线虫病害的防效;B: 菌株 TMQ-KSL-1 对番茄根部促生长效果;C: 100 倍发酵液处理番茄根系;D: 200 倍发酵液处理番茄根系;E: 阿维菌素 500 倍液处理番茄根系;F: 清水处理番茄根系

A: The control effect of strain TMQ-KSL-1 on tomato *Meloidogyne incognita* disease;B: The growth promoting effect of strain TMQ-KSL-1 on tomato roots;C: Treating tomato roots with 100 times fermentation broth;D: Treating tomato roots with 200 times fermentation broth;E: Tomato roots were treated with 500 times Avermectin solution;F: Treatment of tomato root system with clear water



### 3 讨 论

番茄是根结线虫的易感作物,随着设施栽培规模的不断扩大和连作年限的延长,危害程度愈发严重。生物防治是一种安全有效的手段,大量学者为此对微生物资源进行了开发及研究。芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)作为生防细菌,已广泛应用于农作物病害防控<sup>[27-30]</sup>。

近几年,国内外分离得到大量的贝莱斯芽孢杆菌,并对其促植物生长、抗病虫和诱导植物系统抗病性等方面进行了研究。菌株 WRN031 作为一种促生长根际菌(PGPR)可在玉米主根和侧根成熟区积累,起到改善玉米幼苗生长的作用<sup>[19]</sup>。夏明聪等<sup>[31]</sup>发现菌株 YB-145 能够抑制禾谷镰刀菌菌丝的生长,具备产生 IAA(吲哚乙酸)、铁离子载体及分泌蛋白酶和  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶的能力,  $10^8$  cfu/mL YB-145 菌悬液浸种对小麦幼苗纹枯病的防效为 73.31%。菌株 E69 具有广谱抗菌作用,能够抑制稻瘟病菌分生孢子萌发和附着胞的形成,对稻瘟、叶瘟和穗颈瘟均具有良好防效<sup>[32]</sup>。菌株 SZAD1 能产生纤维素酶和几丁质酶,浸种处理对棉花黄萎病的防效达 60.10%<sup>[33]</sup>。菌株 L-1 无菌发酵液耐高温、酸、碱、紫外照射和蛋白酶降解,对梨灰霉和青霉病菌具有稳定的拮抗活性<sup>[34]</sup>。菌株 A-27 对根结线虫(J2)有离体抑杀作用,A-27 可湿性粉剂 10 倍稀释液灌根处理 60 d 后,对番茄根结线虫的防效高达 92.13%<sup>[35]</sup>。菌株 Bv-25 可上调黄瓜防御反应基因的表达,诱导黄瓜对南方根结线虫产生抗性,降低结瘤率<sup>[36]</sup>。

与现有报道比较,本研究分离筛选到的菌株 TMQ-KSL-1 对禾谷镰刀菌具有明显拮抗作用,经菌体、菌落形态,生理生化测定及 16S rDNA 分析,菌株被鉴定为贝莱斯芽孢杆菌,其发酵液可抑制线虫卵孵化,利于形成健康的植物根部土壤环境,在有效防治番茄根结线虫病害的同时达到促进根系生长的作用。本研究为根结线虫病害的生物防治提供了新的菌种资源,因其发酵液 100 倍液与单剂阿维菌素对根结线虫病害防效相当,具有市场开发潜力。本研究未对该菌株抑杀线虫作用的分子基础及作用机理进行研究,存在一定不足,该菌株是否具有更广的土传病害生防功能有待进一步挖掘。

### 参考文献:

- [1] 王藝锦.辽宁省朝阳市日光温室种植结构与效益分析[D].沈阳:沈阳农业大学,2019.
- [2] 金迪,于春雷.东北地区蔬菜种植与生产现状分析[J].现代园艺,2023(16):35-37.
- [3] Li J, Zou CG, Xu JP, et al. Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions: Basis for biological control of plant-parasitic nematodes[J]. Annual Review Phytopathology, 2015, 53: 67-95.
- [4] 刘念,董文阁,董莉,等.设施番茄根结线虫病综合防治技术研究进展[J].东北农业科学,2022,47(6):109-114.
- [5] 段玉玺.植物线虫学[M].北京:科学出版社,2011.
- [6] Collange B, Navarrete M, Peyre G, et al. Root-knot nematode (*Meloidogyne*) management in vegetable crop production: The challenge of an agronomic system analysis[J]. Crop protection, 2011, 30(10): 1251-1262.
- [7] 董梓慧,刘海龙,王阳,等.设施蔬菜根结线虫的发生与绿色防控技术[J].陕西农业科学,2020,66(11):94-95.
- [8] 阎世江.蔬菜根结线虫病防治研究进展[J].天津农林科技,2023(3):30-32.
- [9] 林雪,李永达,张胜菊,等.日光温室高品质中果型番茄品种筛选[J].蔬菜,2023(6):64-66.
- [10] 沈祥军,郭欢欢,时雪,等.通辽市设施土壤根结线虫的发生及防治研究[J].现代农村科技,2023(4):43-44.
- [11] 姚玉荣,霍建飞,贾海燕,等.番茄根结内生真菌诱导植株对南方根结线虫的抗性研究[J].天津农业科学,2022,28(9):46-49.
- [12] Hajihassani A, Davis R-F, Timper P. Evaluation of selected nonfumigant nematicides on increasing inoculation densities of *Meloidogyne incognita* on cucumber[J]. Plant Disease, 2019, 103(12):3161-3165.
- [13] 魏利辉,周冬梅,王云鹏,等.枯草芽孢杆菌 168 的遗传修饰菌株对番茄根结线虫病的生防作用[J].农业生物技术学报,2011,19(4):740-745.
- [14] Zhai YL, Shao ZZ, Cai MM, et al. Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from Antarctic soil against *Meloidogyne incognita*[J]. Frontiers in Microbiology, 2018, 9: 253.
- [15] 杨凡,姜华艳,蔡毓新,等.蔬菜根结线虫生防菌淡紫紫孢菌研究进展[J].中国瓜菜,2023,36(3):1-8.
- [16] 孙文荣,滕美丽,吴兴超,等.阿维菌素可溶液剂药肥对番茄生长及根结线虫防治效果的影响[J].天津农业科学,2023,29(2):48-51.
- [17] Chen XH, Vater J, Piel J, et al. Structural and functional characterization of three polyketide synthase gene clusters in *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42[J]. Journal of Bacteriology,



- 2006,188:4024-4036.
- [18] Meng QX, He J, Hao JJ. Effects of *Bacillus velezensis* strain BAC03 in promoting plant growth [J]. Biological Control, 2016,98:18-26.
- [19] Wang AQ, Hua J, Wang YY, et al. Stereoisomers of nonvolatile acetylbutanediol metabolites produced by *Bacillus velezensis* WRN031 improved root elongation of maize and rice [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68 (23): 6308-6315.
- [20] Rashid MHO, Khan A, Hossain MT, et al. Induction of systemic resistance against aphids by endophytic *Bacillus velezensis* YC7010 via expressing PHYTOALEXIN DEFICIENT4 in Arabidopsis [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 2(8):1-12.
- [21] Fukushima H. Propagation of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) on fungi growing in pine-shoot segments [J]. Applied Entomology Zoology, 1991, 26(3):371-376.
- [22] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's manual of determinative bacteriology [M]. 9th ed. Beijing: Science Press, 1984.
- [23] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [24] Wang LT, Lee FL, Tai CJ, et al. Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(8): 1846-1850.
- [25] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(3): 1104-1109.
- [26] Harada Y, Yoshiga T. Distinguishing between inactivated and dead second stage juveniles of *Meloidogyne incognita* using the NaOH method [J]. Japanese Journal of Nematology, 2015, 45 (1):51-55.
- [27] Gao H, Qi G, Yin R, et al. *Bacillus cereus* strain S2 shows high nematocidal activity against *Meloidogyne incognita* by producing sphingosine [J]. Scientific Reports, 2016, 6 (1): 28756.
- [28] Baghaee-Ravari S, Mahdikhani-Moghaddam E. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* cry14 toxin against root knot nematode, *Meloidogyne javanica* [J]. Plant Protection Science, 2015, 54 (1): 46-51.
- [29] Yi JC, Zhang DJ, Cheng YJ, et al. The impact of *Paenibacillus polymyxa* HY96-2 *luxS* on biofilm formation and control of tomato bacterial wilt [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103: 23-24.
- [30] Abdallah Y, Yang M, Zhang M, et al. Plant growth promotion and suppression of bacterial leaf blight in rice by *Paenibacillus polymyxa* sx3 [J]. Letters in Applied Microbiology, 2019, 68 (5): 423-429.
- [31] 夏明聪, 邓晓旭, 齐红志, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 YB-145 对小麦纹枯病的防治效果及促生作用 [J]. 河南农业科学, 2021, 50(10): 76-83.
- [32] 沙月霞, 隋书婷, 曾庆超, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 E69 预防稻瘟病等多种真菌病害的潜力 [J]. 中国农业科学, 2019, 52 (11):1908-1917.
- [33] 张琼, Zabihullah Sherzad, 唐灿明. 贝莱斯芽孢杆菌 SZAD1 对大丽轮枝菌的生物防治效果 [J]. 棉花学报, 2020, 32(4): 329-338.
- [34] 孙平平, 崔建潮, 贾晓辉, 等. 贝莱斯芽孢杆菌 L-1 对梨灰霉和青霉病菌的抑制作用评价及全基因组分析 [J]. 微生物学报, 2018, 58(9):1637-1646.
- [35] 闫建蓉. 贝莱斯芽孢杆菌 A-27WP 的研制及对番茄根结线虫的防治效果 [D]. 晋中: 山西农业大学, 2022.
- [36] 赵晓曼. 贝莱斯芽孢杆菌 Bv-25 对南方根结线虫的生防作用分析 [D]. 新乡: 河南科技学院, 2021.