



## 大豆根瘤内抗棉花枯萎病菌株的筛选及其防病试验

赵龙飞<sup>1\*</sup>, 徐亚军<sup>1</sup>, 常佳丽<sup>2</sup>, 李全芬<sup>1</sup>, 杨静雅<sup>1</sup>, 欧启凡<sup>1</sup>, 杨梦冉<sup>1</sup>

<sup>1</sup>河南省高校植物与微生物互作重点实验室, 商丘师范学院生命科学学院, 河南 商丘 476000

<sup>2</sup>清华大学环境学院, 水环境保护研究所, 北京 100084

**摘要:** 【目的】采用优良抗病性内生菌资源来控制棉花枯萎病是一种有效的措施。本研究从大豆根瘤中筛选棉花枯萎病拮抗性内生细菌, 探索其对棉花枯萎病菌丝的抑制作用和代表菌株特性, 为发掘和应用防病、抗逆优良菌株提供理论基础。【方法】采用对峙法和代谢液培养法对大豆根瘤内生细菌进行棉花枯萎病菌抑菌性筛选, 显微观察法研究筛选菌株引起病原菌菌丝变化, 通过菌株培养特征、理化特性和16S rDNA 序列同源性分析确定菌株系统发育地位, 比色法测定 DD174 耐盐碱性, 盆栽试验验证防病效果。【结果】经复筛和代谢液试验有 5 株拮抗性较强菌株, 被作用病原菌菌丝畸形、细胞壁消失、自溶, 菌丝基部加粗、分支增多, 呈树根状; 菌丝被菌苔包埋而溶解、断裂, 菌丝末端球形膨大。对棉花枯萎病菌的抑制作用主要通过菌体产生胞外代谢物发挥作用。菌株 DD174、DD176 和 DD179 最相似菌株分别为 *Bacillus oceanisediminis* H2<sup>T</sup>(GQ292772)和 *B. thuringiensis* ATCC 10792<sup>T</sup>(AF290545), 菌株 DD165 和 DD166 最相似菌株均为 *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958<sup>T</sup>(X95923)。DD174 能耐受 6%盐浓度, pH 10 生长良好, 具有一定耐盐碱能力。DD174 处理组防治效果达 76.32%, 其他防效均在 62%以上, 可作为棉花枯萎病的生防菌株资源。【结论】大豆根瘤内存在棉花枯萎病内生拮抗细菌, 其中有些菌株具有一定耐盐碱能力, 对棉花枯萎病病原菌及病害有一定抑菌和防病作用。

**关键词:** 棉花枯萎病菌, 根瘤内生菌, 拮抗性, 16S rDNA, 系统发育分析

棉花枯萎病是尖孢镰刀菌萎蔫专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)引起的维管束病害, 是一种世界性棉花土传病害, 这种病害严重威胁着棉花产量和纤维品质, 发病严重时可能造成绝产, 也是当前危害棉花生产的最严重病害之一<sup>[1]</sup>。但目

前对棉花枯萎病的控制主要采取大量喷施化学农药、选择适宜品种和与其他作物轮作等措施。这些措施不仅控制效果不佳给环境带来污染, 还会增强病原菌抗药性<sup>[2]</sup>。寻求环保、有效的控制措施成为研究者关注的焦点。前人研究<sup>[3-4]</sup>已证实可利

基金项目: 国家自然科学基金(U1204301); 河南省高等学校重点科研项目(17A180011); 国家级大学生创新性实验计划项目(201610483021)

\*通信作者。Tel: +86-370-3057892; Fax: +86-370-2595979; E-mail: hnzhaolongfei@163.com

收稿日期: 2016-10-12; 修回日期: 2016-12-01; 网络出版日期: 2017-01-19

用内生细菌抑制棉花枯萎病的发生和蔓延, 这为利用植物内生细菌资源拓展绿色环保生物防治措施提供了新思路。

植物内生菌(Endophyte)是指在其生活史一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部不引起明显症状的微生物类群, 是植物微生态系统重要组成部分。内生菌与宿主植物经长期协同进化形成互惠互利的关系<sup>[5]</sup>。内生菌具有防病、固氮、溶磷、产植物激素(如 IAA)、产 ACC 脱氨酶、产铁载体、产挥发性有机物质(VOCs)、抑制病原菌、诱导系统抗性、促进植物生长和增强宿主抗逆性等生物学功能<sup>[6]</sup>, 内生菌资源也是植物病害生物防治的天然微生物资源库, 具有潜在的应用和开发价值。自 Stierle 等<sup>[7]</sup>从短叶紫杉(*Taxus breiofolia*)中发现产紫杉醇的内生真菌后, 有关植物内生菌的研究逐渐引起研究者的兴趣, 已成为近十年来微生物学、植物学、植物保护学、生态学等研究领域一大热点。豆科根瘤内蕴藏丰富的内生细菌资源<sup>[8-9]</sup>, 研究发现大豆根瘤内生细菌能产生抗菌类物质、水解酶类、抗生素等代谢产物<sup>[10]</sup>以及在培养基表面迅速形成生物膜, 溶解病原真菌细胞壁, 抑制其生长。所以大豆根瘤这一特殊微环境中丰富的内生细菌资源是研究生物防治剂的优良材料。但目前, 利用大豆根瘤内生细菌资源来防治棉花枯萎病的相关研究确实未见报道。在前期工作中, 课题组分离和保藏了采集自河南省部分地区的大豆根瘤内生细菌样品, 已分析其溶磷性<sup>[11]</sup>、ACC 脱氨酶活性<sup>[12]</sup>、烟草赤星病菌拮抗性<sup>[13]</sup>等特性, 鉴于此, 本试验拟通过对大豆根瘤内生细菌进行棉花枯萎病菌拮抗性筛选、鉴定和特性分析及盆栽防效试验, 初步探讨其抑菌机理, 为棉花枯萎病的生物防治提供菌种资源和科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料和培养基

植物病原菌: 棉花枯萎病菌 FO101(*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)由西北农林科技大学生命科学学院提供, 以菌核形式保藏在 PDA 试管斜面培养基<sup>[13]</sup>。

根瘤内生细菌: 2012 年 7-8 月采集自河南部分地区的大豆根瘤并分离获得。对采集的大豆根瘤, 经平板划线法对内生细菌进行分离、纯化、镜检, 将其在固体斜面 4 °C 短期保藏或甘油管于 -80 °C 冰箱长期保藏、备用。

棉花种子: “百朵大桃懒汉王”采购于河南省商丘市棉办农业技术服务部。

### 1.2 棉花枯萎病菌拮抗性内生细菌初筛

采用对峙平板培养法<sup>[14]</sup>。在无菌条件下, 将活化棉花枯萎病菌饼置于 PDA 平板中央, 置于培养箱中 30 °C 恒温培养 2 d。把 5 株不同内生细菌均匀接种菌饼周围在距平板边缘 2.5 cm 处, 放入 30 °C 恒温培养箱倒置培养 3 d, 以不接种内生细菌的病原菌菌落为对照(CK), 观察并测量培养基中受抑制棉花枯萎病菌落直径和对照菌落直径。每隔 24 h 测量 1 次, 连续测量 3 次, 依据抑菌率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)×100%/(对照菌落直径)<sup>[17]</sup>, 计算抑制率。

### 1.3 棉花枯萎病菌拮抗性内生细菌复筛

挑选初筛中抑菌率较高菌株进行复筛。与初筛方法基本类似, 在无菌条件下, 用打孔器取下棉花枯萎病菌菌饼, 置于 PDA 培养基中央, 待病原菌培养 2 d 后, 把初筛内生细菌制作成菌悬液( $OD_{600} \approx 1$ ), 用移液器吸取 30  $\mu$ L 菌悬液点接在距平板边缘 2.5 cm 处, 每个平板点接同一菌株 3 次。以接种等量无菌水的病原菌菌落为对照, 每处理

3个重复。30 °C 恒温倒置培养，每隔 24 h 观察并记录棉花枯萎病菌落和对照菌落直径变化。

#### 1.4 拮抗菌株代谢液抑菌活性测定

抑菌活性较高菌株接种到 YM 液体培养基<sup>[13]</sup>中，28 °C、130 r/min 恒温振荡培养 7 d 后，10000 r/min 离心 10 min 收集上清，再用 0.22 μm 细菌微孔滤膜过滤上清，滤液用于代谢产物活性测定。取 10 mL 滤液与 150 mL 灭菌冷却至 60 °C 的 PDA 培养基混合均匀制成平板，以添加等量无菌水代替滤液的平板为对照，将直径为 0.5 cm 生长旺盛的棉花枯萎病菌饼接种在平板中央。每个处理 3 次重复，置于 30 °C 恒温培养 5 d，测量处理和对照菌落直径，计算抑菌率。

#### 1.5 受抑制病原菌菌丝的显微观察

复筛中把受抑制作用较明显病原菌菌落培养 48 h 后，置于荧光倒置显微镜下观察病原菌菌丝和对照菌丝间的形态变化，拍照并记录结果。

#### 1.6 筛选菌株培养特征及生理生化测试

对筛选菌株进行菌落和细胞特性测定，方法参见文献[15]。

#### 1.7 16S rDNA 序列测定及系统发育分析

采用 CTAB 法提取内生细菌基因组 DNA，以此为模板进行 16S rDNA 扩增<sup>[2]</sup>，正向引物 P1：5'-CGGGATCCAGAGTTTGATCCTGGCTCAGAA CGAACGCT-3'，反向引物 P2：5'-CGGGATCCTAC GGCTACCTTGTTACGACTTCACCCC-3'，分别对应大肠杆菌(*Escherichia coli*) 16S rRNA 基因序列上 8–37 bp 和 1479–1506 bp 位置，目的片段大小约 1500 bp，获得序列提交 GenBank。使用 ClustalX 1.81 软件进行序列比对，Bioedit 4.8.4 进行手工纠正，使用 TRENCONW 软件以 Neighbor-Joining 方法构建系统发育树，用 Bootstrap 重复 1000 次进行可信度

评估，用 DNAMAN 6.0 软件进行序列相似性分析。

#### 1.8 拮抗性内生细菌耐盐碱性分析

筛选抑菌率较高菌株，采用比浊法测定大豆根瘤内生细菌在盐碱环境下生长规律以反应其盐碱抗性。将待测菌株接种至灭菌 YM 培养基中，置于恒温振荡培养箱中 130 r/min、30 °C 培养 3 d 后，将培养基在 10000 r/min 离心 10 min 弃上清，收集沉淀加入无菌蒸馏水调节 OD<sub>600</sub> 值至 0.8–1.0 的菌悬液，置于 4 °C 冰箱保存备用。配制 YM 培养基分装至 250 mL 三角瓶中，加入 NaCl，配制成 0、3%、4%、5% 和 6% (单位：g/mL) 5 个盐浓度梯度，灭菌后备用，以不加 NaCl 为对照。用 1 mol/L NaOH 调节终 pH 为 7、8、9、10 和 11 的培养基，以 pH 7 培养基为对照。每瓶接入定量菌悬液，置于 130 r/min、30 °C 条件下振荡培养，每 2 h 观察并测 OD<sub>600</sub>。以测得 OD<sub>600</sub> 值作纵坐标，培养时间(h)作横坐标，绘制该菌生长曲线。

#### 1.9 接种菌株对棉花枯萎病的防治效果试验

试验分为空白对照 CK (不接菌组) 和处理组 (接种内生细菌+病原真菌)。每个处理 6 盆，每盆 5 株，设 3 次重复。选择籽粒饱满“懒汉王”棉花种子，表面消毒后按每盆 5 粒播种于灭菌蛭石中，置于人工气候箱中保持一定温湿度。待棉花苗长至 2–3 叶时(约 7–8 cm)，活化内生细菌并制成菌悬液(浓度 6×10<sup>8</sup> CFU/mL)，每株 1 mL 浇灌幼苗根部。每株菌重复 3 次，每重复处理 5 株幼苗，置于 22–32 °C 保湿培养。接种内生细菌 2 d 后，采用切根灌注接种法<sup>[16]</sup>接种处理组，病原菌悬液孢子浓度为 1×10<sup>6</sup> 个/mL，置于 24–30 °C 保湿培养。第 1 次接种 3 周后每 7 d 统计植株的发病率、发病严重度和病情指数。严重程度分级标准：0 级，无病症，不致病，叶色油绿；1 级，1–2 片子叶边缘

发病,病斑微泛黄;2级,子叶及1片真叶局部发黄;3级,2片真叶发病或脱落仅剩心叶,叶色泛黄色枯萎症状明显;4级,植株生长点或全株枯萎,出现落叶。发病率(%)= $\sum$ 病株数/调查总株数 $\times$ 100;病情指数= $\sum$ (该级植株数 $\times$ 病害等级)/(调查植株数 $\times$ 最严重等级) $\times$ 100;防治效果(%)=[(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数] $\times$ 100。

利用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析。采用双因素随机方差分析(two-way ANOVA)和最小显著差数法(LSD)分析菌落直径和对照菌落直径对抑菌率的影响,显著性水平设定为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果和分析

### 2.1 拮抗性大豆根瘤内生细菌初筛

把 276 株大豆根瘤内生细菌采用对峙培养法

进行病原真菌拮抗性试验,初步筛选出对棉花枯萎病有拮抗作用的内生细菌共 61 株,其中抑菌率在 20%以上的有 27 株(表 1),占分离菌株的 9.78%。抑菌率最大者为菌株 DD165 (50.92%),其次为菌株 DD176,抑菌率为 49.69%;抑菌率最小菌株为 DD292 (21.79%)。因此,不同内生细菌菌株对棉花枯萎病菌的抑菌率不同。

### 2.2 拮抗性大豆根瘤内生细菌复筛

对初筛选出 27 株菌进行复筛,结果表明对棉花枯萎病菌抑菌率在 40%以上有 9 株(表 2)。

由表 2 可知,大豆根瘤内生细菌对棉花枯萎病菌抑菌率(72 h)均达到 50.08%以上,其中对病原菌抑制作用最明显菌株为 DD174,抑菌率为 62.48%。对棉花枯萎病菌抑制作用较不明显菌株为 DD006,其抑菌率仅为 50.08%。由此可见,

表 1. 棉花枯萎病菌拮抗性大豆根瘤内生细菌的初筛

Table 1. The first screening results of antagonistic endophytic bacteria isolated from soybean nodules against *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* FO101 (72 h, mean $\pm$ SD)

Endophytic bacteria	Colony diameter of pathogen/cm	Inhibition rate of endophytic bacteria/%	Endophytic bacteria	Colony diameter of pathogen/cm	Inhibition rate of endophytic bacteria/%
CK	4.91 $\pm$ 0.01	—	DD170	2.62 $\pm$ 0.01	46.64 $\pm$ 0.03i
DD165	2.41 $\pm$ 0.01	50.92 $\pm$ 0.01a	DD243	2.63 $\pm$ 0.02	46.44 $\pm$ 0.01j
DD176	2.47 $\pm$ 0.01	49.69 $\pm$ 0.02b	DD254	2.64 $\pm$ 0.01	46.23 $\pm$ 0.02k
DD174	2.51 $\pm$ 0.01	48.88 $\pm$ 0.01c	DD299	2.66 $\pm$ 0.01	45.82 $\pm$ 0.01l
DD044	2.53 $\pm$ 0.02	48.47 $\pm$ 0.02d	DD065	2.70 $\pm$ 0.02	45.01 $\pm$ 0.03m
DD006	2.54 $\pm$ 0.01	48.27 $\pm$ 0.01e	DD134	2.71 $\pm$ 0.01	44.81 $\pm$ 0.03n
DD190	2.55 $\pm$ 0.01	48.07 $\pm$ 0.02f	DD281	2.73 $\pm$ 0.01	44.40 $\pm$ 0.03o
DD179	2.56 $\pm$ 0.02	47.86 $\pm$ 0.03g	DD199	2.83 $\pm$ 0.01	42.36 $\pm$ 0.02p
DD166	2.56 $\pm$ 0.01	47.86 $\pm$ 0.03g	DD252	3.85 $\pm$ 0.02	41.96 $\pm$ 0.03q
DD210	2.56 $\pm$ 0.01	47.86 $\pm$ 0.03g	DD280	3.87 $\pm$ 0.01	41.55 $\pm$ 0.01r
DD060	2.56 $\pm$ 0.01	47.86 $\pm$ 0.03g	DD222	3.32 $\pm$ 0.02	32.38 $\pm$ 0.01s
DD161	2.61 $\pm$ 0.02	46.84 $\pm$ 0.02h	DD189	3.41 $\pm$ 0.01	30.55 $\pm$ 0.03t
DD201	2.61 $\pm$ 0.01	46.84 $\pm$ 0.02h	DD312	3.81 $\pm$ 0.01	22.40 $\pm$ 0.01u
DD303	2.62 $\pm$ 0.01	46.64 $\pm$ 0.03i	DD292	3.84 $\pm$ 0.01	21.79 $\pm$ 0.01v

CK: control. Different lowercase letters in the same column showed significant difference at 0.05 levels. The same as below.

表 2. 大豆根瘤内生细菌对棉花枯萎病菌抑制作用的复筛结果

Table 2. The second screening results of antagonistic endophytic bacteria from soybean nodules against *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Endophytic bacteria	<sup>1</sup> Colony diameter of pathogen/cm	<sup>1</sup> Inhibition ratio of endophytic bacteria/%	<sup>2</sup> Colony diameter of pathogen/cm	<sup>2</sup> Inhibition ratio of endophytic bacteria/%	<sup>3</sup> Colony diameter of pathogen/cm	<sup>3</sup> Inhibition ratio of endophytic bacteria/%
CK	3.67±0.02	—	5.01±0.03	—	6.53±0.01	—
DD174	2.42±0.01	34.06±0.01a	2.53±0.01	49.50±0.01a	2.45±0.02	62.48±0.01a
DD166	2.55±0.02	30.52±0.03b	2.55±0.01	49.10±0.02b	2.48±0.01	62.02±0.01b
DD176	2.55±0.02	30.52±0.03b	2.65±0.02	47.11±0.03c	2.51±0.03	61.56±0.08c
DD179	2.61±0.01	28.88±0.05c	2.61±0.01	47.90±0.02d	2.53±0.01	61.26±0.02d
DD165	2.41±0.01	34.33±0.02d	2.61±0.01	47.90±0.01d	2.56±0.01	60.80±0.01e
DD170	2.87±0.01	21.80±0.04e	2.81±0.01	43.91±0.02e	2.86±0.02	56.20±0.01f
DD044	2.43±0.02	33.79±0.01f	2.82±0.03	43.71±0.02f	2.87±0.01	56.05±0.03g
DD281	2.81±0.01	23.43±0.03g	2.85±0.01	43.11±0.01g	2.98±0.02	54.36±0.01h
DD006	2.43±0.03	33.79±0.03f	2.67±0.01	46.71±0.02h	3.26±0.01	50.08±0.02i

<sup>1</sup>: inoculation for 24 hours; <sup>2</sup>: inoculation for 48 hours; <sup>3</sup>: inoculation for 72 hours; CK: contrast without inoculation. Data were presented as mean±SD, different lowercase letters in the same column showed significant difference at 0.05 levels.

进一步印证不同大豆根瘤内生细菌对棉花枯萎病菌抑制作用存在差异, 并且培养 72 h 抑菌效果最佳。

在复筛过程中, 菌株 DD174、DD166 对病原菌抑制现象如图 1 所示。随时间延长对照组病菌菌落(图 1-A)逐渐变大, 但处理组病菌菌落变化却不明显。

### 2.3 拮抗菌株代谢液活性

根据平板复筛结果, 对复筛菌株抑菌率在 60% 以上的 5 株菌进行代谢液抑制病原菌活性试

验(表 3)。结果表明, 代谢液处理病原菌生长 24 h 最大抑制率为 34.15%, 其他菌株抑菌率均在 26.56% 以上; 培养 48 h 时最大抑菌率为 56.84%, 其他菌株在 37.30% 以上; 培养 72 h 最大抑菌率为 64.06%, 其他菌株在 60.98% 以上。不同菌株间代谢液对病原菌抑菌率呈极显著差异( $P < 0.01$ )。由此可见, 内生细菌代谢液对病原菌是逐步发挥抑菌作用, 在培养 72 h 时抑制效果较好。与复筛抑制效果基本一致, 进一步印证大豆根瘤内生细菌对棉

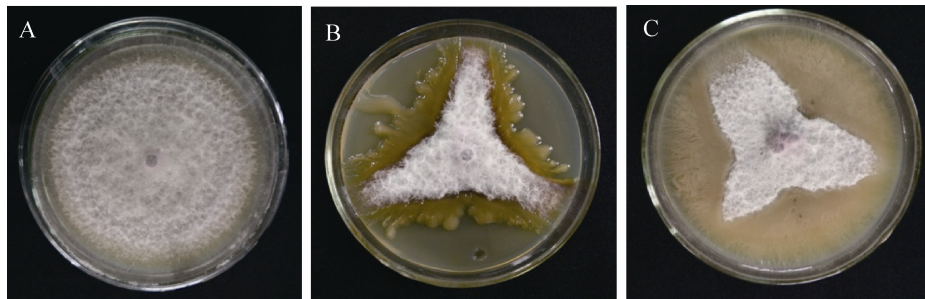


图 1. 菌株 DD174 与 DD166 对棉花枯萎病菌的抑制作用

Figure 1. Inhibition effect of endophytic bacteria against *F. oxysporum* f. sp. *Vasinfectum* (72 h). A: CK; B: DD174; C: DD166.

表 3. 复筛菌株代谢液对棉花枯萎病菌的拮抗作用

Table 3. The inhibitory effect of metabolic liquid from second screened endophytic bacteria against *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Endophytic bacteria	<sup>1</sup> Colony diameter of pathogen/cm	<sup>1</sup> Inhibition ratio of endophytic bacteria/%	<sup>2</sup> Colony diameter of pathogen/cm	<sup>2</sup> Inhibition ratio of endophytic bacteria/%	<sup>3</sup> Colony diameter of pathogen/cm	<sup>3</sup> Inhibition ratio of endophytic bacteria/%
CK	3.69±0.03	—	5.12±0.01	—	6.51±0.02	—
DD174	2.43±0.01	34.15±0.01A	2.21±0.01	56.84±0.01A	2.34±0.01	64.06±0.01A
DD166	2.54±0.01	31.17±0.01B	2.34±0.01	54.30±0.02B	2.38±0.01	63.44±0.01B
DD176	2.48±0.01	32.79±0.02C	3.12±0.02	39.06±0.01C	2.43±0.01	62.67±0.03C
DD179	2.62±0.01	29.00±0.01D	3.17±0.01	38.09±0.01D	2.51±0.01	61.44±0.01D
DD165	2.71±0.01	26.56±0.02E	3.21±0.01	37.30±0.01E	2.54±0.01	60.98±0.01E

CK: control without metabolic liquid; <sup>1</sup>: cultured for 24 h; <sup>2</sup>: cultured for 48 h; <sup>3</sup>: cultured for 72 h. Different capital letters in the same column showed significant difference at  $P < 0.01$  levels.

花枯萎病菌的抑制作用主要是通过菌体产生胞外代谢物在发挥作用。

## 2.4 受抑制病原菌菌丝的显微观察

荧光显微镜显微观察结果(图 2)表明,棉花枯萎病菌对照组菌丝(图 2-A)挺直、粗细均匀、颜色一致;而处理组受内生细菌 DD174 作用的菌丝畸形、粗细不一,细胞壁消失,出现自溶现象、局部发生断裂(图 2-B-a);受 DD179 作用菌丝也呈现畸形,菌丝旋转扭结(图 2-C-b),菌丝末端细胞壁溶解、菌丝变得透明、粗细不均一(图 2-C-c);DD176 作用菌丝基

部加粗,分支增多,呈现树根状(图 2-D-d);DD166 作用菌丝被内生菌形成的生物膜包埋并使菌丝溶解、断裂(图 2-E-e);DD165 沿菌丝形成菌苔,固定菌丝于培养基表面,菌丝末端出现膨大呈球形(图 2-F-f),且菌丝逐渐被溶解、断裂(图 2-F-g)。

## 2.5 筛选菌株的培养特征及生理生化特性

筛选菌株经过 72 h 培养,菌落及菌体特征见图 3、表 4。菌落多数呈现乳白色、不透明、正反面颜色一致。其中 DD176、DD165 菌落较湿润。理化试验结果表明,5 株菌对接触酶、V-P 试验、

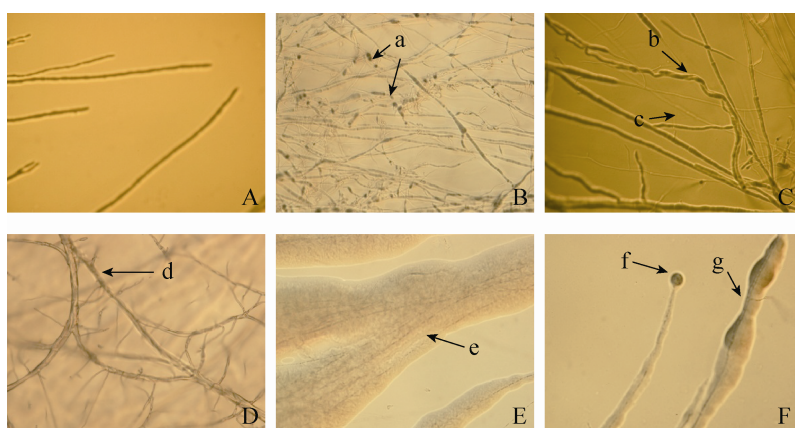


图 2. 大豆根瘤内生细菌对棉花枯萎病菌抑制作用时菌丝变化

Figure 2. Microscopic photography of inhibited hyphae of *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (72 h,  $\times 200$ ). A: control; B: DD174; C: DD179; D: DD176; E: DD166; F: DD165.

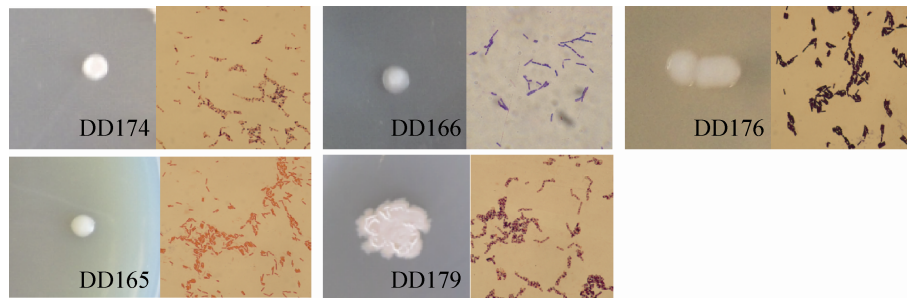


图 3. 筛选菌株菌落形态及菌体显微照片

Figure 3. Colony morphology and microscopic photography of screened strains.

表 4. 筛选菌株的理化特性

Table 4. Physiological and biochemical characteristics of screened strains

Physiological and biochemical characteristics	DD174	DD166	DD176	DD179	DD165
Catalase test	+	+	+	+	+
V-P test	+	+	+	+	+
D-glucose acid yield	+	+	+	+	-
L-Arab sugar acid yield	-	-	-	-	-
D-mannitol	-	+	+	+	+
Xylose	-	+	+	-	+
Broth (pH 5.0)	+	+	+	+	+
Amylase	+	+	-	+	+
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-
Lecithinase	+	+	-	+	+
Nitrate reductase	+	+	-	+	-
Casein decomposition	+	+	+	+	+
Citrate utilization	+	+	-	+	+
Tyrosine hydrolysate	+	+	-	+	+
Morphology	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Strain size/ $\mu\text{m}$	$1.0 \times (3.0-4.0)$	$1.0 \times (2.0-4.0)$	$1.0 \times (2.0-3.0)$	$1.0 \times (2.0-3.0)$	$0.25 \times (1.0-2.0)$
Gram stain	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>+</sup>	G <sup>-</sup>
Spore forming	+	-	+	+	-

+: positive; -: negative.

D-葡萄糖产酸、肉汤、酪素分解反应都呈阳性；  
对 L-阿拉伯糖产酸、苯丙氨酸脱氢酶反应均为阴性；  
D-甘露醇反应除 DD174 外其余菌株反应均为阳性；

木糖反应除 DD174、DD179 外其他菌株反应为阳性；  
淀粉酶、卵黄磷脂酶、柠檬酸盐利用反应除 DD176 外其余菌株为阳性；  
硝酸还原酶、酪氨酸水

解反应除 DD176、DD165 外其余菌株反应为阳性。菌体均为杆状,大小为(0.25–1.00)  $\mu\text{m}$  × (2.0–4.0)  $\mu\text{m}$ 。经革兰氏染色 DD165 为阴性,其他为阳性;除 DD166、DD165 外,其余菌株都有芽孢。结合菌体培养特征和生理生化反应特征,DD174、DD176、DD179 符合芽孢杆菌属(*Bacillus*)特征,DD165、DD166 符合寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)特征。

## 2.6 筛选菌株 16S rDNA 序列测定及系统发育分析

对 5 株菌的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,16S rDNA 序列片段大小均为 1.5 kb,将所得序列提交 GenBank,获序列号为:KR822264、KF843715、KT216617、KT216618、KT216620。菌株间同源性分析(表 5)可知,这 5 株棉花枯萎病菌拮抗性较强内生细菌 16S rDNA 序列与 GenBank 中已报道相关菌株 16S rDNA 序列相似性均在 99.7%以上。整个系统发育树(图 4)分为 2 个分支,菌株 DD174、DD176 和 DD179 位于分支 I(芽孢杆菌属 *Bacillus*),其中 DD174 与模式株海洋沉淀芽孢杆菌 *Bacillus oceanisediminis* H2<sup>T</sup>(GQ292772)具有最大相似率(99.8%);DD176、DD179 与模式株苏云金芽孢杆菌 *Bacillus thuringiensis* ATCC 10792<sup>T</sup>(AF290545)均有最大相似率(100%)。DD165 与 DD166 在系统发育树上属于分支 II(寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*),且与

*Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958<sup>T</sup>(X95923)均具有最高相似率(99.7%)。结合菌体培养特征、生理生化反应特征及系统发育分析,菌株 DD174 最类似于 *B. oceanisediminis*,DD176、DD179 最类似于 *B. thuringiensis*,DD165、DD166 最类似于 *S. maltophilia*。因此,棉花枯萎病大豆根瘤内生拮抗细菌具有一定种属多样性。

## 2.7 大豆根瘤内生细菌对盐碱抗性测定

结合复筛和代谢液抑菌效果,选取 DD174 进行盐碱抗性试验。从 DD174 抗盐生长曲线(图 5)可知,随着盐浓度升高,菌株生长潜伏期不断增长,在盐浓度为 0%时延迟期最短(8 h),盐浓度为 6%时延迟期最长(30 h);到达平稳期 OD 值随盐浓度升高逐渐减小,所有盐浓度在培养至 58 h 开始进入衰亡期。可见,此菌株在 6%盐浓度下也能生长,具有一定抗性。

抗碱生长规律曲线(图 6)表明,pH 9 时菌株延滞期最短(10 h),pH 7、8 时菌株延滞期为 12 h;pH 10 时菌株延滞期为 16 h,对数期(15 h)之后进入平稳期,OD 值在 0.8–1.0 之间,生长良好;在 pH 值达到 11 时菌株不再生长。可见,在一定碱性环境中内生菌可能产生某些物质调节生长环境的 pH 值,使其自身适合生长。因此,菌株 DD174 具有一定耐碱性。

表 5. 测序菌株的同源性分析

Table 5. Homology analysis of the sequenced strains

Strain	Genus affiliation	Accession No. of 16S rDNA sequence	The most closet match	Similarity/%
DD165	<i>Stenotrophomonas</i>	KR822264	<i>S. maltophilia</i> LMG 958 <sup>T</sup> (X95923)	99.7
DD166	<i>Stenotrophomonas</i>	KT216620	<i>S. maltophilia</i> LMG 958 <sup>T</sup> (X95923)	99.7
DD174	<i>Bacillus</i>	KT216617	<i>B. oceanisediminis</i> H2 <sup>T</sup> (GQ292772)	99.8
DD176	<i>Bacillus</i>	KF843715	<i>B. thuringiensis</i> ATCC 10792 <sup>T</sup> (AF290545)	100
DD179	<i>Bacillus</i>	KT216618	<i>B. thuringiensis</i> ATCC 10792 <sup>T</sup> (AF290545)	100



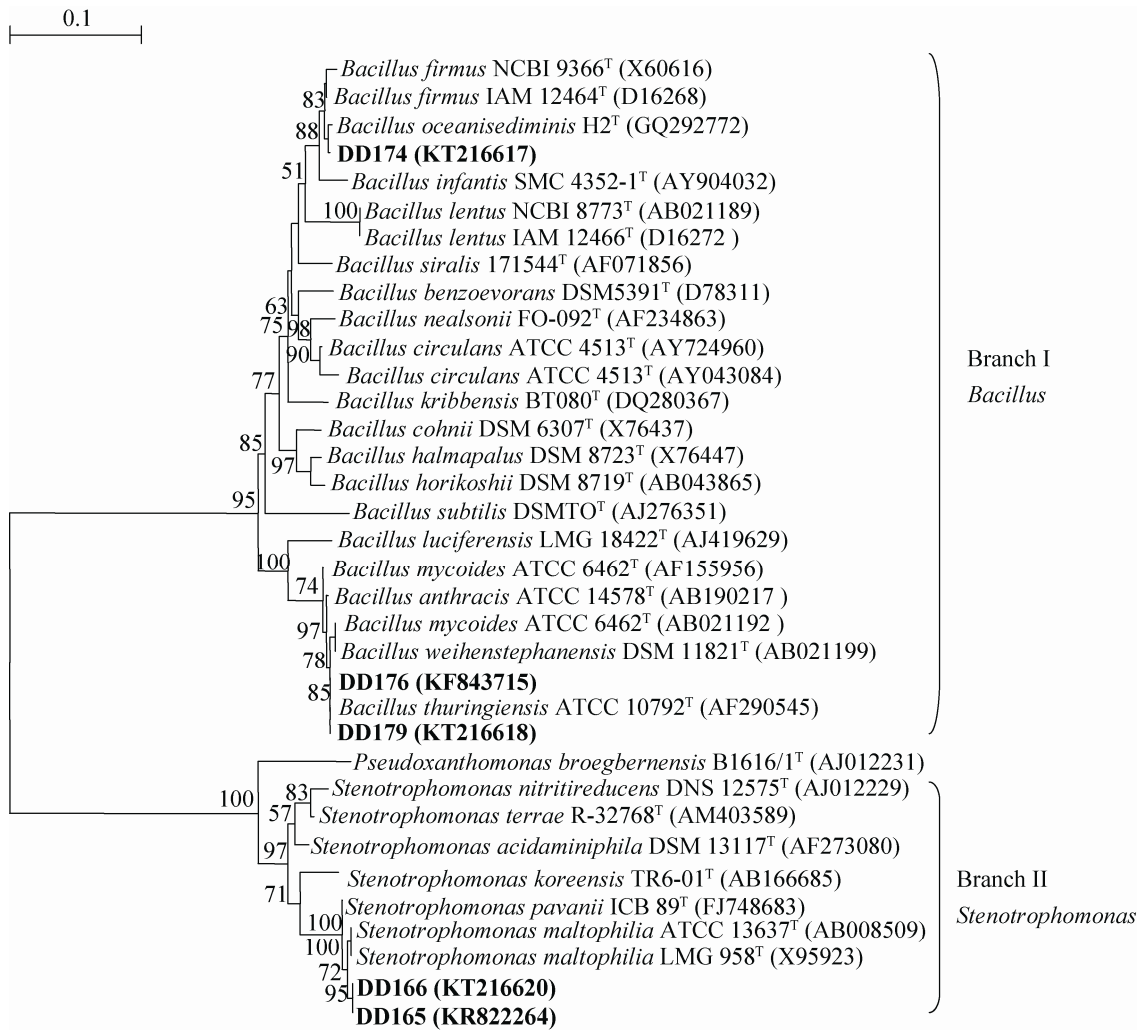


图 4. 筛选菌株 16S rDNA 序列系统发育树

Figure 4. Phylogenetic tree generated by the neighbor-joining method based on 16S rDNA sequences of selected strains. Bootstrap values (1000 replicates) above 50% are indicated above the branches. Strains tested are labeled in bold. Scale bar indicates 0.1% substitution of nucleotide.

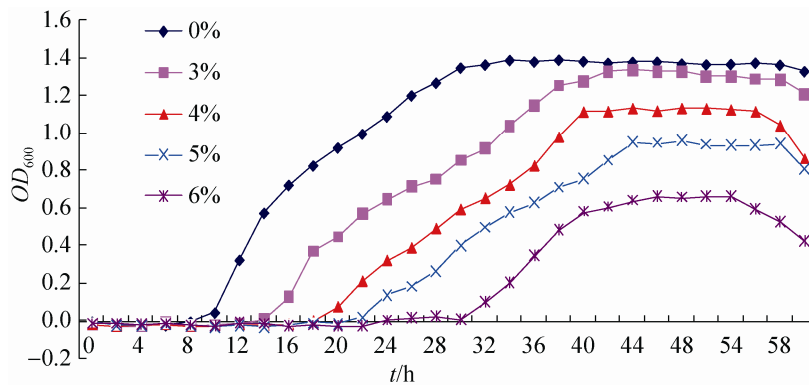


图 5. 内生细菌 DD174 的抗盐生长曲线

Figure 5. The salt resistant growth curve of endophytic strain DD174 from soybean root nodule.

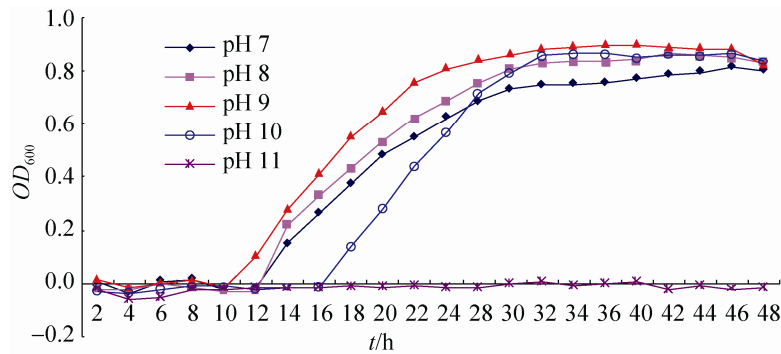


图 6. 大豆根瘤内生细菌 DD174 的抗碱生长曲线

Figure 6. Alkali resistant growth curve of endophytic strain DD174 from soybean root nodule.

### 2.8 接种拮抗性内生细菌对棉花枯萎病的防病效果

盆栽试验表明, 接种 4 周时对照组出现明显病状, 叶色大面积发灰绿, 叶片边缘出现不规则干枯, 沿叶脉向叶片内部延伸, 严重者叶片脱落, 发病率为 86.28%。而内生细菌处理组, 只有部分叶片的接种点变黄, 整片也仍然为绿色, 发病程度相对 CK 较轻。由表 6 可知, 菌株 DD174 和 DD166 处理植株整体上发病率和病情指数均降低, 植株发病率均小于 33%, 防治效果均在 74% 以上。另外, DD174 处理植株叶片绿色, 逐步正常, 病斑面积不再扩大, 生长趋正常; DD165 处理植株部分叶片局部感病处发黄, 病斑处出现枯

死。而对照组叶片边缘大面积变灰绿、泛黄, 枯萎面积扩大, 植株生长受到严重影响。整体上, 拮抗性内生细菌处理组病情指数和防治效果与对照相比达极显著 ( $P < 0.01$ ), 因此, 可作为棉花枯萎病的生防菌株资源。

### 3 讨论

利用植物内生细菌来抑制植物病原微生物进行生物防治国内外已开展许多研究<sup>[2,6,17-20]</sup>, 但从豆科植物特殊组织——根瘤中筛选病原菌拮抗性菌株的研究较为少见<sup>[13]</sup>, 这些研究为棉花枯萎病生物防治提供了新思路和借鉴。本研究从大豆根瘤中分离 276 株内生细菌, 经复筛和代谢液试验, 有 5 株对棉花枯萎病菌具较强拮抗作用, 其中 DD174 最大抑制率(72 h)为 64.06%, 但 DD165 抑制率为 60.98%, 进一步说明不同根瘤内生细菌对病原菌抑制作用不同, 也证明内生细菌产生代谢液中包含代谢物质能有效抑制病原菌菌丝的生长和发育。本研究结果与易龙<sup>[14]</sup>、Fernando<sup>[17]</sup>试验结果类似, 内生细菌 Itb62 无菌滤液对烟草赤星病菌丝生长有很强抑制作用; 镜检发现菌丝形态受到明显影响, 菌丝膨大呈结节状, 成畸形菌丝, 并且破裂、消解。盆栽防病试验表明防治效果为

表 6. 拮抗性内生细菌在苗期对棉花枯萎病防治效果

Table 6. The control efficiency of antagonistic endophytic bacteria against *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Strains	Incidence/%	Disease index	Control efficacy/%
CK	86.28±0.01A	64.51±0.01A	/
DD174	27.66±0.01B	16.19±0.01B	76.32±0.01A
DD166	32.82±0.01C	18.66±0.01C	74.74±0.01B
DD176	37.22±0.01D	19.52±0.01D	67.58±0.01C
DD179	39.34±0.01E	22.15±0.01E	64.96±0.01D
DD165	39.78±0.01F	23.43±0.01F	62.46±0.01E

The data are mean±SD. Different uppercase letters in the same column show significant difference at  $P < 0.01$  level.

52.3%–75.8%<sup>[13]</sup>。而本研究盆栽防治效果最佳菌株 DD174 达 76.32%，其余 4 株防治效果均在 62% 以上，和易龙等研究基本一致。但菌体代谢物中发挥抑制作用的具体成分我们正进一步研究。

芽孢杆菌(*Bacillus*)对环境具有较强适应性，是最普遍被报道的植物生长促生根际细菌，能产生多种次生代谢产物，如多肽类物质、多种胞外水解酶和抗菌物质(Mycosubtilin、iturins、fengymycin、subsporin、bacilysin、fungistatin)等，是枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌广泛抑制病原真菌的主要成分，对棉花枯萎病菌有较强拮抗作用<sup>[21]</sup>。本试验中筛选抑菌性较强菌株 DD174、DD176 和 DD179 最相似菌株均为芽孢杆菌属(*Bacillus*)。产生的抗菌类物质分解消融病原菌细胞壁<sup>[22]</sup>，导致原生质在菌丝末端外溢形成原生质球、破裂，对病原菌菌丝发挥较强抑菌作用<sup>[23]</sup>。本结果与林玲等<sup>[4]</sup>报道相一致，分离自棉花根部的枯萎病拮抗性内生菌中，芽孢杆菌属菌株属于优势种群。在逆境中能产生特殊休眠结构——芽孢，有助于该类细菌在高温、盐碱和干旱等不良环境中长期存在。在不利环境中芽孢杆菌能形成聚羟基烷酸酯，在缺少元素情况下能够争夺周围更多的元素供应给植物体。这些特性有力支持了本试验盐碱抗性试验结果，DD174 可耐受 6% 盐浓度和 pH 10 碱，具有一定耐盐碱性。此外，DD174 盆栽防治效果为 76.32%，这与易龙<sup>[24]</sup>、Leite<sup>[25]</sup>等结论相一致，盆栽试验使用芽孢杆菌属内生菌处理烟草植株，对烟草赤星病防治效果为 75.18%；短小芽孢杆菌 AR03 的无菌滤液能有效地抑制烟草赤星病菌菌丝生长，菌丝隔间变短、肿胀且集结成团，内含物聚集，菌丝顶端生长膨大畸形，减少孢子萌发或产生畸形芽管。前期试验结果<sup>[14]</sup>表明，大豆根瘤内生细菌 DD174 作用于植物病原菌烟草赤星，

菌丝变成结节状，菌丝末端逐渐变细且有斑点、相互缠绕；分离自野生艾蒿的芽孢杆菌属菌株 S11 对棉花枯萎病菌有抑制作用，导致菌丝发生畸形扭曲。因此，DD174 具有一定耐盐碱性和较强生物防治活性，是潜在的作物病害生防资源。

寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)对真菌性植物病菌都有潜在的生物控制作用，大多数菌株具有抗真菌活性和超常水解活性，因其可产生新的抗真菌化合物 maltophilin、xanthobaccin<sup>[26]</sup>、挥发性有机化合物(VOCs)<sup>[27]</sup>、多样化蛋白酶、几丁质酶、葡聚糖酶、酯酶和漆酶等<sup>[28]</sup>。这些酶类水解病原真菌细胞壁，菌丝因缺乏机械强度弯曲、畸形，末端膨大变形，原生质浓缩，最终导致其死亡；此外，可激发宿主防御机制<sup>[29]</sup>。本试验与 DD165、DD166 最相似菌株为嗜麦芽寡养单胞菌(*S. maltophilia*)，对棉花枯萎病菌的抑制率在 60% 以上，盆栽防治效果在 62% 以上。前期试验已表明<sup>[11]</sup>，大豆根瘤内生细菌 DD299 (*S. maltophilia*) 接种水稻苗整体上发病率和病情指数均明显降低，防治效果在 66% 以上，均证实大豆根瘤内生细菌中嗜麦芽寡养单胞菌具有防治病原真菌的潜能。本研究与 Jha 等<sup>[30]</sup>报道相一致，水稻根部的嗜麦芽寡养单胞菌不仅对稻瘟病菌抑制效果明显，且能促进水稻生长。复筛结果表明，随培养时间延长对照组病菌菌落逐渐变大，但处理组病原菌菌落变化却不明显，这可能是由于内生菌 DD165、DD166 生长速度快，在培养基表面迅速形成生物薄膜(biofilm)，能更好地适应周围生存环境，占据营养空间，具更强抗逆性<sup>[31]</sup>和降解能力，导致病原真菌因缺乏营养而生长受抑制<sup>[32]</sup>；另外，对棉花枯萎病菌菌丝进行包埋、物理粘附或机械阻碍，并产生次生代谢产物，对病原菌菌丝可能产生抑制作用，是潜在的植物病原菌生防资源。目前，未见

关于大豆根瘤内生细菌抑制棉花枯萎病菌的相关报道,但其大田应用还有待进一步试验研究。

## 4 结论

本研究有 5 株内生细菌对棉花枯萎病菌具较强拮抗作用。内生细菌作用棉花枯萎病菌,引起菌丝发生畸形、细胞壁消失、自溶,菌丝基部加粗、分支增多,呈树根状;菌丝被菌苔包埋而溶解、断裂,菌丝末端球形膨大。对病原菌抑制作用主要通过菌体产生的胞外代谢物发挥作用。筛选 5 株内生细菌属于 2 个属,即 *Bacillus*、*Stenotrophomonas*。DD174 具较强耐盐碱能力,对棉花枯萎病防治效果达 76.32%,其余 4 株防治效果均在 62%以上,可作为棉花枯萎病的生防菌株资源。筛选大豆根瘤内棉花枯萎病菌拮抗性菌株,为发掘和应用抗逆、防病优良菌株提供理论基础。

## 参考文献

- [1] Shapulatov UM, Buriev ZT, Ulloa M, Saha S, Devor EJ, Ayubov MS, Norov TM, Shermatov SE, Abdurakimov A, Jenkins JN, Abdurakhmonov IY. Characterization of small RNAs and their targets from *Fusarium oxysporum* infected and noninfected cotton root tissues. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, 34(3): 698–706.
- [2] Pereg L, McMillan M. Scoping the potential uses of beneficial microorganisms for increasing productivity in cotton cropping systems. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 80: 349–358.
- [3] Li CH, Deng YY, Zhao MW, Tang CM, Li SP, Lv HW. Population dynamics and antagonism toward *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Verticillium dahliae* Kleb of endophytic bacteria from cotton. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(9): 1196–1202. (in Chinese)  
李春宏, 邓渊钰, 赵明文, 唐灿明, 李顺鹏, 吕海伟. 棉花内生细菌数量动态及其对棉花黄、枯萎病菌的拮抗作用. *微生物学报*, 2009, 49(9): 1196–1202.
- [4] Lin L, Wang MJ, Zhou YJ. Diversity analysis of culturable endophytic bacteria with antagonistic activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* or *Verticillium dahliae* from the roots of *Gossypium hirsutum*. *Cotton Science*, 2015, 27(2): 166–175. (in Chinese)  
林玲, 王明江, 周益军. 棉花根部拮抗枯萎病菌或黄萎病菌的可培养内生细菌多样性分析. *棉花学报*, 2015, 27(2): 166–175.
- [5] Rajendran G, Sing F, Desai AJ, Archana G. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp.. *Bioresource Technology*, 2008, 99(11): 4544–4550.
- [6] Rosenblueth M, Martínez-Romero E. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(8): 827–837.
- [7] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, 260(5105): 214–216.
- [8] Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 2004, 6(12): 1244–1251.
- [9] De Meyer SE, De Beuf K, Vekeman B, Willems A. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 83: 1–11.
- [10] Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 4951–4959.
- [11] Zhao LF, Xu YJ, Cao DJ, Li Y, Li JJ, Lü JM, Zhu ZY, Qin SS, He XL. Screening, resistance, phylogeny and growth promoting of phosphorus solubilizing bacteria isolated from soybean root nodules. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(13): 4425–4435. (in Chinese)  
赵龙飞, 徐亚军, 曹冬建, 李源, 厉静杰, 吕佳萌, 朱自亿, 秦珊珊, 贺学礼. 溶磷性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其系统发育和促生. *生态学报*, 2015, 35(13): 4425–4435.
- [12] Zhao LF, Xu YJ, Chang JL, Li M, Zhang YL, Dang YJ, Wang MS, Cheng YW, Zhang BY. Screening, resistance and growth-promoting effect of endophytic bacteria with ACC deaminase activity isolated from soybean nodules. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(6): 1009–1021. (in Chinese)  
赵龙飞, 徐亚军, 常佳丽, 李敏, 张艳玲, 党永杰, 王梦思, 程亚稳, 张斌月. 具 ACC 脱氢酶活性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其促生作用. *微生物学报*, 2016, 56(5): 1009–1021.

- [13] Zhao LF, Xu YJ, Hou YT, Zou YH, Li YN, Yang ZH, Li XY, Zhang MY. Screening and inhibition of antagonistic endophytic bacteria isolated from soybean (*Glycine max*) nodules against *Alternaria longipes*. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2016, 27(5): 1560–1568. (in Chinese)  
赵龙飞, 徐亚军, 侯怡婷, 邹艳慧, 李亚楠, 杨志华, 李小雨, 张梦瑶. 烟草赤星病菌拮抗性大豆根瘤内生菌的筛选及抑制作用. *应用生态学报*, 2016, 27(5): 1560–1568.
- [14] Yi L, Xiao CG, Ma GH, Wang WN, Long LK. Inhibition and screening of beneficial endophytic bacteria to control tobacco brown spot. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(1): 19–22. (in Chinese)  
易龙, 肖崇刚, 马冠华, 王万能, 龙良鲲. 防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用. *微生物学报*, 2004, 44(1): 19–22.
- [15] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001.
- [16] 方中达. 植病研究方法. 第 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [17] Fernando WGD, Ramarathnam R, Krishnamoorthy AS, Savchuk SC. Identification and use of potential bacterial organic antifungal volatiles in biocontrol. *Soil Biology and Biochemistry*, 2005, 37(5): 955–964.
- [18] Maldonado-González MM, Prieto P, Ramos C. From the root to the stem: interaction between the biocontrol root endophyte *Pseudomonas fluorescens* PICF7 and the pathogen *Pseudomonas savastanoi* NCPPB 3335 in olive knots. *Microbial Biotechnology*, 2013, 6(3): 275–287.
- [19] Gond SK, Bergen MS, Torres MS, White JF Jr. Endophytic *Bacillus* spp. produce antifungal lipopeptides and induce host defence gene expression in maize. *Microbiological Research*, 2015, 172: 79–87.
- [20] Santoyo G, Moreno-Hagelsieb G, Orozco-Mosqueda MDC, Glick BR. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 2016, 183: 92–99.
- [21] Cawoy H, Debois D, Franzil L, De Pauw E, Thonart P, Ongena M. Lipopeptides as main ingredients for inhibition of fungal phytopathogens by *Bacillus subtilis/amyloliquefaciens*. *Microbial Biotechnology*, 2015, 8(2): 281–295.
- [22] Guo QG, Dong WX, Li SZ, Lu XY, Wang PP, Zhang XY, Wang Y, Ma P. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*, 2014, 169(7/8): 533–540.
- [23] Yáñez-Mendizábal V, Zerriouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, Pérez-García A, Teixidó N. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. *European Journal of Plant Pathology*, 2012, 132(4): 609–619.
- [24] Yi L, Ma GH, Yang SY, Xiao CG. Identification of the antagonistic *Bacterium* Ata 28 and its inhibition of tobacco brown spot. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2007, 29(3): 100–103. (in Chinese)  
易龙, 马冠华, 杨水英, 肖崇刚. 拮抗菌 Ata 28 对烟草赤星病菌的抑制及种类鉴定. *西南大学学报(自然科学版)*, 2007, 29(3): 100–103.
- [25] Leite HAC, Silva AB, Gomes FP, Gramacho KP, Faria JC, de Souza JT, Loguercio LL. *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(6): 2639–2651.
- [26] Nakayama T, Homma Y, Hashidoko Y, Mizutani J, Tahara S. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(10): 4334–4339.
- [27] Wheatley RE. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2002, 81(1): 357–364.
- [28] Galai S, Limam F, Marzouki MN. A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase. Use in decolorization of synthetic dyes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 158(2): 416–431.
- [29] Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, van der Lelie D, Dow JM. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(7): 514–525.
- [30] Jha Y, Subramanian RB. Root associated bacteria from the rice antagonizes the growth of *Magnaporthe grisea*. *Journal Plant Pathology & Microbiology*, 2013, 4(2): 1000164.
- [31] Scher K, Romling U, Yaron S. Effect of heat, acidification, and chlorination on *Salmonella enterica* serovar typhimurium cells in a biofilm formed at the air-liquid interface. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(3): 1163–1168.
- [32] Vitullo D, Di Pietro A, Romano A, Lanzotti V, Lima G. Role of new bacterial surfactins in the antifungal interaction between *Bacillus amyloliquefaciens* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathology*, 2012, 61(4): 689–699.

# Screening endophytic bacteria from soybean root nodules to inhibit *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*

Longfei Zhao<sup>1\*</sup>, Yajun Xu<sup>1</sup>, Jiali Chang<sup>2</sup>, Quanfen Li<sup>1</sup>, Jingya Yang<sup>1</sup>, Qifan Ou<sup>1</sup>, Mengran Yang<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions of Henan, College of Life Sciences, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, Henan Province, China

<sup>2</sup> Division of Water Environment, College of Environment, Tsinghua University, Beijing 100084, China

**Abstract:** [Objective] Using desirable strain resources to control *Fusarium* wilt of cotton is an effective way. This study aimed to acquire antagonistic endophytic bacteria from soybean nodules, explore their inhibition mechanism and strain characteristics. [Methods] Confrontation and metabolic liquid culture methods were adopted to screen endophytic bacteria from soybean nodules against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. The effect of screened strains on pathogen hyphae changes were analyzed with microscopic observation method. Combined with cultural, physical and chemical characteristics, 16S rDNA sequencing results and homology analysis of screened strains, phylogenetic status were determined. Disease-control effects were demonstrated by greenhouse inoculation test. [Results] Five strains of endophytes have inhibitory effect by the second screening and metabolic liquid test. Pathogen hyphae treated with endophytes became deformity, its cell wall disappeared, autolysis, bold at the base of the mycelium, branches increased and root shape appeared. Hyphae were embedded, dissolved and fractured by lawn formed by endophytic bacteria, and presented spherical expansion of its terminal. The inhibition of endophytic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* was mainly caused by extracellular metabolites. DD174, DD176 and DD179 were similar to *Bacillus oceanisediminis* H2<sup>T</sup>(GQ292772) and *B. thuringiensis* ATCC 10792<sup>T</sup>(AF290545), respectively. DD165 and DD166 were similar to *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 958<sup>T</sup>(X95923). DD174 tolerated 6% salt concentration and grew well at pH 10. Control effect of treatment group with DD174 was 76.32%, those of others were above 62%, so these strains can be used as biocontrol resources against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. [Conclusion] Endophytic antagonistic bacteria inhabited soybean root nodules against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, soybean nodule endophytes, antagonistic effect, 16S rDNA, phylogenetic analysis

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (U1204301), by the University Key Scientific Research Project of Henan Province (17A180011) and by the National Innovation Experiment Program for University Students (201610483021)

\*Corresponding author. Tel: +86-370-3057892; Fax: +86-370-2595979; E-mail: hnzhaolongfei@163.com

Received: 12 October 2016; Revised: 1 December 2016; Published online: 19 January 2017