



## 植物根际益生菌代表性菌株贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 对松材线虫的抑杀性

张文博, 李昱龙, 周蕾, 沈东霞, 朱丽华, 樊奔\*

南京林业大学林学院, 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037

**摘要:**【目的】由松材线虫导致的松树萎蔫病是松树的毁灭性病害, 也是我国最主要的林业病害之一。本研究测评了在农业上广泛使用的、我国微生物肥料行业主要菌种资源之一——贝莱斯芽孢杆菌, 对松材线虫的潜在抑杀性能。【方法】选用贝莱斯芽孢杆菌的代表性菌株 FZB42 为材料, 测定对不同条件下的菌液上清、不同菌株的菌液上清、细菌素 plantazolicin 的提取物以及菌体直接接触等方式, 对松材线虫死亡率/存活率的影响, 并构建 FZB42 生物膜合成缺损菌株, 测定比较其对松材线虫存活率的影响。【结果】相比于 Landy 培养基, 使用 LB 培养基得到的菌液上清, 对松材线虫具有明显抑杀性, 培养 48 h 的菌液上清比培养 24 h 的菌液上清抑杀性更强, 同时, 菌液上清的抑杀效能随浓度升高及处理时间增长而有所增加。其中, 使用培养 48 h 后收集的 LB 菌液上清处理 48 h, 松材线虫死亡率可高达约 50%。之前报道对秀丽隐杆线虫有杀线虫活性的细菌素 plantazolicin, 经不同突变株上清以及 plantazolicin 提取物测试, 被证实对松材线虫无抑制作用。直接接触实验表明, 尽管 FZB42 的生物膜形成作用会刺激松材线虫提高抗胁迫能力, 但整体而言, 菌体接触对松材线虫亦有明显抑杀效果。【结论】本研究通过严格细致的测试证明, 贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 对松材线虫具有抑杀性, 该抑杀作用的分子基础和作用机理有待深入挖掘, 但其与 plantazolicin 无关。作为安全性好、研究开发程度高的一类生防菌株, 贝莱斯芽孢杆菌在防治松材线虫病方面的潜在价值值得关注。

**关键词:** 贝莱斯芽孢杆菌, FZB42, 松材线虫, 杀线虫活性, plantazolicin

由松材线虫(*Bursaphelenchus xylophilus*)引起的松萎蔫病(pine wilt disease, PWD), 是一种毁灭性的松树流行病, 在东亚地区尤为严重, 也是我

国最主要的林业病害。目前, 我国遭受松萎蔫病危害的森林面积不断扩大, 直接和间接经济损失累积上千亿元<sup>[1-2]</sup>, 林业部门面临的防控形势异常

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1200400); 国家自然科学基金(31970097); 江苏省高校自然科学研究重大项目(17KJA220001)

\*通信作者。Tel: +86-25-85427301; E-mail: fanben@njfu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-06; 修回日期: 2020-07-04; 网络出版日期: 2020-07-10

严峻；而对其治理方式，当前仍以预防和清除病死疫木方式为主，总的来说，尚无非常有效的根除或控制手段。

近 10 余年，国内外植物根际微生物的研究有了长足发展，人们对“植物—微生物”相互作用的机制有了更加深刻的理解，以微生物肥料为主要形式的根际微生物开发利用产业，在我国正蓬勃发展。在各类根际微生物中，芽孢杆菌由于能够产生抗逆性极强的芽孢，在菌剂的生产、运输、存储和应用过程中具有突出的优势；因此，由芽孢杆菌制成的微生物肥料占据了我国 80% 的产品市场，而在各类芽孢杆菌中，使用最多的菌种则是贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。

贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 是同类细菌中研究最为深入的代表性菌株之一<sup>[3-5]</sup>，迄今为止，关于该菌株的学术论文已有 300 多篇<sup>[6]</sup>。FZB42 曾是解淀粉芽孢杆菌植物亚种(*Ba. amyloliquefaciens plantarum*)的模式菌株<sup>[3]</sup>，但 2016 年有研究表明，该亚种和更早命名的贝莱斯芽孢杆菌，乃同种异名<sup>[4-5]</sup>，故将 FZB42 更名为贝莱斯芽孢杆菌。FZB42 将约 10% 的基因组资源，都用于抗生素或细菌素等拮抗物质的合成，其中包括几种聚酮类化合物(difficidin, bacillaene, macrolactin)、脂肽类化合物(surfactin, fengycin, bacillomycin D)以及一种

抑菌能力十分突出的二肽化合物 bacilysin<sup>[7-14]</sup>。这些抗生素对应的基因基础、合成途径和调控机制等方面大多已被深入研究。此外，FZB42 还能够产生强健的生物膜，具有高效的根部定殖能力，这对于帮助植物抵御病原微生物的侵袭，亦有显著贡献。

总的来说，FZB42 作为实验材料，已被用于多种抗生素的分子基础和合成路径研究，为该类菌株在农业上的施用提供了理论依据，但迄今为止，该类菌株在林业上的应用研究仍寥寥无几。2011 年，研究者在 FZB42 中鉴定出了 1 种新的噻唑/恶唑类型的细菌素(命名为 plantazolicin)<sup>[15-16]</sup>，2013 年有报道认为，plantazolicin 具有抑杀秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的活性<sup>[17]</sup>，这促使我们去思考，该物质是否也有杀死松材线虫的活性。因此，在本研究中我们使用 FZB42 对松材线虫的潜在抑制性进行了测定评价，为松萎蔫病防控工作摸索新的突破方向和思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 培养基、菌株和虫株

全文所用菌株及虫株信息详见表 1。松材线虫 AMA3c1 为野生松材线虫 *Bu. xylophilus* AMA3 的全同胞近交系，使用灰葡萄孢菌饲养 AMA3c1。

表 1. 文中使用的线虫、真菌和细菌菌株

Table 1. Nematode, fungal and bacterial strains used

Strains	Description	Sources or references
AMA3c1	<i>Bu. xylophilus</i> derivate	[19]
FZB42	<i>Ba. velezensis</i> , wild type	Laboratory stock
RS06	FZB42, <i>sfp::emAM bacA::cmR</i> , deficient in lipopeptides, polyketides and bacilysin	[18]
RS31	RS06, <i>pznC::spe</i> , does not produce plantazolicin	[15]
FBS262	FZB42, <i>tasA::speR</i>	This work
FBS296	FZB42, <i>tasA::speR</i> , <i>epsA::kmR</i>	This work

FZB42 野生型为本实验室保藏, 其衍生突变株 RS06 和 RS31 由德国洪堡大学 Rainer Borriss 教授赠送, 生物膜突变株 FBS262 和 FBS296 为本研究中构建。各菌株使用 LB 或 Landy 培养基培养<sup>[18]</sup>, 需要补充相应抗生素之处见文中信息。plantazolicin 生产培养基参见文献<sup>[15]</sup>。

## 1.2 无菌松材线虫制备

使用 Zhu 等描述的方法制备无菌线虫<sup>[19]</sup>, 简述如下: 首先用 Baermann 漏斗收集线虫, 然后将收集的线虫悬浮液倒在无菌盖玻片上, 使其在 25 °C 培养皿中产卵 4–6 h。将附着在盖玻片表面的虫卵用无菌水冲洗几次, 去除线虫。盖玻片用 15% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 消毒 60 min, 然后再用无菌水冲洗 3 次。随后, 将盖玻片上消过毒的虫卵置于灰葡萄孢的平板上, 使其在 25 °C 下孵化。在无菌条件下用 Baermann 漏斗收集繁殖的线虫, 保存在 4 °C 冰箱备用。使用前检查无菌情况, 避免污染。

## 1.3 plantazolicin 粗提物制备

从 FZB42 细胞中提取 plantazolicin 的方法参考文献<sup>[17]</sup>。简言之, 将 FZB42 在 PZN 生产培养基上培养 1 d, 从 5 个平板上收集菌落, 溶解于 21 mL 乙腈与 9 mL 蒸馏水的混合液中。再将 30 μL 的甲酸添加到混合物中, 充分涡旋, 然后 8000 r/min 离心 20 min 收集上清液。将上清液用 0.45 μm 滤膜过滤, 然后用旋转蒸发器小心干燥(30 °C, 100 r/min, 80 mbar)。将干燥后的提取物溶于 2 mL (乙腈-水-甲酸)混合液, 然后转移至无菌管中, 再次用真空蒸发器蒸发。称重干燥后的提取物, 溶解于特定体积的甲醇中, 进行后续 HPLC-ESI-MS 分析和线虫实验。

## 1.4 HPLC-ESI-MS 分析

提取物分离使用 UltiMate 3000 UHPLC 色谱

系统(Thermo Fisher Scientific)。使用 Sun Fire C<sub>18</sub> (4.6 mm×150 mm)色谱柱, 流速设置为 0.4 mL/min, 线性梯度为 20%至 98%乙腈和 0.1%甲酸 8 min, 并将 98%乙腈保持 2 min。质谱分析使用 LTQ Orbitrap XL 质谱仪(Thermo Fisher Scientific), 以阳离子模式进行, 质量窗口设置为 500–1400 Da。

## 1.5 FZB42 生物膜合成缺陷菌株的构建

提取 FZB42 的全基因组 DNA 为模板, 使用引物 FBO797 (5'-TATGAGCAGACAGAGGAAAA-3') 和 FBO800 (5'-GATAAAAAAAG-CAAAACGAT-3') 进行 PCR 扩增 *tasA* 区段, 转入 T 载体后, 以限制性内切酶 *EcoR* I 切开, 插入壮观霉素抗性基因 (*speR*) 片段, 构建重组质粒 pFB219。再将 pFB219 转化 FZB42, 挑选阳性克隆进行菌落 PCR 验证, 得到正确的突变体 FBS262(*ΔtasA::speR*)。同理, 使用引物 FBO801 (5'-GCTCTCCTATTCCC GTGT-3') 和 FBO804 (5'-AATAGAAGATAAATGTAAAAAGC-3') 进行 PCR 扩增 *epsA* 区段, 以卡那霉素抗性基因 (*kmR*) 为标记, 构建重组质粒 pFB218。再将该质粒转化 FBS262, 挑选阳性克隆, 测序验证得到突变株 FBS296 (*ΔtasA::speR; ΔepsA::kmR*)。

## 1.6 芽孢悬液制备

芽孢悬液制备参考文献<sup>[20]</sup>。

## 1.7 不同处理下松材线虫死亡/存活率检验

**1.7.1 用 FZB42 菌液上清处理:** 将 FZB42 野生型在 LB 或 Landy 培养基中分别培养 24 h 和 48 h, 收集菌液并离心, 将上清转移到新管中, 过滤除去细菌细胞。然后将 40 μL 或 120 μL 上清添加至 24 孔板中, 再加入 360 μL 无菌松材线虫悬液 (约 1000 条), 立即对上清分别进行 1:9 和 1:3 稀释。温育 24 h 和 48 h 后, 分别计算线虫的死亡

率。阴性对照不加上清, 仅加相应体积的 LB 或者 Landy 培养基, 处理和对照均设置 4 个重复。通过显微观察确定松材线虫的死亡情况: 每次用 10 倍物镜观察 20  $\mu\text{L}$  线虫悬浮液, 如果观察到线虫不运动, 且用细针轻轻敲击其身体不引起任何反应, 则认为线虫死亡。含 plantazolicin 的菌液上清实验, 除培养基不同之外, 其余步骤类似上述过程。

**1.7.2 用 plantazolicin 粗提物处理:** 用甲醇将 plantazolicin 提取物的浓度分别调整为 600 mg/mL 和 300 mg/mL。在 24 孔板每孔中加入 360  $\mu\text{L}$  无菌水和 20  $\mu\text{L}$  FZB42 细胞提取物, 然后再加入 20  $\mu\text{L}$  松材线虫悬液(约 2000 条)进行测试。对照孔用 20  $\mu\text{L}$  甲醇代替 plantazolicin 粗提物, 处理和对照设 5 个重复。25  $^{\circ}\text{C}$  下孵育 18、28、40、64、96 h 后, 分别确定线虫死亡率。确定线虫的死亡的方法同上清液测试。

**1.7.3 菌体接触处理:** 将 FZB42 野生型和生物膜合成缺陷株 FBS296, 分别按 1%接种量接种到 DSM 孢子形成培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 36 h 后, 离心收集芽孢。用无菌 PBS 缓冲液(pH 7.0)将芽孢沉淀洗涤 3 次, 最后用相同的 PBS 缓冲液稀释至  $OD_{600}$  3.0, 再将 10  $\mu\text{L}$  孢子悬浮液用 1 mL 线虫悬液(约 3000 条)稀释, 将稀释液置于 24 孔板中, 25  $^{\circ}\text{C}$  温育 2、4、6、8、10、12 d 后分别确定线虫的存活率。对照组不含细菌, 每组设置 3 个重复, 每孔取样 3 次进行观察, 每次观察 5  $\mu\text{L}$  悬液。

## 1.8 数值统计

使用卡方检验比较线虫死亡率或存活率的差异显著性。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同条件下 FZB42 菌液上清对松材线虫的抑制作用

为了测试贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 对松材线虫的潜在抑制性, 我们优先采用了一种简单方便的策略: 将无菌松材线虫置于一定浓度的 FZB42 菌液上清中, 培养一段时间后检测其死亡率。由于 FZB42 在不同生长时间、不同培养基中, 会以不同的效率生成不同的代谢产物(包括抗生素), 因此我们使用了两种培养基(常用普通培养基 LB 和 FZB42 抗生素生成常用培养基 Landy 培养基), 两个生长时期(培养 24 和 48 h 后)取样的上清, 按两种比例稀释(1:3 和 1:9)添加至线虫悬液, 并分别处理松材线虫 24 h 和 48 h 后进行检测。

测试结果如图 1 和表 2 所示, 在上清浓度为 1:9 稀释的情况下, 只有 1 组处理与对照有差别; 而在 1:3 稀释的情况下, 有 5 组处理与对照有差别, 这说明 1:3 稀释的上清, 对线虫有较明显的抑制作用。两种培养液上清的对比发现, 添加 LB 培养液的上清, 有 4 组处理与对照有显著差别, 其对线虫的抑制率高出对照组 10%–20%; 而添加 Landy 培养基的上清, 只有两组处理与对照有差别, 且仅比对照组高 3%–5%, 这说明 FZB42 在 LB 中产生的代谢物对松材线虫有强烈的抑制作用。

从线虫处理时间上可以发现, 处理 48 h 导致的线虫死亡率明显偏高于处理 24 h, 这与常理相符, 也为后续研究提供了一个基本的参考。其次, 在 LB 中培养 48 h 后收集的上清, 比培养 24 h 后收集的上清有更加明显的抑制效果, 因此我们推测, FZB42 抑制物质的产生主要集中于稳定期中后期。综合来看, 对线虫抑制程度最高的处理组, 是使用 48 h 收集的 LB 培养液上清处理线虫 48 h,

这种条件下松材线虫死亡率高达约 50%，而其他处理组的抑杀率基本都在 20%以下。

上述这些数据为以后分离鉴定 FZB42 的抑制物质，提供了基本的参数依据。

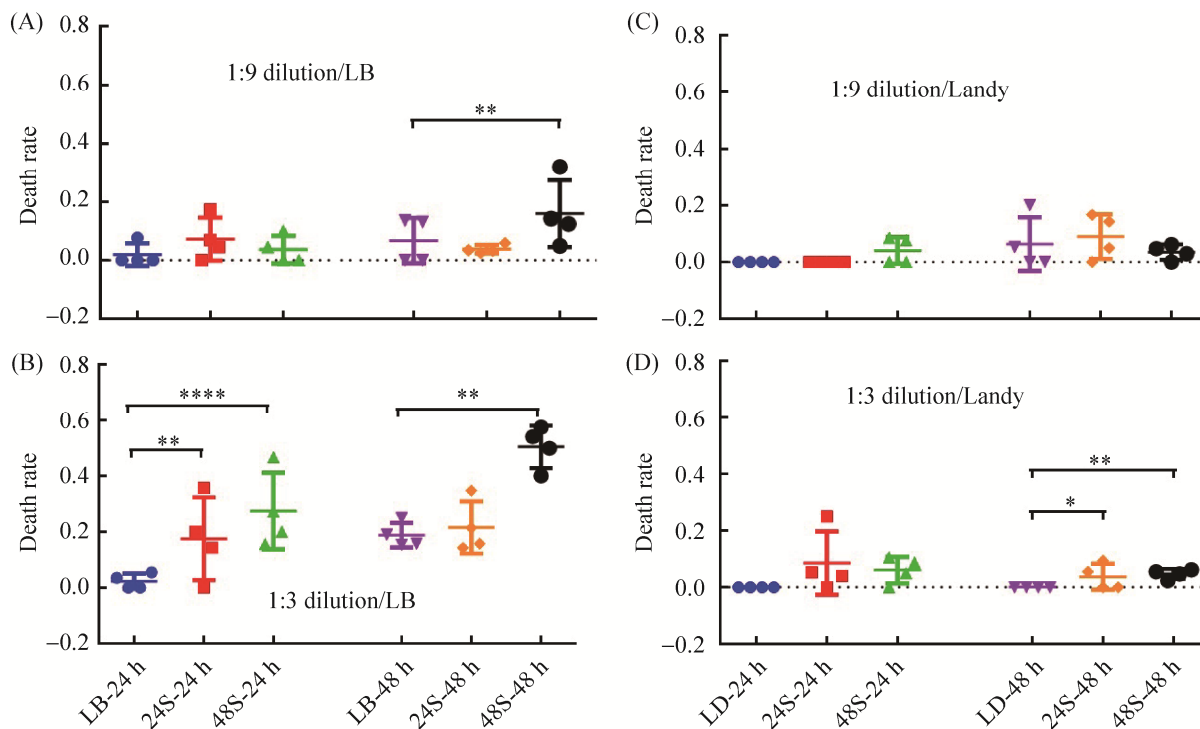


图 1. 不同条件下贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 上清液对松材线虫死亡率的影响

Figure 1. Effects of different culture supernatants of *Ba. velezensis* FZB42 on the mortality of *Bu. xylophilus*. The supernatants of *Ba. velezensis* FZB42 cultured in LB and in Landy medium (LD) were collected at the 24<sup>th</sup> (24S) and the 48<sup>th</sup> (48S) hour after inoculation and then diluted with *Bu. xylophilus* suspension by 1:9 or 1:3. The control (CK) contained no supernatant but only LB or Landy medium. Death rates of the nematodes were determined after incubation for 24 h or 48 h. Four replicates were used for each group. Significance of the discrepancies were calculated by Chi-square test according to the data in Table 2. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*:  $P < 0.0001$ .

表 2. 添加贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 菌液后松材线虫死亡/存活情况统计

Table 2. Statistics of dead or survived *Bu. xylophilus* in suspensions supplemented with different *Ba. velezensis* FZB42 supernatants

Dilution	Nematode status	With supernatants from LB						With supernatants from Landy medium					
		Incubation for 24 h			Incubation for 48 h			Incubation for 24 h			Incubation for 48 h		
		CK	24S	48S	CK	24S	48S	CK	24S	48S	CK	24S	48S
1:9	Dead	1	10	4	2	8	16	0	0	4	2	7	4
	Survived	32	211	112	72	83	78	35	38	78	75	77	123
1:3	Dead	2	9	17	24	16	53	0	5	6	0	4	6
	Survived	80	39	51	104	54	52	31	69	89	181	107	127

Each number is an accumulation of replicates from four wells (80  $\mu$ L in total). 24S: the supernatants collected at the 24<sup>th</sup> hour after inoculation. 48S: the supernatants collected at the 48<sup>th</sup> hour after inoculation. Death rate=dead nematodes/(dead nematodes+survived nematodes) $\times$ 100%.

## 2.2 不同菌株上清对松材线虫的抑制作用

为了测试 FZB42 产生的 plantazolicin 是否具有抑杀松材线虫的活性, 利用与上述实验类似的方法, 对 3 株细菌(FZB42 野生型、突变株 RS06 和 RS31)的培养液上清进行测定。为了方便比较, 将检测结果分别按照处理时间和上清液的稀释倍数分组展示。从图 2-A、2-B、2-C 可知, 在同样处理时间条件下, 随着上清液浓度增加松材线虫的死亡率明显提高, 说明了松材线虫所受的抑制效果具有浓度依赖性; 但是在同一稀释倍数下, 3 个菌株上清的抑制性均无统计学上的显著差异(图 2-D、2-E、2-F)。与野生型相比, RS06 菌株丧失了大部分抗生素合成能力, 而 RS31 是在 RS06 基础上构建的, 进一步丧失了 plantazolicin 的合成能力。因此, 这里的结果暗示, RS06 所不能合成的那些抗生素和 plantazolicin, 对线虫均无显著的抑制作用。

## 2.3 plantazolicin 提取物对松材线虫的抑制性

由于考虑到 plantazolicin 在上清中的浓度不够高而导致上述实验无差别的结论, 因此我们决定对 plantazolicin 进行提取和再实验。提取物通过 HPLC 结合 ESI 质谱分析。HPLC 图谱中显示一个特异峰, 该峰出现在 FZB42 和 RS06 的提取物中, 但没有出现在 RS31 的提取物中, 这与 RS31 中 plantazolicin 合成基因簇被破坏的性质一致; 另外, 该特异性峰的持留时间(RT)为 7.32 min(图 3-A), 与之前报道的 plantazolicin 的保留时间相近。ESI-MS 进一步分析表明, 该峰对应分子的  $m/z=1336.48 [M+H]^+$  和  $m/z=668.74 [M+2H]^{2+}$ , 表明该化合物的分子量为 1335.47 g/mol(图 3-B), MS 谱图和分子量与以前的报告完全相同, 这些结果表

明成功提取了 plantazolicin。

将 plantazolicin 提取物以两种浓度(600 mg/mL 和 300 mg/mL, 均远高于之前报告<sup>[17]</sup>)加至松材线虫悬液中, 分别测试其对松材线虫存活的影响。从图 3-C 可以看出, 在前 64 h 内, 用 plantazolicin 提取物处理的线虫的死亡率低于 5%, 且与对照组之间并无显著差异。在第 96 h 后, 对照组(仅添加甲醇)中线虫死亡率增加到约 24%, 而此时两种浓度 plantazolicin 处理线虫的死亡率竟然仍低于 2%。该结果表明, 在长时间处理(96 h)之后, 高浓度 plantazolicin 提取物, 不仅没有明显的杀线虫作用, 甚至延长了松材线虫的存活。这个结果尽管出乎意料, 但似乎与近年两篇野生型枯草芽孢杆菌能够延长秀丽隐杆线虫寿命的报道相一致<sup>[20-21]</sup>。

## 2.4 FZB42 直接接触对松材线虫存活的影响

野生型枯草芽孢杆菌能够形成生物膜的能力, 在其延长秀丽隐杆线虫寿命的作用中扮演了重要角色<sup>[20]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌是枯草芽孢杆菌的近缘菌种, 而 FZB42 形成生物膜的能力也十分突出, 因此, 为了验证 FZB42 生物膜形成相关过程是否影响了松材线虫的存活, 我们首先构建了 FZB42 的生物膜生成受损突变株 FBS296。菌落 PCR 验证挑选出的阳性转化子经 DNA 测序结果表明, FBS296 中参与生物膜胞外基质主要成分(EPS 和淀粉样蛋白 TasA)合成的基因均被破坏。图 4-A 和 4-B 显示, 与 FZB42 野生型相比, FBS296 的菌落光滑平坦, 几乎没有任何皱褶, 在液体培养基表面也几乎不能形成薄膜, 这说明 FBS296 在固-气和固-液表面的生物膜形成能力完全丧失。

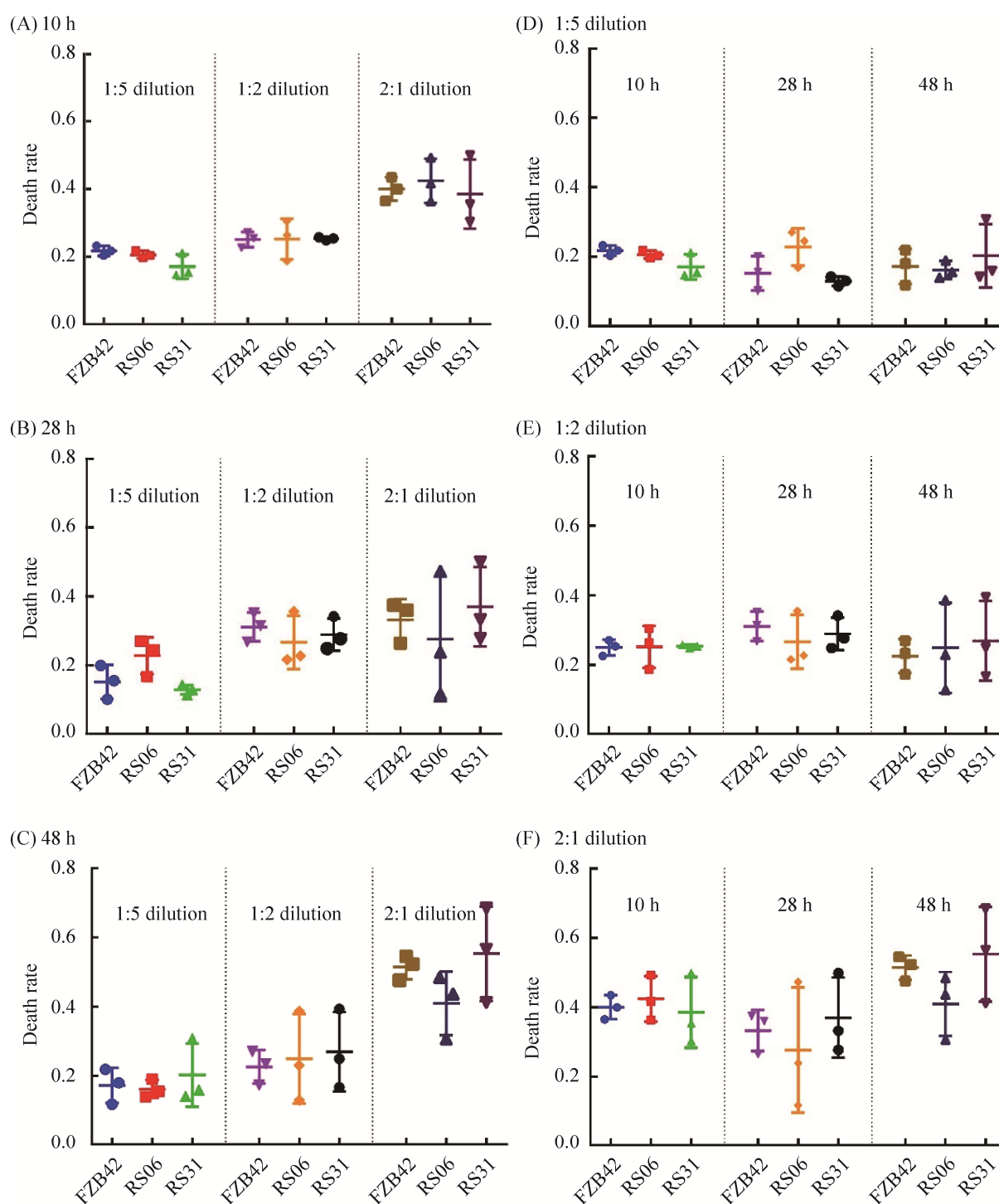


图 2. 3 种菌株上清对松材线虫死亡率的影响

Figure 2. Effect of the culture supernatants of three strains on the mortality of *Bu. xylophilus*. The supernatants of *Ba. velezensis* FZB42 wild type, the mutants RS06 and RS31, cultured in plantazolicin production medium were diluted with *Bu. xylophilus* suspension by 1:5 (D), 1:2 (E) or 2:1 (F). Death rates of the nematodes were determined after incubation for 10 h (A), 28 h (B) and 48 h (C). Four replicates were used for each group. Significance of the discrepancies were calculated by Chi-square test.

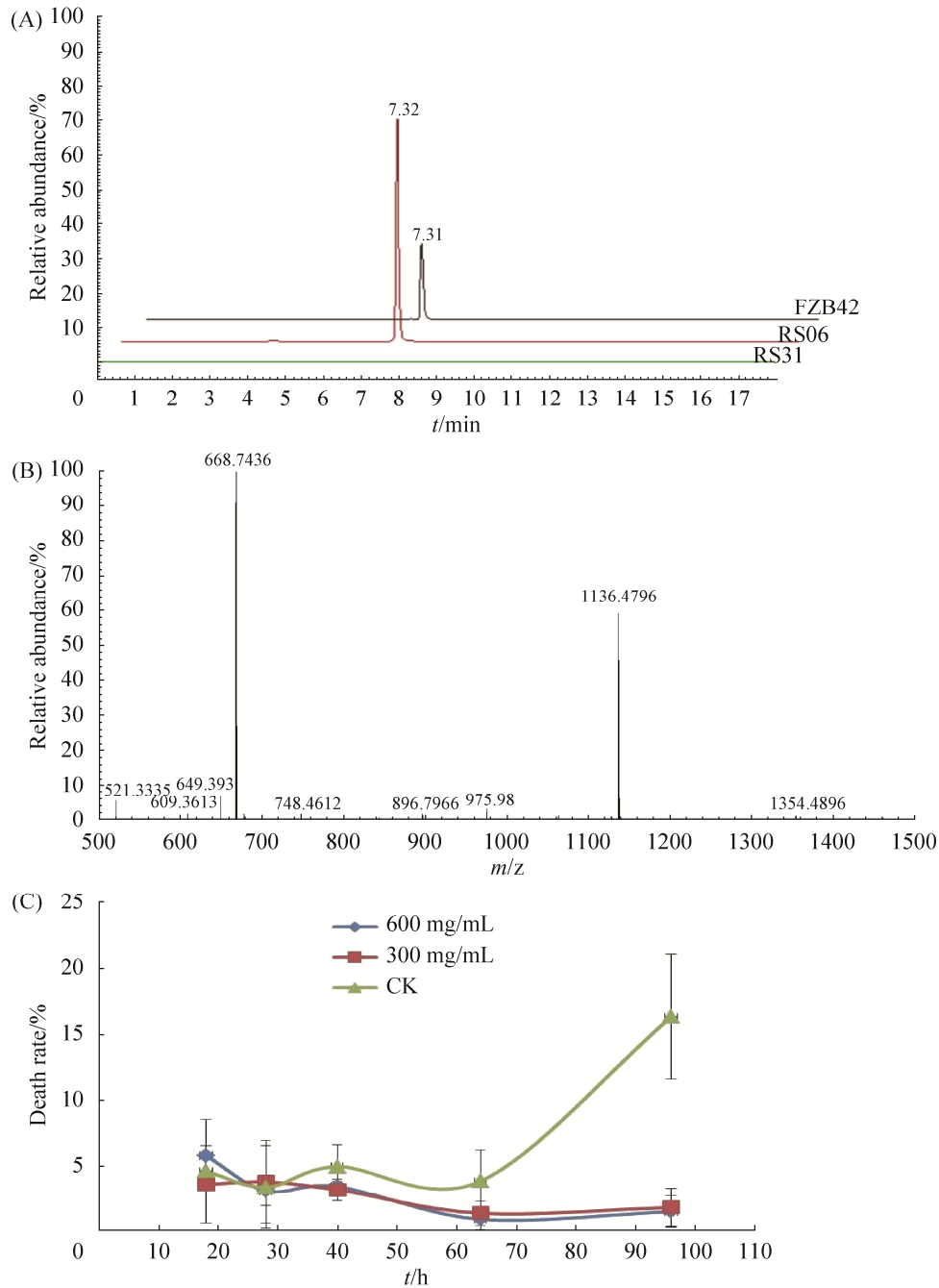


图 3. plantazolicin 提取物的 HPLC-MS 分析及其对松材线虫死亡率的影响

Figure 3. HPLC-MS analysis of plantazolicin extract and its effects on the mortality of *Bu. xylophilus*. A: HPLC chromatogram of plantazolicin extract synthesized by FZB42, RS06 ( $\Delta sfp$ ) and RS31 ( $\Delta sfp$ ,  $\Delta pznC$ ); B: the mass spectrum of plantazolicin extracted from FZB42. The ions with  $m/z$  668.74 [ $M+2H$ ] $^{2+}$  and  $m/z$  1336.48 [ $M+H$ ] $^{+}$  represent the typical molecular mass of plantazolicin; C: the effect of plantazolicin extract on the death rates of *Bu. xylophilus*. The plantazolicin extract were added to *Bu. xylophilus* at two final concentrations (300 mg/mL and 600 mg/mL) and assayed. Death rates were determined at the 18<sup>th</sup>, 28<sup>th</sup>, 40<sup>th</sup>, 64<sup>th</sup> and 96<sup>th</sup> hour after inoculation.



将 FZB42 和 FBS296 的芽孢分别添加至线虫悬液中, 观察其对线虫存活的影响。从图 4-C 可以看出, FZB42 直接接触处理与无细菌的对照相比, 松材线虫存活率在前 4 d 内并无显著差异, 但

在第 6 天、第 8 天和第 10 天, 处理比对照的存活率低约 10%。这表明, FZB42 直接接触对松材线虫具有抑制作用。与野生型 FZB42 相比, FBS296 处理松材线虫的存活率更低, 且其抑制效果在第 4 天即明显显现, 而此时 FZB42 野生型与无菌对照并无明显差别。这说明, FZB42 形成生物膜的能力对松材线虫的存活有助益作用, 这在一定程度上降低了对松材线虫的抑制效果, 当丧失生物膜形成能力后, 则其对松材线虫的抑杀性更加凸显出来。

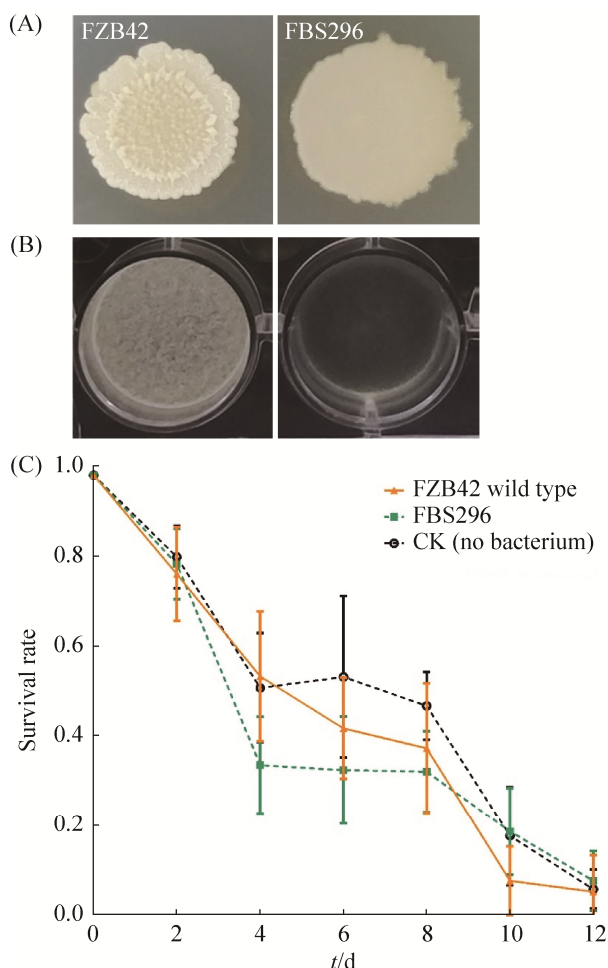


图 4. 贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 菌体接触及其生物膜合成能力对松材线虫存活的影响

Figure 4. Effects of direct contact of *Ba. velezensis* FZB42 and its ability of biofilm formation on the survival of *Bu. xylophilus*. Morphological appearance of colonies (A) and pellicles (B) formed by the FZB42 wild type and the mutant FBS296 deficient in biofilm formation; C: effects of the FZB42 wild type and FBS296 on the survival of *Bu. xylophilus*. Spores from the wild type and FBS296 were applied to *Bu. xylophilus* and their survival rates were determined in 12 days. The control contained no bacterium ( $n=9$ ).

### 3 讨论

松萎蔫病威胁着东亚地区数百万公顷的松树, 因此切实控制松萎蔫病的直接病原——松材线虫, 是从根本上解决松萎蔫病蔓延的有效方式。而生物防治的方法, 显然是其中最具研究价值并有利于环境保护的一类方法。作为革兰氏阳性植物生防菌株的典范, 贝莱斯芽孢杆菌 FZB42 对各类农业植物的促生作用, 以及对诸多植物病原菌的拮抗作用, 已被广泛研究<sup>[6]</sup>, 但是迄今为止, 尚未有人对其对松材线虫的潜在抑杀性进行评价。

在本研究中, 我们测试了 FZB42 对松材线虫生长的影响。将来自不同培养基、不同时期、不同浓度和不同处理时间的 FZB42 菌液添加至松材线虫悬液, 测定松材线虫的死亡率, 发现 FZB42 菌液上清具有抑杀松材线虫的效果, 其中在 LB 培养基和 1:3 稀释上清条件下, 对松材线虫具有明显的抑杀效果; 而收集 48 h 的 LB 培养液上清处理松材线虫 48 h, 可使抑杀率达到约 50%。这些测定条件尽管并非十分细致, 但是这些测定结果确立了一个基本结论, 并勾勒出了抑制效果发生的基本条件, 为后续研究和未来的机理性深入研究

奠定了基础。例如,已有的研究表明,FZB42至少能产生13种拮抗物质(多数可归类为抗生素)<sup>[6]</sup>,这些拮抗物质生产的最适培养基和峰值时间各不相同,其中多种抗生素(例如 fengycin, bacillomycin D, diffcicidin)的优选培养基是 Landy 培养基,但本研究发现, LB 培养液上清对松材线虫的抑制效果明显优于 Landy 培养液,这暗示了在 Landy 培养基中高产的那几种抗生素并非抑制松材线虫的主要物质;相反,在 LB 培养基中积累的某种(某些)代谢物,则似乎应该为抑制效果负责。这些研究结果为后续找寻上清中的抑制物质提供了参考的线索。

先前 Liu 等的研究认为, FZB42 具有针对秀丽隐杆线虫的抑杀活性,这种活性是由 FZB42 所产生的细菌素 plantazolicin 所介导的<sup>[17]</sup>,但该文中仅对杀线活性进行了测试,并未对其机理进行研究。在本研究中,无论使用不同突变株的上清(RS06 vs RS31),还是使用纯化过的 plantazolicin 提取物,均未发现 plantazolicin 对松材线虫具有抑杀作用。不仅如此,在实验中我们发现,添加 plantazolicin 粗提物,反而能够明显提高松材线虫的存活率,这促使我们去进一步探究其原因,并关注 FZB42 生物膜形成能力对松材线虫的影响。近年来有报道表明,枯草芽孢杆菌能够延长秀丽隐杆线虫的寿命<sup>[20-21]</sup>,这种有益作用至少跟两个因素有关,一是枯草芽孢杆菌产生的信号分子一氧化氮(NO)分子可以跨物种发挥调节作用<sup>[20]</sup>;二是枯草芽孢杆菌在秀丽隐杆线虫肠道内发生定殖并形成生物膜,生物膜生成促进了细菌 NO 分子和一种寡肽(CSF)的产生,CSF 在枯草芽孢杆菌群感阈值效应(quorum sensing)中发挥自体诱导物的作用,并和 NO 协同,能够延长线虫寿命,抵御其抗胁迫的能力<sup>[21]</sup>。贝莱斯芽孢杆菌和枯草芽孢

杆菌的亲缘关系很近<sup>[5]</sup>,因此 plantazolicin 提取物促进松材线虫存活率的结果,可以说是和上述报道一致的。而利用生物膜缺损突变株 FBS296 的研究表明, FZB42 的生物膜形成能力,确实对提高松材线虫的存活率有贡献,因此, FZB42 对松材线虫应该同时存在两种影响,一种是抑制作用,一种是增强了线虫的抗胁迫能力,但从整体上看,添加 FZB42 菌株还是降低了松材线虫的存活率(图 4-C)。

综上所述,本研究通过繁重的测定工作,确定了贝莱斯芽孢杆菌对松材线虫具有抑制作用,并对其产生作用效果的基本条件和不同方式进行了分析评价,排除了 plantazolicin 是抑制物质的可能性,初探了生物膜形成能力对松材线虫的影响。在未来的工作中,仍有很多值得深入研究的地方,例如进一步优化 FZB42 抑制效果的作用条件,鉴定抑制松材线虫的具体物质,探索抑制效果的分子机理等等。本文的结果,为这些深入研究奠定了基础,也为松树萎蔫病的生物防治工作,提供了可供参考的视角和可供开发的微生物资源。

## 参 考 文 献

- [1] Ding XL, Ye JR, Lin SX, Wu XQ, Li DW, Nian B. Deciphering the molecular variations of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* with different virulence. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0156040.
- [2] Ye JR. Epidemic status of pine wilt disease in China and its prevention and control techniques and counter measures. *Scientia Silvae Sinicae*, 2019, 55(9): 1-10. (in Chinese)  
叶建仁. 松材线虫病在中国的流行现状、防治技术与对策分析. *林业科学*, 2019, 55(9): 1-10.
- [3] Borriss R, Chen XH, Rueckert C, Blom J, Becker A, Baumgarth B, Fan B, Pukall R, Schumann P, Spröer C, Junge H, Vater J, Pühler A, Klenk HP. Relationship of *Bacillus amyloliquefaciens* clades associated with strains DSM 7<sup>T</sup> and FZB42<sup>T</sup>: a proposal for *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *amyloliquefaciens* subsp. nov. and

- Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* subsp. nov. based on complete genome sequence comparisons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2011, 61(8): 1786–1801.
- [4] Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and ‘*Bacillus oryzicola*’ are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2016, 66(3): 1212–1217.
- [5] Fan B, Blom J, Klenk HP, Borriss R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 22.
- [6] Fan B, Wang C, Song XF, Ding XL, Wu LM, Wu HJ, Gao XW, Borriss R. *Bacillus velezensis* FZB42 in 2018: the gram-positive model strain for plant growth promotion and biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2491.
- [7] Chen XH, Koumoutsis A, Scholz R, Eisenreich A, Schneider K, Heinemeyer I, Morgenstern B, Voss B, Hess WR, Reva O, Junge H, Voigt B, Jungblut PR, Vater J, Süßmuth R, Liesegang H, Strittmatter A, Gottschalk G, Borriss R. Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(9): 1007–1014.
- [8] 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(1/2): 27–37.
- [9] Fan B, Chen XH, Budiharjo A, Bleiss W, Vater J, Borriss R. Efficient colonization of plant roots by the plant growth promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42, engineered to express green fluorescent protein. *Journal of Biotechnology*, 2011, 151(4): 303–311.
- [10] Fan B, Borriss R, Bleiss W, Wu XQ. Erratum to: gram-positive Rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 colonizes three types of plants in different patterns. *Journal of Microbiology*, 2013, 51(4): 544.
- [11] Fan B, Carvalhais LC, Becker A, Fedoseyenko D, von Wirén N, Borriss R. Transcriptomic profiling of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 in response to maize root exudates. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 116.
- [12] Fan B, Li L, Chao YJ, Förstner K, Vogel J, Borriss R, Wu XQ. dRNA-seq reveals genomewide TSSs and noncoding RNAs of plant beneficial rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142002.
- [13] Fan B, Li YL, Li L, Peng XJ, Bu C, Wu XQ, Borriss R. Malonylome analysis of rhizobacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 reveals involvement of lysine malonylation in polyketide synthesis and plant-bacteria interactions. *Journal of Proteomics*, 2017, 154: 1–12.
- [14] Chowdhury SP, Hartmann A, Gao XW, Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 - a review. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 780.
- [15] Scholz R, Molohon KJ, Nachtigall J, Vater J, Markley AL, Süßmuth RD, Mitchell DA, Borriss R. Plantazolicin, a novel microcin B17/streptolysin s-like natural product from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(1): 215–224.
- [16] Kalyon B, Helaly SE, Scholz R, Nachtigall J, Vater J, Borriss R, Süßmuth RD. Plantazolicin A and B: structure elucidation of ribosomally synthesized thiazole/oxazole peptides from *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Organic Letters*, 2011, 13(12): 2996–2999.
- [17] Liu ZZ, Budiharjo A, Wang PF, Shi H, Fang J, Borriss R, Zhang KQ, Huang XW. The highly modified microcin peptide plantazolicin is associated with nematicidal activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(23): 10081–10090.
- [18] 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(1/2): 38–44.
- [19] Zhu LH, Ye JR, Negi S, Xu XL, Wang ZL, Ji JY. Pathogenicity of aseptic *Bursaphelenchus xylophilus*. *PLoS One*, 2012, 7(5): e38095.
- [20] Donato V, Ayala FR, Cogliati S, Bauman C, Costa JG, Leñini C, Grau R. *Bacillus subtilis* biofilm extends *Caenorhabditis elegans* longevity through downregulation of the insulin-like signalling pathway. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 14332.
- [21] Gusarov I, Gautier L, Smolentseva O, Shamovsky I, Eremina S, Mironov A, Nudler E. Bacterial nitric oxide extends the lifespan of *C. elegans*. *Cell*, 2013, 152(4): 818–830.

# Inhibition of pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by rhizobacterium *Bacillus velezensis* FZB42

Wenbo Zhang, Yulong Li, Lei Zhou, Dongxia Shen, Lihua Zhu, Ben Fan\*

Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] Pine wilt disease caused by the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* is a destructive disease of pines and one of the most dangerous forestry diseases in China. *Bacillus velezensis* strains are widely used in agriculture as microbial agents for promoting plant growth and the major bacterial resources in China's microbial fertilizer industry. In this study we evaluated the inhibition of *Bu. xylophilus* by *Ba. velezensis*. [Methods] *Ba. velezensis* FZB42 was used as a representative strain in the study. The inhibition was determined using supernatants of FZB42 cultures under different conditions, the supernatants of different mutants, the extract of plantazolicin, and the direct FZB42 contact on the mortality/survival rate of *Bu. xylophilus*. An FZB42 mutant deficient in biofilm formation was constructed and its effect on the survival rate of *Bu. xylophilus* was also determined. [Results] Compared with Landy medium, the supernatant of FZB42 cultured in LB medium had a significant inhibitory effect on *Bu. xylophilus*. The supernatant collected at the 48<sup>th</sup> hour after inoculation was more inhibitory than that collected at the 24<sup>th</sup> hour. The inhibitory efficacy improved with the increase of supernatant concentration and treatment time. Using LB culture supernatant collected at the 48<sup>th</sup> hour to treat nematodes for 48 h could result in a mortality rate of the nematodes as high as about 50%. The tests with the supernatants of different mutants and the culture extracts showed that plantazolicin, a bacteriocin reported to have a nematocidal activity against *Caenorhabditis elegans*, had no inhibitory effect on *Bu. xylophilus*. Direct contact experiments also showed that FZB42 significantly decreased the survival rate of *Bu. xylophilus*, although the bacterial biofilm formation could enhance *Bu. xylophilus* resistance to stress. [Conclusion] We demonstrated with laborious but strict assays that *Ba. velezensis* FZB42 had an inhibitory effect on the pine wood nematode *Bu. xylophilus*. The molecular basis and mechanism of the inhibitory effect need to be further explored, but it has proved to be not related with plantazolicin. As a group of biocontrol strains with good safety, profound basis research and high degree of development, the potential application value of *Ba. velezensis* in the control of the pine wood nematode deserves our attention.

**Keywords:** *Bacillus velezensis*, FZB42, *Bursaphelenchus xylophilus*, nematocidal activity, plantazolicin

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key R&D Program of China (2018YFC1200400), by the National Natural Science Foundation of China (31970097) and by the Key Scientific Project for Jiangsu Provincial Universities (17KJA220001)

\*Corresponding author. Tel: +86-25-85427301; E-mail: fanben@njfu.edu.cn

Received: 6 June 2020; Revised: 4 July 2020; Published online: 10 July 2020