

研究报告

稻瘟病菌拮抗性大豆根瘤内生细菌的筛选及抑制效果

赵龙飞* 徐亚军 彭顶华 赵瑞英 陈乐乐 刘具备

(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)

摘要:【目的】从河南大豆根瘤的内生细菌资源中筛选对稻瘟病菌有拮抗作用的菌株,初步探讨其抑菌效果,为进一步研究其抑菌机理提供菌种资源。【方法】以稻瘟病菌为供试病原菌,采用对峙法进行拮抗性菌株筛选,显微观察法研究受抑制病原菌菌丝变化,对筛选拮抗性菌株进行细胞形态学及生理生化特性试验、16S rRNA 基因测序和系统发育分析及接种防效试验。

【结果】经复筛有 17 株内生菌拮抗效果较明显,最高抑制率为 62.16%;受抑制病原菌丝呈现弯曲打结、断裂、原生质浓缩等畸形状态。拮抗性筛选过程中内生菌快速生长形成生物薄膜,包埋菌丝并使其断裂。拮抗菌株分布在 7 属 9 种,稻瘟病拮抗性大豆根瘤内生菌呈现种属多样性。防效试验表明内生菌处理组稻苗发病率和病情指数均显著降低,防治效果最高达 74.19%。

【结论】大豆根瘤内生拮抗性菌株具有种属多样性,拮抗性菌株处理组稻苗发病率和病情指数均显著降低,防治效果显著,为进一步研究其抑菌机理提供菌种资源。

关键词: 大豆, 稻瘟病菌, 根瘤内生菌, 拮抗作用, 生物防治

Screening and inhibitory effect of antagonistic endophytic bacteria associated with soybean root nodules against *Magnaporthe grisea*

ZHAO Long-Fei* XU Ya-Jun PENG Ding-Hua ZHAO Rui-Ying
CHEN Le-Le LIU Bei-Bei

(Henan Province Key Laboratory of Plant-Microbe Interactions, Technology Team of Endophytic Microbial Resources Research, College of Life Sciences, Shangqiu Normal University, Shangqiu, Henan 476000, China)

Abstract: [Objective] Strains were screened from endophytic resources of soybean root nodules in Henan province against *Magnaporthe grisea*, and researched its inhibitory effect in order to provide the species resources for further study inhibitory mechanism. [Methods] Taking *Magnaporthe grisea* as tested pathogens, the endophytic bacteria were characterized by antagonistic tests with confront method, the phytopathogen hyphae were analyzed by microscopic observations, the obvious features of antagonistic strains were determined by cell morphological observation, physical and biochemistry characteristics, 16S rRNA gene sequencing, phylogenetic analysis and biological control

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. U1204301); Youth Backbone Teachers Project of Henan Provincial Universities (No. 2012GGJS166)

*Corresponding author: Tel: 86-370-3115317; Fax: 86-370-2595979; E-mail: hnzhaolongfei@163.com

Received: November 15, 2015; Accepted: January 12, 2016; Published online (www.cnki.net): January 12, 2016
基金项目: 国家自然科学基金项目(No. U1204301); 河南省高等学校青年骨干教师项目(No. 2012GGJS166)

*通讯作者: Tel: 86-370-3115317; Fax: 86-370-2595979; E-mail: hnzhaolongfei@163.com

收稿日期: 2015-11-15; 接受日期: 2016-01-12; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2016-01-12

effect tests. **[Results]** A total of 17 strains have obvious antagonistic effect by secondary screening, the highest inhibition rate reach 62.16%. Results of microscopic analysis on pathogen hyphae showed that hyphae appear bend knot, fracture, protoplasm concentration, deformity and so on. Interestingly, endophytes rapidly grew to form biofilms on plate during antagonistic screening, and embed hyphae and make it break. Combined with the colony characteristics, physical and biochemistry characteristics and phylogenetic analysis, antagonistic strains were distributed in seven genera and nine species, so antagonistic endophytic bacteria against rice blast possessed species diversity. Control effect tests suggested that rice seedlings incidence and disease index of treatment group with endophytes are significantly lower, biological control efficiency reach up to 74.19%. **[Conclusion]** Diverse strains were screened from endophytic resources of soybean root nodules against *Magnaporthe grisea*, rice seedlings incidence and disease index of treatment group with endophytes are significantly lower, biological control efficiency reach significant, it provided species resources for further study inhibitory mechanism.

Keywords: Soybean, *Magnaporthe grisea*, Endophytic bacteria, Antagonistic effect, Biological control

稻瘟病(Blast disease of rice)是由稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)引起的水稻真菌性病害,是最严重的水稻病害之一,一般减产 10%–20%,严重时可达 40%–50%,大暴发时甚至颗粒无收^[1]。由于稻瘟病菌个体微小、种类繁多、繁殖迅速且受地理和气候影响,治理起来较为困难。目前,治理稻瘟病主要采用抗病品种、化学药剂和栽培管理,其中化学药剂防治造成环境污染、成本高、诱导病原菌产生抗性^[2],不符合绿色农业发展需求。因此,探索新的防治方法迫在眉睫。

植物内生菌(Endophytes)是指能够在健康植物各器官或组织内度过其生活史的全部阶段或某一特定阶段的一类微生物。内生菌种类繁多,内生菌与宿主植物经长期协同进化,形成互惠互利、相互依存的关系^[3]。它们能促进植物根系发育和发挥固氮作用,为寄主提供更多营养^[4];提高寄主抗病防病能力^[5]。顾沛雯^[6]研究抗植物病害的内生菌次级代谢产物并提出研发新农药的思路。吴海燕等^[7]研究表明大豆根瘤内生菌次级代谢产物对大豆胞囊线虫有一定抑制作用。此外,课题组前期研究^[8]表明,大豆根瘤内生菌具有溶磷、产植物激素及促进生长功能;野生艾蒿不同部位内生细菌对稻瘟病的抑制作用不同^[9];枸骨内生菌对稻瘟病菌最大抑制率可达 51.7%^[10]。利用植物内生菌防治植

物病害、促进生长已引起广泛关注^[11]。大豆属于大宗经济作物,在河南有较大种植面积,而大豆根部有特殊组织——根瘤,在根瘤微环境内根瘤菌和宿主形成共生固氮体系,与其共处微环境的还有丰富的内生菌资源,大豆根瘤内生菌为新型、高效和安全活性的生物药剂研制提供了丰富的微生物资源。水稻属于我国大宗粮食作物,在河南主要分布在信阳、新乡、原阳以及黄河沿岸。在水稻根部和大豆根系具有交叉的微生物群系,水稻和大豆间套可提高粮食产量。但目前,关于大豆根瘤内生菌抑制稻瘟病菌的研究未见报道。本试验通过对大豆根瘤内生菌的拮抗性筛选、分子鉴定,筛选出稻瘟病拮抗性内生菌株,为稻瘟病生物防治提供新的菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:稻瘟病菌 MG102 (*Magnaporthe grisea*)由西北农林科技大学生命科学院惠赠,以菌核形式保藏在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$,传代采用 PDA (马铃薯蔗糖琼脂培养基)^[10], $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d;根瘤内生菌分离自河南部分地区采集的大豆根瘤(由本实验室分离纯化、保藏)。水稻品种:Y 两优 66 (豫审稻 2014007,购自信阳市浉河区申丰种子批发站)。

1.2 内生菌初筛

用接种针挑取菌丝转接至 PDA 平板中央, 28 °C 恒温倒置培养 3–5 d, 待长满平皿后, 用无菌打孔器(直径 5 mm)选择同心环上生理年龄一致的菌苔打取菌饼, 转接到 PDA 平板中央, 倒置在恒温箱中 28 °C 培养待用。采用对峙培养法^[10]测定内生菌对稻瘟病菌的拮抗作用。在培养 2 d 的稻瘟病菌饼四周 2.5 cm 处分别接种 5 种不同内生菌, 以不接内生菌的平板为对照。培养 48 h 后第一次测量并记录抑菌圈大小及对照直径, 以后每隔 24 h 进行一次测量记录, 记录 3 次。抑制率计算公式为: 抑制率(%)=(对照菌落直径–处理菌落直径)×100/(对照菌落直径)^[10]。

1.3 内生菌复筛

复筛方法和初筛基本相同, 不同之处在于: (1) 同一平板上病原菌周围等距离处点接的是同一菌株, 以接等量无菌水的平板为对照。(2) 点接的是菌悬液。用 LB 液体培养基^[8]培养菌体并制备菌悬液, 用分光光度测定并调整 $OD_{600} \approx 1$ (大约 10^{10} CFU/mL), 用移液器点接 10 μ L 于病原菌菌落周围, 同一菌株点接 3 次, 培养 48 h 后测量并记录受抑制病原菌直径大小及对照直径, 每隔 24 h 测量一次, 测量 3 次, 计算抑制率。

1.4 受抑制植物病原菌菌丝的显微观察

筛选复筛抑制作用较强的菌株, 采用复筛方法培养 24 h, 在倒置显微镜下研究病原菌菌丝变化, 观察并拍照记录结果。

1.5 细胞形态学特征及生理生化特性测定

筛选 7 株抑制效果明显的菌株, 在牛肉膏蛋白胨固体培养基^[8]上 30 °C 培养 4–5 d 后, 进行革兰氏染色, 用显微镜观察染色结果, 并测定菌株大小以及生理生化等表型特征, 记录细胞形态、菌落特征及反应结果^[12]。

1.6 16S rRNA 基因扩增及测序

采用 50 μ L 扩增体系^[13]: 2×Taq Master Mix (0.1 U/ μ L Taq DNA polymerase, 3 mmol/L MgCl₂, 0.4 mmol/L dNTPs, 2×PCR 反应缓冲液) 25 μ L, 正

向引物 P₁ 10 μ mol/L 1 μ L, 反向引物 P₆ 10 μ mol/L 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 21 μ L。扩增条件: 94 °C 5 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 36 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物经电泳、测序(北京奥科生物有限公司)。将测序结果放在 GenBank 数据库中进行相似性比对, 用软件 ClustalX 2.1 和 Treeconw 进行系统发育树构建, 利用 DNAMAN 软件进行相似性比较。

1.7 接种内生细菌对稻瘟病的防治效果

选饱满、无霉变种子用无菌水浸泡, 置 28 °C 温箱中催芽 48 h, 待种子露白后播种在盛无菌有机营养土的花盆内(每盆干重 200 g), 置于 28 °C 光照培养箱内培养 2 d, 待发芽整齐置于 22–32 °C 的强光照(20 000 lx)下培养。本试验主要调查叶瘟, 筛选优良菌株制成菌悬液(5×10^8 CFU/mL), 喷洒在水稻苗上, 以叶面布满雾点为宜。每菌株重复 3 次, 每重复处理 5 株稻苗。用无菌水接种的苗子为对照组(CK), 3 d 后悬滴法^[14]接种病原菌 MG102 孢子悬液。严重程度分级标准如下: 0 级, 无病症, 不致病, 叶色油绿; 1 级, 病斑有针尖大小, 0–0.5 mm, 叶色绿色; 2 级, 病斑直径 0.5–2 mm, 叶色黄绿; 3 级, 病斑直径 2–4 mm, 叶色泛黄色; 4 级, 病斑直径 4 mm 以上, 叶色局部发白。病情指数(%)= Σ (病害等级×该级叶数)/(调查叶数×最严重等级)×100; 防治效果(%)=[(对照病情指数–处理病情指数)/对照病情指数]×100。统计各菌株的叶片接种点发病率、发病严重度和病情指数, 结果用 SPSS 11.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 内生拮抗菌株初筛

从大豆根瘤中分离的内生细菌共 276 株, 采用对峙培养法筛选对稻瘟病有拮抗作用的菌株(图 1)。培养 6 d 后记录初筛结果, 抑制率在 36% 以上的有 30 株, 见表 1。有 16 株菌抑制率大于 45%, 其中菌株 DD160、DD266、DD299 最大抑制率均为 58.82%。

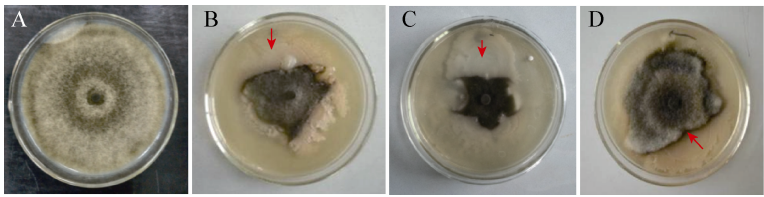


图 1 内生菌株对稻瘟病菌拮抗作用

Figure 1 Inhibitory effect of endophytic bacteria against *Magnaporthe grisea*

注：A：对照菌落； B：DD160 抑菌作用； C：DD266 抑菌作用； D：DD192 抑菌作用。

Note: A: Colony of comparison; B: Inhibitory effects of DD160; C: Inhibitory effects of DD266; D: Inhibitory effects of DD192.

表 1 菌株对病原菌抑制作用的初筛结果			
Table 1 Primary screening results of the inhibitory effects of endophytic bacteria on <i>Magnaporthe grisea</i>			
菌株	抑制率 ¹	抑制率 ²	抑制率 ³
Strains	Inhibitory ratio ¹ (%)	Inhibitory ratio ² (%)	Inhibitory ratio ³ (%)
CK	—	—	—
DD160	38.09±0.01C	50.00±0.03A	58.82±0.01A
DD266	38.09±0.03C	50.00±0.02A	58.82±0.01A
DD299	33.33±0.01D	46.15±0.01B	58.82±0.01A
DD159	33.33±0.02D	46.15±0.01B	55.80±0.01B
DD222	38.88±0.01B	50.00±0.03A	52.00±0.01C
DD192	33.33±0.01D	45.45±0.01D	52.00±0.02C
DD232	33.33±0.01D	45.45±0.01D	52.00±0.01C
DD290	0.00±0.00L	40.74±0.01F	48.48±0.01D
DD260	23.80±0.01I	40.74±0.03F	48.48±0.01D
DD303	19.04±0.01J	37.03±0.01G	48.48±0.01D
DD272	23.80±0.01I	37.03±0.01G	48.48±0.02D
DD291	0.00±0.00L	40.74±0.01F	48.48±0.01D
DD201	33.33±0.01D	45.45±0.01D	48.00±0.01E
DD72	53.84±0.01A	45.83±0.01C	46.77±0.01F
DD235	28.57±0.01E	33.33±0.01I	45.45±0.01G
DD281	19.04±0.01J	33.33±0.02I	45.45±0.01G
DD324	0.00±0.00L	42.42±0.01E	44.44±0.01H
DD234	0.00±0.00L	0.00±0.00N	44.00±0.01I
DD261	27.77±0.01G	36.36±0.01H	44.00±0.03I
DD298	19.04±0.01J	37.03±0.01G	42.42±0.01J
DD252	19.04±0.01J	29.62±0.01K	42.42±0.01J
DD270	9.52±0.01K	29.62±0.02K	42.42±0.01J
DD300	9.52±0.01K	33.33±0.01I	42.42±0.01J
DD319	25.64±0.01H	33.33±0.01I	41.93±0.01K
DD161	25.64±0.01H	31.25±0.01J	40.32±0.01L
DD198	27.77±0.01G	36.36±0.01H	40.00±0.01M
DD307	9.52±0.01K	29.62±0.01K	39.39±0.01N
DD268	0.00±0.00L	33.33±0.01I	39.39±0.01N
DD304	28.20±0.01F	27.08±0.01L	38.70±0.01O
DD210	0.00±0.00L	24.00±0.03N	36.66±0.01P

注：¹：接种后 72 h 抑菌率；²：接种后 96 h 抑菌率；³：接种后 120 h 抑菌率。—：没有抑制现象。表中数据为平均值±标准差，数据后面不同字母表示在 $P<0.01$ 水平差异极显著。

Note：¹: Inhibition rate after inoculation for 72 hours; ²: Inhibition rate after inoculation for 96 hours; ³: Inhibition rate after inoculation for 120 hours. Data are $\bar{x} \pm s$ in table, different letters behind data in the same column show significant difference at $P<0.01$ level.

2.2 内生拮抗菌株复筛

对初筛获得的 30 株对稻瘟病抑制作用明显的菌株进行复筛。在恒温箱中 28 °C 培养 120 h 后，复筛结果如表 2 所示。有 17 株菌抑菌率在 46%以上，其中菌株 DD160、DD266、DD299 抑菌率均为最大，达 62.16%。

2.3 植物病原菌菌丝的显微观察分析

稻瘟病菌受大豆根瘤内生菌拮抗作用，引起

菌丝发生明显变化(图 2)。对照病原菌菌丝粗直、健壮(图 2A)，受作用菌丝呈现瘤状、断裂、弯曲打结、原生质浓缩成球状等畸形状态。DD160 对稻瘟病产生抑制作用使菌丝呈瘤状(图 2B 中 a)；DD266 沿稻瘟病菌丝方向产生生物薄膜，包埋稻瘟菌丝并使其降解(图 2C 中 b、c)；DD299 使作用菌丝细胞壁溶解，菌丝断裂，成段存在(图 2D 中 d、e)；DD192 使稻瘟病菌丝弯曲，呈树根状，且有打

表 2 菌株对病原菌抑制作用复筛结果							
Table 2 Secondary screening results of the inhibitory effects of endophytic bacteria on <i>Magnaporthe grisea</i>							
菌株 Strain	抑制率 ¹ Inhibitory ratio ¹ (%)	抑制率 ² Inhibitory ratio ² (%)	抑制率 ³ Inhibitory ratio ³ (%)	菌株 Strain	抑制率 ¹ Inhibitory ratio ¹ (%)	抑制率 ² Inhibitory ratio ² (%)	抑制率 ³ Inhibitory ratio ³ (%)
DD160	36.47±0.01A	42.42±0.01B	62.16±0.01A	DD201	22.01±0.03H	31.31±0.01I	52.77±0.01F
DD266	27.77±0.01C	41.24±0.01C	62.16±0.01A	DD272	20.13±0.01I	29.03±0.01M	50.72±0.01G
DD299	25.69±0.01D	36.02±0.01E	62.16±0.01A	DD72	20.75±0.02K	25.25±0.01P	50.12±0.01H
DD159	29.16±0.01B	43.50±0.01A	60.22±0.01C	DD235	23.61±0.01F	31.72±0.01G	50.09±0.01H
DD192	18.05±0.01N	37.09±0.01D	60.34±0.01B	DD281	21.52±0.01I	32.25±0.01F	50.03±0.01I
DD232	20.83±0.01J	32.25±0.01F	59.45±0.01D	DD324	19.44±0.01M	26.55±0.01N	47.22±0.01J
DD290	22.22±0.01G	30.10±0.01K	53.35±0.01E	DD234	14.58±0.01O	29.56±0.01L	47.22±0.01J
DD260	21.52±0.01I	31.63±0.01H	53.33±0.01E	DD261	13.19±0.01P	30.64±0.01J	46.26±0.01K
DD303	24.30±0.01E	25.92±0.01O	53.33±0.01E	CK	—	—	—

注：¹：接种后 72 h 测定抑菌率，对照菌落直径 3.7 cm；²：接种后 96 h 测定抑菌率，对照菌落直径 4.8 cm；³：接种后 120 h 测定抑菌率，对照菌落直径 6.2 cm；表中数据为平均值±标准差，数据后面不同大写字母表示在 $P<0.01$ 水平差异极显著。
Note：¹：Inhibition rate after inoculation for 72 hours, control colony diameter is 3.7 cm；²：Inhibition rate after inoculation for 96 hours, control colony diameter is 4.8 cm；³：Inhibition rate after inoculation for 120 hours, control colony diameter is 6.2 cm. Data are $\bar{x} \pm s$ in table, different letters behind data in the same column show significant difference at $P<0.01$ level.

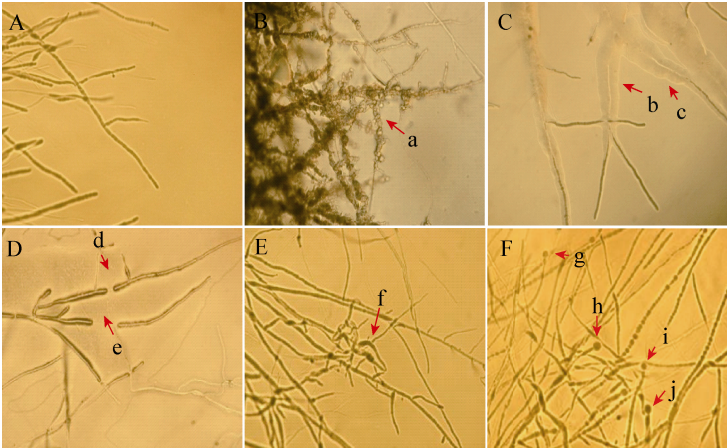


图 2 大豆根瘤内生菌对稻瘟病菌的拮抗作用

Figure 2 Antagonistic effects of endophytic bacteria from soybean nodules against *Magnaporthe grisea*

注：A：正常菌丝；B：DD160 处理后菌丝出现瘤状；C：菌丝被 DD266 形成的生物薄膜包埋；D：DD299 处理后菌丝断裂；E：DD192 处理后菌丝畸形弯曲打结；F：DD159 处理后菌丝末端原生质浓缩、断裂。
Note: A: Normal hyphae; B: Hyphae showed nodules shape after inoculated with DD160; C: Hyphae were buried with biofilm formed by DD266; D: Hyphae become fractures under treatment with DD299; E: Hyphae become deformity, bending and knot under treatment with DD192; F: Hyphal tips become sphere due to protoplasm concentration and fractures under treatment with DD159.

结现象(图 2E 中 f); DD159 使病原菌菌丝末端原生质浓缩呈球状且断裂(图 2F 中 g、h、i、j)。

2.4 内生拮抗菌株的形态及生理生化特征

对复筛抑菌率大于 52%的 10 株菌进行理化特性以及菌体形态进行研究, 结果见表 3。所有菌株对接触酶、D-葡萄糖产酸、肉汤反应均为阳性;

V-P 试验除 DD290 外其余均为阳性, L-阿拉伯糖产酸 DD290、DD303、DD266 反应均为阳性, 对 D-甘露醇利用除 DD160 均为阳性反应, DD201、DD232、DD290、DD299 均能利用木糖, 淀粉酶反应 DD201 和 DD290 为阴性, 其余菌株均可代谢产生淀粉酶; 苯丙氨酸脱氨酶只有 DD290、DD303、

表 3 筛选菌株的理化特性										
Table 3 Physiological and biochemical characteristics of antagonistic strains										
生理生化特性 Physiological and biochemical characteristics	DD160	DD201	DD232	DD290	DD299	DD303	DD192	DD159	DD266	DD260
接触酶	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase test										
V-P 试验	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
V-P test										
D-葡萄糖产酸	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-glucose acid yield										
L-阿拉伯糖产酸	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-
L-arab sugar acid yield										
D-甘露醇	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-mannitol										
木糖	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Xylose										
肉汤	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Broth (pH 5.0)										
淀粉酶	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Amylase										
苯丙氨酸脱氨	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
Phenylalanine deaminase										
卵黄磷脂酶	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
Lecithinase										
硝酸还原酶	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+
Nitrate reductase										
酪素分解	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-
Casein decomposition										
柠檬酸盐利用	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
Citrate utilization										
酪氨酸水解	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Tyrosine hydrolysate										
菌体形状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	杆状	短杆状	杆状	短杆状
Morphology	Rod	Rod	Rod	rod	Rod	Rod	Rod	Short rod	Rod	Short rod
菌体大小	1×(3-4)	(1.0-1.2)× (3-5)	(0.5-1.0)× (1.5-4.0)	(1.0-1.2)× (2.5-5.0)	(1.0-1.2)× (2.6-6.5)	(0.5-1.0)× (1-3)	1× (4-6)	(0.6-1.1)× (1.2-1.5)	1× (3-4)	(0.3-1.0)× (0.6-1.2)
Strain size (μm)										
革兰氏染色	G ⁺	G ⁻	G ⁻	G ⁻	G ⁺	G ⁻	G ⁺	G ⁻	G ⁻	G ⁻
Gram stain										
芽孢	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Spore forming										

Note: +: Positive; -: Negative.

DD192 反应为阳性, 菌株 DD160、DD299、DD30、DD192、DD159 能产生卵黄磷脂酶, 反应为阳性。除 DD201、DD232、DD192 外其余菌株硝酸还原酶反应阳性; 除 DD232、DD192、DD260 外其余菌株均能产生对酪素分解。大部分菌株对酪氨酸水解和柠檬酸盐利用反应阳性。菌体 DD159、DD260 大小为 $(0.3-1.1) \mu\text{m} \times (0.6-1.5) \mu\text{m}$, 呈短杆状, 其他菌株大小为 $(0.5-1.2) \mu\text{m} \times (1.0-6.5) \mu\text{m}$, 呈杆状。经革兰氏染色, 菌株 DD160、DD299、DD192 为革兰氏阳性, 呈紫色, 且有芽孢。

2.5 内生拮抗菌株的 16S rRNA 基因 PCR 扩增及系统发育分析

对复筛中抑菌率大于 52% 菌株进行 16S rRNA 基因 PCR 产物电泳检测, 均获得 1 500 bp 片段, 送

测序公司获得核苷酸序列, 构建系统发育树(图 3)、序列同源性比对(表 4)。由图 3 可知, 整个系统发育树中测试菌株分布在 7 属 9 种, DD201、DD232、DD290 在系统发育树上均位于分支 I, 与假单胞菌属(*Pseudomonas*)为同一个分支, 菌株 DD201、DD232 与蒙氏假单胞菌 *P. monteilii* CIP 104833^T 距离最近, 最大相似率为 99.5%; 菌株 DD290 与 *P. migulae* CIP 105470^T 相距很近, 最大相似率为 99.2%。结合细胞形态和理化特性, 菌株 DD232、DD201 最相似率菌株为蒙氏假单胞菌(*P. monteilii*), DD290 为米氏假单胞菌(*P. migulae*)。菌株 DD266 位于系统发育树分支 II 上, 与肠杆菌属(*Enterobacter*)为同一个分支, 且与阴沟肠杆菌(*E. cloacae*) ATCC 10347^T 相距最近, 最大相似率为 99.0%。结合细胞形态和理化特性, 菌株 DD266 最

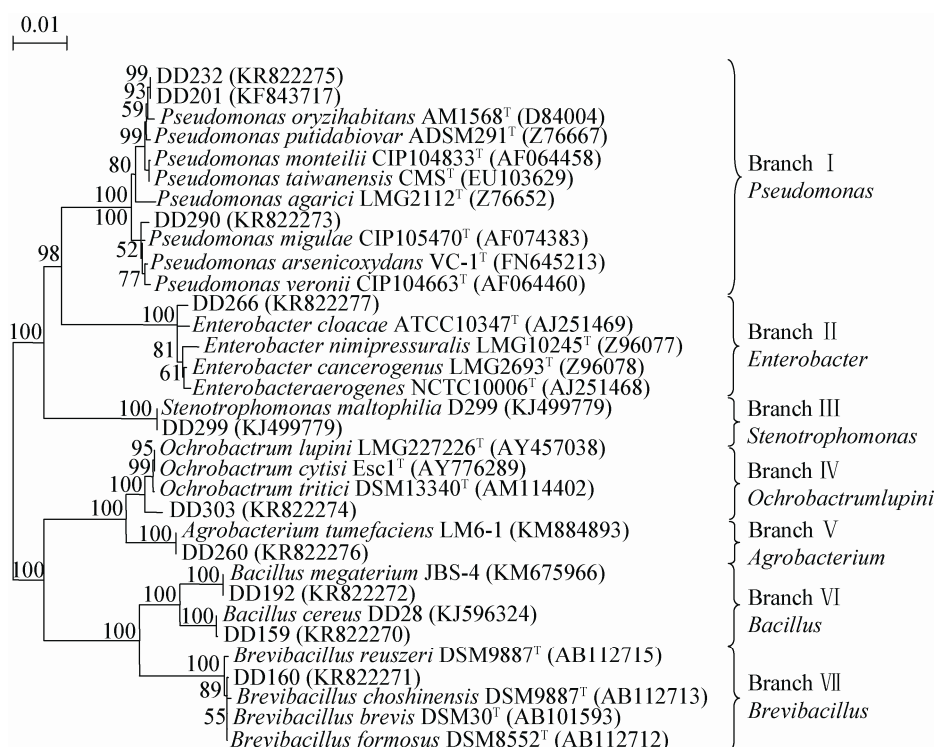


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育进化树

Figure 3 The phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence by Neighbor-Joining method

注: 括号内为菌株的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中的登录号; 分支上数字表示自举值(构建系统树时 1 000 次计算时形成该节点的百分比); 标尺表示 100 个核苷酸有 1 个替换。

Note: The numbers in parentheses represent the accession numbers in the GenBank for the 16S rRNA gene sequences of those reference strains and screened strains. The numbers in the branching points are bootstrap values (expressed as percentages of 1 000 replications; only values above 50% are shown). The scale bar indicates 0.01 substitutions one percent nucleotide position with their 16S rRNA gene sequences.

表 4 测序菌株的同源性分析
Table 4 Homology analysis of the tested strains

菌株 Strain	隶属于 Genus affiliation	登录号 GenBank accession number	最相似菌株 The most closest match	相似率 Similarity (%)
DD160	短芽孢杆菌属 <i>Brevibacillus</i>	KR822271	短芽孢杆菌 <i>B. brevis</i> DSM 30 ^T (AB101593)	99.0
DD201	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	KF843717	蒙氏假单胞菌 <i>P. monteilii</i> CIP104833 ^T (AF064458)	99.5
DD232	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	KR822275	蒙氏假单胞菌 <i>P. monteilii</i> CIP104833 ^T (AF064458)	99.5
DD290	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	KR822273	米氏假单胞菌 <i>P. migulae</i> CIP105470 ^T (AF074383)	99.2
DD299	寡养单胞菌属 <i>Stenotrophomonas</i>	KJ499779	嗜麦芽寡养单胞菌 <i>S. maltophilia</i> (KJ499779)	100
DD303	苍白杆菌属 <i>Ochrobactrum</i>	KR822274	小麦苍白杆菌 <i>O. tritici</i> DSM13340 ^T (AM114402)	98.2
DD192	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	KR822272	巨大芽孢杆菌 <i>B. megaterium</i> JBS-4 (KM675966)	100
DD159	芽孢杆菌属 <i>Bacillus</i>	KR822270	蜡状芽孢杆菌 <i>B. cereus</i> DD28 (KJ596324)	99.9
DD266	肠杆菌属 <i>Enterobacter</i>	KR822277	阴沟肠杆菌 <i>E. cloacae</i> ATCC10347 ^T (AJ251469)	99.0
DD260	农杆菌属 <i>Agrobacterium</i>	KR822276	根癌土壤杆菌 <i>A. tumefaciens</i> LM6-1 (KM884893)	100

相似菌株为阴沟肠杆菌(*E. cloacae*)。DD299 位于系统发育树分支Ⅲ，与寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)为同一个分支，且与嗜麦芽寡养单胞菌 *S. maltophilia* D299 序列最大相似率为 100%。结合细胞形态和理化特性，菌株 DD299 最相似菌株为嗜麦芽寡养单胞菌(*S. maltophilia*)。DD303 位于系统发育树分支Ⅳ，该分支为苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)，与小麦苍白杆菌 *O. tritici* DSM13340^T 序列最大相似率为 98.2%。结合细胞形态和理化特性，DD303 最相似率菌株为小麦苍白杆菌(*O. tritici*)。DD260 位于系统发育树分支Ⅴ，与农杆菌属(*Agrobacterium*)为同一分支，且与根癌土壤杆菌(*A. tumefaciens* LM6-1)相距最近，二者序列最大相似率为 100%。结合细胞形态和理化，菌株 DD260 最相似菌株为根癌土壤杆菌(*A. tumefaciens*)。菌株 DD192、DD159 位于发育树分支Ⅵ，该分支为芽孢杆菌属(*Bacillus*)，菌株 DD192 与巨大芽孢杆菌 *B. megaterium* JBS-4 距离最近，最大相似率为 100%，结合细胞形态和理化特性，菌

株 DD192 最相似菌株为巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)；DD159 与蜡状芽孢杆菌 *B. cereus* DD28 距离最近，且二者最大相似率为 99.9%。结合细胞形态和理化，菌株 DD159 最相似菌株为蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)。DD160 在系统发育树上位于分支Ⅶ，属于短芽孢杆菌属(*Brevibacillus*)，与短芽孢杆菌 *B. brevis* DSM30^T 最大相似率为 99%。结合细胞形态和理化特征，菌株 DD160 最相似菌株为短芽孢杆菌(*B. brevis*)。

2.6 接种拮抗性内生菌对水稻幼苗的控病效果

盆栽试验表明，10 d 后对照组出现明显病状，叶片出现水渍状暗绿小点，扩大成短椭圆形且有灰绿色霉斑出现。发病率为 72.24%。而内生菌处理组，只有部分叶片的接种点变暗绿色，整片也仍为绿色，发病程度较轻。由表 5 可知，DD160、DD266 和 DD299 处理的稻苗整体上发病率和病情指数均明显降低，发病率均小于 30%，病情指数在 20%以下，防治效果均在 66%以上。另外，14 d 观察 DD160 处理的稻苗，叶色逐步正常，病斑面

表 5 拮抗内生菌在稻苗上对稻瘟病的防治效果
Table 5 The control efficiency of antagonistic endophytic bacteria against *Magnaporthe grisea*

菌株	发病率	病情指数	防治效果
Strains	Incidence rate (%)	Disease index	Control efficacy (%)
CK	72.24±0.01A	51.30±0.02A	—
DD160	21.23±0.03B	13.24±0.01B	74.19±0.01A
DD266	23.01±0.01C	15.23±0.01C	70.31±0.03B
DD299	28.15±0.01D	17.36±0.01D	66.16±0.02C
DD159	30.14±0.01E	20.61±0.01E	59.82±0.01D
DD192	32.68±0.01F	21.55±0.01F	57.99±0.01E
DD232	35.33±0.01G	22.25±0.01G	56.63±0.01F
DD290	36.27±0.01H	23.38±0.01H	54.42±0.01G
DD260	38.11±0.01I	24.42±0.01I	52.40±0.02H
DD303	40.92±0.01J	25.10±0.01J	51.07±0.01I
DD201	41.36±0.01K	25.23±0.01K	50.82±0.01J

注：表中数据为平均值±标准差。同列数据后面不同大写字母表示在 $P<0.01$ 水平差异极显著。

Note: The data are mean $\bar{x} \pm s$. Different letters behind data in the same column show significant difference at $P<0.01$ level.

积不再扩大，生长趋于正常；而对照组叶片病斑面积扩大，植株生长受到严重影响。总之，拮抗性内生菌株处理组的病情指数和防治效果与对照相比，防病效果在 $P<0.01$ 水平上达极显著性降低，可作为稻瘟病菌潜在的生防菌株资源。

3 讨论

3.1 丰富的拮抗性内生菌资源

以稻瘟病菌为靶标菌，从大豆根瘤内生菌中进行筛选，有 18 株抑制率达 21% 以上，占总菌数的 6.6%，其中 4 株抑制率在 30% 以上。结果表明对稻瘟病拮抗效果明显的内生菌分布在 7 属 9 种，为稻瘟病菌的生物防治提供了丰富的微生物资源。DD160 属于短芽孢杆菌(*Brevibacillus brevis*)，广泛存在于土壤、水等环境中，曾大兴等^[15]对枯草芽孢杆菌研究表明，芽孢杆菌发酵原液对病原菌孢子萌发有较强抑制作用，从而抑制病原菌的传播、蔓延。Leelasuphakul 等^[16]表明芽孢杆菌对不同植物病原真菌和细菌有防治作用，如对水稻纹枯病、稻瘟病、小麦纹枯病、豆类根腐病、水稻穗颈瘟、小麦全蚀病等。DD192、DD159 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株，吕黎等^[17]研究表明巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)能产生伊枯草菌素

(Iturin A₂)对水稻纹枯病、烟草灰霉病、香蕉灰斑病都有一定防治作用。Kanjnamaneesathian 等^[18]以 *Bacillus megaterium* 为基础开发的生物防治产品田间试验表明，对稻瘟病、水稻纹枯病都有很好的防治效果，在泰国当地正在推广和大力减少使用杀菌剂。蛋白组学分析^[19]表明，枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)细胞和培养液上清蛋白中含有内切-1,4- β -葡聚糖酶，参与多糖降解产生的甘油酸-3-磷酸脱氢酶和丝氨酸蛋白酶对抑制稻瘟病菌活性发挥重要作用。蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)次代谢产物具有丰富的生物学功能多样性^[20]。Lodewyckx 等表明能产生高活性的酶类^[21]、小分子量表面活性剂、多肽类抗真菌活性物质等^[22]，对特定病原菌产生具有活性的抗生素；而地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)分泌的脂肽(表面活性剂)，可诱导稻瘟病菌形态发生变化，阻碍其进一步生长，表现出杀菌剂活性，可作为潜在的稻瘟病抑制剂^[23]。菌株 DD201、DD232、DD290 均属于假单胞菌属(*Pseudomonas*)，该属菌株广泛分布在土壤、植物根际及植物组织内。假单胞菌能产生特异性抗菌化合物藤黄绿菌素(Pyoluteoin)和二乙酰间苯三酚(2,4-Diacetylphloroglucinol)对稻瘟病菌、棉花黄萎病菌等有抑制作用^[24]。Spence 等^[22]体外试验表明，假单胞菌 EA105 能减少 90% 稻瘟病菌附着胞形成，直接抑制 76% 病原菌生长，并且单独产生 HCN，活体试验表明降低稻瘟病 33% 损害，激起宿主诱导系统抗性产生茉莉酸和乙烯。Jha 等^[25]表明利用 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 在稻瘟病出现时单独接种和联合接种都能产生防御相关酶如几丁质酶、多酚氧化酶、多聚过氧化物酶，抑制菌丝生长、完全阻止病菌附着胞的形成，而且诱导宿主产生系统抗性，从而抑制稻瘟病的暴发。因此，假单胞菌属是抑制稻瘟病的另一类潜在的内生菌资源。DD299 属于嗜麦芽寡养单胞菌(*S. maltophilia*)，Jha 等^[26]分离自水稻根部的拮抗性细菌嗜麦芽寡养单胞菌不仅对稻瘟病菌抑制效果明显，且单独接种或复合接种都能提高水稻生长指标。已有研究表明寡养单胞菌对真菌性

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^[27]、产生新的抗真菌化合物 Maltophilin、Xanthobaccin^[28], 产生抗真菌的挥发性有机化合物(VOCs)^[29]、超常水解活性、多样化蛋白酶、几丁质酶、葡聚糖酶、DNA 酶、RNA 酶、酯酶和漆酶等^[30-31]。这些酶类水解病原真菌细胞壁, 菌丝因缺乏机械强度末端膨大变形, 原生质浓缩, 最终导致其死亡; 此外, 可激发宿主防御机制^[32]。

3.2 内生菌抑菌病原菌的可能机理

在筛选过程中, 大豆根瘤内生菌处理病原菌, 菌丝呈现扭曲打结、细胞壁溶解、菌丝断裂、原生质浓缩、末端分枝增多等畸形现象, 可能机制有: (1) 竞争生态位。内生菌和病原菌有相同或相似生态位, 内生菌与病原真菌生长在同一个 PDA 培养基上, 二者在营养上形成竞争, 使病原菌因缺乏营养萎缩、发生畸变。菌株 DD160、DD192 拮抗病原真菌使其菌丝扭曲打结现象。Loaces 等^[33]研究表明分离自水稻的假单胞菌具有拮抗活性, 能产生铁载体与病菌竞争铁元素, 导致病菌因得不到铁而受抑制。(2) 产生水解酶类。内生菌能产生水解酶类, 如几丁质酶和水解酶。病原真菌细胞壁主要为几丁质和葡聚糖, 这些水解酶破坏真菌菌丝细胞壁以及尖端新合成几丁质, 导致细胞壁变薄、因壁受力不均出现局部原生质浓缩。如 DD299、DD159 拮抗病原菌使其菌丝细胞壁溶解、菌丝断裂、原生质浓缩的现象。曾大兴等^[15]研究表明防治水稻稻瘟病内生菌 *Pseudomonas fluorescens* 产生的几丁质酶和葡聚糖酶的水平与它的防病效果有密切关系。(3) 产生抗生素及化感物质。内生菌通过自身代谢产生抗生素类物质, 对植物病原菌具有防病、抗病作用。徐亚军等^[9]表明根系内生菌产生的抗生素类物质, 如 2,4-二乙酰藤黄酚(PHL)、吩嗪羧酸(PCA)、杀菌性挥发物(VOS)等, 对小麦全蚀病菌有较强的抑制作用。分离自芽孢杆菌的抗生素肽类 IturinA 以及多烯大环内酯亚胺 A 可干扰和阻碍病原菌菌丝和孢子的形成^[34]。(4) 形成生物薄膜。生物膜是内生

菌附着于表面或彼此吸附形成复杂胞外多聚物质的矩阵, 并对其包埋的状态, 以适应特定生存环境或生长阶段的需要^[35]。细菌高种群密度可执行单细胞无法完成的特有程序, 如分泌某种代谢物和胞外酶, 当达到一定阈值浓度就对病原菌发挥作用。如枯草芽孢杆菌 6051 能在拟南芥根系形成生物薄膜, 敲除 6051 的表面活性素合成基因后, 成膜能力下降, 失去对病害的防治能力, 证实生防菌在根系形成生物薄膜对植物病害防治具有重要意义^[36]。DD266 在培养基表面形成生物薄膜对病原菌丝进行包埋(图 2C), 阻碍菌丝生长并将其溶解。

由于内生菌具有提高植物抗病性、与病原菌竞争生态位或产生拮抗物质等功能, 被广泛的研究和探讨。但利用豆科植物特殊结构——根瘤内生菌资源探索生物防治资源的研究较为薄弱, 生防作用机理还需进一步通过代谢组学和转录组学深入研究。因此, 本研究筛选对稻瘟病菌拮抗作用的大豆根瘤内生菌, 并对其拮抗作用初步研究, 为探索内生菌与病原菌的互作机制、研发生物防治菌剂提供了微生物资源。

参 考 文 献

- [1] Xiao J, Yang Z, Chen X, et al. Induced resistance against blast disease of rice by ethanol extract from endophyte[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(3): 433-438 (in Chinese) 肖军, 杨镇, 陈珣, 等. 内生菌醇提取物对水稻抗稻瘟病的诱导作用[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(3): 433-438
- [2] Zhang CQ, Zhou MG, Zhu GN. History and research advance of chemicals for controlling rice blast disease[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2009, 11(1): 72-80 (in Chinese) 张传清, 周明国, 朱国念. 稻瘟病化学防治药剂的历史沿革与研究现状[J]. 农药学报, 2009, 11(1): 72-80
- [3] Ryan P, Germaine K, Franks A, et al. Bacterial endophytes: recent developments and applications[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 278(1): 1-9
- [4] Yang B, Chen Y, Li X, et al. Research progress on endophyte-promoted plant nitrogen assimilation and metabolism[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(9): 2656-2664 (in Chinese) 杨波, 陈晏, 李霞, 等. 植物内生菌促进宿主氮吸收与代谢研究进展[J]. 生态学报, 2013, 33(9): 2656-2664
- [5] Zou WX, Tan RX. Recent advances on endophyte research[J]. Acta Botanica Sinica, 2001, 43(9): 881-892 (in Chinese) 邹文欣, 谭仁祥. 植物内生菌研究新进展[J]. 植物学报, 2001, 43(9): 881-892
- [6] Gu PW. Plant endophyte and its secondary metabolites in the application of producing bio-pesticides[J]. Journal of Agricultural Sciences, 2009, 30(3): 56-59 (in Chinese)

- 顾沛雯. 植物内生菌及其代谢产物在生物农药创制中的应用[J]. 农业科学研究, 2009, 30(3): 56-59
- [7] Wu HY, Yuan F, Chen LJ, et al. Advances in soybean cyst nematode and mechanism of soybean resistance to heterodera glaucines[J]. Soybean Science, 2001, 20(4): 285-289 (in Chinese)
- 吴海燕, 远方, 陈立杰, 等. 大豆胞囊线虫病与大豆抗胞囊线虫机制的研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(4): 285-289
- [8] Zhao LF, Xu YJ, Cao DJ, et al. Screening, resistance, phylogeny and growth promoting of phosphorus solubilizing bacteria isolated from soybean root nodules[J]. Acta Ecologica Sinica, 2015, 35(13): 4425-4435 (in Chinese)
- 赵龙飞, 徐亚军, 曹冬建, 等. 溶磷性大豆根瘤内生菌的筛选、抗性及其系统发育和促生[J]. 生态学报, 2015, 35(13): 4425-4435
- [9] Xu YJ, Zhao LF, Chen P, et al. Isolation, screening and characterization of phytopathogen antagonistic endophytes from wild *Artemisia argyi*[J]. Acta Ecologica Sinica, 2013, 33(12): 3697-3705 (in Chinese)
- 徐亚军, 赵龙飞, 陈普, 等. 植物病原菌拮抗性野生艾蒿内生菌的分离、筛选和鉴定[J]. 生态学报, 2013, 33(12): 3697-3705
- [10] Zhao LF, Xu YJ, Lai XH, et al. Screening probiotic endophytic bacteria from medicinal plant *Ilex cornuta* and the phytopathogen inhibiting effect[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2015, 26(5): 1553-1562 (in Chinese)
- 赵龙飞, 徐亚军, 赖心河, 等. 枸骨益生菌的筛选及其抑菌作用[J]. 应用生态学报, 2015, 26(5): 1553-1562
- [11] Shi JY, Chen WX, Liu AY. Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases[J]. Acta Ecologica Sinica, 2006, 26(7): 2395-2401 (in Chinese)
- 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展. 生态学报, 2006, 26(7): 2395-2401
- [12] Dong XZ, Cai MY. Systematic determinative manual of general bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 365 (in Chinese)
- 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 365
- [13] Wang YH, Meng XK, Liu YF, et al. Identification of eight strains of *Bacillus* species and comparison of their difference in biological activities[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(3): 376-384 (in Chinese)
- 王亚会, 孟祥坤, 刘永峰, 等. 八株芽孢杆菌的鉴定及其生物活性差异比较[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(3): 376-384
- [14] Mu CQ, Liu X, Lu QG, et al. Biological control of rice blast by *Bacillus subtilis* B-332 strain[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2007, 34(2): 123-128 (in Chinese)
- 穆常青, 刘雪, 陆庆光, 等. 枯草芽孢杆菌 B-332 菌株对稻瘟病的防治效果及定殖作用[J]. 植物保护学报, 2007, 34(2): 123-128
- [15] Zeng DX, Zhang XY, Jia SJ, et al. *Bacillus subtilis* C-D6 as a potential biocontrol agent against appressorium formation of *Colletotrichum capsici*[J]. Microbiology China, 2015, 42(12): 2377-2385 (in Chinese)
- 曾大兴, 张晓阳, 贾书娟, 等. 枯草芽孢杆菌 C-D6 对辣椒炭疽菌附着胞形成的抑制作用研究[J]. 微生物学通报, 2015, 42(12): 2377-2385
- [16] Leelasuphakul W, Hemmanee P, Chuenchitt S. Growth inhibitory properties of *Bacillus subtilis* strains and their metabolites against the green mold pathogen (*Penicillium digitatum* Sacc.) of citrus fruit[J]. Postharvest biology and Technology, 2008, 48 (1): 113-121
- [17] Lü L, Wang L, Zhou JM, et al. Research status and application of *Bacillus megaterium*[J]. Journal of Agricultural Sciences, 2014, 35(3): 49-52 (in Chinese)
- 吕黎, 王蕾, 周佳敏, 等. 巨大芽孢杆菌的研究现状及应用[J]. 农业科学研究, 2014, 35(3): 49-52
- [18] Kanjanameesathian M, Chumthong A, Pengnoo A, et al. Remove from marked records *Bacillus megaterium* suppresses major Thailand rice diseases[J]. Asian Journal of Food and Agro-Industry, 2009, 2(Special Issue): S154-S159
- [19] Zhang CX, Zhang XX, Shen SH. Proteome analysis for antifungal effects of *Bacillus subtilis* KB-1122 on *Magnaporthe grisea* P131[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 30(6): 1763-1774
- [20] Kilian M, Steiner U, Krebs B, et al. FZB24® *Bacillus subtilis*-mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality[J]. Pflanzenschutz- Nachrichten Bayer, 2000, 53(1): 72-93
- [21] Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, et al. Endophytic bacteria and their potential applications[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 2002, 21(6): 583-606
- [22] Spence C, Alff E, Johnson C, et al. Natural rice rhizospheric microbes suppress rice blast infections[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1): 1-17
- [23] Tendulkar SR, Saikumari YK, Patel V, et al. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen *Magnaporthe grisea*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2331-2339
- [24] Zhang WY, Gao J, Zhang C, et al. Isolation, identification and characterization of five *Pseudomonas* strains[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2013, 53(9): 957-965 (in Chinese)
- 张望月, 高健, 张超, 等. 五种假单胞菌的分离鉴定及其生物活性[J]. 微生物学报, 2013, 53(9): 957-965
- [25] Jha Y, Subramanian RB. Endophytic *Pseudomonas pseudoalcaligenes* shows better response against the *Magnaporthe grisea* than a rhizospheric *Bacillus pumilus* in *Oryza sativa* (Rice)[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2011, 44(6): 592-604
- [26] Jha Y, Subramanian RB. Root associated bacteria from the rice antagonizes the growth of *Magnaporthe grisea*[J]. Journal Plant Pathology & Microbiology, 2013, 4(2): 2-6
- [27] Minkwitz A, Berg G. Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(1): 139-145
- [28] Nakayama T, Homma Y, Hashidoko Y, et al. Possible role of xanthobaccins produced by *Stenotrophomonas* sp. strain SB-K88 in suppression of sugar beet damping-off disease[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(10): 4334-4339
- [29] Wheatley RE. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2002, 81(1): 357-364
- [30] Dobbie J. Isolation and characterization of an extracellular proteinase produced by a soil strain of *Xanthomonas maltophilia*[J]. Current Microbiology, 1991, 22(2): 85-90
- [31] Galai S, Limam F, Marzouki MN. A new *Stenotrophomonas maltophilia* strain producing laccase. Use in decolorization of synthetic dyes[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 158(2): 416-431
- [32] Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, et al. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2009, 7(7): 514-525
- [33] Loaces I, Ferrando L, Scavino AF. Dynamics, diversity and function of endophytic siderophore-producing bacteria in rice[J]. Microbial Ecology, 2011, 61(3): 606-618
- [34] Francis I, Holsters M, Vereecke D. The gram-positive side of plant-microbe interactions[J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(1): 1-12
- [35] Zerrouh H, de Vicente A, Pérez-García A, et al. Surfactin triggers biofilm formation of *Bacillus subtilis* in melon phylloplane and contributes to the biocontrol activity[J]. Environmental Microbiology, 2014, 16(7): 2196-2211
- [36] Branda SS, Chu F, Kearns DB, et al. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(4): 1229-1238