

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54(5): 589–594; 4 May 2014  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.05.014

## 解淀粉芽孢杆菌杀线虫活性高效筛选模型的建立及应用

施慧, 孙帆, 刘仲仲, 张克勤, 黄晓玮\*

云南大学生物资源保护与利用重点实验室, 云南 昆明 650091

**摘要** 【目的】食线虫细菌对线虫的侵染机制报道甚少, 限制了生防细菌的在农业实践中的广泛应用。本研究中, 我们构建了一种对细菌杀线虫活性进行快速高效筛选的方法来快速寻找与线虫侵染功能相关的基因。【方法】将培养在固体平板上的野生型解淀粉芽孢杆菌 FZB42 及其突变株接种于 5 mL 液体快杀培养基中, 37°C 培养 24 h 后, 在 24 孔板中分别加入 200  $\mu$ L 菌液和 50–60 条 L4 龄秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*), 记录变化明显的时间点及线虫存活数, 将相对于原始菌株杀线虫能力明显下降的突变株选出, 并进行多次复筛。同时以传统的固体平板杀线虫法作为对照。【结果】用液体快杀法在 21 h 时筛选出了与原始菌株相比杀线虫活性显著下降的 2 株突变株 F1 和 F2, 与传统的固体平板杀线虫法结果一致, 且极大地缩短了筛选时间。【结论】该研究为下一步鉴定食线虫细菌中的毒力基因、进而阐明病原细菌侵染宿主的分子机制提供了良好的生物材料, 并缩短了研究周期。

**关键词:** 解淀粉芽孢杆菌, 杀线虫活性, 突变文库筛选, 生物防治

中图分类号: Q933 文章编号: 0001-6209(2014)05-0589-06

植物寄生线虫病是普遍发生的植物病害之一, 全球每年由植物寄生线虫所造成的作物损失高达数百亿美元<sup>[1–2]</sup>, 在我国主要危害烟草、三七、棉花、花生、西洋参等经济作物, 线虫病害已成为农业生产中的重要限制因子之一。

目前对线虫的防治主要包括化学农药防治、轮作法和抗性品种利用等, 但都有一定的局限性。尽管化学农药防治仍是现有最常用、且有效的防治措施, 但容易使线虫产生抗药性, 而且残留期长, 所以在应用上受到限制<sup>[3]</sup>。此外, 定殖于植物根部的线虫, 由于土壤生态的特殊性, 必须大剂量使用才能达到防治效果, 而大量的化学农药会对生态环境造成严重污染<sup>[4]</sup>。抗性品种的使用则因线虫常有小种

分化而受到限制。故线虫的生物防治以其安全、高效等特点近年来受到了广泛的重视, 并成为研究热点<sup>[5–8]</sup>。其中, 杀线虫细菌由于易于大量培养、定殖, 且对植物寄生线虫致死性强, 在植物寄生线虫生物防治上表现出广阔的应用前景和市场开发潜力<sup>[9–12]</sup>。

目前为了找到与杀线虫相关的新功能基因, 研究杀线虫机理, 很多研究是通过突变文库的筛选来获得生物材料的, 国内多数采用经典的固体平板杀线虫生测法或者采用菌株的发酵上清液来进行筛选, 这些方法研究周期较长且工作较为繁琐。而 Steven Garvis 等采用了一种高效的液体快杀筛选模型对绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的杀线

基金项目: 国家自然科学基金(30970065, U1036602); 云南省科技厅项目(2010GA012)

\* 通信作者。Tel: +86-871-65031092; Fax: +86-871-65034838; E-mail: xwhuang@ynu.edu.cn

作者简介: 施慧(1987—), 女, 云南省昭通市人, 硕士研究生, 研究方向为食线虫细菌侵染相关基因的研究。E-mail: shihui1107@126.com

收稿日期: 2013-08-20; 修回日期: 2013-12-23

虫活性进行生测实验<sup>[13]</sup>,但是国内外还没有报道过 Steven Garvis 等采用的这种快速高效的筛选方法对解淀粉酶芽孢杆菌 FZB42 是否适用。因此,本研究中作者采用了在进化上与植物寄生线虫关系最近、易于人工快速饲养的模式生物秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 来筛选对植物寄生线虫有活性的菌株,并优化了这种快速高效筛选模型,构建了适用于解淀粉酶芽孢杆菌 FZB42 的液体快杀筛选模型,为下游新功能基因的鉴定研究缩短了周期,提供了材料基础。作者利用已有的解淀粉酶芽孢杆菌 FZB42 随机突变文库<sup>[14]</sup>,通过对解淀粉酶芽孢杆菌 FZB42 突变文库中 400 多个突变子进行液体生测实验,筛选与野生型菌株 FZB42 相比杀线虫活性显著下降的菌株。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株:** (1) 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) FZB42 及其全基因组的随机突变文库由德国洪堡大学 Rainer Borriss 教授提供,并保存于本实验室。(2) 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) OP50,保存于本实验室。

**1.1.2 供试线虫:** 野生型秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) N2,保存于本实验室。

**1.1.3 培养基和溶液<sup>[13,15]</sup>:** (1) LB 培养基:用于杀线虫细菌的传代和保藏;(2) NGM 培养基:用于野生型秀丽隐杆线虫 N2 的培养;(3) 液体快杀培养基;(4) M9 buffer;(5) Bleach 混合液。

### 1.2 解淀粉芽孢杆菌野生型 FZB42 及其突变株的培养

将解淀粉芽孢杆菌野生型 FZB42 及其突变株分别划线接种于 LB 无抗平板和加了卡那抗生素的 LB 平板上,37℃ 培养 16-18 h。

### 1.3 野生型秀丽隐杆线虫 N2 的培养

将大肠杆菌 OP50 接入 5 mL 试管 LB 中,过夜培养后取适量涂布于 NGM 固体平板上,然后取适量线虫加入平板中,置于 20℃ 培养 3-4 d。

### 1.4 秀丽隐杆线虫 N2 的四龄 L4 同步化

野生型秀丽隐杆线虫 N2 培养 3-4 d 时,在线虫体内及其培养基表面会产生大量的卵,用 M9 buffer 把线虫及卵全部冲洗下来,加到 15 mL 离心

管中,350 × g 离心 3 min,重复 3 次;用移液枪小心除去上清,尽量不要吸到离心管底部的线虫;加入 1-1.5 mL Bleach 混合液,漩涡震荡 3-5 min,在显微镜下观察,等线虫体壁完全降解后,再加入 10 mL M9 buffer,350g 离心 3min,重复 3 次,小心去除上清。用 7-8 mL M9 buffer 洗涤 3-4 次,彻底去除 Bleach 混合液后,加入 4-5 mL M9 buffer,20℃ 慢摇孵化 18h 后,得到 L1 幼虫。再次用 M9 buffer 洗涤,350 × g 离心 3 min,重复 2-3 次,小心去除上清留下适量的线虫悬液,加入含有 OP50 的 NGM 平板中 20℃ 培养 28h,即获得 L4 线虫。

### 1.5 解淀粉芽孢杆菌 FZB42 突变文库杀线虫活性的测定

**1.5.1 液体快杀线虫生测:** 将生长在固体平板上的野生型解淀粉芽孢杆菌 FZB42 及其突变株接种于 5 mL 液体快杀培养基中,37℃ 培养 24 h。将过滤除菌的 M9 buffer 把培养至 L4 阶段的线虫从平板上冲洗下来,350 × g 离心 3 min,重复 2-3 次,悬浮后取 10 μL 在显微镜下观察线虫悬液中线虫的数量,然后取含有 50-60 条线虫的悬液置于含有 300 μL 左右的液体快杀培养基的 24 孔板中。然后在每个孔中分别加入 200 μL 上述培养好的菌液,每种菌液做 3 个平行,每隔 4 h 计数,直至加入野生型菌液的线虫全部死完,记录变化明显的时间点及线虫存活数,将相对于野生株杀线虫能力明显下降的突变株选出。然后再进行复筛,每个突变株设 3 次重复,并设 3 个平行,直到挑出效果较明显的突变株。

**1.5.2 固体平板杀线虫生测:** 将野生型解淀粉芽孢杆菌 FZB42 及其突变株分别涂布于 LB 无抗平板和加了卡那抗生素的 LB 平板上,待细菌培养到长满菌苔后,在平板中央加入大约 50 条线虫。每隔 24 h 计数,记录变化明显的时间点及线虫的存活数,通过多次复筛,选出杀线虫活性相对于原始菌株明显变化的突变株。

线虫存活率的计算:

$$\text{线虫存活率} = \frac{\text{某时间点线虫存活数}}{\text{加入的线虫总数}} \times 100\%$$

## 2 结果

### 2.1 突变株生长缺陷的排除

本研究从稀释涂布后保存的解淀粉芽孢杆菌

FZB42 突变文库中随机选取了 400 多株突变株进行杀线虫生测实验。为了去除由于本身的生长能力缺陷所导致的侵染能力下降,作者在预实验中将进行杀线虫活性测试的 400 多个突变子分别划线与 LB 固体平板上过夜培养,然后挑出在 LB 固体平板上和野生型菌株具有相同生长能力的突变子。最终得到 356 个生长稳定的突变菌株,以供下一步实验。

## 2.2 突变株杀线虫活性的生测和高效筛选

在液体快杀培养基中,对上述 356 个排除生长缺陷的突变子进行杀线虫活性的初筛,选出杀线虫能力与野生型菌株具有显著差异的突变株共 32 个(表 1)。

表 1. 对秀丽隐杆线虫毒性降低的突变菌株的初步筛选结果

Table 1. Summary of the mutant strains with reduced toxicity against *C. elegans*

strain	survival rate / %		
	4 h	12 h	21 h
wild type	68.32 ± 7.83	18.2 ± 4.87	0
S1	80.35 ± 6.89	58.31 ± 8.67	32.5 ± 10.4
S2	75.2 ± 10.7	60.25 ± 11.2	30.34 ± 5.33
S3	65.58 ± 6.28	40.3 ± 6.53	18.57 ± 3.69
S4	85.4 ± 6.47	60.2 ± 7.72	25.32 ± 8.32
S5	73.36 ± 8.55	45.76 ± 6.7	15.08 ± 3.95
S6	83.25 ± 10.68	55.64 ± 7.3	30.15 ± 5.92
S7	87.57 ± 2.21	55.4 ± 5.6	35.65 ± 3.89
S8	78.45 ± 5.5	50.27 ± 10.32	25.35 ± 8.56
S9	87.13 ± 3.88	60.5 ± 7.84	38.55 ± 15.4
S10	90.08 ± 2.55	68.36 ± 11.86	42.2 ± 9.68
S11	92.12 ± 1.88	65 ± 7.87	40.35 ± 10.8
S12	68.5 ± 11.93	38.28 ± 10.5	20.85 ± 7.77
S13	76.75 ± 4.32	42.8 ± 15.33	24.9 ± 13.53
S14	80.33 ± 5.67	48.83 ± 5.8	30.34 ± 7.5
S15	68.1 ± 12.9	40.48 ± 3.58	18.57 ± 6.89
S16	85.07 ± 10.02	60.67 ± 9.42	35.6 ± 8.54
S17	70.3 ± 14.1	48.5 ± 3.67	20.82 ± 11.32
S18	76.47 ± 5.65	52.3 ± 10.2	30.5 ± 3.25
S19	85.3 ± 3.25	65.42 ± 5.4	40.58 ± 2.68
S20	65.78 ± 15.5	35.55 ± 4.55	10.38 ± 4.59
S21	70.67 ± 9.23	46.7 ± 7.3	23.4 ± 12.35
S22	80.24 ± 9.1	55.25 ± 2.56	35.67 ± 7.86
S23	90.1 ± 4.58	64.37 ± 2.48	38.3 ± 6.83
S24	88.08 ± 4.3	65.35 ± 7.32	40.55 ± 4.59
S25	82.32 ± 3.55	55.21 ± 9.35	28.8 ± 13.5
S26	75.55 ± 7.62	50.08 ± 2.37	25.3 ± 6.85
S27	70.34 ± 6.89	50.15 ± 1.78	20.54 ± 1.88
S28	68.47 ± 11.3	45.06 ± 1.92	18.7 ± 4.31
S29	74.39 ± 8.9	35.9 ± 5.68	12 ± 6.8
S30	65.44 ± 12.69	30.59 ± 10.02	10.6 ± 5.4
S31	82.54 ± 11.6	42.83 ± 4.53	15.4 ± 7.5
S32	80.65 ± 5.8	45.6 ± 5.32	18.52 ± 6.53

## 2.3 突变株的复筛

再次利用液体快杀线虫生测法对 32 个突变株的复筛,通过 3 次重复,每次重复设立 3 个平行,最后挑出杀线虫活性相对于野生株显著下降的突变株 2 株,命名为 F1 和 F2。生测结果显示:加入野生型菌株对线虫处理 4 h 时线虫存活率为 65.47%,而加入 F1 和 F2 处理的分别为 87.35% 和 91.08%;野生型 FZB42 菌株对线虫处理 12 h 时线虫存活率为 22.5%,而 F1 和 F2 处理的分别为 67.25% 和 65.8%;野生型 FZB42 处理 21 h 时线虫存活率为 0,而 F1 和 F2 处理的分别为 46.7% 和 38.85%,显著高于野生型菌株(表 2 和图 1)。

表 2. 液体快杀线虫生测法复筛结果

Table 2. Results from the repeated screening to the candidate mutants with liquid bioassay

strain	survival rate / %		
	4 h	12 h	21 h
wild type	65.47 ± 12.56	22.5 ± 5.32	0
F1	87.35 ± 9.05	67.25 ± 8.55	46.7 ± 9.56
F2	91.08 ± 7.52	65.8 ± 13.28	38.85 ± 7.65
F3	75.75 ± 4.37	42.85 ± 14.32	25.26 ± 13.52
F4	80.23 ± 5.42	48.5 ± 5.8	30.35 ± 11.25

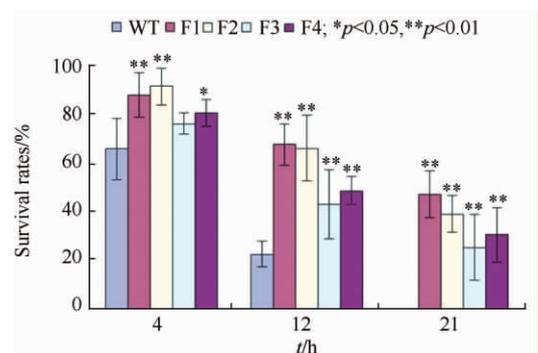


图 1. 液体快杀线虫生测法复筛结果

Figure 1. Results from the repeated screening to the candidate mutants with liquid bioassay.

采用经典的固体平板杀线虫生测法对筛选出的杀线虫活性显著降低的突变株进行验证。加入野生型菌株对线虫处理 96h 时线虫存活率为 61.99%,而加入 F1 和 F2 处理的分别为 87.03% 和 94%;野生型 FZB42 菌株对线虫处理 120h 时线虫存活率为 32.48%,而 F1 和 F2 处理的分别为 74.25% 和 77.54%;野生型 FZB42 处理 168h 时线虫存活率为 0,而 F1 和 F2 处理的分别为 40.75% 和 35.64%,结

果与液体快杀线虫生测法相一致(图2)。

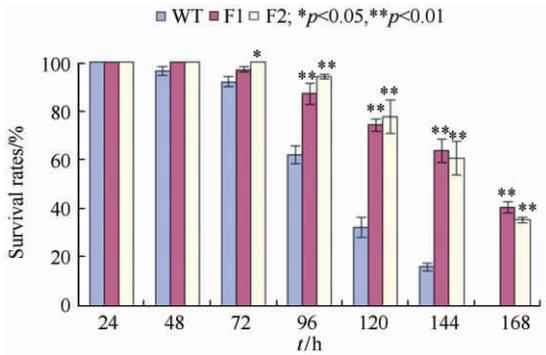


图2. 固体平板杀线虫生测法验证液体快杀线虫生测的结果

Figure 2. Bioassay of solid plate validated the results from liquid bioassay.

### 3 讨论

线虫作为植物重要的病原生物,具有多寄主性,隐蔽性,顽固性和等特点,其种群增长迅速,防治极为困难。杀线虫细菌是线虫的一类重要的天敌,由于生长快、易于培养等特点已成为生物防治线虫的新突破口<sup>[16]</sup>。目前国外的相关文献报道了食线虫细菌侵染线虫的毒力因子及其作用的分子机理的研究,但仍然比较有限,主要集中在侵染性胞外蛋白酶和伴孢晶体毒素蛋白的研究上。Huang等从侧孢短芽胞杆菌(*Brevibacillus Laterosporus*) G4菌株中纯化出的丝氨酸胞外蛋白酶可水解多种底物,包括胶原和线虫体壁,具有很强的杀线虫能力,组织病理电镜实验证实这种蛋白酶严重破坏了线虫体壁<sup>[17]</sup>。杀线虫芽胞杆菌(*Bacillus nematocida*) B16菌株分泌的碱性丝氨酸蛋白酶和中性金属蛋白酶协同作用,能够破坏线虫体壁和肠道,最终导致线虫死亡<sup>[18]</sup>。而Höss S等在苏云金芽胞杆菌中发现毒素蛋白Cry proteins对线虫有毒性作用,并部分阐明了其毒性机理<sup>[19]</sup>。除蛋白酶以外,食线虫细菌是否还具有其它的毒力因子,还有待于进一步研究。

解淀粉酶芽胞杆菌 FZB42 是一种能够产生多种次生代谢产物,在促植物生长及抑植物病原菌方面有显著活性的菌株<sup>[20]</sup>。此外,因为该菌全基因组提示含有与已知的杀线虫活性相关的两种蛋白酶基因,因此推测可能也具有杀线虫作用<sup>[21]</sup>,但相关的分子机制还不清楚。

因此,本研究利用已有的解淀粉酶芽胞杆菌 FZB42 随机突变文库<sup>[14]</sup>,通过对解淀粉酶芽胞杆菌 FZB42 突变文库中 400 多个突变子进行液体生测实验,筛选到了两株与野生型菌株 FZB42 相比杀线虫活性显著下降的菌株。液体快杀法结果显示,两菌株 F1 和 F2 作用于线虫 21h 时,线虫的存活率分别高达 46.7% 和 38.9%,而此时的野生型 FZB42 处理的线虫存活率为 0,显示了这两个突变株的杀线虫活性远远低于野生型菌株。而采用经典的固体生测法验证,得到结果与液体快杀法一致,但耗时很长,到 168h 时野生型 FZB42 处理的线虫存活率才为 0。因此液体快杀法大大缩短了整个研究的周期。

在筛选过程中,为了排除由于突变株本身生长缓慢而造成的与野生株相比的杀线虫活性下降的干扰,作者将随机选取的 400 多个突变株分别划线过夜培养,然后挑出和野生型相比生长一致的突变株,最终得到 356 株进行后续实验。在生测过程中发现不同批次的同一批菌的结果之间有一定的差异,所以作者就通过多次复筛,且每个样做 3 个平行来减少误差,确保结果的可靠性。

针对以上获得的两个突变菌株,作者后续则可采用分子生物学手段来鉴定出突变基因,从而鉴定出与杀线虫活性相关的新功能基因,进而阐明解淀粉酶芽胞杆菌 FZB42 杀线虫的机理。因此,本研究中该高效快速筛选模型的建立,无疑为菌株基因定向改良、及未来开发利用新的杀线微生物制剂奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Liu F, Liu X, Yang Z, Wang K. Research advances on *Bacillus thuringiensis* with nematicidal activity against plant parasitic nematodes. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012, 28(3): 430-434. (in Chinese)  
刘芳,刘晓艳,杨自文,王开梅.对植物寄生线虫具有活性的苏云金芽胞杆菌研究进展.中国生物防治学报 ISTIC, 2012, 28(3): 430-434.
- [2] Huang H, Yuan W, Wei H, Wang Y, Zhu J, Sun Q, Bao S. Screening and identification of an *Actinomycete* strain with nematicidal activity. *Biotechnology Bulletin*, 2013 (11): 176-180. (in Chinese)  
黄惠琴,袁维道,魏华,王英,朱军,孙前光,鲍时翔.一株抗根结线虫放线菌的筛选与鉴定.生物技术通报, 2013(11): 176-180.

- [3] Molinari S. Natural genetic and induced plant resistance, as a control strategy to plant-parasitic nematodes alternative to pesticides. *Plant Cell Reports*, 2011, 30(3): 311-323.
- [4] Gust AA, Brunner F, Nürnberger T. Biotechnological concepts for improving plant innate immunity. *Current Opinion in Biotechnology*, 2010, 21(2): 204-210.
- [5] Sahebani N, Hadavi N. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40(8): 2016-2020.
- [6] Sikora RA, Pocasangre L, Felde A, Niere B, Vu TT, Dababat AA. Mutualistic endophytic fungi and *in-planta* suppressiveness to plant parasitic nematodes. *Biological Control*, 2008, 46(1): 15-23.
- [7] Affokpon A, Coyne DL, Htay CC, Agbèdè RD, Lawouin L, Coosemans J. Biocontrol potential of native *Trichoderma* isolates against root-knot nematodes in West African vegetable production systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2011, 43(3): 600-608.
- [8] Ward E, Kerry BR, Manzanilla-López RH, Mutua G, Devonshire J, Kimenju J, Hirsch PR. The *Pochonia chlamydosporia* serine protease gene *vcpl* is subject to regulation by carbon, nitrogen and pH: Implications for nematode biocontrol. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35657.
- [9] Paiva G, Proença DN, Francisco R, Verissimo P, Santos SS, Fonseca L, Abrantes IMO, Morais PV. Nematicidal bacteria associated to *pinewood* nematode produce extracellular protease. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79705.
- [10] 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(3): 417-422.
- [11] Yang LL, Huang Y, Liu J, Ma L, Mo MH, Li WJ, Yang FX. *Lysinibacillus mangiferahumi* sp. nov., a new bacterium producing nematicidal volatiles. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2012, 102(1): 53-59.
- [12] Lee JH, Ma KC, Ko SJ, Kang BR, Kim IS, Kim YC. Nematicidal activity of a non-pathogenic biocontrol bacterium, *Pseudomonas chlororaphis* O6. *Current Microbiology*, 2011, 62(3): 746-751.
- [13] Garvis S, Munder A, Ball G, Bentzmann SD, Wiehlmann L, Ewbank JJ, Tümmler B, Filloux A. *Caenorhabditis elegans* semi-automated liquid screen reveals a specialized role for the chemotaxis gene *cheB2* in *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(8): e1000540.
- [14] Le Breton Y, Mohapatra NP, Haldenwang WG. In vivo random mutagenesis of *Bacillus subtilis* by use of TnYLB-1, a mariner-based transposon. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 327-333.
- [15] Feng H, Craig HL, Hope IA. Expression pattern analysis of regulatory transcription factors in *Caenorhabditis elegans* // Deplancke B, Gheldof N. Gene Regulatory Networks: Methods and Protocols. Hatfield: Humana Press, 2012: 21-50.
- [16] Tian BY, Yang JK, Zhang KQ. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*, 2007, 61(2): 197-213.
- [17] Huang XW, Tian BY, Niu QH, Yang JK, Zhang LM, Zhang KQ. An extracellular protease from *Brevibacillus laterosporus* G4 without parasporal crystals can serve as a pathogenic factor in infection of nematodes. *Research in Microbiology*, 2005, 156(5): 719-727.
- [18] Niu QH, Huang XW, Tian BY, Yang JK, Liu J, Zhang L, Zhang KQ. *Bacillus* sp. B16 kills nematodes with a serine protease identified as a pathogenic factor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 722-730.
- [19] Höss S, Menzel R, Gessler F, Nguyen HT, Jehle JA, Traunspurger W. Effects of insecticidal crystal proteins (Cry proteins) produced by genetically modified maize (*Bt* maize) on the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Pollution*, 2013, 178: 147-151.
- [20] Chen XH, Scholz R, Borriss M, Junge H, Mögel G, Kunz S, Borriss R. Difficidin and bacilysin produced by plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* are efficient in controlling fire blight disease. *Journal of Biotechnology*, 2009, 140(1): 38-44.
- [21] Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Schneider K, Vater J, Süßmuth R, Piel J, Borriss R. Genome analysis of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals its potential for biocontrol of plant pathogens. *Journal of Biotechnology*, 2009, 140(1): 27-37.

# Establishment and application of efficient nematocidal screening model in *Bacillus amyloliquefaciens*

Hui Shi , Fan Sun , Zhongzhong Liu , Keqin Zhang , Xiaowei Huang\*

Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resources , Key Laboratory for Microbial Resources of the Ministry of Education , Yunnan University , Kunming 650091 , Yunnan Province , China

**Abstract** [Objective] The mechanisms of nematophagous bacteria against nematodes remain unclear , limiting the use of biocontrol bacteria in the agriculture. Therefore , we constructed a rapid and efficient screening model to quickly identify new candidate genes involved in nematode infection. [Methods] The wild-type *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 as well as more than 400 random mutants were inoculated into 5 mL liquid bioassay medium. After growth at 37°C for 24 h , 200  $\mu$ L bacterial culture and 50 – 60 Level 4 age nematodes were added to 24-well plates , and then the survival rates of nematodes were determined at different time points. Through several rescreening , we selected the mutant strains whose nematocidal activities significantly decreased compared with the wild-type strain. Meanwhile , the conventional bioassay of solid plate was used as control. [Results] Two mutants ( F1 and F2) with obvious decreased nematocidal activities were selected from the random mutation library by liquid bioassay , consistent with the result of conventional solid plate bioassay. By comparing to 168 h-screening in each round of the solid plate bioassay , the method of liquid bioassay required only 24 h. The result indicated that the liquid bioassay greatly reduced the experimental time. [Conclusion] Our current study has successfully constructed a rapid and efficient method to bioassay the nematocidal activity , which could also lay the foundation for further cloning the candidate genes involved in the microbial infection against nematodes.

**Keywords:** *Bacillus amyloliquefaciens* , nematocidal activity , screen mutant library , biocontrol

( 本文责编: 王晋芳)