

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (8) :926 - 935; 4 August 2014  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.011

## 野生大豆抗感大豆孢囊线虫材料内生细菌多样性分析

武云鹏<sup>1,2</sup>, 史凤玉<sup>1</sup>, M. Imran Hamid<sup>2</sup>, 张瑞敬<sup>3</sup>, 朱英波<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>河北科技师范学院生命科技学院, 河北 秦皇岛 066600

<sup>2</sup>中国科学院微生物研究所, 真菌学国家重点实验室, 北京 100101

<sup>3</sup>张家口市植物保护植物检疫站, 河北 张家口 075000

**摘要:** 【目的】对抗感野生大豆材料根内生细菌的多样性进行比较分析, 为研究野生大豆内生细菌与大豆孢囊线虫之间的相互关系奠定基础。【方法】在野生大豆抗大豆孢囊线虫 3 号生理小种筛选基础上, 利用扩增核糖体 DNA 限制性分析 (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) 和 16S rDNA 克隆文库测序相结合的方法, 对抗感野生大豆根系内生细菌多样性及群落结构进行分析。【结果】野生大豆根内生细菌分属于 6 大类群, 其中变形菌门 (Proteobacteria) 和厚壁菌门 (Firmicutes) 为优势类群, 相对丰度分别为 46.8% 和 13.6%, 另外有少量的放线菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、酸杆菌门 (Acidobacteria)、异常球菌-栖热菌门 (Deinococcus-Thermus) 和古细菌 (Archaea), 18.8% 克隆序列与环境未培养细菌的 16S rDNA 序列有较高的相似性。野生大豆高抗材料内生细菌的多样性比高感材料更为丰富, 且抗感材料内生细菌优势菌群存在明显差异, 中慢生根瘤菌 (*Mesorhizobium tamadayense*)、肠杆菌 (*Enterobacter ludwigii*) 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 为野生大豆高抗材料特有的可操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs) 中的优势种群。【结论】研究结果表明抗感野生大豆根内生细菌的优势种群存在明显差异, 而内生细菌的优势种群与大豆孢囊线虫的相互关系正在深入分析研究。

**关键词:** 大豆孢囊线虫, 野生大豆材料, 内生细菌, 扩增核糖体 DNA 限制性分析, 分类操作单元

**中图分类号:** X172      **文章编号:** 0001-6209 (2014) 08-0926-10

与植物相关的细菌多种多样, 形成一个复杂的微生物群落, 依据其定殖生态位点的不同, 可分为内生细菌、根际细菌和附生细菌<sup>[1]</sup>。植物内生细菌 (Endophytic bacteria) 是一类在其生活史的一定阶段或全部阶段寄居于植物组织内部, 但不会使宿主表现明显病症的微生物类群。有研究指出, 一些内生细菌类群在与宿主在长期协同进化的过程中, 形

成了稳定的互惠共生关系<sup>[2]</sup>, 其在促进宿主植物生长、抵御病原体入侵和有机污染物降解等方面发挥着重要作用<sup>[3]</sup>。许多植物组织的内生细菌种群多样性十分丰富, 但其多样性和群落结构常因宿主植物类型<sup>[4]</sup>、组织器官<sup>[5]</sup>和宿主植物生长环境<sup>[3]</sup>的不同而有所差异。植物内生细菌被认为是土壤微生物菌群的一部分, 特定植物的根系分泌物是促使根

**基金项目:** 河北省自然科学基金项目 (C2014407021); 中国博士后科学基金 (20100480028); 河北科技师范学院博士启动基金 (2007YB010)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-335-2039623; E-mail: xiaozhu\_1688@126.com

**作者简介:** 武云鹏 (1988 -), 男, 河北张家口人, 硕士研究生, 研究方向为大豆孢囊线虫生物防治。E-mail: wuyunpeng\_2007@126.com

**收稿日期:** 2014-03-19; **修回日期:** 2014-06-18

际土壤细菌变为内生细菌的主要驱动力<sup>[6]</sup>, 植物可以直接或间接利用此类细菌控制土传病害的发生<sup>[7]</sup>。因此了解植物内生细菌的多样性及其功能, 将有助于内生细菌资源的开发和利用。

大豆孢囊线虫 (SCN, *Heterodera glycines* Ichinohe) 是世界大豆生产中最为严重的土传性病害之一, 每年给各大豆主产国造成重大的经济损失<sup>[8]</sup>。目前, 种植抗线品种是控制该病较为经济有效的措施<sup>[9]</sup>。由于生产上推广的栽培大豆 (*Glycines max*) 存在抗源亲本材料遗传基础相对狭窄的问题, 连年种植单一品种易引起大豆孢囊线虫生理小种发生变异而导致抗性丧失<sup>[10]</sup>。而野生大豆 (*Glycines soja*) 作为栽培大豆的近缘种在我国分布广泛, 其长期承受独特的环境压力, 具有丰富的抗病基因及优异的可遗传性状, 一定程度上拓宽了大豆抗线育种中种质资源的利用范围<sup>[11]</sup>。有研究指出, 野生大豆具有丰富的内生细菌菌群, 其中芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的一些细菌对 SCN 卵孵化和二龄幼虫活性具有强烈抑制作用<sup>[12-13]</sup>, 这类细菌可能在抵御大豆孢囊线虫入侵或发育方面发挥着重要作用。然而受传统分离方法的局限, 人们对野生大豆内生细菌群落结构和功能的认识还很不足。近年来随着分子生物学技术的飞速发展, 基于非培养技术建立的 16S rDNA PCR-DGGE、ARDRA 和高通量测序等方法已被成功地应用到植物内生细菌群落相关研究中<sup>[14-15]</sup>, 这有利于我们更深入的理解植物内生细菌的群落结构及其功能类群在抵御病原物入侵时所发挥的作用。

本研究在前期野生大豆抗大豆孢囊线虫种质资源筛选的基础上<sup>[16]</sup>, 利用扩增核糖体 DNA 限制性分析 (Amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARDRA) 和 16S rDNA 克隆文库测序的方法, 分析在大豆孢囊线虫 3 号生理小种胁迫条件下野生大豆内生细菌的多样性和群落结构组成, 为探明野生大豆材料内生细菌功能类群在抗 SCN 中的作用提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** DNeasy plant mini kit 购自德国 QIAGEN 公司, 引物由上海生工生物工程技术有限公司

服务公司合成, *Ex Taq* DNA Polymerase 等扩增所用试剂和 pMD18-T 载体均购自宝生物 (大连) 有限公司, Gel Extraction Kit 购自美国 OMEGA 公司, 内切酶购自加拿大 New England Biolabs 公司。PCR 仪和凝胶成像分析仪购自美国 Bio-Rad 公司, 人工气候箱 MGC-350BP-2 购自上海一恒科学仪器有限公司。

**1.1.2 供试植物:** 野生大豆 (*Glycines soja*) 材料由河北科技师范学院野生大豆遗传资源课题组提供。

**1.1.3 供试土壤:** 土壤采自黑龙江省富锦市头林镇 5 年连作大豆田 (N 132°35', E 46°63'), 土壤类型为草甸土, 土壤 pH 6.8, 土壤含水量为 9.25%, 有机质含量为 37.8 g/kg, 全氮、全磷和全钾含量分别 3.2 g/kg、1.1 g/kg 和 21.4 g/kg。土样过 10 目 (2 mm) 网筛, 并用无菌水调节土壤含水量至 15% 左右备用。

### 1.2 试验设计

将高抗大豆孢囊线虫野生大豆材料 188、高感野生大豆材料 137 和对照栽培大豆 Lee 播种于直径 15 cm 盛有 1 kg 供试病土的花盆中, 每份材料播种 6 盆, 出苗 10 d 后每盆留苗 5 株, 并接种新鲜大豆孢囊线虫二龄幼虫 1000 条/100g 土。花盆按完全随机区组设计摆放于人工气候箱中 (8 h 黑暗, 16 h 光照, 25 °C) 进行培养。接种 25 d 后, 每份供试材料随机选取 3 盆, 调查根上 SCN 雌虫的数量, 并以 Lee 为感病对照计算雌虫指数。45 d 后采集供试野生大豆根系样品保存于 -80 °C, 用于根系内生细菌 DNA 提取。同时称取 100 g 土样置于 250mL 烧杯中, 加水 150 mL 浸泡 1 h, 用湿筛法将土壤样品中的孢囊筛出, 经橡胶塞在 200 目筛上研磨后, 收集 500 目筛上物于 50 mL 离心管中, 35% 蔗糖梯度 1795 × g 离心 3 min, 含卵的上清液再过 500 目筛, 清水冲洗后, 收集于 50 mL 离心管中定容, 将卵悬液保存在 4°C 冰箱中, 用以测定土壤中大豆孢囊线虫的卵数量。

雌虫指数 (%) = (供试野生大豆材料单株平均孢囊数 / Lee 单株平均孢囊数) × 100

### 1.3 野生大豆材料内生细菌群落分析

**1.3.1 根内 DNA 提取:** 参照 Zhang 等<sup>[17]</sup> 的方法, 用灭菌水反复清洗野生大豆根系组织, 将抗感材料根系切成 5 cm 长度, 并分别构建样品混合池。根系样品依次用 70% 乙醇浸泡 3 min, 2.5% 次氯酸钠浸泡 3 min, 70% 乙醇浸泡 30 s, 灭菌水冲洗 5 次。取

最后一次清洗的灭菌水 500  $\mu\text{L}$  涂布于 TSA 平板, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 2–3 d, 以检测根系表面消毒是否完全。称取 1 g 表面消毒彻底的根系, 用 DNeasy plant mini kit (QIAGEN) 提取野生大豆抗感材料根内细菌总 DNA, 提取方法按照试剂盒说明书操作。

**1.3.2 内生细菌 16S rDNA 片段的扩增:** 以野生大豆根内细菌总 DNA 为模板, 采用细菌 16S rDNA 通用引物 799f (5'-AACMGGATTAGATACCCKG-3') 和 1492r (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系和程序参照 Zhang 等<sup>[18]</sup> 方法。PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 目的条带切胶回收, 用 Gel Extraction Kit (OMEGA) 纯化, 方法按照说明书进行。

**1.3.3 内生细菌 16S rDNA 文库构建及 ARDRA 分析:** 纯化后 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 随机挑选 200 个克隆子构建克隆文库, 以 M13r 和 M13f 为通用引物进行菌落 PCR 验证。阳性菌落 PCR 产物 (约 900 bp) 用 *Hae* III (New England Biolabs) 和 *Hinf* I (New England Biolabs) 进行双酶切。酶切产物用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以 Quantity one 软件读取酶切条带大小, 具有相同酶切条带的克隆被定义为同一个操作分类单元 (OTUs, Operational taxonomic units), 代表性克隆委托北京奥美德诺生物科技公司进行测序。稀缺性曲线通过网络程序来绘制 (<http://www.uga.edu/strata/software/Software.html>)。

**1.3.4 数据及序列分析:** 野生大豆抗感材料雌虫数、雌虫指数和土壤卵量采用 SPSS18.0 软件进行方差分析。克隆序列去除载体序列后, 通过 Blast 程序在 GenBank 中进行相似性对比, 获得亲缘关系最近且相似度  $\geq 97\%$  菌株的序列。内生细菌多样性指数 Shannon-Weiner ( $H'$ ) 和物种均一度指数 Pielou index ( $E'$ ) 采用 Biodap 软件 (Gordon Thomas, Vancouver, BC, Canada) 计算<sup>[19]</sup>。

**1.3.5 序列登录号:** 将测序得到的细菌 16S rDNA 基因序列提交 GenBank 数据库, 获取序列登录号为: KJ564078-KJ564120。

## 2 结果和分析

### 2.1 野生大豆材料抗性分析

野生大豆材料对 SCN 3 号生理小种的抗性反应

如图 1 所示, 接种 SCN 二龄幼虫 25 d 后, 供试野生大豆和对照大豆 Lee 根上的雌虫数均达到高峰期, 且野生大豆对 SCN 抗感反应存在明显差异, 野生大豆材料 188 单株平均雌虫数和雌虫指数分别为 8 和 9.3%, 对 SCN 3 号生理小种表现为高抗; 而野生大豆材料 137 单株平均雌虫数和雌虫指数则达到 63 和 69.2%, 表现为高感。野生大豆材料 188 和 137 根上雌虫数及雌虫指数均达到极显著性差异水平 ( $p < 0.01$ ,  $n = 15$ )。接种 45 d 后, 相应栽培土壤中的 SCN 卵数量也达到显著性差异水平 ( $p < 0.05$ ,  $n = 3$ )。

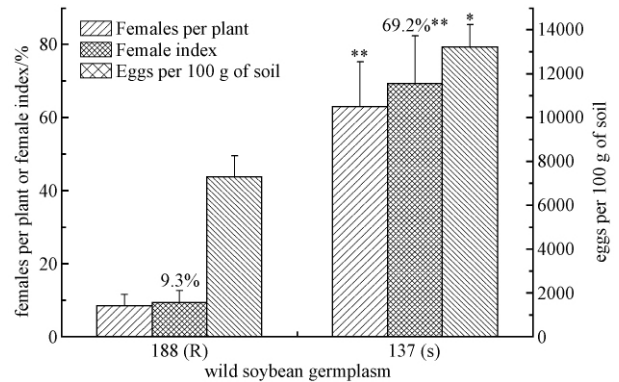


图 1. 野生大豆抗感材料雌虫数、雌虫指数 (25 d) 和土壤卵量 (45 d)

Figure 1. The number of females, female index at 25 dpi and the number of eggs at 45 dpi associated with *H. glycines*-resistant and susceptible germplasm of wild soybean.

### 2.2 野生大豆根内细菌的 PCR 扩增

以野生大豆根内细菌总 DNA 为模板, 对内生细菌 16S rDNA 的 V5-V9 高变区进行扩增。图 2 是电

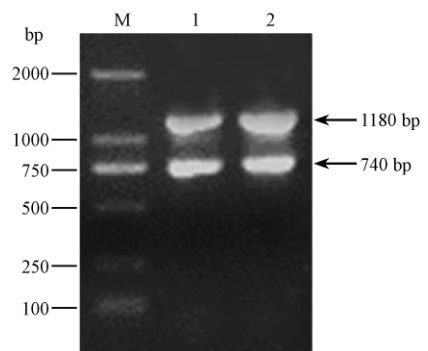


图 2. 野生大豆根内生菌 16S rDNA 片段扩增

Figure 2. PCR amplification of endophytic bacteria 16S rDNA fragment of wild soybean. M, DL 2000 DNA Ladder; lane 1, *H. glycines*-resistant germplasm '188'; lane 2, Susceptible germplasm '137'.

泳结果, 其中 740 bp 为野生大豆内生细菌目的条带, 而 1180 bp 为野生大豆线粒体 18S rDNA, 将目的条带切胶回收用于野生大豆内生细菌 16S rDNA 克隆文库构建。

### 2.3 16S rDNA 克隆文库构建和 ARDRA 分析

为分析野生大豆根内生细菌的多样性, 分别构建了野生大豆材料 188 和 137 根内生细菌 16S rDNA 克隆文库。经菌落 PCR 验证, 野生大豆 SCN 高抗材料 188 文库中获得 196 个阳性克隆, 高感材料 137 文库中获得 188 个阳性克隆。通过 ARDRA 酶切图谱分析, 以具有相同酶切条带的克隆视为同一个 OTU 的标准, 野生大豆高抗材料 188 的 196 个克隆被归为 36 个 OTUs, 高感材料 137 的 188 个克隆被归为 32 个 OTUs。稀缺性曲线分析表明: 这些克隆代表了文库中大多数细菌的多样性 (图 3)。

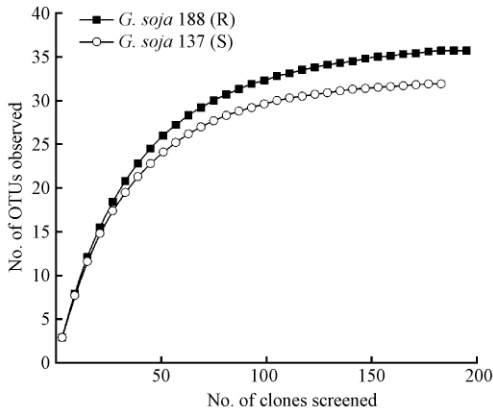


图 3. 野生大豆抗感材料内生细菌 16S rDNA 克隆文库稀缺性曲线分析

Figure 3. Rarefaction curve of endophytic bacterial 16S rDNA clone library of *H. glycines*-resistant and susceptible germplasm of wild soybean.

### 2.4 野生大豆内生细菌群落分析

根据抗感野生大豆材料内生细菌 16S rDNA 克隆文库的 ARDRA 分析结果, 选取 45 个代表性克隆进行测序, 共获得 43 个有效序列。对 384 个克隆在细菌各主要分类单元的分布统计结果表明, 其主要分属于 6 大类群 (Proteobacteria、Firmicutes、Actinobacteria、Bacteroidetes、Acidobacteria 和 Deinococcus-Thermus), 涵盖 32 个属和 4 个未培养细菌类群。其中优势类群为变形菌门 Proteobacteria (46.8%), 其他类群的相对丰度为: 厚壁菌门 Firmicutes (13.6%)、放线菌门 Actinobacteria (8.3%)、拟杆菌门 Bacteroidetes (8.1%)、酸杆菌门

Acidobacteria (5.7%)、异常球菌-栖热菌门 Deinococcus-Thermus (3.1%) 和古细菌 Archaea (0.5%), 18.8% 克隆序列与一些未培养细菌的序列同源性较高 (表 1, 图 4)。

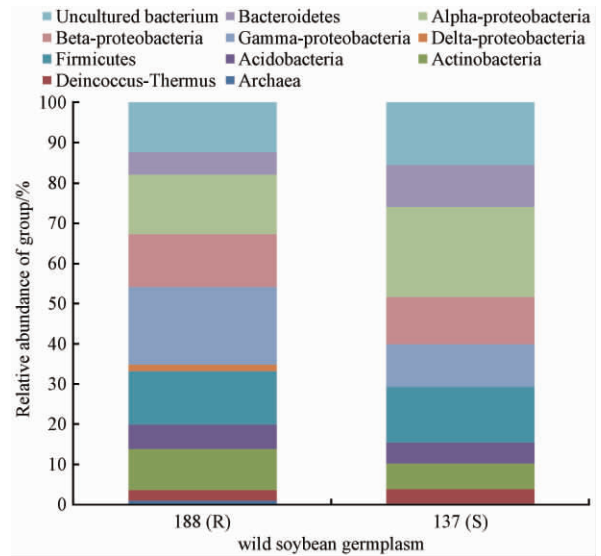


图 4. 野生大豆抗感材料内生细菌群落结构

Figure 4. Endophytic bacterial community structure of *H. glycines*-resistant and susceptible germplasm of wild soybean.

野生大豆高抗 SCN 材料 188 和高感材料 137 根内生细菌物种均一度相同 ( $E = 0.95$ ), 但群落组成存在明显差异。野生大豆高抗 SCN 材料 188 和高感材料 137 的 Shannon-Weiner 多样性指数 ( $H'$ ) 分别为 3.41 和 3.29, 野生大豆高抗 SCN 材料内生细菌多样性更为丰富 (表 1)。高抗 SCN 材料 188 内生细菌优势类群为变形菌门  $\gamma$  亚群 Gamma-proteobacteria (19.4%), 包括 8 个 OTUs, 其中来自假单胞菌属 *Pseudomonas* (12.8%) 和肠杆菌属 *Enterobacter* (3.1%) 属的 4 个 OTUs, 为其优势种群, 且数量高于高感材料 137; 在野生大豆材料 188 根内, 其他主要类群分别为变形菌门  $\alpha$  亚群 Alpha-proteobacteria (14.8%)、变形菌门  $\beta$  亚群 Beta-proteobacteria (13.3%)、厚壁菌门 Firmicutes (13.3%) 和放线菌门 Actinobacteria (10.2%), 其中来自中慢生根瘤菌属 (*Mesorhizobium*) (4.1%)、紫色杆菌属 (*Janthinobacterium*) (9.2%) 和链霉菌属 (*Streptomyces*) (6.6%) 的 4 个 OTUs 分别为其所属类群的优势种群。而变形菌门  $\delta$  亚群 Delta-proteobacteria (1.5%) 和古细菌 Archaea (1.0%) 为 SCN 高抗材料 188 所特有的类群。高抗材料内生细

表 1. 野生大豆抗感材料根系内生细菌 16S rDNA 克隆分布及其多样性  
 Table 1. Distribution and diversity of 16S rDNA clones associated with endophytic bacteria from  
*H. glycines*-resistant and susceptible germplasm of wild soybean

Groups	<i>H. glycines</i> -resistant germplasm '188'		Closest NCBI match (GenBank accession No.), Similarity /%	<i>H. glycines</i> -susceptible germplasm '137'	
	No. of clones	Relative abundance /%		No. of clones	Relative abundance /%
Alpha-proteobacteria	3	1.53	<i>Aurantimonas altamirensis</i> IFP14.1 EU544515, 99%	4	2.13
	3	1.53	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110 NR_074322, 99%	17	9.04
	5	2.55	<i>Bradyrhizobium</i> sp. EC550-1 AY624133, 100%	7	3.72
	8	4.08	<i>Mesorhizobium tamadayense</i> LBER1 FN563430, 97%	0	0.00
	6	3.06	<i>Sinorhizobium americanum</i> ENCBTM 43 JN009837, 100%	3	1.60
	3	1.53	<i>Sinorhizobium</i> sp. 209 EU488747, 98%	11	5.85
	1	0.51	<i>Sphingomonas</i> sp. B5-4 KC555188, 100%	0	0.00
Beta-proteobacteria	11	5.61	<i>Janthinobacterium</i> sp. HC7-1 JF313019, 99%	6	3.19
	7	3.57	<i>Janthinobacterium lividum</i> Acam EU275366, 98%	0	0.00
	7	3.57	<i>Burkholderia</i> sp. WT5 FJ939283, 99%	9	4.79
	0	0.00	<i>Aquicola tertiarycarbonis</i> L10 NR_043913, 99%	3	1.60
	1	0.51	Uncultured betaproteobacterium CN-1_SL2 EF219856, 99%	3	1.60
	0	0.00	<i>Variovorax ginsengisoli</i> Gsoil 3165 AB245358, 99%	1	0.53
Gamma-proteobacteria	12	6.12	<i>Pseudomonas asplenii</i> LMG 5147 HE586387, 99%	3	1.60
	9	4.59	<i>Pseudomonas putida</i> AJ AY391278, 99%	4	2.13
	4	2.04	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 76P KC865280, 99%	0	0.00
	1	0.51	<i>Stenotrophomonas rhizophila</i> Cl-28 KC178602, 100%	3	1.60
	6	3.06	<i>Enterobacter ludwigii</i> IHB B 6551 KF475862, 99%	0	0.00
	1	0.51	<i>Acinetobacter</i> sp. PMM5 KF732993, 99%	4	2.13
	2	1.02	<i>Psychrobacter</i> sp. B-G-TSA3 HM629421, 99%	0	0.00
	3	1.53	Uncultured gammaproteobacterium F45B39 AY539818, 99%	0	0.00
	0	0.00	<i>Pantoea</i> sp. R8 AJ002811, 99%	2	1.06
	0	0.00	<i>Klebsiella variicola</i> XF11 KC853305, 98%	4	2.13
Delta-proteobacteria	3	1.53	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> BEP2 AF148938, 99%	0	0.00
Deinococcus-Thermus	5	2.55	<i>Deinococcus</i> sp. G3-6-20 KC494323, 99%	7	3.72
Actinobacteria	0	0.00	<i>Rhodococcus erythropolis</i> VOL KF499507, 100%	3	1.60
	13	6.63	<i>Streptomyces</i> sp. P4 JN102356, 99%	2	1.06
	7	3.57	<i>Microbacterium</i> sp. ZYY125 JX531695, 99%	6	3.19
	0	0.00	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> T258 KC764990, 99%	1	0.53
Acidobacteria	7	3.57	Uncultured <i>Acidobacteria</i> bacterium D. an-35 JX505102, 98%	10	5.32
	5	2.55	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i> D08 NR_044937, 99%	0	0.00
Firmicutes	3	1.53	<i>Alkalibacterium</i> sp. E-059 FJ764766, 98%	5	2.66
	6	3.06	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032 NR_074977, 100%	9	4.79
	4	2.04	<i>Bacillus simplex</i> 262XG7 KF818626, 99%	7	3.72
	7	3.57	<i>Bacillus megaterium</i> ML275 KC692202, 99%	0	0.00
	6	3.06	<i>Paenibacillus</i> sp. AS40 AM162338, 97%	5	2.66
Bacteroidetes	3	1.53	<i>Niabella yanshanensis</i> CCBAU 05354 FJ457040, 98%	6	3.19
	8	4.08	<i>Candidatus Paenicardinium endonii</i> DQ314214, 99%	14	7.45
Uncultured bacterium	10	5.10	Uncultured bacterium ANTLV9_F06 DQ521559, 98%	5	2.66
	10	5.10	Uncultured bacterium RH2058 AB511005, 99%	13	6.91
	4	2.04	Uncultured bacterium SS-75 AY945880, 97%	7	3.72
	0	0.00	Uncultured bacterium LLEBETA_C11 HE857509, 99%	4	2.13
Archaea	2	1.02	<i>Crenarchaeote</i> sp. NRP-N AB243805, 99%	0	0.00
Total no. of clones	196			188	
Shannon diversity index ( $H'$ )	3.41			3.28	
Pielou index ( $E$ )	0.95			0.95	

菌特有的 10 个 OTUs 分别来自: 中慢生根瘤菌属 (4.1%)、鞘脂单胞菌属 (*Sphingomonas*) (0.5%)、紫色杆菌属 (*Janthinobacterium*) (3.6%)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (2.0%)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) (3.1%)、嗜冷杆菌属 (*Psychrobacter*) (1.0%)、一种未培养变形菌门  $\gamma$  亚群 Gamma-proteobacteria 细菌 (1.5%)、蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*) (1.5%)、细小杆菌属 (*Microbacterium*) (2.6%) 和芽胞杆菌属 (*Bacillus*) (3.6%)。

高感 SCN 材料 137 根内细菌优势类群为变形菌门  $\alpha$  亚群 Alpha-proteobacteria (22.3%), 包括 5 个 OTUs, 其中来自慢生根瘤菌属 (*Bradyrhizobium*) 和中华根瘤菌属 (*Sinorhizobium*) 的 3 个 OTUs 为其优势种群, 数量明显高于高抗材料 188; 高感 SCN 材料 137 根内其他优势类群分别属于厚壁菌门 Firmicutes (13.8%)、变形菌门  $\beta$  亚群 Beta-proteobacteria (11.7%)、变形菌门  $\gamma$  亚群 Gamma-proteobacteria (10.6%) 和拟杆菌门 Bacteroidetes (10.6%)。伯克氏菌属 (*Burkholderia*) (4.8%)、假单胞菌属 (2.1%)、不动杆菌属 (*Acinetobacter*) (2.1%)、克雷伯氏杆菌属 (*Klebsiella*) (2.1%)、芽胞杆菌属 (4.8%) 和 *Paenicardinium* (7.5%) 分别为其所属类群的优势种群。高感 SCN 材料 137 内生细菌特有的 7 个 OTUs 分别来自: 水居菌属 (*Aquicola*) (1.6%)、贪食菌属 (*Variovorax*) (0.5%)、泛生菌属 (*Pantoea*) (1.1%)、克雷伯氏杆菌属 (2.1%)、红球菌属 (*Rhodococcus*) (1.6%)、节杆菌属 (*Arthrobacter*) (0.5%) 和一些未培养细菌 (2.1%)。

此外, 除一些未培养细菌 OTUs 外, 野生大豆高抗 SCN 材料 188 和高感材料 137 共同优势种群为 *Candidatus Paenicardinium endonii*。

### 3 讨论

以往关于大豆抗 SCN 机制的相关研究, 主要关注于植物本身抗病基因表达<sup>[9]</sup>。而与植物密切相关的微生物也发挥着不可忽视的作用, 特别是与宿主植物经过长期协同进化, 最终形成稳定生态关系的植物内生细菌, 植物可以选择和利用一些内生细菌功能类群提高自身抗逆、抗胁迫和抗病害的能力。关于植物内生细菌多样性与植物病害关系引起了人们的广泛关注。王琦等<sup>[20]</sup>研究表明, 棉花不同抗性品种内生细菌种群存在明显差异, 抗枯萎病品种的

内生细菌数量明显高于感病品种。许乐等<sup>[21]</sup>等比较了健康和感枯萎病香蕉植株内生细菌的多样性和群落结构, 发现香蕉抗病品种比感病品种植株中内生细菌的多样性更丰富且更稳定。刘冰等<sup>[22]</sup>从温州蜜柑和赣南纽荷尔脐橙中分离内生细菌, 分析内生细菌与寄主品种抗溃疡病之间的关系, 发现柑橘可培养内生细菌与寄主抗溃疡病之间存在着协同关系。在本研究中, 我们对野生大豆不同抗性材料内生细菌的多样性进行探索, 也获得类似的研究结果, 发现高抗材料 188 比高感材料 137 的内生细菌多样性更丰富且一些功能细菌类群较多。这似乎表明这些或部分内生细菌可能与其寄主品种抗病之间可能存在广泛的协同关系。

野生大豆高抗 SCN 材料 188 克隆文库中的紫色杆菌属、假单胞菌属和链霉菌属的相对丰度高于高感材料 137; 塔玛德亚中慢生根瘤菌 (*M. tamadayense*)、路德维格肠杆菌 (*E. ludwigii*) 和巨大芽胞杆菌 (*B. megaterium*) 为高抗材料 188 特有 OTU 中的优势种群。这些特殊的细菌菌群有可能在野生大豆抗 SCN 危害的过程中发挥着重要作用。

紫色杆菌属包括一些革兰氏阴性、运动型、产紫色杆菌素及无芽孢的球杆菌, 其广泛存在于植物、土壤和河流的相关微生物区系中。在野生大豆高抗材料 188 根内生细菌克隆文库中, 存在 7 个蓝黑紫色杆菌 (*J. lividum*) 克隆, 而高感材料 137 中未检测出其存在。有研究指出<sup>[23]</sup> 此类细菌可以定殖于红背蝾螈 (*Plethodon cinereus*) 和黄腿山蛙 (*Rana muscosa*) 等两栖类动物体表, 并可能通过相同的代谢途径产生非水溶性紫色杆菌素和生物膜, 以提高自身环境适应能力, 同时也对青蛙壶菌 (*Batrachochytrium dendrobatidis*) 等两栖类动物病原真菌具有广谱抗性。紫色杆菌 (*Janthinobacterium* sp.) HH01 菌株具有 4 个编码胞外几丁质酶的基因, 同时其所产生紫色杆菌素对秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 具有致死能力<sup>[24]</sup>。几丁质是大豆孢囊线虫体壁的主要组成成分, 野生大豆根内紫色杆菌细菌有可能通过产生几丁质酶或紫色杆菌素的方式, 对大豆孢囊线虫侵入或发育阶段产生一定影响。

在变形菌门  $\beta$  亚群中, 假单胞杆菌属为野生大豆抗感材料的优势微生物菌群, 但该属在野生大豆高抗材料中的相对丰度为 12.8%, 明显高于高感材料 (3.7%)。有研究指出, 假单胞菌属是植物病原

真菌、细菌和植物病原线虫的主要生防细菌类群。其主要通过产生抗生素或其他有毒物质、与病原物竞争营养盐、诱导植物产生系统抗性和扰乱病原线虫与寄主植物识别过程等方式控制或减轻病原危害<sup>[25]</sup>。荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)可产生2,4-二乙酰基间苯三酚(2,4-DAPG)和吩嗪-1-羧酸(PCA)等抗生素,是小麦全蚀病等多种土传病害抑制性土壤形成的主要生物因子<sup>[26]</sup>。少数产2,4-DAPG的荧光假单胞菌菌株可以抑制根结线虫属(*Meloidogyne*)卵孵化,影响根结线虫属和孢囊线虫属(*Heterodera*)等植物寄生线虫二龄幼虫的活性,并有效减少根结数和孢囊数<sup>[27]</sup>。此外,假单胞菌也能通过信号转导诱导植物产生系统抗性,从而影响爪哇根结线虫(*M. javanica*)入侵和根内发育<sup>[28]</sup>。在本研究中,荧光假单胞杆菌作为野生大豆高抗SCN材料根内生细菌所特有的分类单元之一,尽管相对丰度较低(2.04%),但其可能在控制大豆孢囊线虫入侵或发育过程中仍发挥着重要作用。

除上述内生细菌外,本研究在野生大豆根内也发现了链霉菌属、根瘤菌属、肠杆菌属和芽孢杆菌属等细菌,其中链霉菌属包括一些革兰氏阳性丝状细菌,能产生抗生素、水解酶及酶抑制剂等生物活性物质,是控制土传病害最有潜力的生防因子。最为典型的除虫链霉菌(*S. avermitilis*)能产生大环内酯类化合物-阿维菌素,已作为杀虫剂、杀螨剂和杀线剂成功运用于商业化生产<sup>[29]</sup>。有研究指出,链霉菌属细菌能有效的抑制SCN卵孵化,并对二龄幼虫有一定毒性<sup>[30]</sup>。

塔玛德亚中慢生根瘤菌(*M. tamadayense*)首次分离自西班牙特纳利夫岛上两种豆科灌木(*Anagyris latifolia*和*Lotus berthelotii*)的根瘤内<sup>[31]</sup>,该属细菌主要与耐重金属、豆科植物固氮和促进植物生长等作用有关<sup>[32]</sup>。本研究中,慢生根瘤菌属为野生大豆高感SCN材料137根内细菌的优势种群(12.8%),也有研究表明<sup>[33]</sup>植物寄生线虫存在的情况下,单独使用该菌对大豆的增产效果不佳,但与其他生防菌一起施用,可达到植物寄生线虫防控的目的。此外,肠杆菌(*E. ludwigii*)作为根际促生菌,具有高效溶磷能力及拮抗茄病镰刀菌(*Fusarium solani*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等土壤病原菌的特点<sup>[34]</sup>。芽孢杆菌属中巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)可有效降低孢囊线虫属和根结线虫属等植物寄生线虫对植物的侵入数量<sup>[35]</sup>。

在本研究中,检测到大量SCN内共生体*Candidatus Paenicardinium endonii*的存在(11.5%),有研究指出此类细菌存在于SCN二龄幼虫及雌、雄成虫的线虫假体腔和生殖组织内<sup>[36]</sup>,目前尚不清楚*Candidatus Paenicardinium endonii*对SCN有何生物学意义,但关于昆虫或线虫和其内共生体细菌如*Cardinius*和*Wolbachia*的相关研究表明,内共生体细菌可能在其宿主的生态和进化等方面均发挥着重要作用<sup>[37-38]</sup>。*Candidatus Paenicardinium endonii*虽不属于野生大豆内生细菌范畴,但其大量存在于SCN体内说明该共生体对SCN的生存发挥一定作用,为较为真实地反映野生大豆-SCN-内生菌的相互关系,我们将该线虫内共生体细菌统计在野生大豆内生细菌克隆文库中。

内生细菌的数量随不同植物、不同品种、不同生育期而不同。高增贵等<sup>[39]</sup>研究玉米品种遗传背景对内生细菌的种类及其数量的影响,指出品种的遗传背景对内生细菌种群有明显的选择性,品种内生细菌的种类及其数量在很大程度上受品种的遗传背景控制,尤其内生细菌的种类与品种的遗传背景存在明显的相关性。王琦等<sup>[20]</sup>等对种植在偏砂性和偏粘性土壤中的不同抗枯萎病品种进行了内生细菌分析,发现不同品种、不同土质及不同生育期的内生细菌数量有显著差异,不同生育期的菌量变化是五叶期最低、现蕾期最高、开花结铃后期又下降。而本试验还只是对抗感SCN野生大豆材料内生细菌多样性的初步探索,对于野生大豆的遗传背景、生育期和环境等因素对内生细菌是否存在选择性,以及野生大豆利用哪些细菌功能类群并以何种机制参与SCN防控还需要更有力的证据和更深入的研究,笔者将继续开展这方面的工作。

**致谢:**感谢中国科学院微生物研究所林斌博士、束弛博士和张伟伟博士对本文撰写提出的宝贵意见。

## 参考文献

- [1] Pini F, Frascella A, Santopolo L, Bazzicalupo M, Biondi EG, Scotti C, Mengoni A. Exploring the plant-associated bacterial communities in *Medicago sativa* L. *BMC Microbiology*, 2012, 12: 78-87.
- [2] Huang J, Sheng X, He L. Biodiversity of phosphate-dissolving and plant growth-promoting endophytic bacteria of two crops. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(6): 710-716. (in Chinese)

- 黄静, 盛下放, 何琳燕. 具溶磷能力的植物内生促生细菌的分类筛选及其生物多样性. 微生物学报, 2010, 50 (6): 710-716.
- [3] Kuklinsky-Sobral HL, Araujo WL, Mendes R, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. Isolation and characterization of endophytic bacteria from soybean (*Glycine max*) grown in soil treated with glyphosate herbicide. *Plant Soil*, 2005, 273 (1-2): 91-99.
- [4] Adams PD, Klopper JW. Effect of host genotype on indigenous bacterial endophytes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Soil*, 2002, 240 (1): 181-189.
- [5] Sessitsch A, Reiter B, Pfeifer U, Wilhelm E. Cultivation-independent population analysis of bacterial endophytes in three potato varieties based on eubacterial and *Actinomycetes*-specific PCR of 16S rRNA genes. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 39 (1): 23-32.
- [6] Bais HP, Weir TL, Perry LG, Gilroy S, Vivanco JM. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annual Review of Plant Biology*, 2006, 57: 233-266.
- [7] Hallmann J, Quadt-Hallmann A, Rodriguez-Kabana R, Klopper JW. Interactions between *Meloidogyne incognita* and endophytic bacteria in cotton and cucumber. *Soil Biology and Biochemistry*, 1998, 30 (7): 925-937.
- [8] Youssef RM, Kim K-H, Haroon SA, Matthews BF. Post-transcriptional gene silencing of the gene encoding aldolase from soybean cyst nematode by transformed soybean roots. *Experimental Parasitology*, 2013, 134 (2): 266-274.
- [9] Liu SM, Kandoth PK, Warren SD, Yeckel G, Heinz R, Alden J, Yang CL, Jamai A, El-Mellouki T, Juvalé PS, Hill J, Baum TJ, Cianzio S, Whitham SA, Korkin D, Mitchum MG, Meksem K. A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature*, 2012, 492 (7428): 256-262.
- [10] Yuan C, Shen B, Dong Y. Released soybean varieties resistant to cyst nematode in China and their resistance genetic derivation. *Soybean Science*, 2009, 28 (6): 1049-1053. (in Chinese)  
袁翠平, 沈波, 董英山. 中国大豆抗(耐)孢囊线虫病品种及其系谱分析. 大豆科学, 2009, 28 (6): 1049-1053.
- [11] Lai Y, Lin H, Fang W, Yao Z, Qi N, Wang Q, Yang X, Li H. Wild soybean natural resources and its application in broadening of soybean germplasm. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2004, 35 (3): 184-188. (in Chinese)
- 来永才, 林红, 方万程, 姚振纯, 齐宁, 王庆祥, 杨雪峰, 李辉. 野生大豆资源在大豆种质拓宽领域中的应用. 沈阳农业大学学报, 2004, 35 (3): 184-188.
- [12] Shi F, Wu Y, Zhang R, Wu N, Zhu Y. Diversity and nematicidal activity of the endophytic bacteria in the wild soybean *Glycine soja*. *Acta Phytophylacica Science*, 2013, 40 (4): 327-332. (in Chinese)  
史凤玉, 武云鹏, 张瑞敬, 吴楠, 朱英波. 野生大豆内生细菌多样性及其杀线虫活性分析. 植物保护学报, 2013, 40 (4): 327-332.
- [13] Zhu Y, Shi F, Li J, Long R, Wu Y, Qiao Y. Identification of endophytic *Bacillus* sp. BHL3501 from wild soybean and its inhibitory effect against soybean cyst nematode. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2011, 39 (34): 21077-21078, 21081. (in Chinese)  
朱英波, 史凤玉, 李建英, 龙茹, 武云鹏, 乔亚科. 野生大豆内生芽孢杆菌 BHL3501 的鉴定及对大豆孢囊线虫的抑制作用. 安徽农业科学, 2011, 39 (34): 21077-21078, 21081.
- [14] Yang R, Sun G, Zhang R, Chen L. 16S rDNA RFLP analysis of endophytic bacteria from *Brassica napus*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45 (4): 606-609. (in Chinese)  
杨瑞先, 孙广宇, 张荣, 陈立军. 油菜内生细菌 16S 核糖体的 RFLP 分析. 微生物学报, 2005, 45 (4): 606-609.
- [15] Manter DK, Delgado JA, Holm DG, Stong RA. Pyrosequencing reveals a highly diverse and cultivar-specific bacterial endophyte community in potato roots. *Microbiology Ecology*, 2010, 60 (1): 157-166.
- [16] Zhu Y, Shi F, Li J, Long R, Wu Y, Qiao Y. Identification on soybean germplasm resistant to soybean cyst nematode from *Glycine soja*. *Soybean Science*, 2011, 30 (6): 959-963. (in Chinese)  
朱英波, 史凤玉, 李建英, 龙茹, 武云鹏, 乔亚科. 抗大豆孢囊线虫病野生大豆种质资源的初步筛选. 大豆科学, 2011, 30 (6): 959-963.
- [17] Sun L, Qiu FB, Zhang XX, Dai X, Dong XZ, Song W. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microbiology Ecology*, 2008, 55 (3): 415-424.
- [18] Zhang YZ, Wang ET, Li M, Li QQ, Zhang YM, Zhao SJ, Jia XL, Zhang LH, Chen WF, Chen WX. Effects of rhizobial inoculation, cropping systems and growth stages on endophytic bacterial community of soybean roots. *Plant Soil*, 2011, 347 (1-2): 147-161.
- [19] Wu B, Tian JQ, Bai CM, Xiang MC, Sun JZ, Liu XZ.



- The biogeography of fungal communities in wetland sediments along the Changjiang River and other sites in China. *ISME Journal*, 2013, 7 (7) : 1299-1309.
- [20] Wang Q, Ru S, Mei R. Analysis of endophytic bacteria in vascular tissue of cotton -relationship between soil type, growth stage and microbial change of different resistant varieties. *Chinese Journal of Microecology*, 1997, 9 (1) : 48-50. (in Chinese)  
王琦, 鲁素芸, 梅汝鸿. 棉花维管组织内生细菌分析之(一)-不同抗性品种含菌动态与土质和生育期的关系. *中国微生物学杂志*, 1997, 9 (1) : 48-50.
- [21] Xu L, Ruan X, Li D, Li H. Endophytic bacterial diversity and communities of banana cultivars with different resistance to fusarium wilt disease. *Microbiology China*, 2012, 39 (9) : 1250-1259. (in Chinese)  
许乐, 阮小蕾, 李冬丽, 李华平. 对枯萎病不同抗性的香蕉品种的内生细菌多样性及群落结构. *微生物学通报*, 2012, 39 (9) : 1250-1259.
- [22] Liu B, Li D, Hu C, Cha S. The Relativity between cultural endophytic bacteria in orange and the resistance of the host variety against the citrus canker. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35 (2) : 319-323. (in Chinese)  
刘冰, 李冬植, 胡长志, 查顺清. 柑橘可培养内生细菌与寄主品种抗溃疡病相关性的初步研究. *江西农业大学学报*, 2013, 35 (2) : 319-323.
- [23] Harris RN, Brucker RM, Walke JB, Becker MH, Schwantes CR, Flaherty DC, Lam BA, Woodhams DC, Briggs CJ, Vredenburg VT, Minbiole KPC. Skin microbes on frogs prevent morbidity and mortality caused by a lethal skin fungus. *ISME Journal*, 2009, 3 (7) : 818-824.
- [24] Hornung C, Poehlein A, Haack FS, Schmidt M, Dierking K, Pohlen A, Schulenburg H, Blokesch M, Plener L, Jung K, Bonge A, Krohn-Molt I, Utpatel C, Timmermann G, Spieck E, Pommerening-Roser A, Bode E, Bode HB, Daniel R, Schmeisser C, Streit WR. The *Janthinobacterium* sp. HH01 genome encodes a homologue of the *V. cholerae* CqsA and *L. pneumophila* LqsA autoinducer synthases. *PLoS One*, 2013, 8 (2) : e55045. doi:10.1371/journal.pone.0055045
- [25] Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonads*. *Nature Review Microbiology*, 2005, 3 (4) : 307-319.
- [26] Mendes R, Kruijt M, de Bruijn I, Dekkers E, van der Voort M, Schneider JHM, Piceno YM, DeSantis TZ, Andersen GL, Bakker PAHM, Raaijmakers JM. Deciphering the rhizosphere microbiome for disease-suppressive bacteria. *Science*, 2011, 332 (6033) : 1097-1100.
- [27] Timper P, Kone D, Yin J, Ji P, Gardener BBM. Evaluation of an antibiotic-producing strain of *Pseudomonas fluorescens* for suppression of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematode*, 2009, 41 (3) : 234-240.
- [28] Siddiqui IA, Shaikat SS. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* is independent of salicylic acid production. *Journal of Phytopathology*, 2004, 152 (1) : 48-54.
- [29] Samac DA, Kinkel LL. Suppression of the root-lesion nematode (*Pratylenchus penetrans*) in alfalfa (*Medicago sativa*) by *Streptomyces* spp. *Plant Soil*, 2001, 235 (1) : 35-44.
- [30] Chen L, Chen J, Zheng Y, Dong J, Yu B, Duan Y. Identification of actinomycetes strain snea253 and its activity against soybean cyst nematode. *Chinese Journal of Biological Control*, 2009, 25 (1) : 66-69. (in Chinese)  
陈立杰, 陈井生, 郑雅楠, 董健, 于佰双, 段玉玺. 放线菌 Snea253 的鉴定及对大豆孢囊线虫的抑制作用. *中国生物防治*, 2009, 25 (1) : 66-69.
- [31] Ramirez-Bahena MH, Hernandez M, Peix A, Velazquez E, Leon-Barrios M. Mesorhizobial strains nodulating *Anagyris latifolia* and *Lotus berthelotii* in Tamadaya ravine (Tenerife, Canary Islands) are two symbiovars of the same species, *Mesorhizobium tamadayense* sp. nov.. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35 (5) : 334-341.
- [32] Laranjo M, Alexandre A, Oliveira S. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Research in Microbiology*, 2014, 169 (1) : 2-17.
- [33] Oyekanmi EO, Coyne DL, Fagade OE, Osonubi O. Improving root-knot nematode management on two soybean genotypes through the application of *Bradyrhizobium japonicum*, *Trichoderma pseudokoningii* and *Glomus mosseae* in full factorial combinations. *Crop Protection*, 2007, 26 (7) : 1006-1012.
- [34] Shoebitz M, Ribaudo CM, Pardo MA, Cantore ML, Ciampi L, Cura JA. Plant growth promoting properties of a strain of *Enterobacter ludwigii* isolated from Lolium perenne rhizosphere. *Soil Biology and Biochemistry*, 2009, 41 (9) : 1768-1774.
- [35] Padgham JL, Sikora RA. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. *Crop Protection*, 2007, 26 (7) : 971-977.
- [36] Noel GR, Atibalentja N. 'Candidatus Paenicardinium endonii', an endosymbiont of the plant-parasitic nematode

*Heterodera glycines* (Nemata : Tylenchida), affiliated to the phylum Bacteroidetes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 1697-1702.

- [37] Haegeman A, Vanholme B, Jacob J, Vandekerckhove TTM, Claeys M, Borgonie G, Gheysen G. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: Member of a new *Wolbachia* supergroup. *International Journal for Parasitology*, 2009, 39 (9) : 1045-1054.
- [38] Matalon Y, Katzir N, Gottlieb Y, Portnoy V, Zchori-Fein

E. *Cardinium* in *Plagiomerus diaspidis* (Hymenoptera : Encyrtidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 2007, 96 (2) : 106-108.

- [39] Gao Z, Chen J, Liu X, Xue C. The correlation between maize genetic polymorphisms and endophytic bacteria population in plant roots. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26 (6) : 1920-1925. (in Chinese)
- 高增贵, 陈捷, 刘限, 薛春生. 玉米品种遗传多态性与根系内生细菌种群的相互关系. *生态学报*, 2006, 26 (6) : 1920-1925.

## Endophytic bacterial diversity of wild soybean (*Glycine soja*) varieties with different resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*)

Yunpeng Wu<sup>1, 2</sup>, Fengyu Shi<sup>1</sup>, M. Imran Hamid<sup>2</sup>, Ruijing Zhang<sup>3</sup>, Yingbo Zhu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, Hebei Province, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Mycology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

<sup>3</sup> Zhangjiakou Station of Plant Protection, Zhangjiakou 075000, Hebei Province, China

**Abstract:** [Objective] The aim of this study was to investigate endophytic bacterial diversity of wild soybean varieties with different resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*), for deciphering the interactions of soybean cyst nematode with endophytic bacteria. [Methods] After screening wild soybean varieties against race 3 of *H. glycines*, we investigated endophytic bacterial diversity in root tissues of wild soybean varieties with different resistance to *H. glycines* using 16S rDNA cloning library and amplified ribosomal DNA restriction analysis. [Results] Endophytic bacteria of wild soybean root belonged to 6 bacterial groups, the clones belonging to group Proteobacteria and Firmicutes were the endophyte dominants in wild soybean with 46.8% and 13.6% of total clones, respectively. Actinobacteria, Bacteroidetes, Acidobacteria, Deinococcus-Thermus and Archaea were less represented. 18.8% of clone sequences were similar to those of uncultured bacteria in the environment. The bacterial diversity was higher in *H. glycines*-Resistant than -Susceptible wild soybean varieties, and the dominant group was different between *H. glycines*-Resistant and -Susceptible wild soybean varieties. *Mesorhizobium tamadayense*, *Enterobacter ludwigii* and *Bacillus megaterium* were the main bacterial groups in special operational taxonomic units (OTUs) of *H. glycines*-Resistant wild soybean variety. [Conclusions] By 16S rDNA cloning library and amplified ribosomal DNA restriction analysis, the diversity of dominant group of endophytic bacteria in root tissues has difference among *H. glycines*-Resistant and -Susceptible wild soybean varieties.

**Keywords:** *Heterodera glycines*, *Glycine soja*, endophytic bacteria, amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA), operational taxonomic units (OTUs)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of Hebei (C2014407021), by the China Postdoctoral Science Foundation and Scientific (20100480028) and by the Research Fund for Doctoral Young Scholars in HNUST (2007YB010)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-335-2039623; E-mail: xiaozhu\_1688@126.com

Received: 19 March 2014/ Revised: 18 June 2014