

网络出版日期:2017-10-18
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20171018.1733.032.html>

高寒草地牧草内生细菌 262AG6 拮抗功能测定及鉴定

郭海, 杨成德, 姚玉玲, 崔月贞, 牛小丽, 薛莉

(甘肃农业大学 植物保护学院, 甘肃省农作物病虫害生物防治工程实验室, 兰州 730070)

摘 要 为明确高寒草地牧草矮生嵩草(*Kobresia humilis*)内生细菌 262AG6 的生防潜力,采用平皿对峙法测定其抑菌功能,并综合形态学特征和 16S rDNA 序列分析对其进行鉴定。结果表明,262AG6 对马铃薯炭疽病菌(*Colletotrichum coccodes*)的抑制效果达到 81.33%,对其他多种病原真菌也具有良好抑制能力,且抑菌能力稳定;在含 100 mg · L⁻¹ 色氨酸和不含色氨酸的 King 培养液中分泌 IAA 的量分别为 8.04 mg · L⁻¹ 和 7.98 mg · L⁻¹;具有溶解无机磷和固氮的能力;262AG6 革兰氏染色呈阳性,杆状,菌体大小为(1.63~3.65) μm × (0.38~0.95) μm,综合形态特性、16S rDNA 和 gyrB DNA 序列分析将菌株 262AG6 鉴定为解淀粉芽胞杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

关键词 内生细菌;解淀粉芽胞杆菌;抑菌能力;鉴定

中图分类号 S43 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2017)10-1529-08

植物病害生物防治是利用生物或生物代谢产物控制植物病害的方法,由于其对环境友好和符合农业可持续发展观的特点受到广大植保工作者的青睐。目前,真菌、细菌、放线菌等微生物在生物防治方面都有较多研究,并取得明显进展。生防细菌因其种类繁多,总量庞大且易于培养和作用方式多样等特点成为近年来植物病害生物防治研究与应用的热点。植物内生细菌指能够在健康植株上定殖并与其创立共生联系的一个微生物群落。近年来的研究表明,植物内生细菌与宿主植物建立复杂的微生态系统,其通过固氮、溶磷、抑菌等生物功能促进植物生长和提高抗逆能力。当前,植物内生细菌已经成为农业上防控植物病害的重要手段,如高小宁等^[1]报道,植物内生细菌 Em7(*Bacillus subtilis*)对油菜菌核病的防治效果达 50%~70%,与化学农药戊唑醇(Tebuconazole)和多菌灵(Carbendazim)相当;也有研究显示,从桔梗^[2]、向日葵^[3]、茄子^[4]、山茶^[5]、甜菜^[6]、水稻^[7]、针茅^[8]、红树^[9]和珠芽蓼^[10]等植物体内分离获得的内生菌对其寄主病害的防控拥有优越的效果;植物内生细菌这一微生物群类在植物病害防治领域具有重要地位。

本研究以从东祁连山高寒草地矮生嵩草中分离的内生细菌 262AG6 为试验材料,对其固氮、溶磷等功能进行测定,并综合其形态特性和 16S rDNA 序列分析进行鉴定,以期丰富植物病害防治资源,为高寒草地牧草内生细菌资源的利用与开发提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试培养基 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)用于病原真菌的培养和对峙试验;肉汁胨培养基(NA)用于内生细菌的活化、保存等;金氏(King)培养基用于产 IAA 试验;Pikovaskaia 培养基和门金娜培养基分别用于有机磷和无机磷溶解试验;Ashby 培养基用于菌株固氮能力测定^[11]。

1.1.2 供试菌株 供试拮抗细菌:东祁连山高寒草地矮生嵩草内生细菌 262AG6;供试病原真菌:马铃薯坏疽病菌(*Phoma foveata*)、马铃薯枯萎病菌(*Fusarium avenaceum*)、马铃薯炭疽病菌(*Colletotrichum coccodes*)、马铃薯立枯丝核病菌(*Rhizoctonia solani*)、番茄早疫病菌(*Alternaria*

收稿日期:2016-12-18 修回日期:2017-03-15
基金项目:国家自然科学基金(31660148)。
第一作者:郭海,男,在读硕士,研究方向为植物病理学。E-mail:guoh456@163.com
通信作者:杨成德,男,教授,硕士生导师,研究方向为植物病理学。E-mail:yangcd@gsau.edu.cn

solani)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、孜然根腐病菌(*Fusarium solani*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)。以上菌株均由甘肃农业大学植物保护学院提供。

1.2 方法

1.2.1 抑菌能力测定 采用平皿对峙法^[12-13]鉴定抑菌功能。将活化病原真菌制成直径 0.6 cm 的菌饼置于 PDA 平皿中央,在距菌饼 25 mm 处用十字交织法点接菌 4 次,对照组点接无菌水,每处理 3 次重复,25 ℃ 恒温培养(马铃薯坏疽病菌处理置于 20 ℃ 恒温培养),待对照组铺满培养皿后,测量处理组菌落和对照菌落直径,并计算抑菌率(%). 抑菌率=[(对照组真菌直径-试验组真菌直径)/(对照组真菌直径-原菌饼直径)]×100%。

1.2.2 抑菌稳定性测定 将 262AG6 在 NA 平皿上持续接菌 10 次(每隔 2 d 转接 1 次),然后以马铃薯炭疽病菌为指示菌并用平皿对峙法测定其抑菌能力。

1.2.3 对病原菌菌丝生长的干扰作用 挑取平皿对峙法处理中病原真菌菌丝和对照中正常菌丝于光学显微镜下观察比较菌丝形态特征,描述并照相。

1.2.4 其他生物学功能测定 固氮功能测定:将 262AG6 低龄菌悬浮液分开接种于 Ashby 无氮平皿和液体培养基,3 次重复,以无菌水为对照,生长温度 28 ℃,在第 3、5、7 d 观察其变化,继代培养 3 代后平皿上有菌落并且培养液变混浊者即可认为具有固氮能力^[14]。

溶磷能力测定^[13-14]: (1) 定性测定,将 262AG6 点接在 Pikovaskaia 培养基和门金娜培养基,每皿接 5 个点,28 ℃ 培养 8 d 后观测菌株在培养基平皿上形成的溶磷圈,并按照溶磷圈直径/菌落直径(D/d 值)确定溶磷能力; D/d 值与其溶磷能力成正比。(2) 定量测定,将菌株 262AG6 接种于 Pikovaskaia 培养液,以不接菌处理为对照。28 ℃、160 r·min⁻¹ 摇床培养 10 d,4 ℃、10 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 后取上清液,采取钼锑抗比色法测定有效磷增加。

产 IAA 能力测定:采用 Salkowski 比色法^[15]测定 262AG6 的产 IAA 能力。

1.2.5 鉴定 形态观察:将活化后的 262AG6 接种于 NA 平皿培养基,观察菌落特征,拍照并描述,挑选低龄菌落进行革兰氏染色^[11]和镜检,观

察菌体形态和颜色,随机测量 50 个菌体的长和宽,并显微照相。

DNA 提取:按照天根生化科技(北京)有限公司提供的试剂盒提取 DNA 并通过凝胶电泳查验,特异性 DNA 条带保存于-20 ℃ 冰箱,备用。DNA 提取试剂盒为细菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型),版本号 DP121221。

16S rDNA 扩增:采用引物 1(5'-GAAGT-CATCATGACCGTTCTGCATGCCGGTGGA-AAGTTCGA-3') 和引物 2(5'-AGCAGGG-TACGGATGTGCGAGCCATCTACGTCAGC-GTCAGTCAT-3') 进行 PCR 扩增。扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 10 s,54 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 40 s,35 个循环;最后在 72 ℃ 延伸 8 min,终止反应。50 μL 反应体系:10×buffer(含 MgCl₂) 5 μL,dNTP(5 mmol·L⁻¹) 1 μL,primer 1(10 μmol·L⁻¹) 1 μL,primer 2(10 μmol·L⁻¹) 1 μL,Taq poly-merase(2 U·μL⁻¹) 0.4 μL,Target DNA(10 mg·L⁻¹) 1 μL,ddH₂O 40.6 μL^[12]。将扩增产物送至武汉金开瑞公司测序,将测序结果与 GenBank 已报道的序列进行同源性比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>),并采用 Clustal(1.8) 软件进行多重序列比较,采用 MEGA(5.0) 的邻接法构建系统发育树,明确该菌株的系统发育学定位。

gyrB DNA 扩增:采用引物 UP-1S(5'-GAA-GTCATCATGACCGTTCTGCATGCCGGTGGA-AAGTTCGA-3') 和引物 UP-2Sr(5'-AGCA-GGGTACGGATGTGCGAGCCATCTACGTC-AGCGTCAGTCAT-3') 进行扩增,扩增条件:95 ℃ 5 min,94 ℃ 1 min,55 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 10 min;4 ℃ 保持 1 h^[13]。25 μL 反应体系:2×Power Taq PCR Master Mix 12.5 μL,primer UP-1S(10 μmol·L⁻¹) 1 μL,primer UP-2Sr(10 μmol·L⁻¹) 1 μL,Target DNA(10 mg·L⁻¹) 1 μL,ddH₂O 9.5 μL。

将 16S rDNA 扩增和 gyrB DNA 扩增产物送至武汉金开瑞公司测序,将测序结果与 GenBank 已报道的序列进行同源性比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>),并采用 Clustal(1.8) 软件进行多重序列比较,采用 MEGA(5.0) 的邻接法构建系统发育树,明确该菌株的系统发育学定位。

2 结果与分析

2.1 262AG6 生防潜力评估

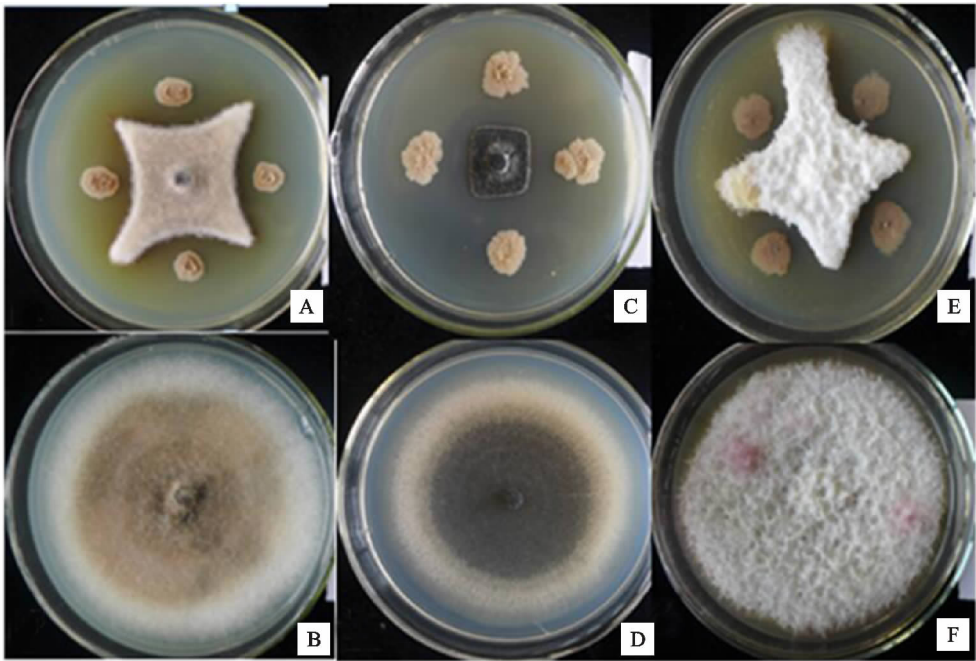
由表 1 和图 1 可知,菌株 262AG6 对马铃薯炭疽病菌、马铃薯枯萎病菌、马铃薯坏疽病菌、马铃薯立枯丝核病菌、番茄早疫病菌、小麦根腐病

菌、孜然根腐病菌、黄瓜枯萎病菌的抑制率分别为 81.33%、68.72%、67.50%、64.67%、56.79%、71.78%、66.24%和 58.19%,说明,菌株 262AG6 对马铃薯等多种作物的多种病原真菌具有抑菌作用,抗菌谱广,可以一菌多防。

表 1 262AG6 对病原真菌的抑制效果
Table 1 Inhibitory effect of 262AG6 against phytopathogenic fungi

病原菌 Pathogenic fungi	对照组菌落直径/cm Diameter of CK colony	处理组菌落直径/cm Diameter of treatment colony	抑菌率/% Inhibitory rate
马铃薯立枯丝核病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	8.65±0.062	3.43±0.033	64.67
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	7.42±0.238	3.45±0.067	58.19
马铃薯坏疽病菌 <i>Phoma foveata</i>	8.58±0.087	3.20±0.090	67.50
马铃薯枯萎病菌 <i>Fusarium avenaceum</i>	8.30±0.115	3.01±0.042	68.72
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	7.62±0.125	3.63±0.125	56.79
马铃薯炭疽病菌 <i>Colletotrichum coccodes</i>	8.10±0.106	2.00±0.058	81.33
孜然根腐病菌 <i>Fusarium solani</i>	8.05±0.084	3.22±0.060	66.24
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	7.45±0.099	2.53±0.056	71.78

注:数据为“平均数±标准误”。下同。
Note:Data in the table indicate “Mean±Standard error”. The same below.



A. 坏疽病菌处理 Treatment of *P. foveata*;B. 坏疽病菌对照 Non-treatment control of *P. foveata*;C. 炭疽病菌处理 Treatment of *C. coccodes*;D. 炭疽病菌对照 Non-treatment control of *C. coccodes*;E. 枯萎病菌处理 Treatment of *F. avenaceum*;F. 枯萎病菌对照 Non-treatment control of *F. avenaceum*

图 1 262AG6 对马铃薯 3 种病原真菌的抑制效果

Fig.1 Inhibitory effect of 262AG6 on 3 species of pathogenic fungi in potato

将 262AG6 继代培养 10 代后与马铃薯炭疽病菌十字交织培养,发现拮抗菌 262AG6 的抑菌效果在其继代培养之后差异不显著($P<0.05$),

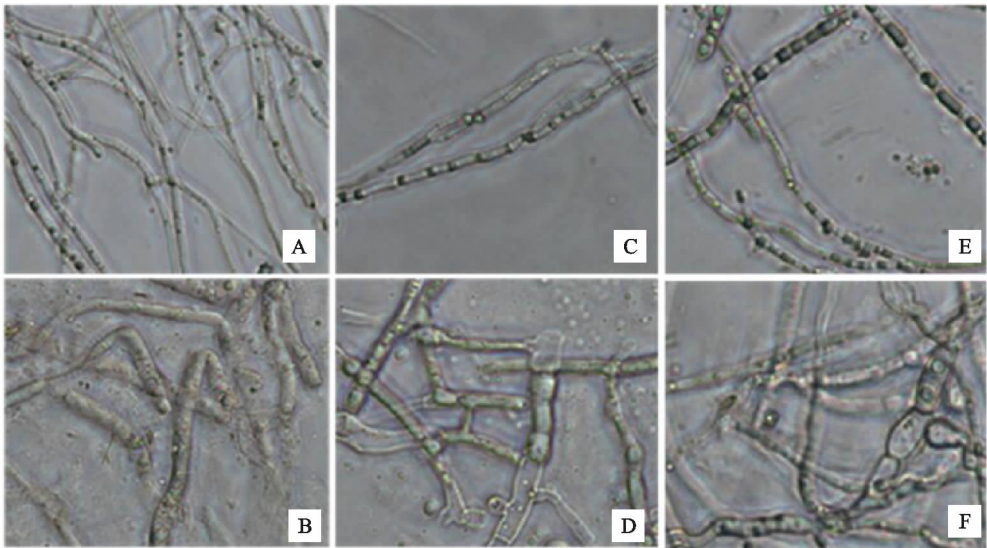
说明该拮抗菌株抑菌能力稳定(表 2)。将马铃薯坏疽病菌、马铃薯枯萎病菌、马铃薯坏疽病菌与 262AG6 进行对峙培养,发现病原菌菌落生长受

到显著影响,显微观察发现菌丝正常生长也受到产生泡囊、变形、扭曲(图 2)。较为明显的影响,表现为畸形,原生质外泄,菌丝

表 2 继代培养的 262AG6 对马铃薯炭疽病菌(*C. coccodes*)抑制效果
Table 2 Inhibitory rate of subculture 262AG6 against *C. coccodes*

拮抗菌 Antagonistic bacteria	对照组菌落直径/cm Diameter of CK colony	处理组菌落直径/cm Diameter of treatment colony	抑菌率/% Inhibition rate
262AG6	8.10±0.106	2.00±0.058	81.33 a
继代培养(10 代)262AG6 Subculture(10 times)262AG6	8.03±0.105	1.90±0.052	81.41 a

注:数值后小写字母相同表示在 0.05 水平差异不显著。
Note:Data followed by the same lowercase letters indicate no significant difference at 0.05 level.



A. 坏疽病菌处理 Inhibit hyphoe of *P. foveata*; B. 坏疽病菌对照 Normal hyphoe of *P. foveata*; C. 炭疽病菌处理 Inhibit hyphoe of *C. coccodes*; D. 炭疽病菌对照 Normal hyphoe of *C. coccodes*; E. 枯萎病菌处理 Inhibit hyphoe of *F. avenaceum*; F. 枯萎病菌对照 Normal hyphoe of *F. avenaceum*

图 2 262AG6 对病原真菌菌丝生长的干扰作用

Fig. 2 Effect of 262AG6 on growth of pathogenic fungus mycelium

2.2 262AG6 生物学功能测定

溶磷能力测定结果显示,262AG6 在 Piko-vaskaia 平皿上培养 8 d 后产生明显的溶磷圈, D/d 的值为 1.19,门金娜培养基上未形成溶磷圈;定量测定发现,菌株 262AG6 在 Pikovaskaia 培养液中有效磷增加量为 $1.01\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,说明,该内生菌株对无机磷具有消溶能力,不能消溶有机磷。

定性测定产 IAA 能力,发现接入 262AG6 的处理组和对照组的 King 培养液的颜色都变为红色,说明 262AG6 能够产 IAA。PC 曲线: $y=0.042x-0.051$ ($R^2=0.914$); S2 曲线: $y=0.009x+0.719$ ($R^2=0.989$); x 代表 IAA 浓度, y 代表 OD_{530} 。定量研究表明,遵照 PC 曲线和 S2 曲线基准方程,菌株在 2 种培养液中培育 12 d 后,在 King 培养液不含色氨酸的情况下 262AG6

产生 IAA 的量为 $7.98\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,在 King 培养液含 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 色氨酸的情况下产生 IAA 的量为 $8.04\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,色氨酸对 262AG6 生产 IAA 的量影响不显著,说明,262AG6 不依赖外源色氨酸即可合成 IAA。

固氮能力测定结果显示,262AG6 可以在 Ashby 培养基上生长,连续培养 3 代后,262AG6 也能在无氮培养基上生长并能使培养液变混浊,证明 262AG6 具有固氮能力。

2.3 262AG6 的鉴定

2.3.1 形态特性 262AG6 革兰氏染色为阳性(图 3),菌体杆状,菌体为 $(1.63\sim3.65)\text{ }\mu\text{m}\times(0.38\sim0.95)\text{ }\mu\text{m}$ 。在 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ NA 培养基上培育 3 d 后,菌落类似圆形,直径为 $6\sim8\text{ mm}$,边沿不规整,中间凸起,表形轮廓不平整,不透明,呈微乳黄色(图 4)。

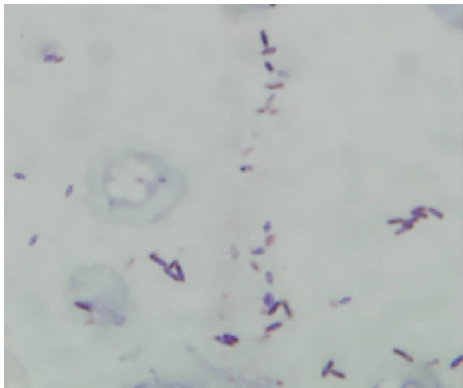


图 3 262AG6 革兰氏染色
Fig.3 262AG6 gram staining



图 4 262AG6 在 NA 培养基上的菌落特征
Fig.4 Colony morphology of 262AG6 on NA medium

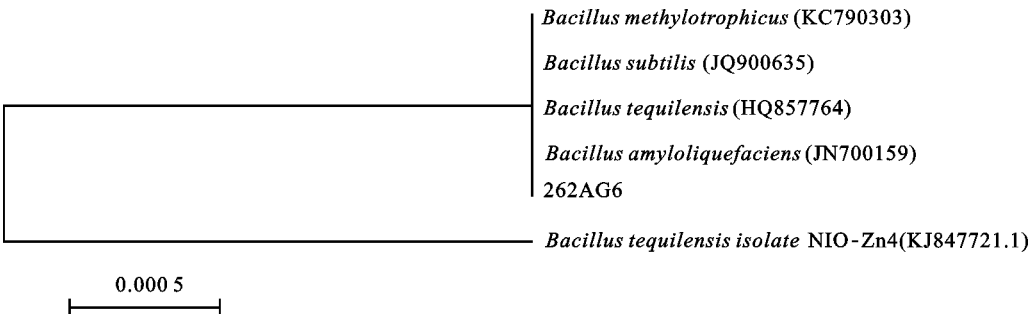


图 5 262AG6 的 16S rDNA 系统发育树
Fig.5 16S rDNA phylogenetic tree of 262AG6

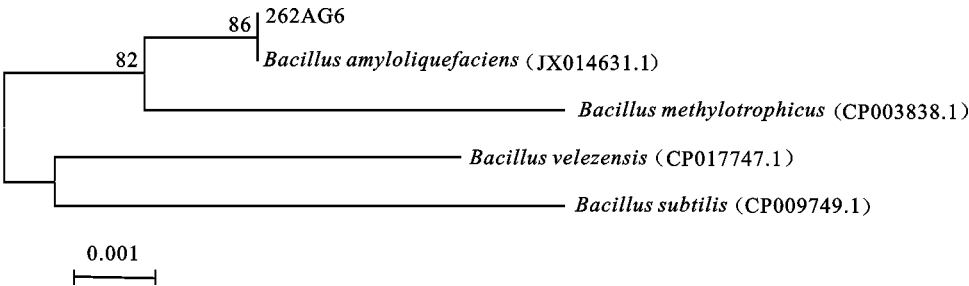


图 6 262AG6 的 gyrB 系统发育树
Fig.6 gyrB phylogenetic tree of 262AG6

2.3.2 DNA 序列分析 提取 262AG6 的 DNA，经 16S rDNA 和 gyrB PCR 扩增后产物经凝胶电泳检测，分别在 1 500 bp 和 1 000 bp 处有清晰 PCR 特异性条带，将产物测序所得该菌株的 16S rDNA 序列碱基长为 1 460 bp，gyrB 序列碱基长为 1 075 bp。

经 Blast 相似性分析表明，菌株 262AG6 (Genbank 登陆号：KF836523) 与 Genbank 数据库下载的 *Bacillus methylotrophicus* (KC790303)、*Bacillus amyloliquefaciens* sub sp. *Plantarum* (JN700159)、*Bacillus tequilensis* (HQ857764)、*Bacillus subtilis* (JQ900635)、*Bacillus tequilensis* isolate NIO-Zn4 (KJ847721. 1) 的相似度都在 99% 以上，运用 MEGA 5.0 的邻接法构建系统发育树(图 5，图 6)，发现其与 *Bacillus methylotrophicus* (KC790303)、*Bacillus amyloliquefaciens* sub sp. *Plantarum* (JN700159)、*Bacillus tequilensis* (HQ857764)、*Bacillus subtilis* (JQ900635) 等菌株的遗传距离均小于 0.000 5，确认 262AG6 (KF836523) 为芽胞杆菌属，但无法确认其属内种的地位。

经 Blast 相似性分析表明，262AG6 与已报道的 *Bacillus amyloliquefaciens* (JX014631. 1)、*Bacillus methylotrophicus* (CP003838. 1)、*Bacillus velezensis* (CP017747. 1)、*Bacillus subtilis*

(CP009749.1)种的同源相似性都在 99%以上,结合形态特性和 16S rDNA 分析最终将其鉴定为解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

3 讨论

植物内生细菌是大自然对植保工作者的馈赠,拥有极高的利用价值,相关的报道较多,如陈越渠等^[16]从杨树枝条上获得的枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)对杨树烂皮病的防控成果达 85.4%和 69.6%;赵龙飞等^[17]从大豆根瘤菌中分离出的 17 株内生菌对稻瘟病菌具备抑菌功效;王涵琦等^[18]发现 ZHA10 对马铃薯炭疽菌的平皿对峙控制率达 72.62%;本研究显示,262AG6 对马铃薯炭疽菌的抑菌率达 81.33%,并且该菌株抑菌谱较宽,对马铃薯、小麦、番茄等寄主植物的 8 病原菌的抑制率均高于 50%,10 代以内其继代稳定性良好,具有开发为生物农药的潜质。

内生菌的产 IAA、固氮和溶磷功能可能对植物有促生作用,畅涛等^[19]研究发现,珠芽蓼内生菌 ZA1 具有固氮和分泌生长素 IAA 功能,对马铃薯具有促生和增产的效果;262AG6 在 King 培养液不含色氨酸的情况下产生 IAA 的量为 $7.98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,在含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 色氨酸的 King 培养基中分泌 IAA 的量为 $8.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,且具有固氮和溶解无机磷的能力,生物功能多样化,有巨大的开发为微生物肥料的潜力,但其抑菌防控机制以及田间的实际防病促生成效还有待更深入的测验。林玲等^[20]研究认为,植物内生细菌对植物有防病促生的功能,这与本研究结果一致,说明,262AG6 具备开拓成为防治马铃薯真菌病害的生物农药和微生物菌肥的潜能。

4 结论

高海拔地区牧草矮生嵩草的内生细菌 262AG6 对马铃薯多种病原真菌有明显的抑制效果,而且该菌株的抑菌谱较广,可以产 IAA,溶解无机磷,有固氮能力,为 G^+ ,菌体大小为 $1.63 \sim 3.65 \mu\text{m} \times 0.38 \sim 0.95 \mu\text{m}$ 。综合形态特性、16S rDNA 分析和 gyrB DNA 序列分析,将其鉴定为解淀粉芽胞杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

参考文献 Reference:

[1] 高小宁. 植物内生细菌菌株 Em7 对油菜菌核病的防治研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2012.

GAO X N. Biological control of endophytic bacterium strain Em7 against sclerotinia sclerotiorum on oilseed rape[D]. Yangling Shaanxi: Northwest A&F University, 2012 (in Chinese with English abstract).

[2] ISLAM S M A, MATH R K, KIM J M, *et al.* Effect of plant age on endophytic bacterial diversity of balloon flower (*Platycodon grandiflorum*) root and their antimicrobial activities [J]. *Current Microbiology*, 2010, 61: 346-356.

[3] FORCHETTI G, MASCIARELLI O, IZAGUIRRE M, *et al.* Endophytic bacteria improve seedling growth of sunflower under water stress produce salicylic acid, and inhibit growth of pathogenic fungi [J]. *Current Microbiology*, 2010, 61: 485-493.

[4] RAMESH R, JOSHI A A, GHANEKAR M P. *Pseudomonads*, major antagonistic endophytic bacteria to suppress bacterial wilt pathogen, *Ralstonia solanacearum* in the eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25: 47-55.

[5] 譙天敏, 张 静, 冉晓潇, 等. 解淀粉芽胞杆菌在山茶叶中定植及对山茶灰斑病的防效[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2015, 43(10): 1-8.

QIAO T M, ZHANG J, RAN X X, *et al.* Colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* in camellia leaves and its control efficacy against camellia gray spot [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2015, 43(10): 1-8 (in Chinese with English abstract).

[6] 史应武, 娄 恺, 李 春, 等. 甜菜褐斑病内生拮抗菌的筛选、鉴定及其防效测定[J]. 植物病理学报, 2009, 39(2): 221-224.

SHI Y W, LOU K, LI CH, *et al.* Screening identification and control efficacy of sugar beet an tagonistic endophytic bacteria against *Cerospora beticola* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2009, 39(2): 221-224 (in Chinese with English abstract).

[7] 农 倩, 陈雪凤, 黎起秦, 等. 水稻内生细菌 B196 的鉴定及其对水稻纹枯病的防治作用[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(1): 99-103.

NONG Q, CHEN X F, LI Q Q, *et al.* Identification of rice endophytic bacterial strain B196 and its control effect on rice sheath blight [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2011, 27(1): 99-103 (in Chinese with English abstract).

[8] 王玉琴, 杨成德, 王 颖, 等. 针茅内生细菌菌株 265ZY4 的鉴定及其生物学功能[J]. 微生物学通报, 2015, 42(1): 101-109.

WANG Y Q, YANG CH D, WANG Y, *et al.* Identification and determination of biological functions of endophytic bacteria 265ZY4 from *Stipa capillata* [J]. *Microbiology China*, 2015, 42(1): 101-109 (in Chinese with English abstract).

[9] 汪 远, 詹儒林, 何 红, 等. 红树内生细菌菌株 Kc-38 的抗菌物质及对采后芒果炭疽病的防效[J]. 中国生物防治学

- 报,2012,27(1):82-87.
- WANG Y,ZHAN R L,HE H,*et al.* Antibiotic substances produced by mangrove endophytic bacteria Kc-38 and bio-control efficacy on anthracnose of postharvest mangoes [J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2012,27(1):82-87 (in Chinese with English abstract).
- [10] 李振东,陈秀蓉,李鹏,等. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定[J]. 草业学报,2010,19(2):61-68.
- LI ZH D,CHEN X R,LI P,*et al.* Identification of *Polygonum viviparum* endophytic bacteria ZS and determination of the capacity to secrete IAA and antagonistic capacity towards pathogenic fungi [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010,19(2):61-68(in Chinese with English abstract).
- [11] 方中达. 植病研究方法[M]. 第 3 版. 北京:中国农业出版社,1997:124-125.
- FANG ZH D. Research Method of Plant Pathology [M]. 3rd Edition. Beijing:Chinese Agriculture Press,1997:124-125(in Chinese).
- [12] 李振东,陈秀蓉,杨成德. 珠芽蓼内生菌 Z17 抑菌能力测定及其鉴定[J]. 草业科学,2011,28(12):2096-2101.
- LI ZH D,CHEN X R,YANG CH D. Identification of *Polygonum viviparum* endophytic bacteria Z17 and its capacity to antagonistic towards pathogenic fungi [J]. *Pratacultural Science*, 2011,28(12):2096-2101 (in Chinese with English abstract).
- [13] 畅涛. 生防菌莫海威芽孢杆菌 ZA1 生物学功能及其发酵工艺研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2014:15-32.
- CHANG T. Study on biological function and fermentation process of antagonist Bacterium *Bacillus mojavensis* ZA1 [D]. Lanzhou:Gansu Agricultural University,2014:15-32 (in Chinese with English abstract).
- [14] 席琳乔,李德锋,王静芳,等. 棉花根际促生菌固氮和分泌生长激素能力的测定[J]. 干旱区研究,2008,25(5):690-694.
- XI L Q,LI D F,WANG J F,*et al.* Measurement of nitrogen fixation capability and excreted IAA capability of PG-PB isolated from cotton rhizosphere in salina [J]. *Arid Zone Research*, 2008,25(5):690-694(in Chinese with English abstract).
- [15] GLICKMAN E,DESSAUX Y. A critical examination of the specificity of the salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995,619(2):793-796.
- [16] 陈越渠,李立梅,毛赫,等. 杨树烂皮病内生拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 植物保护,2015,41(6):126-131.
- CHEN Y Q,LI L M,MAO H,*et al.* Screening of antagonistic bacteria of *Valsa sordida* and identification of the strain NS3 [J]. *Plant Protection*, 2015,41(6):126-131(in Chinese with English abstract).
- [17] 赵龙飞,徐亚军,彭顶华,等. 稻瘟病菌拮抗性大豆根瘤内生细菌的筛选及抑制效果[J]. 微生物学通报,2016,43(5):998-1008.
- ZHAO L F,XU Y J,PENG D H,*et al.* Screening and inhibitory effect of antagonistic endophytic bacteria associated with soybean root nodules against *Maghaporthe grisea* [J]. *Microbiology China*, 2016,43(5):998-1008 (in Chinese with English abstract).
- [18] 王涵琦,畅涛,杨成德,等. 马铃薯炭疽病(*Colletotrichum coccodes*)拮抗菌株的筛选及鉴定[J]. 植物保护,2014,40(1):38-42.
- WANG H Q,CHANG T,YANG CH D,*et al.* Screening and identification of the antagonistic organisms against *Colletotrichum coccodes* on potato [J]. *Plant Protection*, 2014,40(1):38-42(in Chinese with English abstract).
- [19] 畅涛,杨成德,薛莉,等. 珠芽蓼内生菌 ZA1 对马铃薯的防病促生研究[J]. 草业学报,2015,24(12):83-91.
- CHANG T,YANG CH D,XUE L,*et al.* Effects of disease control and growth promotion of *Polygonum viviparum* endophytic bacteria *Bacillus mojavensis* on potato [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2015,24(12):83-91 (in Chinese with English abstract).
- [20] 林玲,乔勇升,顾本康,等. 植物内生细菌及其生物防治植物病害的研究进展[J]. 江苏农业学报,2008,24(6):969-974.
- LIN L,QIAO Y SH,GU B K,*et al.* Advances in the study of plant endophytic bacteria and their effects on biological control of plant disease [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2008,24(6):969-974(in Chinese with English abstract).

Identification and Determination of Antagonistic Function of Endophytic Bacteria 262AG6 from *Kobresia humilis* in Alpine Grassland

GUO Hai, YANG Chengde, YAO Yuling, CUI Yuezhen,
NIU Xiaoli and XUE Li

(College of Plant Protection, Gansu Agricultural University, Biocontrol Engineering Laboratory
of Crop Diseases and Pests of Gansu Province, Lanzhou 730070, China)

Abstract In order to evaluate the biological control potential of endophytic bacteria 262AG6 isolated from *Kobresia humilis* at alpine grassland, the inhibitory effects were studied by dual culture against *Colletotrichum coccodes*, and the 262AG6 was identified by morphological characteristics and 16S rDNA sequence analysis. The results showed that the inhibition ratio of 262AG6 strain against *Colletotrichum coccodes* was as high as 81.33%, and also presented a higher stability and inhibitory effects on other species of pathogens. The secreted contents of IAA were $8.04 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ with $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ tryptophan on the King media and $7.98 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ without tryptophan, and the strain also had ability to dissolve inorganic phosphorus and to fix nitrogen. The thalli was rod-shaped, gram-positive and $(1.63-3.65) \mu\text{m} \times (0.38-0.95) \mu\text{m}$ in size. The 262AG6 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* based on 16S rDNA and gyrB DNA sequence analysis and the morphological characteristics.

Key words Endophytic bacteria; *Bacillus amyloliquefaciens*; Inhibitory effects; Identification

Received 2016-12-18

Returned 2017-03-15

Foundation item The National Natural Science Foundation of China (No. 31660148).

First author GUO Hai, male, master student. Research area: plant pathology. E-mail: guoh456@163.com

Corresponding author YANG Chengde, male, professor, master supervisor. Research area: plant pathology. E-mail: yangcd@gsau.edu.cn

(责任编辑: 郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)