

一株萎缩芽孢杆菌 XW-2 对松材线虫的杀线活性*

肖海燕¹ 黄华毅² 胡铭彪² 龙锦发² 陈刘生²
黄咏槐² 赵丹阳² 扈丽丽²

(1. 韶关市国有林场事务中心, 广东 韶关 512000;

2. 广东省森林培育与保护利用重点实验室/广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520)

摘要 为明确萎缩芽孢杆菌 *Bacillus atrophaeus* XW-2 对松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 的杀线活性, 开发松材线虫病生防制剂, 研究通过室内浸渍试验, 测定了 XW-2 菌悬液和发酵上清液对松材线虫的杀线活性。结果表明, XW-2 的菌悬液和发酵上清液原液处理松材线虫 12 h 时, 松材线虫死亡率分别为 100% 和 91.00%; 处理 24 h 的死亡率均可达 100%; 随着稀释倍数的增大, 线虫死亡率逐渐降低, 稀释 100 倍时, 菌悬液处理松材线虫 24 h 的线虫死亡率为 86.67%, 发酵上清液处理的线虫死亡率为 63.00%。因此, XW-2 菌悬液和发酵上清液对松材线虫均具有杀线活性, 相同浓度下的菌悬液杀线活性显著 ($P < 0.05$) 高于发酵上清液。

关键词 生防制剂; 松材线虫; 综合防控

中图分类号: S763 **文献标志码:** A **文章编号:** 2096-2053 (2024) 06-0073-05

DOI: 10.20221/j.cnki.2096-2053.202406010

The Activity of *Bacillus atrophaeus* XW-2 Against *Bursaphelenchus xylophilus*

XIAO Haiyan¹ HUANG Huayi² HU Mingbiao² LONG Jinfa²
CHEN Liusheng² HUANG Yonghuai² ZHAO Danyang² HU Lili²

(1. Shaoguan State Owned Forest Farm Affairs Center, Shaoguan, Guangdong 512000, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization/Guangdong Academy of Forestry, Guangzhou, Guangdong 510520, China)

Abstract To determine the killing activity of *Bacillus atrophaeus* XW-2 against the *Bursaphelenchus xylophilus*, a biocontrol agent against pine wood nematode disease was developed. The killing activity of XW-2 bacterial suspension and fermentation supernatant against *Bursaphelenchus xylophilus* was determined by the indoor immersion test. The results showed that when XW-2 bacterial suspension and fermentation supernatant were used to treat pine wood nematodes for 12 hours, the correction rates for pine wood nematodes were 100% and 91.00%, respectively. However, after 24 h of treatment, the corrected mortality rates reached 100%. As the dilution concentration increases, the mortality rate of nematodes gradually decreases. However, after diluting the bacterial suspension 100 times and treating nematodes for 24 hours, the corrected mortality rate of nematodes is 86.67%. However, after diluting the fermentation supernatant 100 times and treating pine wood nema-

* 基金项目: 广东省林业科技创新项目 (2023KJCX024)。

第一作者: 肖海燕 (1976—), 女, 工程师, 主要从事森林保护等技术和推广应用, E-mail: 66927867@qq.com。

通信作者: 扈丽丽 (1984—), 女, 副研究员, 主要从事植物病原线虫致害机理和林业有害生物综合防控研究, E-mail: hulili0113@sinogaf.cn。

todes for 24 hours, the corrected mortality rate of nematodes is 63.00%. Therefore, the XW-2 bacterial suspension and fermentation supernatant both had bactericidal activity against pine wood nematodes, and the bactericidal activity of the bacterial suspension at the same concentration was significantly ($P < 0.05$) higher than that of the fermentation supernatant.

Key words biocontrol agents; pine wood nematode; comprehensive prevention and control

松材线虫病 (Pine wilt disease, PWD) 是松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 寄生松树 *Pinus* spp. 引起的一种系统性侵染病害, 对全球松树产业造成严重影响。该病害因易传播、发病快、防治困难而在我国迅速扩散蔓延。截至 2023 年底, 松材线虫病已在我国 18 个省 (区、市) 136 个地级市的 663 个县级行政区相继发生, 目前疫情已扩散至我国北方吉林省^[1]。对松材线虫病的新一轮适生区预测分析表明, 我国大多数省区均属于松材线虫病的高适生区或中适生区^[2]。松材线虫病严重破坏了松林等自然景观, 造成重大林业经济和生态价值损失, 给林业管理部门和地方政府带来较重的防治压力和经济负担。

世界各国均在松材线虫病治理中, 采取了包括制定法律、合理管护和加强检疫等不同的防治策略, 以及物理、化学和生物防治等技术措施, 虽取得一定成效, 但并未能遏制松材线虫病的扩散蔓延^[3]。目前我国松材线虫病防治的主要措施包括疫情监测普查、疫木除治、媒介昆虫防治和检疫封锁^[4]。但现有措施和防治手段均未取得持续性良好的防治效果, 松材线虫病依然是威胁松林生态安全的重要生物因子。

生物防治是一种经济和环境友好型病虫害防治技术, 已在各种林木病虫害防治中得到广泛研究和应用^[5-6]。筛选和鉴定具有杀松材线虫活性的生防菌株是松材线虫病研究中的重要科学方向。2018 年至今, 在国内外关于具有杀线活性的生防菌株挖掘和应用的报道中, 关于根结线虫的报道有 44 篇, 87 菌株; 关于胞囊线虫的报道有 10 篇, 16 菌株; 而关于松材线虫的报道仅有 11 篇, 8 菌株^[7]。在国内, 关于具有杀线活性生防菌的报道多集中于根结线虫, 针对松材线虫的研究甚少^[8]。目前国内报道的生防细菌以芽孢杆菌属为主, 生防真菌以节丛孢属和镰刀菌属为主, 但均停留在理论研究阶段^[9]。因此, 挖掘更多具有杀线活性的生物防治资源将为利用生防菌防控松材线虫病提供科学依据。

芽孢杆菌是一类具有广阔应用前景的生防细菌, 在植物病虫害的生物防治中发挥了重要作用。黄华毅等^[10]从杨树 *Populus tomentosa* 根际土壤中分离鉴定到一株枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* SY-15, 研究表明, 该菌株可产生蛋白酶和纤维素酶, 对植物病原真菌金黄壳囊孢菌 *Cytospora chrysosperma* 抑菌活性为 100%, 是防治杨树腐烂病和其他真菌病害的高效生防菌株。梁文洪等^[11]的研究发现, 森林假单胞菌 *Pseudomonas silvicola* T1-3-2 对杉木炭疽病的抑菌活性达 65% 以上, 并且对多种植物病原真菌具有广谱抑菌特性。本研究测定了一株萎缩芽孢杆菌 *Bacillus atrophaeus* XW-2 对松材线虫的杀线活性, 旨在为进一步利用该菌株研制高效、便携和实用性强的生防菌剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试细菌 萎缩芽孢杆菌菌株 XW-2 分离自杨树叶片, 微生物保藏号 CGMCC No. 7698, 由本课题组分离鉴定并保存于 20% 甘油中。

1.1.2 松材线虫 松材线虫分离自广东省清远市阳山县松材线虫病疫情小班的枯死马尾松 *Pinus massoniana* 中, 采用贝曼漏斗法分离线虫^[12], 在显微镜下经形态鉴定确认为松材线虫, 在 PDA 培养基上培养拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis* sp. 至长满整个培养皿, 挑取单条松材线虫雌虫至长满盘多毛孢的培养皿里纯化培养, 并继代繁殖备用。杀线活性测定时用贝曼漏斗分离纯培养的松材线虫, 制备成浓度为 $100 \text{ nematodes} \cdot 100 \mu\text{L}^{-1}$ 的线虫悬浮液。

1.1.3 培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato dextrose agar (Medium), PDA): 马铃薯 200 g, 葡萄糖 10 g, 琼脂 18 g, 水 1 000 mL, 121 °C 高温高压灭菌 20 min 保存备用。Luria-Bertani (LB) 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g, 酵母提取物 5 g, NaCl 10 g, 加去离子水至 800 mL, 待完全溶解后, 用 $5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液调 pH 至 7 后, 加去

离子水定容至 1 000 mL, 121 ℃ 高温高压灭菌 20 min 保存备用。LB 固体培养基配制同液体培养基, 每 1 000 mL 培养基加琼脂 15 g。

1.2 菌悬液和发酵上清液的制备

将甘油保存的 XW-2 在 LB 固体培养基上进行活化培养, 在 28 ℃ 下培养 24 h 后, 挑取单菌落于盛有 100 mL LB 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 180 r · min⁻¹ 震荡培养 24 h 至 O. D.₆₀₀ ≈ 9.81, 然后 8 500 rpm 离心 10 min, 得到发酵上清液, 收集备用。同时用等体积无菌水悬浮菌体 O. D.₆₀₀ ≈ 8.23, 得到菌悬液备用。按照 1 : 10、1 : 50、1 : 100 的体积比稀释菌悬液和发酵上清液, 分别测定不同稀释倍数的菌悬液和发酵上清液对松材线虫的杀线活性。

1.3 杀线活性测定

采用浸渍法测定杀线活性, 分别取菌悬液和发酵上清液 1 mL 于 24 孔板中, 再分别加入 100 μL 松材线虫悬浮液 (100 nematodes), 用无菌水做对照, 置于 28 ℃ 培养箱中, 分别在处理 12 h 和 24 h 后, 收集线虫并清水复苏 4 h, 于显微镜下用针刺法确认线虫死活状态并计数, 不蠕动且用挑针刺刺激仍然不动的线虫视为死亡, 最后计算死亡率, 每个处理设置 5 个重复。

$$R = \frac{S_2}{S_1} \times 100\%$$

式中, R 为死亡率, S_1 为供试线虫总数, S_2 为死亡线虫数。

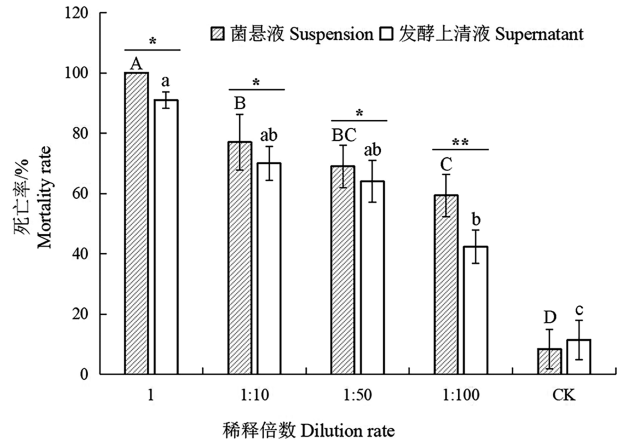
1.4 数据分析

采用 Excel 2023 和 GraphPad Prism 5 软件进行数据处理, 选择 Two-way ANOVA 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 XW-2 菌悬液对松材线虫的杀线活性

生测结果显示, XW-2 菌悬液原液处理松材线虫 12 和 24 h 时, 松材线虫的死亡率均为 100% (图 1~2); 稀释 10 倍的死亡率分别为 77.00% 和 94.00%; 稀释 50 倍, 死亡率分别为 69.00% 和 92.67%; 稀释 100 倍, 死亡率分别为 59.33% 和 86.67%。该结果表明, XW-2 菌悬液对松材线虫的杀线活性, 随着稀释倍数的增加显著降低 ($P < 0.01$), 但在处理 24 h 时, 稀释 100 倍时菌悬液的杀线活性高达 86.67% (图 2)。

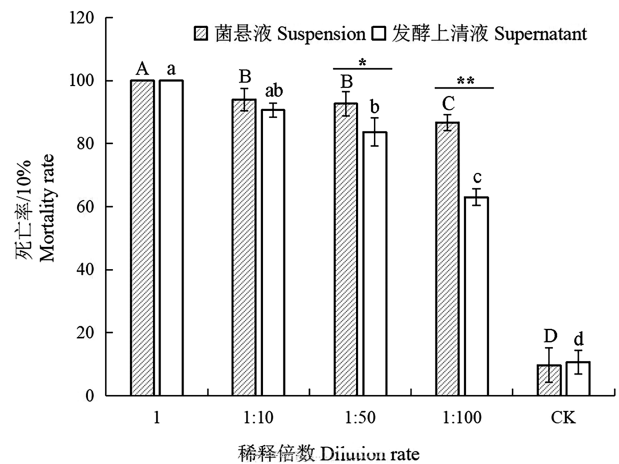


注: CK 为无菌水对照; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); * 在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, ** 在 $P < 0.01$ 水平上差异显著。

Note: CK is control of ddH₂O; * indicates significant difference at $P < 0.05$, ** indicates significant difference at $P < 0.01$.

图 1 XW-2 菌悬液与发酵上清液对松材线虫 12 h 的杀线活性

Fig. 1 The activity of XW-2 suspension and supernatant against pine wood nematode for 12 h



注: CK 为无菌水对照; 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$); * 在 $P < 0.05$ 水平上差异显著, ** 在 $P < 0.01$ 水平上差异显著。

Note: CK is control of ddH₂O; * indicates significant difference at $P < 0.05$, ** indicates significant difference at $P < 0.01$.

图 2 XW-2 菌悬液与发酵上清液对松材线虫 24 h 的杀线活性

Fig. 2 The activity of XW-2 suspension and supernatant against pine wood nematode for 24 h

2.2 XW-2 发酵上清液对松材线虫的杀线活性

结果表明, XW-2 发酵上清液原液处理松材线虫 12 和 24 h 时, 松材线虫的死亡率分别为 91.00% 和 100% (图 1~2); 稀释 10 倍的死亡率

分别为 70.00% 和 90.67%；当稀释 50 倍时，死亡率分别为 64.00% 和 83.67%；当稀释 100 倍时，死亡率分别为 42.33% 和 63.00%。

2.3 菌悬液与发酵上清液杀线活性比较

结果表明，XW-2 菌悬液原液处理松材线虫 12 h 对松材线虫的杀线活性显著高于发酵上清液原液 ($P < 0.05$) (图 1)。随着稀释倍数的增加，菌悬液的杀线活性始终高于发酵上清液。当菌悬液和发酵上清液均稀释 100 倍时，菌悬液的杀线活性极显著高于发酵上清液 ($P < 0.01$) (图 1)，死亡率约为发酵上清液的 1.4 倍，但两者对松材线虫的死亡率均低于 60.00%，分别为 59.33% 和 42.33%。

XW-2 菌悬液和发酵上清液原液处理松材线虫 24 h 时，松材线虫的死亡率均为 100% (图 2)。当两者均稀释 10 和 50 倍时，菌悬液的杀线活性略高于发酵上清液。当两者均稀释 100 倍时，菌悬液的杀线活性极显著高于发酵上清液 ($P < 0.01$) (图 2)，约为发酵上清液的 1.4 倍，死亡率均高于 60.00%，分别为 86.67% 和 63.00%。

3 讨论与结论

松材线虫病是世界范围内的检疫性森林病害，该病害致病机理复杂，涉及病原（松材线虫）、寄主植物（松树）、传播媒介（松墨天牛 *Monochamus alternatus*）和环境条件等多个病害发生相关的因素，因此尚未有科学有效的防治措施^[1]。生物防治被认为是一种安全、有效、可行的植物病虫害防治手段，在有害生物防治领域发挥了重要作用^[5]。以真菌、细菌、放线菌为主要代表的生防菌在自然界分布广泛，种类繁多，但已报道对松材线虫具有杀线作用的种类还较少，已有报道对其杀线机理和林间应用产品开发的研究也比较缺乏。

伊氏线虫真菌 *Esteya vermicola* 是世界上第一个报道且至今研究最为广泛和深入地处理松材线虫有高效防治作用的生防菌株^[13-14]，虽已明确伊氏线虫真菌寄生松材线虫的分子机理，但伊氏真菌在林间发挥作用的关键技术仍未解决^[15]。研究较多且具有广泛应用前景的细菌主要有芽孢杆菌、假单胞菌、沙雷氏菌和巴氏杆菌等^[16]。而对松材线虫具有较高杀线活性的细菌多集中在芽孢杆菌和假单胞菌^[14,19]。芽孢杆菌是一类分布广泛、易

于培养且研究较多的革兰氏阳性细菌，苏云金芽孢杆菌 *B. thuringiensis* 是目前最理想和用于害虫生物防治最成功的芽孢杆菌，但关于 Bt 对松材线虫杀线活性和实际应用价值的研究也较少^[16,20]。近年来报道对松材线虫具有杀线活性的芽孢杆菌有短小芽孢杆菌 *B. pumilus* 和蜡样芽孢杆菌 *B. cereus*^[17]。

早在 2008 年，就有报道从松材线虫虫体和健康马尾松中分别分离到 2 株坚强芽孢杆菌 *B. firmus* GD1 和 GD2，研究表明 2 株坚强芽孢杆菌均可延长松材线虫的存活时间，且高浓度的 GD1 和 GD2 能促进线虫的繁殖^[21]。李亮亮等^[17] 从湿地松 *P. elliotii* 中分离到 1 株具有杀松材线虫活性的蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13，NJSZ-13 菌悬液处理松材线虫 48 h 后的线虫死亡率可达 81.5%。许嘉麟等^[22] 随后研究了 NJSZ-13 对松材线虫产卵和繁殖的影响，表明 NJSZ-13 的菌悬液和发酵滤液均具有杀线活性，且都能抑制松材线虫产卵、卵孵化和繁殖，但发酵滤液在抑制产卵、卵孵化和繁殖的效果显著高于菌悬液。本研究中萎缩芽孢杆菌 XW-2 是分离自杨树叶片的内生菌，结果显示，XW-2 的菌悬液和发酵上清液均对松材线虫具有较好的杀线活性，但菌悬液在 12 h 的杀线活性显著高于发酵上清液，而在 24 h 菌悬液与发酵上清液的杀线活性均达到 100%，但稀释 100 倍后，菌悬液处理松材线虫 24 h 的杀线活性显著高于发酵上清液。

生防细菌因其具有在植物体内分布的普遍性和多样性，且易于培养等优势，近年来成为植物寄生线虫生防菌研究的热点^[23]，目前已发现的具有杀线活性的内生细菌有假单胞菌属^[24]、嗜麦芽窄食单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia*^[25]、缺陷短波单胞菌 *Brevundimonas diminuta*^[26]、枯草芽孢杆菌^[27] 等。多数研究认为内生细菌主要通过产生次生代谢化合物来调节线虫体内的酶和生物代谢通路，从而使线虫活力下降甚至死亡^[23]，例如蜡样芽孢杆菌能产生胞外蛋白酶，水解包括线虫角质层和胶原等，造成线虫内溶物的泄漏，最终杀死线虫^[28]。而苏云金芽孢杆菌在代谢过程中产生晶体蛋白毒素，引起线虫肠内膜渗透性增大，从而破坏线虫肠道组织，致使线虫死亡^[29]。

本研究首次报道了萎缩芽孢杆菌对松材线虫的杀线活性，与已报道的蜡样芽孢杆菌不同的是，蜡样芽孢杆菌发酵滤液的杀线活性高于菌悬液，

而本文中萎缩芽孢杆菌的菌悬液杀线活性高于发酵上清液^[22]。此外,目前关于芽孢杆菌对线虫的杀线活性成份和机理的研究,均是在秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 和根结线虫中开展的^[16]。因此关于萎缩芽孢杆菌对松材线虫的杀线活性成份和机理,以及进一步的开发应用条件均需开展深入的研究。

参考文献

- [1] 国家林业和草原局. 国家林业和草原局公告(2024年第4号)(2024年松材线虫病疫区)[EB/OL]. (2024-02-27)[2024-09-30]. <https://www.forestry.gov.cn/search/547482>.
- [2] 叶建仁,吴小芹. 松材线虫病研究进展[J]. 中国森林病虫,2022,41(3):1-10.
- [3] 郭文霞. 国外松材线虫病防治策略和技术措施[J]. 河北林业科技,2022(4):47-53.
- [4] 国家林业和草原局. 国家林业和草原局关于印发《松材线虫病防治技术方案(2022年版)》的通知[EB/OL]. (2022-09-20)[2024-09-30]. https://www.xinpu.gov.cn/zfbm/qczj_5733555/zcwj_5733537/202301/P020230118594510485114.pdf.
- [5] 杨忠岐,王小艺,张翌楠,等. 以生物防治为主的综合控制我国重大林木病虫害研究进展[J]. 中国生物防治学报,2018,34(2):163-183.
- [6] 王曦苗,曹业凡,朴春根,等. 韩国松材线虫病防控成效及启示[J]. 世界林业研究,2022,35(6):94-100.
- [7] LI J,ZOU C,XU J,et al. Molecular mechanisms of nematode-nematophagous microbe interactions:basis for biological control of plant-parasitic nematodes[J]. Annual review of phytopathology,2015,53(1):67-95.
- [8] 陈学新,杜永均,黄健华,等. 我国作物病虫害生物防治研究与应用最新进展[J]. 植物保护,2023,49(5):340-370.
- [9] 郝昕. 松材线虫响应强力节丛孢胁迫的分子机制研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2023.
- [10] 黄华毅,扈丽丽,陈刘生,等. 拮抗菌株 SY-15 的鉴定及其抑菌活性分析[J]. 林业与环境科学,2021,37(6):76-82.
- [11] 梁文洪,赵倩,张良军,等. 森林假单胞菌抑菌物稳定性及其成分分析[J]. 林业与环境科学,2023,39(6):1-10.
- [12] 冯志新. 植物线虫学[M]. 北京:中国农业出版社,2001.
- [13] LIOU J Y,SHIH J Y,TZEAN S S,et al. *Esteya*, a new nematophagous genus from Taiwan, attacking the pine wood nematode (*Bursaphelenchus xylophilus*) [J]. Mycological research,1999,103(2):242-248.
- [14] CHU W H,DOU Q,CHU H L,et al. Research advance on *Esteya vermicola*, a high potential biocontrol agent of pine wilt disease [J]. Mycological progress, 2015, 14(12):1-9.
- [15] 贺然. 伊氏线虫真菌对松材线虫应答机制及碳氮营养的转录组和代谢组学特征[D]. 北京:中国林业科学研究院,2020.
- [16] 金娜,刘倩,简恒. 植物寄生线虫生物防治研究新进展[J]. 中国生物防治学报,2015,31(5):789-800.
- [17] 李亮亮,谈家金,陈凤毛. 两株松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2017,41(4):37-41.
- [18] 许嘉麟,谈家金,郝德君. 蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株对松材线虫产卵和繁殖的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(5):209-214.
- [19] 贺丽娜,冯源,石慧敏,等. 具有杀线活性马尾松内生细菌的筛选与鉴定[J]. 生物技术通报,2022,38(8):159-166.
- [20] 朱丽梅,吴小芹,徐旭麟. 松材线虫拮抗细菌的筛选和鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2008,51(3):91-94.
- [21] 谈家金,冯志新. 2个细菌菌株对松材线虫存活与繁殖的影响[J]. 植物病理学报,2003,33(6):557-558.
- [22] 许嘉麟,谈家金,郝德君. 蜡样芽孢杆菌 NJSZ-13 菌株对松材线虫产卵和繁殖的影响[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(5):209-214.
- [23] 江绪文,李贺勤. 植物内生菌防治植物寄生线虫的研究进展[J]. 生物技术通报,2014(9):7-12.
- [24] INSUNZA V,ALSTRÖM S,ERIKSSON K B. Root bacteria from nematocidal plants and their biocontrol potential against trichodorid nematodes in potato [J]. Plant and soil,2002,241(2):271-278.
- [25] KRECHEL A,FAUPEL A,HALLMANN J,et al. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood [J]. Canadian journal of microbiology, 2002, 48(9):772-786.
- [26] ZHENG L,LI G,WANG X,et al. Nematicidal endophytic bacteria obtained from plants [J]. Annals of microbiol,2008,58(4):569-572.
- [27] 彭双,闫淑珍,陈双林. 具杀线虫活性植物内生细菌的筛选和活性产物[J]. 微生物学报,2011,51(3):368-376.
- [28] SELA S,SCHICKLER H,CHET I,et al. Purification and characterization of a *Bacillus cereus* collagenolytic/proteolytic enzyme and its effect on *Meloidogyne javanica* cuticular proteins [J]. European journal of plant pathology,1998,104:59-67.
- [29] 余洁,林锦庄,黄勤清,等. 苏云金芽孢杆菌对新秀丽小杆线虫的作用[J]. 农业生物技术学报,2007,15(2):306-311.