

南极土壤来源的恶臭假单胞菌1A00316 抗南方根结线虫的机制*

唐佳频¹ 邵宗泽² 张智涛¹ 李光玉² 景雪萍¹ 喻子牛¹ 张吉斌^{1**}

¹华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 生命科学技术学院, 微生物农药国家工程研究中心 武汉 430070

²国家海洋局第三海洋研究所, 海洋生物遗传资源重点实验室 厦门 361005

摘要 对1 432株海洋和极地来源的细菌进行抗南方根结线虫的离体筛选, 并对其中活性较好的一株菌进行菌种鉴定并通过盆栽实验验证其在实际生防中的效果. 设计诱导系统抗性实验, 测定植物防御酶活的变化, 初步研究细菌的抗虫机制. 结果显示, 从1 432株细菌离体筛选得到了9株具有抗南方根结线虫的细菌, 其中南极土壤来源的菌株1A00316在离体和活体中均表现出较好的抗性, 其生防效果达到71.67%, 经鉴定该菌株为恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*). 诱导番茄系统抗性实验结果显示, 经菌株1A00316发酵液处理后的番茄3种防御酶苯丙氨酸解氨酶 (PAL)、多酚氧化酶 (PPO) 以及过氧化物酶 (POD) 的酶活均显著提高, 分析数据认为该菌株的菌体可诱导番茄系统抗性. 本研究表明恶臭假单胞菌1A00316抗南方根结线虫效果较好, 可作为微生物制剂应用于实际生防中; 该菌不仅有直接抗虫作用, 还存在间接抗虫机制, 其多重抗虫机制也具有进一步的研究价值. 表5 图1 参17

关键词 南方根结线虫; 恶臭假单胞菌; 南极土壤; 生物防治; 诱导系统抗性

CLC S476 : S154.39

Mechanism of antagonistic bacteria *Pseudomonas putida* 1A00316 from the South Pole soil against *Meloidogyne incongnita**

TANG Jiapin¹, SHAO Zongze², ZHANG Zhitao¹, LI Guangyu², JING Xueping¹, YU Ziniu¹ & ZHANG Jibin^{1**}

¹State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, National Engineering Research Center for Microbial Pesticides, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

²Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

Abstract *Meloidogyne incongnita* causes serious damage to crops. Nowadays, attention has been paid to the side effects of chemical insecticides control. It is important to isolate the antagonistic microbe against root knot nematode from microbial resources. In this study 1 432 marine and polar isolates were screened against nematode to identify 9 strains with high nematocidal activity to study its biocontrol effect on nematode by pot experiments. Among them the strain 1A00316 isolated from the South Pole showed good inhibition on *M. incongnita* *in vitro* and in pot experiment, with biocontrol efficiency on nematodes as 71.67%. The experiment of induced systemic resistance (ISR) was conducted to study the possible mechanisms of 1A00316 against *M. incongnita* by determining the enzymes. Strain identification showed the strain 1A00316 belonged to *Pseudomonas putida*. The ISR mediated by strain 1A00316 in tomato clearly showed an improvement of activity of three defense enzymes: phenylalanineammonialyase (PAL), polyphenol oxidase (PPO) and peroxidase (POD) in tomato plants. The result indicated strain 1A00316 itself could induce systematic resistance to tomato and enhance their resistance against nematode. This research showed that *P. putida* strain 1A00316 has good resistance to *M. incongnita*, of both direct and induced systemic resistance, therefore can be used as microbial agents.

Keywords *Meloidogyne incongnita*; *Pseudomonas putida*; biological control; induced systemic resistance

近年来, 植物寄生线虫是提高农作物产量中一个重要的限制因素, 尤以植物根结线虫和植物孢囊线虫对农作物庄稼危害最大, 分布范围也最广^[1]. 生物防治是控制植物病害、减少化学农药污染的有效途径, 目前许多学者已经分离到了

抗植物寄生线虫的微生物资源, 从各类文献报道来看, 分离到的抗线虫活性的菌株多为真菌, 如淡紫色拟青霉^[2]、厚垣轮枝孢菌^[3]、哈茨木霉^[4]、水生真菌YMF 1.01019^[5]等. 杀线虫细菌主要是根际细菌和芽胞杆菌, 如多粘类芽胞杆菌^[6]、蜡样芽胞杆菌^[7]、荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌^[8]. 虽然分离到的微生物资源丰富, 但仅有一部分被制成生防产品运用于实际生活中, 因此发掘高效且新颖的生物资源仍具有重要的意义. 我们尝试从特殊生境的细菌中筛选出抗根结线虫活性的

收稿日期 Received: 2014-05-08 接受日期 Accepted: 2014-05-29

*国家重点基础研究发展计划项目 (2013CB127504) 资助 Supported by the National Basic Research Program of China (2013CB127504)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhangjb@mail.hzau.edu.cn)

菌株,结合温室盆栽实验对其在实际生防效果进行评估,同时从诱导抗性角度对其抗虫机制进行初步研究,并推测经过活性菌株的处理后,植株的防御酶会有不同程度的提高,这对以后进一步研究该菌的抗虫机制将具有重要的作用

1 材料与方法

1.1 供试菌株

海洋和极地细菌由中国国家海洋局海洋微生物菌种保藏管理中心(MCCC)提供。

1.2 南方根结线虫

南方根结线虫由南京农业大学李红梅教授提供。

1.3 培养基

2216E:氯化钠19.45 g、蛋白胨10 g、酵母粉5 g、牛肉浸粉1 g、乙酸钠1 g、氯化镁0.75 g、硫酸镁0.75 g、氯化钾0.55 g、柠檬酸钠0.5 g、硝酸铵0.2 g、碳酸氢钠0.16 g、柠檬酸铁0.1 g、溴化钾0.08 g、氯化铈34 mg、硼酸22 mg、硫酸锌10 mg、磷酸氢二钠8 mg、硅酸钠4 mg、氟化钠2.4 mg、氯化锰0.5 mg、硫酸铜0.5 mg,蒸馏水定容至1 000 mL,终pH 7.6±0.2,121℃灭菌20 min。

磷脂培养基:牛肉膏5 g、蛋白胨10 g、琼脂18 g,蒸馏水定容至1 000 mL,pH调节至7.0左右灭菌备用。鸡蛋黄5 mL、生理盐水(过滤除菌)5 mL混匀后加入200 mL的前期基础培养基中到平板备用。

明胶液化培养基:蛋白胨5 g、明胶100-150,加蒸馏水定容至1 000 mL,115℃灭菌20 min备用。

1.4 抗南方根结线虫的细菌离体筛选试验

在平板上将菌株划线分离活化得到单菌落;从海洋菌平板挑取单菌落到PA瓶中培养制备种子液(28℃,180 r/min,16 h);取1%种子液至三角瓶中摇瓶培养制备试验用发酵液(28℃,180 r/min,48 h);取发酵液上清过滤除菌后备用;取根结线虫卵块用2%次氯酸钠表面消毒后用无菌水孵育出二龄线虫备用。用96孔板进行毒力测定,每孔吸取试验用二龄南方根结线虫30头左右;加入定量(200 μL)过滤除菌后的上清液,加入1%的氯霉素抑制;每种假单胞菌发酵液上清设置3个重复,并用2216E培养基设置对照;20℃温育,分别于24 h、48 h、72 h,在倒置显微镜下观察线虫存活情况;线虫死活判断以针触之不动判定为死亡。死亡率按以下公式统计:

$$\text{线虫死亡率} = \frac{\text{线虫死亡数}}{\text{供试线虫数}} \times 100\%$$

$$\text{线虫校正死亡率} = \frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照死亡率}}{1 - \text{对照死亡率}} \times 100\%$$

1.5 菌株1A00316抗南方根结线虫的盆栽实验

番茄种子灭菌处理,70%酒精1 min,2%次氯酸钠消毒10 min,无菌水洗涤3次;番茄种子在吸满水的滤纸上萌发;将萌发的种子种植至无菌的培养土中1 000 g(土:沙=1:1),每盆接种一颗番茄;待番茄长出4片真叶后,采用灌根法,每盆接入5 mL细菌发酵液上清,接入3 d后接种3 mL幼虫悬浮液(约1 000条),对照接入5 mL蒸馏水。每种处理设3次重复。在温室内容养30 d后小心拔出番茄植株,用清水将根部的土壤洗净,计数所有植株的根结数量;植株根试验设2种处理,设只接种线虫的番茄为空白对照处理CK。根结指数参照

Negron和Acosta的方法^[9]分0-5级。

0级:无根结或卵块;1级:1-2个根结或卵块/株;2级:3-10个根结或卵块/株;3级:11-30个根结或卵块/株;4级:31-100个根结或卵块/株;5级:100个以上根结或卵块/株。

$$\text{防治效果} = \frac{\text{对照平均根结指数} - \text{处理平均根结指数}}{\text{对照平均根结指数}} \times 100\%$$

1.6 菌株1A00316的鉴定及生理生化特征分析

将菌株进行革兰氏染色、卵磷脂酶实验以及明胶液化实验,观察有无液化现象以及透明区域出现。通过16S rRNA的克隆和序列分析,确定待测细菌的属。以菌株1A00316的总DNA为模板,以27 F,1492 R引物扩增基因片段,获得了一条大小为1.5 kb左右的特异性引物片段,与原核生物的16S rRNA基因片段大小相符。将该产物切胶回收后纯化,纯化的样品测序。将测序得到的1A00316的16S rRNA的基因的序列(1 155 bp)在NCBI数据库中进行比对,选取与其序列重叠率≥98%的部分菌株构建系统发育树。

1.7 菌株1A00316诱导番茄系统抗性实验

1.7.1 植物温室实验及样品处理 盆栽种植番茄,待长出4片子叶后,选择长势一致的植株作为供试植株。取大小相同的盆钵,放入灭菌后的沙土(1:1),每盆移入5颗番茄幼苗,接种南方根结线虫二龄幼虫1 000条左右,实验设5个处理,M为接种根结线虫的处理,M316为接种根结线虫和1A00316发酵液的处理;1A00316和1A00316S分别为接种1A00316发酵液及其发酵液上清的处理,F组为未侵染根结线虫和未接种1A00316的番茄植株。每个处理3个重复,分别于处理番茄7 d、14 d、21 d、28 d、35 d测试各处理的酶活指标。

1.7.2 酶粗提液制备 准确称取1 g番茄根系样品,放入预冷的研钵中,加入1.5 mL 0.1 mol/L pH 8.8的硼酸缓冲液(内含1 mmol/L EDTA,5 mmol/L巯基乙醇,聚乙烯吡咯烷酮PVP少许)及约0.2 g石英砂,冰浴中研磨成匀浆,转入离心管中;用1.5 mL上述缓冲液冲洗研钵及研棒,合并转入离心管10 000 r/min,4℃离心20 min,上清液即为酶的粗提液;将粗提液放入冰箱中-20℃冷冻保存。

1.7.3 酶粗提液蛋白含量的测定 参照考马斯亮蓝G-250法,用牛血清蛋白做标准曲线;然后吸取各样品提取液0.1 mL,加5 mL考马斯亮蓝G-250蛋白试剂,充分混匀;放置2 min后,在595 nm波长下比色测定;记录吸光值,并通过标准曲线查得各样品中蛋白质的含量。其计算公式为:

$$\text{样品蛋白质含量}/\mu\text{g g}^{-1} = \frac{\text{蛋白质含量} \times \text{提取液定容后体积}}{\text{样品重}}$$

1.7.4 苯丙氨酸解氨酶(PAL)酶活测定 将酶的粗提液用0.1 mol/L pH 8.8的硼酸缓冲液稀释10倍^[10];取洁净的试管加入2.0 mL 0.1 mol/L pH 8.8的硼酸缓冲液(不含巯基乙醇)和1.0 mL 0.02 mol/L苯丙氨酸,再加入0.5 mL稀释后的酶液,空白对照(3.0 mL 0.1 mol/L pH 8.8的硼酸缓冲液和0.5 mL稀释酶液);仪器调零,在290 nm处测吸光值1(D₁);在40℃水浴中反应15 min后立即终止反应,在290 nm处测吸光值2(D₂),每个样品重复3次;用OD₂减OD₁所得值为净增加值,以每小时OD值变化0.01为一个酶活单位。其计算公式为:

$$PAL/U\ g^{-1} = \frac{\Delta D_{290\ nm} \times \text{稀释倍数} \times V}{0.01 \times a \times \text{每毫升粗酶液含蛋白量} \times \frac{t}{60}}$$

*V*为反应总体积 (mL), *a*为测定时用的酶液量 (mL), *t*为反应时间 (min).

1.7.5 多酚氧化酶 (PPO) 酶活测定 取200 μL酶粗提液用0.1 mol/L硼酸缓冲液稀释2倍后取50 μL加入试管中^[10]; 与2.95 mL 0.05 mol/L pH 6.8含0.02 mol/L邻苯二酚的磷酸缓冲液混合, 以不加酶液而加同体积的提取缓冲液作为空白对照; 30 ℃水浴中反应2 min后, 记录398 nm处光密度值, 以每分钟OD值变化0.01为一个酶活单位, 每样品重复3次; 其计算公式为:

$$PPO/U\ g^{-1} = \frac{\Delta D_{398\ nm} \times \text{稀释倍数} \times V}{t \times \text{所加酶液毫升数} \times \text{每毫升酶粗提液含蛋白量}}$$

$\Delta D_{398\ nm}$: 2 min时的 $D_{398\ nm}$ 值减去0 min时的 $D_{398\ nm}$ 值, *V*为反应液体积 (mL), *t*为反应时间 (min).

1.7.6 过氧化物酶 (POD) 酶活测定 样品200 μL酶粗提液用0.2 mol/L硼酸缓冲液稀释2倍后取50 μL加入试管中^[10]; 与3.0 mL 0.1 mol/L pH 5.8含18 mmol/L愈创木酚的磷酸钠缓冲液混匀, 在30 ℃水浴中平衡5 min; 加入50 μL 2.5% (*V/V*) 过氧化氢溶液, 混匀, 起始酶反应, 用同体积提取缓冲液代替酶液作为空白对照; 仪器调零, 在470 nm处测光密度值记为 $D_{470\ nm}$, 每30 s测1次, 测5 min, 以每分钟OD值变化0.1为一个酶活单位, 样品重复3次. 其计算公式为:

$$POD/U\ g^{-1} = \frac{\Delta D_{470\ nm} \times V}{t \times \text{所加酶液毫升数} \times \text{每毫升粗提液含蛋白量}}$$

$\Delta D_{470\ nm}$: 5 min时的 $D_{470\ nm}$ 值减去0 min时的 $D_{470\ nm}$ 值, *V*为反应液体积 (mL), *t*为反应时间 (min).

2 结果与分析

2.1 抗南方根结线虫的细菌离体筛选结果

通过线虫离体筛选试验共筛选出了9株具有杀虫效果的菌株 (表1), 其中有6株的杀虫率达到80%以上, 并且这些菌株都属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*). 本实验都是用菌株发酵上清液处理, 说明这些菌株分泌的某些次级代谢物具有抗虫作用, 具体是何种物质还有待进一步研究. 6株菌中有4株为铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*), 考虑到以后的应用, 选择对其中的一株效果较好的菌株1A00316进行深入研究, 确认其在实际生防中的作用效果.

表3 各处理番茄根系苯丙氨酸解氨酶活性的变化
Table 3 Changes of PAL activity in tomato roots with different treatments

处理时间 Time (t/d)	苯丙氨酸解氨酶酶活 PAL activity (λ/U g ⁻¹)				
	M	F	M316	1A00316	1A00316S
7	3.46 ± 0.14B	43.30 ± 0.85D	5.84 ± 0.72C	1.06 ± 0.25A	4.06 ± 1.36B
14	4.00 ± 0.27B	2.59 ± 0.23AB	1.90 ± 0.37A	16.76 ± 1.3C	3.81 ± 0.28B
21	0.89 ± 0.07A	0.89 ± 0.07A	8.56 ± 0.88C	3.52 ± 0.31B	4.18 ± 1.29B
28	3.66 ± 0.49AB	2.72 ± 0.06B	2.34 ± 0.24A	4.65 ± 0.13C	4.36 ± 0.34C
35	3.95 ± 0.51A	3.65 ± 0.38A	5.45 ± 0.87B	6.02 ± 0.23B	3.85 ± 0.78A

表格中每列平均值后面的字母相同表示各处理间不具有显著性差异, 字母不同表示各处理间具有显著性差异. 利用SPSS18.0进行Duncan多重比较分析实验数据的差异显著性, 显著水平为0.05. M: 只接种根结线虫的番茄植株; M316: 接种南方根结线虫以及生防菌1A00316发酵液的番茄植株; F: 未侵染根结线虫和未接种1A00316的番茄植株; 1A00316: 只接种生防菌1A00316发酵液的番茄植株; 1A00316S: 只接种1A30016上清液的番茄植株. Uppercase letters indicate significant difference at the level of *P* < 0.05 (Duncan's multiple range test). M: tomatoes inoculated with *Meloidogyne incongnita*; F: tomatoes without any treatment; M316: tomatoes treated with 1A00316 fermentation broth and *Meloidogyne incongnita*; 1A00316: tomatoes treated with 1A00316 fermentation broth; 1A00316S: tomatoes treated with 1A00316 liquid supernatant of fermentation broth.

表1 抗南方根结线虫的海洋细菌筛选结果
Table 1 Screening of marine bacterium against *Meloidogyne incongnita*

菌株编号 Strain number	菌种信息 Genus	平均校正死亡率(r/%) Mean corrected mortality
1A00316	<i>Pseudomonas</i> sp.	86.58 ± 4.21
1A00318	<i>Pseudomonas</i> sp.	58.8 ± 3.17
1A00364	<i>P. aeruginosa</i>	55.03 ± 2.03
1A01321	<i>P. aeruginosa</i>	80.95 ± 0.81
1A04311	<i>P. aeruginosa</i>	90.00 ± 1.11
1A05429	<i>P. aeruginosa</i>	98.00 ± 3.51
1A06830	<i>P. plecoglossicida</i>	83.72 ± 2.08
1A06832	<i>P. otitidis</i>	87.50 ± 7.22
1A06898	<i>P. plecoglossicida</i>	63.64 ± 2.31

2.2 菌株1A00316抗南方根结线虫盆栽实验结果

表2显示菌株1A00316对南方根结线虫的平均生防效果为71.67%, 与未用菌液处理的植株相比根结数明显减少, 说明该菌株在温室实验中也能起到抗南方根结线虫的效果.

表2 抗南方根结线虫盆栽实验结果
Table 2 Pot experiment of control effect of strain 1A00316 against *Meloidogyne incongnita*

不同处理 Treatment	根结指数 Root knot index	生防效果(r/%) Biocontrol effect
1A00316发酵液处理 Fermentation broth of 1A00316	1.33 ± 0.57	71.67±10.48
对照 Control	4.67 ± 0.57	

2.3 菌种鉴定

以1A00316菌株的DNA为模板, 以27 F, 1492 R引物进行PCR扩增, 获得了一条大小为1.5 kb左右的特异性引物片段, 与原核生物的16S rRNA片段大小相符. 将该产物切胶回收后纯化, 纯化的样品测序. 将测序得到的1A00316的16S rRNA的基因的序列 (1 155 bp) 在NCBI数据库中进行比对, 选取与其序列重叠率≥98%的部分菌株构建系统发育树 (图1). 由系统树结构可知, 与菌株1A00316同源性最近的菌株是恶臭假单胞菌CNE 18 (*P. putida* strain CNE 18), 处于同一个分支. 综上, 结合16S rRNA基因分子鉴定及其前面的生理生化鉴定结果, 基本可以确定1A00316属于恶臭假单胞菌 (*P. putida*), 该菌革兰氏染色阴性, 明胶水解实验、卵磷脂酶实验阴性, 好氧, 最适宜生长温度为25-28 ℃, 具有特殊的腥臭味.

2.4 菌株1A00316诱导植物系统抗性实验结果

2.4.1 苯丙氨酸解氨酶酶活变化 PAL的活性变化如表3所

示. 经1A00316处理的实验组较未经处理的实验组的PAL的酶活均有增加的趋势. 与M组相比, M316组PAL活性于处理后的第21天达到峰值, 同时由表可以看出M316组的PAL酶活性波动比较大, 在第7天、第21天和35天的酶活性均显著高于M组. 1A00316组的PAL活性在第14天达到峰值. 其中, 第14天时, 1A00316组的酶活为16.76 U/g, M组为4.00 U/g, F组为2.74 U/g, 1A00316组为M组的4.19倍, 为F组的6.47倍; 第21天时, M316组的酶活为8.56 U/g, M组和F组均为0.89 U/g, M组和F组的9.72倍, 通过该表我们发现1A00316组的PAL活性在第14、21、28、35天的测量值均比M组和F组高, 而1A00316S组只是在第21、28天的PAL活性显著高于M组和F组, 说明1A00316发酵液和上清液在一定程度上有诱导番茄PAL产生的作用.

2.4.2 多酚氧化酶酶活变化 1A00316组PPO的酶活除了第14天低于M组和F组(表4), 其余时间点酶活均明显高于M组和F组. 1A00316组和M316组的PPO活性随着时间的增加而显著提高. 第14天时, 与M组相比, M316组的酶活显著低于M组, 而第35天M316组显著高于M组, 是M组的2.5倍; 1A00316S组的酶活在第7、21天两次酶活测定中没有显著差异, 其他时间点1A00316S组显著比M组低. 表明1A00316发酵液有诱导提高PPO活性的作用, 而1A00316S没有诱导提高PPO活性的作用.

2.4.3 过氧化物酶酶活变化 1A00316组POD的活性始终显著高于M组和F组(表5). 第35天1A00316组POD的活性比M组高11倍, 比F组高7倍. M316组的酶活则表现出明显的波动性, 其中在第14天显著高于M组, 第21天和第35天高于M组, 而第7天和第28天又低于M组. 1A00316S组也表现出一定的波动性, 第14天POD的活性显著高于M组, 第21天和35天与M组没有显著差异, 在第7天和第28天却显著低于M组. 实验结果表

明, 与1A00316上清液相比, 1A00316发酵液诱导POD活性的提高较显著.

综上, 1A00316发酵液及其发酵上清液对植物系统诱导抗性相关的3种酶PAL、PPO和POD的作用不同, 1A00316发酵液在观察的35 d内, 对以上3种酶的活性有明显促进作用, 而1A00316上清液除了对PAL的活性提高有一定作用, 对PPO和POD作用不明显. 根据以上结果, 确定1A00316菌体具有诱导番茄对线虫的抗性作用.

3 结论与讨论

本研究以海洋和极地细菌为筛选菌株, 以南方根结线虫病原靶标, 筛选出9株具有抗根结线虫效果的假单胞菌, 其中一株有拮抗活性的恶臭假单胞菌1A00316, 其发酵上清液对线虫的拮抗活性为86.58%, 温室盆栽实验数据显示其对南方根结线虫的防治效率达71.67%, 说明其在活体植株中同样具有良好的生物防治效果. 目前报道的抗南方根结线虫的假单胞菌有荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)^[11]、恶臭假单胞菌^[12]、门多萨假单胞菌(*P. mendocina*)^[13]、栖稻假单胞菌(*P. oryzae*)^[14]等根际细菌, 这些假单胞菌抗线虫机制主要包括杀虫次级代谢物、诱导系统抗性、与线虫共同竞争营养位点^[15]等. 其中部分菌株的抗虫机制具多效性, 如研究发现假单胞菌CHA0产生的活性物质2,4-DAPG(2,4-diacetylphloroglucinol, DAPG)既有直接触杀作用, 又可以诱导植株产生系统抗性^[16]. 从实验结果分析, 当植物受到侵害时, 这些诱发因子诱导了植物产生防御反应, 表现为某些蛋白质如防御酶活的增加, 这些蛋白质在正常情况下表达量很低, 但是当受到外界环境刺激时, 可大量表达, 增加

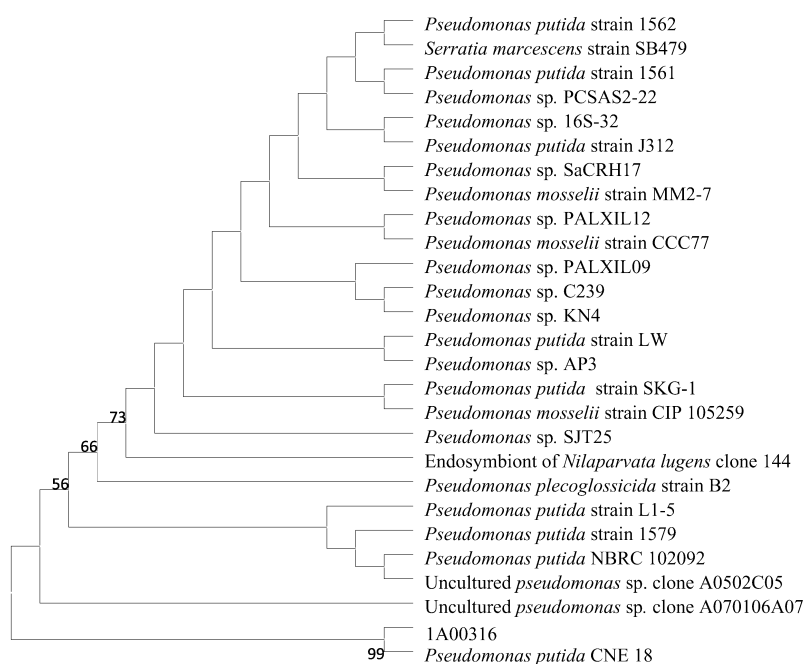


图1 1A00316菌株的系统发育树.

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain 1A00316.

表4 各处理番茄根系多酚氧化酶活性的变化

Table 4 Changes of PPO activity in tomato roots with different treatments

处理时间 Time (t/d)	多酚氧化酶酶活 PPO activity (λ/U g ⁻¹)				
	M	F	M316	1A00316	1A00316S
7	0.32 ± 0.04A	0.43 ± 0.02A	0.49 ± 0.01A	2.96 ± 0.17B	0.36 ± 0.04A
14	1157.32 ± 20.21D	565.29 ± 22.26C	271.58 ± 23.24B	195.91 ± 33.33A	180.50 ± 18.23A
21	716.74 ± 49.48B	419.37 ± 33.70A	679.05 ± 21.67B	2966.27 ± 197.94C	748.92 ± 122.21B
28	1319.30 ± 66.15B	697.11 ± 76.24A	1285.65 ± 24.76B	4306.98 ± 256.2C	596.31 ± 47.61A
35	734.92 ± 40.53A	1962.98 ± 68.7C	1869.36 ± 143.43B	7924.34 ± 310.2D	645.67 ± 327.25B

每列平均值后面的字母相同表示各处理间不具有显著性差异，字母不同表示各处理间具有显著性差异。利用SPSS18.0进行Duncan多重比较分析实验数据的差异显著性，显著水平为0.05。M：只接种根结线虫的番茄植株；M316：接种南方根结线虫以及生防菌1A00316发酵液的番茄植株；F：未侵染根结线虫和未接种1A00316的番茄植株；1A00316：只接种生防菌1A00316发酵液的番茄植株；1A00316S：只接种1A30016上清液的番茄植株。

Uppercase letters indicate significant difference at the level of *P* < 0.05 (Duncan’s multiple range test). M: tomatoes inoculated with *Meloidogyne incognita*; F: tomatoes without any treatment; M316: tomatoes treated with 1A00316 fermentation broth and *Meloidogyne incognita*;1A00316: tomatoes treated with 1A00316 fermentation broth; 1A00316S: tomatoes treated with 1A00316 liquid supernatant of fermentation broth.

表5 各处理番茄根系过氧化物酶活性的变化

Table 5 Changes of POD activity on tomato roots with different treatments

处理时间 Time (t/d)	过氧化物酶酶活 POD activity (λ/U g ⁻¹)				
	M	F	M316	1A00316	1A00316S
7	20.69 ± 1.07B	9.21 ± 0.5A	19.22 ± 0.77B	105.18 ± 2.14C	13.65 ± 01.74A
14	9781.98 ± 310.1A	12099.17 ± 152.97B	15360.22 ± 264.17C	16861.05 ± 449.2D	13808.69 ± 224.94C
21	30106.95 ± 829.50A	27727.97 ± 2345.13B	30294.65 ± 1036.83A	51464 ± 1168.59B	37452 ± 604.82A
28	6538.42 ± 73.44C	4749.39 ± 309.87B	3772.91 ± 292.6A	7736.3 ± 179.37D	3174.667 ± 447.48A
35	9777.8 ± 109.74A	15413.29 ± 714.02A	14333.02 ± 789.9A	107604 ± 8073.1B	10722.24 ± 1133.2A

每列平均值后面的字母相同表示各处理间不具有显著性差异，字母不同表示各处理间具有显著性差异。利用SPSS18.0进行Duncan多重比较分析实验数据的差异显著性，显著水平为0.05。M：只接种根结线虫的番茄植株；M316：接种南方根结线虫以及生防菌1A00316发酵液的番茄植株；F：未侵染根结线虫和未接种1A00316的番茄植株；1A00316：只接种生防菌1A00316发酵液的番茄植株；1A00316S：只接种1A30016上清液的番茄植株。

Uppercase letters indicate significant difference at the level of *P* < 0.05 (Duncan’s multiple range test). M: tomatoes inoculated with *Meloidogyne incognita*; F: tomatoes without any treatment; M316: tomatoes treated with 1A00316 fermentation broth and *Meloidogyne incognita*; 1A00316: tomatoes treated with 1A00316 fermentation broth; 1A00316S: tomatoes treated with 1A00316 liquid supernatant of fermentation broth.

果蔬的自身抗病能力^[17]。目前的文献报道具有诱导抗性的细菌主要有荧光假单胞菌、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* spp.) 等，其作用机制也有所不同。这些生防细菌诱导产生的与植物抗病性防御反应相关的酶类括POD、几丁质酶、超氧化物歧化酶 (SOD)、PPO和苯丙氨酸解氨酶等，ISR反应与这些酶活的增加有关。本研究通过对番茄防御酶活进行测定，发现经菌株1A00316处理过的PAL酶活、PPO酶活及POD酶活均能在一定程度有所提高，但1A00316上清液对酶活的提高效果不明显，说明1A00316菌株具有诱导番茄对线虫的抗性作用。

本研究表明南极土壤来源的恶臭假单胞菌1A00316不仅可以分泌某些活性成分直接抗南方根结线虫，还存在诱导系统抗性的间接机制，但对于其诱导抗性的分子机制以及是何种活性物质有直接的杀线虫作用还需要进一步研究。极地来源的微生物生长环境具有特异性，发掘新型抗线虫活性物质的比例高于陆生微生物；同时盆栽实验结果说明可以将该菌体制成微生物菌剂直接用于南方根结线虫的实际防治中，有较强的应用价值。

参考文献 [References]

1 Curtis RHC. Plant parasitic nematode proteins and the host and parasite interaction [J]. *Brief Funct Genomics*, 2007, **6** (8): 50-58
2 Huang X, Zhao N, Zhang K. Extracellular enzymes serving as virulence

factors in nematophagous fungi involved in infection of the host [J]. *Res Microbiol*, 2004, **115** (10): 811-816
3 Tikhonov VE, Lopez-Llorc LV, Salinas J Jansson, HB. Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *Verticillium chlamydosporium* and *V. suchlasporium* [J]. *Fungal Genet Biol*, 2002, **35** (1): 67-78
4 Dababat A, Sikora RA, Hauschild R. Use of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* for the biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato [J]. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2006, **71** (3): 953-961
5 Dong J, Zhou Y, Li R, Zhou W, Li L, Zhu Y, Huang R, Zhang K. New nematocidal azaphilones from the aquatic fungus *Pseudohalonectria adversaria* YMF1.01019 [J]. *FEMS*, 2006, **264** (1): 65-69
6 Khan Z, Kim SG, Jeon YH, Khanc HU, Sona SH, Kim YH. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR-1, suppresses root-knot nematode [J]. *Bioresour Technol*, 2008, **99** (8): 3016-3023
7 Oka YJ, Chet I, Spiegel Y. Control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Bacillus cereus* [J]. *Biocontrol Sci Technol*, 1993, **3** (2): 115-126
8 Almaghrabi OA, Massoud SI, Abdelmoneim TS. Abdelmoneim. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2013, **20** (1): 57-61
9 Negron JA, Acosta N. The *Fusarium oxysporum* f. sp. coffeae-

- Meloidogyne incognita* complex in Bourboncoffee [J]. *Nematropica*, 1989, **19** (2): 161-168
- 10 谭可菲, 段玉玺, 朱晓峰, 罗宝君, 赵秀梅, 王连霞, 姜晓军. 根结线虫生防菌snf8对番茄诱导抗性的初步研究[J]. 黑龙江农业科学, 2011 (1): 22-24 [Tan KF, Duan YX, Zhu XF, Luo BJ, Zhao XM, Wang LX, Jiang XJ. The preliminary study on the induced systemic resistance mediated by strain snf8 against root-knot nematode in tomato. *Heilongjiang Agric Sci*, 2011 (1): 22-24]
- 11 Siddiqui IA, Shaukat SS. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol [J]. *Soil Biol Biochem*, 2003, **35**: 1615-1623
- 12 Burkhead KD, Schisler DA, Slininger PJ. Pyrrolnitrin production by biological control agent *Pseudomonas cepacia* B37w in culture and in colonized wounds of potatoes [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60** (6): 2031-2039
- 13 Duponnois R, Ba AM, Mateille T. Beneficial effects of *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas mendocina* for biocontrol of *Meloidogyne incognita* with the endospore-forming bacterium *Pasteuria penetrans* [J]. *Nematology*, 1999, **1**: 95-102
- 14 Samaliev HY, Andreoglou FI, Elawad SA. The nematocidal effects of the bacteria *Pseudomonas oryzae* and *Xenorhabdus nematophilus* on the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* [J]. *Nematology*, 2000, **2** (5): 507-514
- 15 田宝玉, 黄薇, 江贤章, 黄建忠. 植物寄生线虫生防细菌及其作用机制研究[J]. 生物技术, 2009, **19** (4): 90-93 [Tian BY, Huang H, Jiang XZ, HUANG JZ. Bacteria Used in the biocontrol of plant-parasitic nematodes and its pathogenesis [J]. *Biotechnology*, 2009, **19** (4): 90-93]
- 16 Meyer SLF, Halbrecht JM, Carta LK, Skantar AM, Liu T, Abdelnabby HME, Vinyard BT. Toxicity of 2, 4-diacetylphloroglucinol (DAPG) to plant-parasitic and bacterial-feeding nematodes [J]. *J Nematol*, 2009, **41** (4): 274
- 17 张璐, 张瑶, 刘丽丹, 曾凯芳. 膜醌毕赤酵母对草莓采后灰霉病抗病性的诱导[J]. 食品科学, 2013, **34** (22): 1-8 [Zhang L, Zhang Y, Liu LD, Zeng KF. Induction of disease resistance to gray mold by *Pichia membranaefaciens* in postharvest strawberry fruit. *Food Sci*, 2013, **34** (22): 1-8]