

研究报告



M60 家族肽酶参与调控蜡质芽胞杆菌 AR156 防治南方根结线虫病的作用机制

廖梦婕^{1,2} 汪宏凯^{1,2} 蒋春号^{*1,2} 郭坚华^{*1,2}

1 南京农业大学植物保护学院 江苏 南京 210095

2 南京农业大学农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室 江苏 南京 210095

摘要:【背景】南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)寄主范围广泛,能侵染茄科、豆科、葫芦科等蔬菜,对世界农业生产造成了严重危害,每年造成的损失可高达数百亿美元。蜡质芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) AR156 是一种革兰氏阳性杆状细菌,对于南方根结线虫引起的土传病害有较好的防治效果,并且已经完成了全基因组测序。【目的】了解 AR156 对南方根结线虫的生防机理,寻找与生防功能相关的基因,进行遗传功能基因的分析。【方法】构建蜡质芽胞杆菌 AR156 miniTn10 随机插入突变体文库,通过对南方根结线虫致死率和温室防病试验进行筛选,找到与 AR156 生防能力相关的突变体,鉴定相关功能基因,并对产蛋白酶活性、定殖能力、生物膜形成和游动性等方面进行检测。【结果】与 AR156 野生型相比,转座子插入位点在 M60 家族肽酶的突变体 BC41 产蛋白酶活性下降,植物根围定殖能力减弱,生物膜形成能力和游动性受到影响,从而导致其防治南方根结线虫的能力降低。【结论】通过对生防相关功能基因的分析,初步明确 M60 家族肽酶在蜡质芽胞杆菌 AR156 防治南方根结线虫的过程中发挥重要作用。

关键词: 蜡质芽胞杆菌, 南方根结线虫, M60 家族肽酶, 定殖能力, 生物膜, 游动性

Foundation items: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0201100); National Natural Science Foundation of China (31471812, 31672075)

***Corresponding authors:** JIANG Chun-Hao: Tel: 86-25-84395312; E-mail: chjiang@njau.edu.cn
GUO Jian-Hua: Tel: 86-25-84395425; E-mail: jhguo@njau.edu.cn

Received: 19-03-2018; **Accepted:** 18-05-2018; **Published online:** 07-06-2018

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201100); 国家自然科学基金(31471812, 31672075)

***通信作者:** 蒋春号: Tel: 025-84395312; E-mail: chjiang@njau.edu.cn

郭坚华: Tel: 025-84395425; E-mail: jhguo@njau.edu.cn

收稿日期: 2018-03-19; 接受日期: 2018-05-18; 网络首发日期: 2018-06-07

Mechanism of M60 family peptidase of *Bacillus cereus* AR156 involved in biocontrol against *Meloidogyne incognita*

LIAO Meng-Jie^{1,2} WANG Hong-Kai^{1,2} JIANG Chun-Hao^{*1,2} GUO Jian-Hua^{*1,2}

1 College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

2 Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095, China

Abstract: [Background] *Meloidogyne incognita* has a wide range of hosts to infect including *Solanaceae*, *Leguminosae*, *Cucurbitaceae* and other vegetables. It causes serious damage and tens of billions of losses to the global agricultural production every year. *Bacillus cereus* AR156 is a gram-positive and rod-shaped bacterium that can be used as a biocontrol agent to control *M. incognita*, and has complete genome-wide sequencing. [Objective] In order to understand its biocontrol mechanism against *M. incognita* and to search for the related gene of biocontrol function, we analyzed the functional gene of *B. cereus* AR156. [Methods] We screened mortality of *M. incognita* and biocontrol efficiency under greenhouse in the AR156 miniTn10 random insertion transposon library to find mutants associated with biocontrol ability in AR156. Gene involved in biocontrol in AR156 was identified. And we compared producing-protease ability, colonization, biofilm formation and swarming motility. [Results] Compared with the AR156 wild-type, BC41 had reduced production of protease, colonization of plant rhizosphere, formation of biofilm and swarming motility. Its insertion site is the M60 family peptidase, which decreased the ability to biocontrol *M. incognita*. [Conclusion] M60 family peptidase plays an important role in the biocontrol activity of *B. cereus* AR156 by the analysis of biocontrol-related functional gene.

Keywords: *Bacillus cereus*, *Meloidogyne incognita*, M60 family peptidase, Colonization, Biofilm, Swarming motility

随着我国农业设施化、专业化的迅猛发展,植物寄生线虫严重危害着农业生产,尤其在温室大棚等保护地上更严重^[1]。根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是定居型内寄生线虫,其中南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)分布最广、危害最大。南方根结线虫主要侵染植物的根部,特别是侧根与须根,能导致作物减产 15%–20%,发病严重的年份甚至高达 70%以上^[2-3]。目前我国农业生产上主要以化学防治为主,同时结合物理防治、农业防治等其他措施,这些方法在一定程度上遏制了病害的发生与发展,然而长期依赖化学药剂容易使植株产生抗药性,降低防治效果,也会导致化学农药高残留等问题。同时,在大力倡导无公害、绿色、可持续发展的今天,化学药剂不可避免地会破坏生态平衡,造成环境的污染。因此,通过增强拮抗物质活性或引入其他活性物质的生物防治手段愈来愈受到国内外学者的关注,并已经成为当前的研究热点。

对根结线虫有防治效果的生物因子有很多,目前研究比较广泛的是真菌和细菌,生防菌具有无污染、无毒等特点。据报道,单顶孢霉属(*Monacrosporium*)能有效防治南方根结线虫;淡紫拟青霉(*Paecilomyces lilacinus*)对南方根结线虫也有显著的抑制作用;镰刀菌(*Fusarium* spp.)通过产生代谢小分子活性物质对线虫产生影响;具有内生孢子的巴氏杆菌属(*Pasteuria* spp.)对于多种寄生线虫都有明显的防治效果^[4-7]。植物根际促生菌(Plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)也是该病害生物防治中的一大类重要资源。Becker 等^[8]发现芽胞杆菌(*Bacillus* spp.)和假单胞菌(*Pseudomonas* spp.)能有效控制根结线虫的发生与发展;丁国春等^[2]报道枯草芽胞杆菌 AR11 能防治南方根结线虫。

蜡质芽胞杆菌(*Bacillus cereus*) AR156 由本实验室筛选,能够高效防治多种病原真菌、细菌及线虫等引起的土传病害。本研究通过构建

AR156 miniTn10 随机插入突变体文库, 筛选到与 AR156 生防能力相关的突变体, 并完成相关功能基因的鉴定, 初步明确了 AR156 防治南方根结线虫的生防机理, 为生物农药的研究提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 菌株和线虫

蜡质芽胞杆菌 AR156 和含卡那霉素抗性的 AR156 来源于南京农业大学生物农药及绿色植保实验室。供试线虫分离自上海阿林果蔬园发病番茄植株, 经形态学和分子生物学方法鉴定为南方根结线虫, 利用感病番茄(上海合作 903)进行繁育。接种 45 d 后, 番茄根部有大量的卵块, 将根部洗干净, 用医用解剖针将病根上的卵块挑取下来, 收集、过滤 500 目筛子, 筛子下放上装有无菌水的培养皿, 28 °C 孵化培养。利用贝曼漏斗法^[9]获得二龄幼虫。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Hind* III, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 树脂型™ 基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。PCR 仪, Eppendorf 公司。

1.1.3 培养基

LB 培养基、LBGM 培养基根据严芳^[10]的方法进行配制。蛋白培养基、产蛋白酶培养液根据 Yang 等^[11]的方法进行配制。

1.2 方 法

1.2.1 蜡质芽胞杆菌随机突变体文库的构建

将含有 pIC333 质粒的菌株 B79 接种在含有 100 mg/L 壮观霉素和 1 mg/L 红霉素的液体 LB 培养基中, 25 °C、200 r/min 培养至对数中期, 然后将培养物以 1:100 稀释至新鲜仅含有壮观霉素的液体 LB 培养基中, 45 °C、200 r/min 培养过夜。以上两个步骤重复 8–10 次。最后, 梯度稀释后选择合适的浓度涂布于含有壮观霉素的 LB 平板上, 并将平板放置于 45 °C 培养过夜。挑取

培养过夜的转化子纯化, 并将抗壮观霉素但是对红霉素敏感的转化子保存^[10,12]。

1.2.2 线虫致死率测定

从-70 °C 冰箱中取出保存菌株, 在 LB 平板上划线, 28 °C 培养 24 h, 接种至 5 mL LB 试管中, 28 °C、200 r/min 培养 12 h 至菌液 OD_{600} 为 1.0, 大约 10^8 CFU/mL, 备用。使用贝曼漏斗法^[9]收集南方根结线虫的二龄幼虫, 利用 24 孔的聚氯乙烯微孔板, 在每个小孔中加入已计数的活的二龄幼虫溶液 100 μ L, 然后分别加入 200 μ L AR156 野生型和突变体菌液, 于 25 °C 处理 48 h 后显微镜检。每个处理设置 4 个重复, 以无菌水为对照。计算南方根结线虫的死亡率和校正死亡率。死亡率=(死亡线虫数/供试线虫数) \times 100%, 校正死亡率=[(处理死亡率-对照死亡率)/(1-对照死亡率)] \times 100%^[13]。

1.2.3 温室防效试验

待番茄幼苗 3–4 叶期后进行移栽。移栽当天, 分别用 20 mL 10^8 CFU/mL 的 AR156 野生型和突变体菌液灌根处理, 每个处理设置 3 个重复, 并设置清水对照。第 7 天在根际注射接种南方根结线虫, 每棵苗接种 800 条。接种线虫第 45 天开始统计发病结果。按照南方根结线虫病级标准记录病级数, 计算病害严重度和防病效果^[14]。病情分级标准: 0 级: 根系健康, 无根结; 1 级: 根系只有不易发现的小根结; 2 级: 有一些明显的小根结, 主根干净; 3 级: 有一些明显的大根结, 主根干净; 4 级: 绝大部分是大根结, 主根干净; 5 级: 50% 根系被侵染, 主根出现根结; 6 级: 主根上出现大量根结; 7 级: 绝大部分主根上有根结; 8 级: 全部主根上均有根结; 9 级: 全部根上均有根结; 10 级: 绝大部分是大根结, 主根干净。病害严重度和防效的计算公式如下: 病害严重度=[\sum (各级病根数 \times 相对级数值)/(调查总根数 \times 10)] \times 100%, 防治效果=[(对照组病害严重度-处理组病害严重度)/对照组病害严重度] \times 100%。

1.2.4 随机突变体插入位点的鉴定

利用树脂型™ 基因组 DNA 提取试剂盒提取

基因组 DNA。由于转座子元件上不含有 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切位点, 因此使用 *EcoR* I 或 *Hind* III 酶切基因组 DNA 24 h。纯化回收, 并使用 T4 DNA 连接酶在 16 °C 下连接 24 h。使用 42 °C 热击的方法将连接混合物转化到大肠杆菌 Top10, 利用壮观霉素抗性筛选大肠杆菌的转化子。提取质粒, 并使用引物 miniTn10-113-98 (5'-GCCGCGTTGGCCGA TTC-3') 和 miniTn10-2235-2249 (5'-GATATTCAC GGTTA-3') 测序。这 2 个引物序列允许从转座子插入位点的边界序列向外读取 DNA 序列。将得到的 DNA 序列在 NCBI 上与 2 个蜡质芽胞杆菌 ATCC14579 和 AR156 的基因组序列进行比对, 分析插入位点^[10]。

1.2.5 蛋白酶活性检测

将待测突变体和野生型菌株接种至蛋白培养基平板上, 28 °C 培养 2–3 d, 观察并记录透明圈的大小^[11]。利用福林酚试剂法定量检测待测突变体和野生型菌株产蛋白酶能力。

1.2.6 定殖能力的评价

实验室前期已经对 AR156 野生型进行了卡那霉素抗性的筛选。因此将带有卡那霉素抗性的 AR156 和 AR156 突变体的菌液分别浇灌至植物根围之后, 在 1、3、7、12、22 和 30 d 后分别收集样品, 梯度稀释涂平板统计菌落数, 分析其在植物根围的定殖能力。具体方法: 取 3 g 植物的根围土, 加入含有 27 mL 0.85% NaCl 的离心管中, 室温下 200 r/min 振荡 30 min, 静置 5 min 后对样品进行梯度稀释, 选择合适的浓度涂布于含有相对应抗生素的平板上, 平板放置于 37 °C 培养过夜后统计菌落数。每个样品取 3 次重复。

1.2.7 生物膜形成能力的评估

利用 12 孔的聚氯乙烯微孔板分析 AR156 野生型和突变体的生物膜形成能力。将生长至稳定期的细胞按照 0.1% 的比例加入 LBGM 培养基中, 28 °C 静置培养 48 h。拍照记录结果。

1.2.8 游动性能力的检测

根据 Kearns 等^[15]的方法对蜡质芽胞杆菌进行

游动性检测。挑取培养过夜的单菌落接种于 LB 培养液中, 28 °C、200 r/min 培养至细胞生长的对数期。取 5 μL 菌液置于 0.5% LB 平板中央, 放置于通风厨中 10 min, 然后 25 °C 静置培养。每个处理 3 个重复, 并重复试验 3 次。

2 结果与分析

2.1 蜡质芽胞杆菌 AR156 和随机插入突变体对南方根结线虫的致死率

从蜡质芽胞杆菌 AR156 的随机突变体文库中选取了 50 个突变体, 比较它们与野生型对南方根结线虫致死率的影响。结果发现, 与 AR156 野生型相比, 除了突变体 BC41 外, 其余突变体对南方根结线虫的致死率均没有显著影响。因此随机选取 9 株突变体和 BC41 进行后续试验(表 1)。

2.2 蜡质芽胞杆菌 AR156 和随机插入突变体对南方根结线虫的生防效果

在温室条件下, 比较筛选出来的突变体与野生型对南方根结线虫的防治能力。表 2、图 1 显示, AR156 野生型菌株对南方根结线虫具有较好的防效

表 1 蜡质芽胞杆菌 AR156 和随机插入突变体对南方根结线虫的致死率

Table 1 Mortality of *M. incognita* treated by *B. cereus* AR156 and insertional mutants

| 菌株 Strains | 校正致死率 Corrected mortality (%) |
|---------------|----------------------------------|
| AR156 | 84.19 |
| BC75 | 85.37 |
| BC44 | 85.01 |
| BC179 | 84.39 |
| BC58 | 83.94 |
| BC56 | 83.69 |
| BC70 | 83.69 |
| BC138 | 83.31 |
| BC143 | 82.95 |
| BC41 | 65.40 |

注: CK 处理后南方根结线虫的死亡率为 0.65%。

Note: Mortality of *M. incognita* treated by sterile water was 0.65%.

表 2 蜡质芽胞杆菌 AR156 和随机插入突变体对南方根结线虫的防治效果

Table 2 Biocontrol efficiencies of *B. cereus* AR156 and insertional mutants towards *M. incognita*

| 处理 Treatments | 病害严重度 Disease severity (%) | 防治效果 Biocontrol efficiency (%) |
|------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| CK | 68.33±0.014a | — |
| BC58 | 30.83±0.008c | 54.89 |
| BC75 | 30.83±0.022c | 54.89 |
| BC179 | 30.83±0.014c | 54.89 |
| AR156 | 31.67±0.022c | 53.66 |
| BC143 | 31.67±0.008c | 53.66 |
| BC44 | 32.50±0.033c | 52.44 |
| BC70 | 32.50±0.025c | 52.44 |
| BC138 | 32.50±0.022c | 52.44 |
| BC56 | 33.33±0.017c | 51.22 |
| BC41 | 43.33±0.014b | 36.59 |

注：防治效果是接种南方根结线虫第 45 天的结果，每个处理重复 3 次；不同字母表示处理间在 $P < 0.05$ 的显著水平下差异性显著。

Note: Biocontrol efficiency was determined at 45 dpi, each treatment repeated 3 times; Means with different letters have significant differences ($P < 0.05$, LSD test).

(53.66%)；与 AR156 野生型相比，BC41 对南方根结线虫的防效显著降低；而其他突变体对南方根结线虫的防效则基本与野生型一致，没有明显的差异，这一结果与对南方根结线虫致死率的结果相符合。

2.3 BC41 插入位点鉴定

突变体插入位点的鉴定结果显示，突变体 BC41 的随机插入位点为 1 283 251 nt，位于 M60 family peptidase (M60 家族肽酶)。

2.4 蜡质芽胞杆菌 AR156 和随机插入突变体产蛋白酶能力的检测

从定性、定量两方面综合比较 AR156 野生型和 9 株突变体菌株的产蛋白酶活性。由表 3 定性检测的结果可知，与 AR156 野生型相比，只有 BC41 产蛋白酶活性明显减弱。表 4 定量检测的结果也验证了上述结论，除 BC41 外，其他突变体的产蛋白酶活性与 AR156 野生型相比无显著变化。

2.5 BC41 在番茄根围定殖能力的评估

图 2 结果表明，蜡质芽胞杆菌 AR156 能够在番茄根围稳定定殖，接种 30 d，在番茄根围的定殖量依然能达到 10^7 CFU/g 土壤以上；而 BC41 在番茄根围的定殖量则降低至 4.7×10^6 CFU/g 土壤，只有

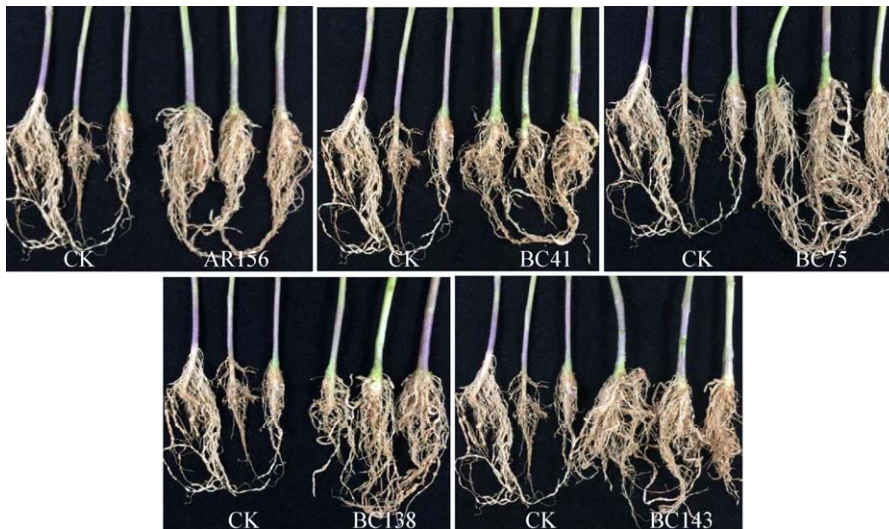


图 1 蜡质芽胞杆菌 AR156 和随机插入突变体对南方根结线虫的防治效果

Figure 1 Biocontrol efficiencies of *B. cereus* AR156 and insertional mutants towards *M. incognita*

表 3 蜡质芽胞杆菌 AR156 和随机插入突变体产蛋白酶能力的定性检测

Table 3 Protease activity of *B. cereus* AR156 and insertional mutants by qualitative detection

| 菌株 Strains | 透明圈大小 Transparent circle size (cm) |
|---------------|---------------------------------------|
| BC75 | 0.686 7±0.038 3a |
| BC56 | 0.683 3±0.025 8a |
| BC44 | 0.676 7±0.049 7a |
| BC179 | 0.673 3±0.020 7a |
| BC70 | 0.673 3±0.025 0a |
| AR156 | 0.669 0±0.043 0a |
| BC58 | 0.668 3±0.024 8a |
| BC143 | 0.666 7±0.040 8a |
| BC138 | 0.666 7±0.040 8a |
| BC41 | 0.348 3±0.026 8b |

注：不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 的显著水平下差异性显著。
Note: Means with different letters have significant differences ($P<0.05$, LSD test).

表 4 蜡质芽胞杆菌 AR156 和随机插入突变体产蛋白酶能力的定量检测

Table 4 Protease activity of *B. cereus* AR156 and insertional mutants by quantitative detection

| 菌株 Strains | 蛋白酶活力 Protease activity (U/mL) |
|---------------|-----------------------------------|
| BC56 | 64.139 1±0.347 8a |
| BC179 | 63.559 4±2.633 7ab |
| BC75 | 63.559 4±2.443 1ab |
| AR156 | 63.443 5±1.739 1ab |
| BC138 | 63.095 7±1.391 3abc |
| BC143 | 62.400 0±2.508 2abc |
| BC44 | 61.704 3±2.782 6bc |
| BC70 | 61.472 5±1.062 6bc |
| BC58 | 61.008 7±2.087 0c |
| BC41 | 39.443 5±1.204 9d |

注：不同字母表示处理间在 $P<0.05$ 的显著水平下差异性显著。
Note: Means with different letters have significant differences ($P<0.05$, LSD test).

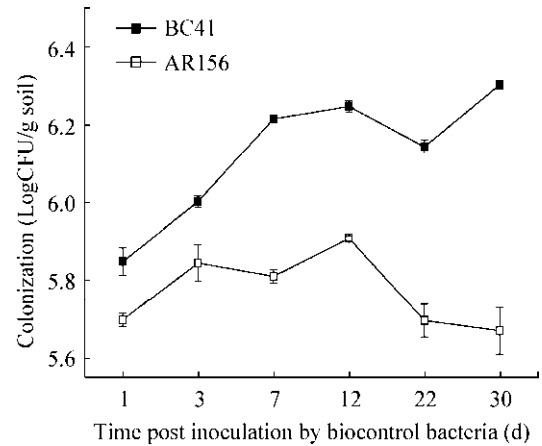


图 2 蜡质芽胞杆菌 AR156 和 BC41 在番茄根围的定殖能力

Figure 2 Colonization of *B. cereus* AR156 and BC41 in the rhizosphere

野生型定殖量的 1/5 左右。这意味着与 AR156 相比，突变体 BC41 的定殖能力显著下降。同时，温室试验的结果也显示，突变体对南方根结线虫的防治效果也显著低于野生型。因此，推断定殖能力是影响 AR156 发挥生防作用的重要因素之一。

2.6 蜡质芽胞杆菌 AR156 和 BC41 生物膜形成能力的评估

由图 3 可知，在 LBGM 培养基中，30 °C 培养 48 h 后，野生型 AR156 菌株已经在生物膜表面形成明显的褶皱，而突变体 BC41 的生物膜比较光滑，只有少许的褶皱。所以与野生型 AR156 相比，该突变体生物膜形成能力显著减弱。

2.7 蜡质芽胞杆菌 AR156 和 BC41 游动性能力的比较

如图 4 所示，在 25 °C 静置培养 10 h 后，野生型蜡质芽胞杆菌细胞游动至整个 0.5% LB 平板

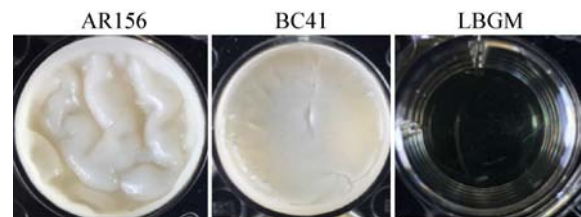


图 3 蜡质芽胞杆菌 AR156 和 BC41 的生物膜形成
Figure 3 Biofilm formation of *B. cereus* AR156 and BC41

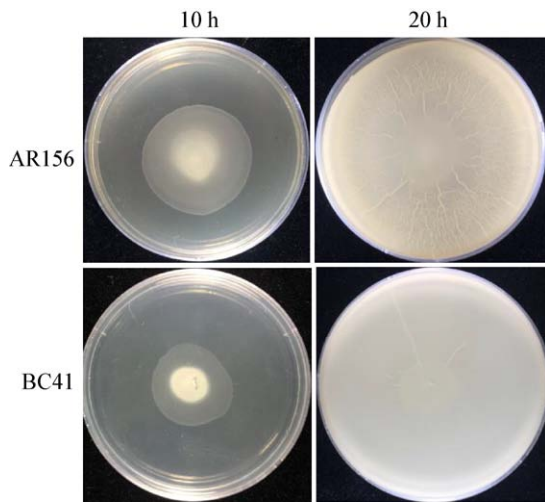


图4 蜡质芽胞杆菌 AR156 和 BC41 的游动性能力检测
Figure 4 Assays of swarming motility by *B. cereus* AR156 and BC41

约 2/3 的位置, 而突变体则只能游动至平板 1/3 的位置; 培养 20 h 后, 野生型与突变体虽然都游动至整个平板, 但是 AR156 菌落表面有明显的起皮, 这表明相较于野生型, 突变体 BC41 的游动能力明显减弱。

3 讨论与结论

AR156 是本实验室筛选出来的一株能够防治南方根结线虫的蜡质芽胞杆菌, 本研究利用转座子 miniTn10 构建其随机插入突变体文库, 从中选取 50 株 AR156 突变体通过对南方根结线虫致死率和温室防病试验进行筛选, 得到一株生防能力大幅度降低的突变体 BC41, 其余突变体的防治效果和野生型相差不大。经鉴定, BC41 随机插入的位点位于 M60 家族肽酶。生防菌产生分泌的蛋白酶等次生代谢产物是生物防治植物病害过程中重要的一部分^[16-17]。生防菌在对线虫病害发挥作用时的第一步就是要穿透线虫的体壁, 而其体壁的主要成分是蛋白质, 有些生防菌产生分泌的蛋白酶等活性物质能直接抑制或杀死线虫, 而且其活性与防治效果呈现一定程度上的相关性^[18-20]。Niu 等^[21]报道 *Bacillus* spp. B16 产生的 28 kD 蛋白酶能有效地杀死线虫; Lian 等^[22]研究表明芽胞杆菌 RH219 分泌

的蛋白酶 Apr219 对根结线虫有致死能力; Wei 等^[23]利用产蛋白酶活性为指标进行根结线虫生防菌的筛选, 可以大大提高生防菌筛选的效率。蛋白酶又称内肽酶, 蛋白质的水解需要蛋白酶和肽酶协同催化完成^[24], 将该位点进行突变, 减弱了 BC41 分解线虫体壁蛋白质的能力, 从而影响了温室防病效果。在检测 AR156 野生型和突变体产蛋白酶活性时, 我们发现只有 BC41 产蛋白酶活性明显减弱, 而其他突变体的产蛋白酶活性与 AR156 野生型无显著差异。这一结果再一次解释了 BC41 温室防效降低的原因。

无论生防菌以何种作用机理防治植物病害, 能够稳定地在植物根围定殖是其发挥生防作用的前提条件。M60 家族与多糖的识别、结合和分泌等过程有关, 研究表明其家族含有 HEXXH 和 N 端信号肽, 有的还包含跨膜结构域, 这些都暗示着 M60 家族可以分泌或锚定在宿主细胞的表面上^[25-26]。目前已经有 M60 能够影响蜡质芽胞杆菌作为生防因子发挥作用的报道^[10]。在本试验中, 我们发现突变体 BC41 在番茄根围定殖的能力相较于野生型显著减弱, 由此可以推断 AR156 的细胞通过 M60 识别周围细胞, 相互聚集定殖在植物根围, 从而开始侵染南方根结线虫, 达到防治病害的作用。

微生物通过细胞相互识别分泌基质, 通过基质相互聚集在一起, 粘附到生物或者非生物界面上形成的薄膜状结构被认为是生物膜^[27-29]。有些生防菌在植物根表能够形成生物膜。植物根围是一个狭小的空间, 根围能受到植物根系分泌物间接的影响; 而且根系的表面营养成分丰富, 包裹在自身分泌的基质中的多细胞微生物能被允许定殖在根系表面^[30-31]。已有报道表明, 蜡质芽胞杆菌能在植物根围形成生物膜^[32-33]。在本研究中, 与 AR156 野生型相比, 突变体 BC41 生物膜形成能力受损、游动性减弱, 这表明 AR156 能通过植物根系形成生物膜来发挥对南方根结线虫的生防作用, 但生物膜形成能力的受损致使 BC41 防病能力降低。

REFERENCES

- [1] Yang XJ, Chen FR, Xie SY. Advances in occurrence and control of Citrus Bacterial Canker Diseases[J]. China Fruits, 2002(5): 46-50 (in Chinese)
杨秀娟, 陈福如, 谢世勇. 柑桔溃疡病发生与防治研究进展[J]. 中国果树, 2002(5): 46-50
- [2] Ding GC, Fu P, Li HM, et al. Biocontrol evaluation of *Bacillus subtilis* strain AR11 against *Meloidogyne incognita*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2005, 28(2): 46-49 (in Chinese)
丁国春, 付鹏, 李红梅, 等. 枯草芽胞杆菌 AR11 菌株对南方根结线虫的生物防治[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 46-49
- [3] Duan YX, Qu ZL, Wang YY, et al. Screening the strains of *Fusarium* against *Meloidogyne incognita*[J]. Agrochemicals, 2010, 49(8): 607-609,620 (in Chinese)
段玉玺, 曲泽岚, 王媛媛, 等. 南方根结线虫生防镰刀菌菌株筛选[J]. 农药, 2010, 49(8): 607-609,620
- [4] Cai JX. Study on control technology of *Meloidogyne incognita* in tomato[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2016 (in Chinese)
蔡加星. 番茄南方根结线虫防控技术的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2016
- [5] Liu GK, Xiao S, Hong CF, et al. Parasitism of isolates of *Fusarium* spp. to *Meloidogyne incognita* eggs[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2006, 35(5): 459-462 (in Chinese)
刘国坤, 肖顺, 洪彩凤, 等. 镰刀菌对南方根结线虫卵的寄生特性[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2006, 35(5): 459-462
- [6] Zhu XF, Duan YX, Chen LJ, et al. Study on the toxicity test and control effect of *Aspergillus niger* Snf009 fermentation liquid on *Meloidogyne incognita*[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2009, 38(4): 84-85 (in Chinese)
朱晓峰, 段玉玺, 陈立杰, 等. 黑曲霉 Snf009 发酵液对根结线虫的毒性测定及温室防效研究[J]. 河南农业科学, 2009, 38(4): 84-85
- [7] Liu JS, Li Y, Li YM, et al. Study on control techniques of cucumber root-knot nematode pesticides in greenhouse[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2010, 56(1): 74-77 (in Chinese)
刘俊生, 李媛, 李英梅, 等. 温室黄瓜根结线虫病药剂防治技术研究[J]. 陕西农业科学, 2010, 56(1): 74-77
- [8] Becker JO, Zavaleta-Mejia E, Colbert SF, et al. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation[J]. Phytopathology, 1998, 78: 1466-1469
- [9] Xu ZG. General Plant Pathology[M]. 4th Edition. Beijing: Higher Education Press, 2009: 230 (in Chinese)
许志刚. 普通植物病理学[M]. 4 版. 北京: 高等教育出版社, 2009: 230
- [10] Yan F. Characterization of novel genes involved in biocontrol and multicellularity in *Bacillus*[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese)
严芳. 蜡质芽胞杆菌 AR156 生防功能基因和调控生物膜形成功能基因研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2015
- [11] Yang JH, Liu HX, Zhu GM, et al. Diversity analysis of antagonists from rice-associated bacteria and their application in biocontrol of rice diseases[J]. Journal of Applied Microbiology, 2008, 104(1): 91-104
- [12] Kearns DB, Chu F, Rudner R, et al. Genes governing swarming in *Bacillus subtilis* and evidence for a phase variation mechanism controlling surface motility[J]. Molecular Microbiology, 2004, 52(2): 357-369
- [13] Chen LJ, Chen Y, Zhang GD, et al. Nematicidal activity of extraction and fermentation filtrate of basidiomycetes collected in Liaoning province, China[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(4): 467-473 (in Chinese)
陈立杰, 陈越, 张国栋, 等. 辽宁省大型真菌浸提液及发酵液对线虫的毒力作用[J]. 中国生物防治, 2010, 26(4): 467-473
- [14] Bridge J, Page SLJ. Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart[J]. Tropical Pest Management, 1980, 26(3): 296-298
- [15] Kearns DB, Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*[J]. Molecular Microbiology, 2003, 49(3): 581-590
- [16] Griffin AS, West SA, Buckling A. Cooperation and competition in pathogenic bacteria[J]. Nature, 2004, 430(7003): 1024-1027
- [17] Siddiqui IA, Haas D, Heeb S. Extracellular protease of *Pseudomonas fluorescens* CHA0, a biocontrol factor with activity against the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 5646-5649
- [18] Moyne AL, Shelby R, Cleveland TE, et al. Bacillomycin D: an iturin with antifungal activity against *Aspergillus flavus*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90(4): 622-629
- [19] Huang XW, Zhao NH, Zhang KQ. Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host[J]. Research in Microbiology, 2004, 155(10): 811-816
- [20] Huang Y, Xu CK, Ma L, et al. Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematicidal activity against *Meloidogyne incognita*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2010, 126(3): 417-422
- [21] Niu QH, Huang XW, Zhang L, et al. A neutral protease from *Bacillus nematocida*, another potential virulence factor in the infection against nematodes[J]. Archives of Microbiology, 2006, 185(6): 439-448
- [22] Lian LH, Tian BY, Xiong R, et al. Proteases from *Bacillus*: a new insight into the mechanism of action for rhizobacterial suppression of nematode populations[J]. Letters in Applied Microbiology, 2007, 45(3): 262-269
- [23] Wei LH, Xue QY, Wei BQ, et al. Screening of antagonistic bacterial strains against *Meloidogyne incognita* using protease activity[J]. Biocontrol Science and Technology, 2010, 20(7): 739-750
- [24] Wu JZ. Enzymatic hydrolysis of soybean protein and its

- antioxidant activity[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China University of Technology, 2003 (in Chinese)
吴建中. 大豆蛋白的酶法水解及产物抗氧化活性的研究[D]. 广州: 华南理工大学博士学位论文, 2003
- [25] Wang P, Granados RR. An intestinal mucin is the target substrate for a baculovirus enhancer[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997, 94(13): 6977-6982
- [26] Nakjang S, Ndeh DA, Wipat A, et al. A novel extracellular metalloproteinase domain shared by animal host-associated mutualistic and pathogenic microbes[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e30287
- [27] Barbara N, Maria V, Angela S, et al. SslE elicits functional antibodies that impair *in vitro* mucinase activity and *in vivo* colonization by both intestinal and extraintestinal *Escherichia coli* strains[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(5): e1004124
- [28] Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, et al. Microbial biofilms[J]. Annual Review of Microbiology, 1995, 49(1): 711-745
- [29] O'Toole GA, Gibbs KA, Hager PW, et al. The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Journal of Bacteriology, 2000, 182(2): 425-431
- [30] Hall-Stoodley L, Stoodley P. Evolving concepts in biofilm infections[J]. Cellular Microbiology, 2009, 11(7): 1034-1043
- [31] Emmert EAB, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective[J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 171(1): 1-9
- [32] Chandramohan L, Ahn JS, Weaver KE, et al. An overlap between the control of programmed cell death in *Bacillus anthracis* and sporulation[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(13): 4103-4110
- [33] Shemesh M, Chai YR. A combination of glycerol and manganese promotes biofilm formation in *Bacillus subtilis* via histidine kinase KinD signaling[J]. Journal of Bacteriology, 2013, 195(12): 2747-2754

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于1974年，月刊，是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办，国内外公开发行的，以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括：工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展，以及微生物学教学研究改革等。

本刊为中文核心期刊，中国科技核心期刊，CSCD核心期刊，曾获国家优秀科技期刊三等奖，中国科学院优秀科技期刊三等奖，北京优秀科技期刊奖，被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

据中国科学技术信息研究所信息统计，本刊2012年至今以国内“微生物、病毒学类期刊”综合评价总分第一而蝉联“百种中国杰出学术期刊奖”，并入选“中国精品科技期刊”，成为“中国精品科技期刊顶尖学术论文(F5000)”项目来源期刊。

欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买，2019年每册定价80元，全年960元，我们免邮费寄刊。

邮购地址：(100101)北京朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn, tongbao@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: M413