

土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应*

张 慧 杨兴明 冉 炜[†] 徐阳春 沈其荣

(南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高新技术研究重点实验室, 南京 210095)

摘 要 实验采用平板对峙法,从黄萎病发生严重的棉田中的健康植株根际土壤中分离筛选到 11 株对棉花黄萎病致病菌 *Verticillium dahliae* Kleb (Vd) 具有拮抗效果的菌株,抑菌率在 51.8% 和 87.4% 之间,经培养滤液抑菌率试验复筛,选择抑菌效果较好的 3 株菌株进行盆栽试验。结果表明:在施用拮抗菌摇床培养液 (VS)、有机肥 (VF) 和两者结合 (VFS) 的 3 个处理中, VFS 效果最显著,防病率达 57%, 植株生理性状显著改善,根际可培养微生物数量发生显著变化,细菌数量增加 7.3~13.4 倍、放线菌数量增加 3.2~5.9 倍,病原菌菌核数量下降 34%。结合生理生化和 16S rDNA 技术鉴定,初步确定供试的 2 株菌为死谷芽孢杆菌 (*Bacillus vallismortis*), 1 株菌为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。研究表明拮抗菌与有机肥共同施用不仅可以起到防病的作用,而且可以使棉花连作土壤微生物区系向健康、合理的方向发展。本文首次报道了死谷芽孢杆菌对棉花黄萎病有抑制作用。

关键词 棉花黄萎病;拮抗细菌;根际微生物

中图分类号 S154.39 **文献标识码** A

棉花黄萎病是世界棉区的主要土传病害,在我国各产棉区危害日益加重,据统计 2002 年我国黄萎病发病面积高达 300 万 $\text{hm}^{2[1]}$,已成为制约我国棉花产业发展的瓶颈问题。黄萎病是棉花产生连作障碍的主要病害之一,其病原菌为土壤习居菌大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* Kleb (Vd),该病害的防治方法已成为棉花生产的研究热点。生物防治是目前研究克服土传病害的重要方法之一,获得高效拮抗菌株是进行生物防治研究的基础^[2,3]。本文利用分离筛选到的拮抗细菌与合适有机肥结合,综合防治棉花黄萎病,同时测定棉花根际微生物数量,试图为研究克服棉花连作障碍机理提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验样本

土壤: 2006 年 12 月在江苏省大丰市黄萎病重病棉田采集健康植株根际土壤样品 36 份,自然晾干、低温保存。供试病原菌株:棉花黄萎病菌大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* Kleb (Vd),来自南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高新技术研究重

点实验室。供试培养基: PDA、NA、NB,配方参照文献 [4]。

1.2 拮抗菌的分离筛选与效果测定

土壤细菌的分离筛选: 对土壤样品进行系列稀释涂布培养获得细菌单菌落^[5]。将 Vd 保藏种进行活化,用打孔器 (直径 5 mm) 在菌落边缘区域打孔制成菌片,转接在 PDA 平板中央,28 培养 4 d,采用对峙法将分离到的细菌菌株点接在距 Vd 菌片 20 mm 处,每皿接种 3 个菌株,同时设空白对照 (不接菌)。28 培养 7 d,测量 Vd 的菌落直径,并按照下式计算抑菌率。

$$\text{抑菌率 \%} = \frac{\text{对照 Vd 直径} - \text{供试菌株 Vd 直径}}{\text{对照 Vd 直径}} \times 100$$

选择抑菌效果显著的菌落进行纯化,并保存。

1.3 拮抗菌培养滤液对病原菌的抑制效果测定

选择测定中抑菌效果明显的菌株, NB 培养基 37、170 r min^{-1} 振荡培养 48 h,菌悬液经 0.2 μm 细菌过滤器过滤获得滤液。按体积比 1:10 与冷却至 40~50 的 PDA 培养基均匀混合,凝固后在平板中央接种病原菌菌块 (直径 5 mm),同时用无菌水设对照,每处理重复 3 次,28 培养 7 d,测量 Vd 菌

* 国家自然科学基金项目 (40871126) 和国家科技部项目 (2007CB109304) 资助

[†] 通讯作者, Tel: 025-84395212, E-mail: ranwei@njau.edu.cn

作者简介:张 慧 (1981~),女,吉林省延边人,硕士研究生,从事土壤微生物研究。E-mail: 2005103090@njau.edu.cn

收稿日期: 2007-11-14; 收到修改稿日期: 2008-05-26

落直径,并计算抑菌率(公式同上),选择抑菌效果较好的菌株进行抗性试验,确定相互间无生长抑制现象的菌株制备复合菌悬液进行盆栽试验。

1.4 盆栽试验

供试土壤取自江苏省盐城市棉花连作土壤(四茬),有机质 10.18 g kg^{-1} ,全氮 1.32 g kg^{-1} ,速效磷 28.37 mg kg^{-1} ,速效钾 $190.13 \text{ mg kg}^{-1}$;供试病原菌孢子悬液为病原菌接种于 PDA 液体培养基, 28°C 、 170 r min^{-1} 振荡培养 7 d,菌悬液经 4 层纱布过滤获得;拮抗菌复合菌悬液为 HJ-5、DF-15、DF-14 三株拮抗菌分别接种于 NB 培养基中, 28°C 、 170 r min^{-1} 振荡培养 48 h 后,按照含菌量 1:1:1 的比例混合制备;供试有机肥由江苏新天地氨基酸肥料有限责任公司提供,有机质 360.5 g kg^{-1} ,全氮 35.6 g kg^{-1} ,全磷 62.8 g kg^{-1} ;供试棉花品种为新陆早八号,砂培育苗待 2 至 3 片真叶后使用。

试验设 5 个处理,空白(CK)、空白+病原菌(V)、空白+病原菌+拮抗菌复合菌悬液(VS)、空白+病原菌+有机肥(VF)、空白+病原菌+拮抗菌复合菌悬液+有机肥(VFS),每盆装土 1.5 kg ,施尿素 0.15 g ,氯化钾 0.1 g ,4 次重复。病原菌接种方法:将棉花黄萎病病原菌的孢子悬液与盆栽土壤混合均匀装盆(2.8×10^4 个 g^{-1} 土)。有机肥使用方法:每盆 20 g 与土壤混合均匀。拮抗菌接种方法:用无菌水将制备好的拮抗菌复合菌悬液稀释 5 倍,棉苗沾根后定植,其余稀释液浇灌于棉苗根部周围(6.7×10^7 个 g^{-1} 土),或者与有机肥混合均匀后施入。棉花生长 48 d 后调查黄萎病发生情况,并计算发病率和防治效果,测定棉花株高、鲜重、干重(105 杀青 30 min,75 烘干至恒重)。

1.5 土壤微生物数量的测定方法

根际土壤可培养微生物采用系列稀释平板计数法计数^[6],细菌采用 NA 培养基,真菌采用马丁氏(Martin)培养基,放线菌采用改良高氏一号培养基。

土壤中棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌菌核数的测定参照文献[7]。选择性培养基配制方法为:土壤浸提液 25 ml , KH_2PO_4 1.5 g , K_2HPO_4 4 g ,尿酸钠 0.2 g ,半乳糖醛酸钠(果胶) 1 g ,山梨糖 1 g ,Dox 盐 2 ml ,Tergito NP-10 1 ml ,PCNB 0.1 g ,琼脂 17 g ,蒸馏水 1000 ml ,pH6.4~6.7。每 1000 ml 融化培养基倒皿前加抗菌素液 50 ml (含氯霉素 0.05 g 链霉素 0.05 g 青霉素-G 盐 0.05 g)。

1.6 拮抗菌株的鉴定

将分离得到的拮抗菌株接种至 NB 培养基平板

上, 28°C 倒置培养 5 d,观察其菌落形态特征。利用革兰氏染色镜检和透射电镜技术观察菌体形态。淀粉水解等生理生化试验及其培养基按常见细菌鉴定方法进行^[8]。

降解菌株的分子生物学鉴定:采用菌体直接扩增 16S rDNA 的方法。PCR 扩增引物选用 16S rDNA 细菌通用引物 27f/1492r [5'端引物:5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3' (*Escherichia coli* bases 8~27)^[9], 3'端引物:5'-TACCTTGTTACGACTT-3' (*Escherichia coli* bases 1507~1492)^[10]]。扩增反应体系为: $10 \times \text{Taq}$ 聚合酶反应缓冲液 $5 \mu\text{l}$, dNTP (20 mmol l^{-1}) $5 \mu\text{l}$, 5'端引物 ($25 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$) $2 \mu\text{l}$, 3'端引物 ($25 \text{ pmol } \mu\text{l}^{-1}$) $2 \mu\text{l}$, Mg^{2+} (25 mmol l^{-1}) $6 \mu\text{l}$, 菌体 DNA (约 $50 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) $1 \mu\text{l}$, Taq DNA 聚合酶 ($5 \text{ U } \mu\text{l}^{-1}$) $0.5 \mu\text{l}$, H_2O $28.5 \mu\text{l}$, 总体积 $50 \mu\text{l}$ 。PCR 反应条件: 94°C 预变性 2 min, 进入热循环: 94°C 变性 30 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 30 个循环。PCR 产物采用试剂盒 (Axyrep DNA Gel Extraction Kit, Axygen Biosciences) 纯化后,与 pMD19-T-vector 载体连接。16 连接 10 h,转化 *E. coli* DH5, 经蓝白斑筛选,随机挑选阳性克隆,酶切质粒 DNA 验证后,进行测序。测序结果在 GenBank 数据库中进行同源性检索。

1.7 数据处理

数据采用 SAS8.2 统计软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的筛选与鉴定

通过平板对峙法,从分离到的 600 余株土壤细菌中筛选到 11 株具有拮抗能力的菌株(表 1),其中 HJ-1、HJ-5、DF-6、DF-7、DF-12、DF-13、DF-14、DF-15 等 8 株菌株均能显著抑制 Vd 生长,抑菌率大于 70%。

胞外拮抗物质的产生能力是筛选高效拮抗菌株的标准之一。通过对初筛获得的 8 株拮抗菌的培养滤液抑制 Vd 生长能力的测定发现, HJ-5、DF-15、DF-14、DF-13、DF-12 等 5 株拮抗菌的培养滤液对 Vd 菌落生长的影响与对照差异显著 ($p < 0.05$),结果见表 2。其中 HJ-5、DF-15、DF-14 三株菌株的抑菌率大于 30%,通过平板抗性试验表明三者之间无拮抗现象,所以选用 HJ-5、DF-15、DF-14 三株拮抗菌制备拮抗菌复合菌悬液进行盆栽试验。

表 1 分离菌株对 Vd 生长的影响

Table 1 Influence of the isolated bacterial strains on growth of Vd

供试菌株 Bacterial strain	抑菌率 Inhibition rate (%)	抑菌带 Inhibition zone (mm)
HJ-1	74.6	8ab
HJ-2	51.8	4.7c
HJ-3	62.6	8.7ab
HJ-4	68.2	7.1b
HJ-5	87.4	9.6a
DF-6	72.5	7.3b
DF-7	78.9	8.5ab
DF-12	75.2	8.8ab
DF-13	73.5	7.5b
DF-14	84.7	8.3ab
DF-15	86.6	8.6ab

表 2 初筛菌株的培养滤液对 Vd 生长的影响

Table 2 Effect of culture filtrate of the isolated strains on growth of Vd

初筛菌株 Bacterial strain	Vd 菌落直径 Diameter of Vd (mm)	抑菌率 Inhibition rate (%)
CK	70a	-
HJ-1	67ab	4.3
HJ-5	40c	42.9
DF-6	62ab	11.4
DF-15	47c	32.9
DF-12	59b	15.7
DF-13	58b	17.1
DF-14	45c	35.7
DF-7	62ab	11.4

2.2 拮抗菌与有机肥结合施用对棉花苗期生长的影响

通过利用拮抗菌复合培养液与有机肥混合接种,进行盆栽试验。结果表明,CK与 VS、VF处理间株高、鲜重无显著差异,干重差异显著;VS与 VF处理间干重差异显著;CK与 VFS处理间株高、鲜重、干重差异均显著(表 3),说明拮抗菌对棉花苗期生长有促进作用,拮抗菌与有机肥共同施用能够显著提高棉花苗期的生长。

表 3 拮抗菌与有机肥结合施用对棉花苗期生长的影响

Table 3 Effect of antagonistic bacteria plus organic manure on growth of cotton seedling

处理 Treatment	株高 Plant height (cm)	鲜重 Fresh weight (g)	干重 Dry weight (g)
CK	18.1 ±0.7b	14.6 ±0.8c	2.1 ±0.2b
V	8.6 ±1.2c	4.1 ±1.6d	0.61 ±0.1c
VS	20.7 ±7.9ab	17.1 ±3.1bc	4.4 ±0.6a
VF	19.9 ±1.4ab	15.0 ±1.5ab	2.2 ±0.1b
VFS	26.8 ±1.3a	21.6 ±1.4a	4.5 ±0.2a

2.3 拮抗菌与有机肥结合施用对棉花苗期黄萎病的防治效果

从表 4 可以看出,VS、VF、VFS处理对棉花苗期黄萎病均有防治效果,其中 VFS的防治效果高达 57%,VS和 VFS处理结果表明拮抗菌对棉花黄萎病具有防治效果;VF和 VFS处理结果表明施用有机肥能够降低黄萎病的发病率,其中 VFS处理的发病率降低达 50%;VFS的防治效果说明拮抗菌与有机肥结合施用能够提高防治效果。

表 4 拮抗菌与有机肥结合施用防治棉花黄萎病的效果

Table 4 Effect of antagonistic bacteria plus organic manure on control of cotton verticillium wilt in green house

处理 Treatment	发病率 Incidence of Verticillium wilt (%)	防治效果 Control Effect (%)
CK	13%	-
V	88%	-
VS	50%	43%
VF	63%	28%
VFS	38%	57%

2.4 拮抗菌与有机肥结合施用对棉花连作土壤微生物数量的影响

从测定各处理间根际土壤微生物数量可以看出(表 5),VS、VF、VFS处理真菌数量较 CK均有减少,细菌和放线菌数量有显著增加。其中,细菌为 CK的 4.94~9.06倍、3.56~5.89倍、7.33~13.44倍;VF和 VFS处理放线菌数较 CK有显著增加,

表 5 施用拮抗菌及有机肥对棉花连作土壤微生物区系的影响

Table 5 Effect of antagonistic bacteria plus organic manure on soil microflora in cotton fields under consecutive cropping

处理 Treatment	细菌 Bacteria ($\times 10^7$ cfu g^{-1} soil)	放线菌 Actinomyces ($\times 10^6$ cfu g^{-1} soil)	真菌 Fungi ($\times 10^4$ cfu g^{-1} soil)	大丽轮枝 菌菌核 Sclerotia (个 g^{-1})
CK	1.8 ±0.5b	2.7 ±1.1b	2.3 ±0.5ab	87 ±7b
V	1.6 ±1.0b	2.3 ±1.0b	2.7 ±1.2a	109 ±16a
VS	12.6 ±3.7a	9.2 ±0.9a	1.3 ±0.4bc	79 ±23b
VF	8.5 ±2.1a	5.8 ±3.2b	1.2 ±1.1bc	81 ±21b
VFS	18.7 ±5.5a	12.2 ±3.7a	1.9 ±0.3c	78 ±7b

为 CK的 2.44倍~4.81倍、3.15倍~5.89倍;VS、VF处理真菌数量较 CK稍有减少,VFS处理较 CK显著减少;VFS处理大丽轮枝菌菌核数量较 V处理下降 34%。

2.5 菌株生理生化特性及 16S rDNA 鉴定

在 LB 平板上,37 培养箱倒扣生长 12 h 后的

HJ-5、DF-15、DF-14 菌株菌落周边不规则,不透明,具运动性,HJ-5、DF-15 菌株菌落表面起皱,DF-14 菌落表面光滑。挑单菌落镜检均为杆状。透射电镜照片显示 HJ-5 和 DF-14 菌株为杆菌(图 1)。染色表明,三株菌株均为革兰氏阳性(G+)细菌。生理生化试验表明,HJ-5、DF-15、DF-14 菌株的葡萄糖产酸、蔗糖产酸、麦芽糖产酸、木糖产酸、甘露醇产酸

反应、淀粉水解、氧化酶、厌氧生长、甲基红反应、V-P (Voges-Proskauer)反应、柠檬酸盐利用和硝酸盐降解等均为阳性,而乳糖产酸和丙酸盐利用均为阴性。由于 HJ-5 和 DF-15 菌生理生化特性完全相同,在浓度为 50 mg L⁻¹ 的 NaCl 溶液中生长受到显著抑制,而 DF-14 菌生长良好,因此初步判断 HJ-5 与 DF-15 菌为同一种菌,而与 DF-14 菌有差异。

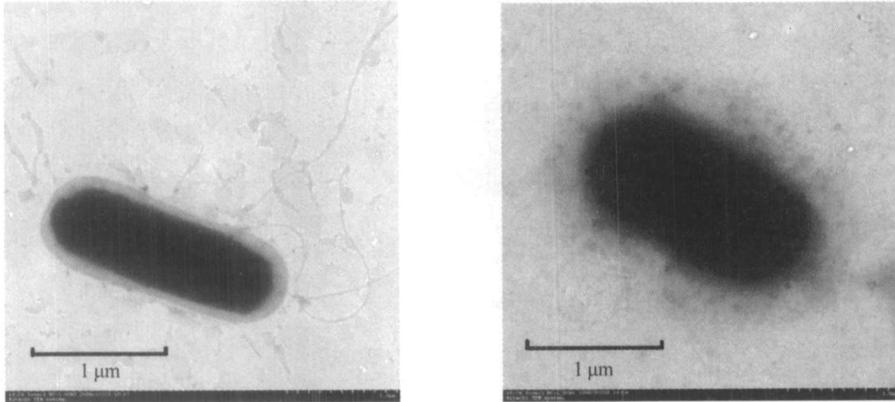


图 1 HJ-5(左)和 DF-14(右)菌体透射电镜图片

Fig. 1 Thalli photo of bacteria of HJ-5(left), DF-14(right) (Bar = 1 μm)

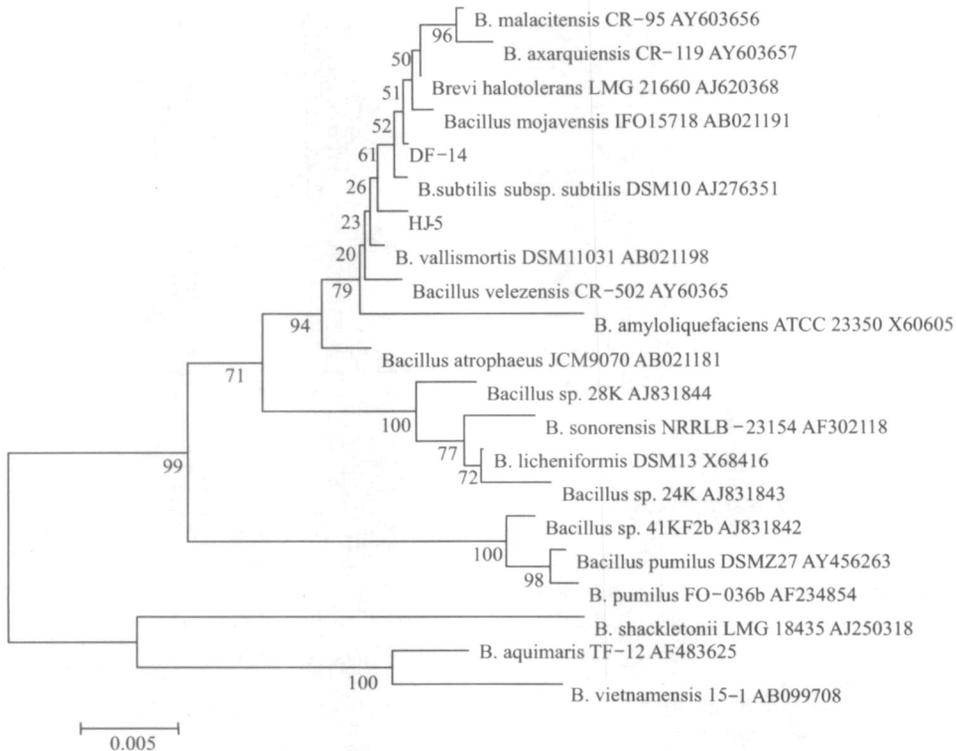


图 2 基于 HJ-5、DF-14 和相关菌株的 16S rDNA 序列建立的系统发育树(建树方法采用邻位相连法,标尺代表 16S rDNA 序列中每 1 000 个核苷中有 5 个核苷替代)

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences of HJ-5, DF-14 and related strains (This tree was established using the neighbor-joining method. The bar represents 5 nucleotide substitutes per 1 000 nucleotides in 16S rDNA sequences)

进一步用分子生物学方法对 HJ-5 和 DF-14 菌株进行鉴定,扩增获得的 16S rDNA 序列 HJ-5 菌株有 1 562 bp,DF-14 菌株有 1 606 bp。测序结果在 GeneBank 数据库中进行 BLAST 同源性检索,再用 MEGA3.1 分析绘制系统发育树(图 2)。结果表明,HJ-5 菌株与死谷芽孢杆菌 *Bacillus vallismortis* (AB021198) 的同源性达 99.8%,DF-14 菌株与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (AJ276351) 的同源性达 97.7%,因此初步确定 HJ-5 为死谷芽孢杆菌,DF-14 为枯草芽孢杆菌。

3 讨 论

迄今,本文首次报道了死谷芽孢杆菌对大丽轮枝菌侵染和危害有显著的抑制作用。自 1996 年首次报道死谷芽孢杆菌为枯草芽孢杆菌的近亲以来^[11],2007 年一项研究首次报道了该菌对番茄的青枯病致病菌 (*Ralstonia solanacearum*) 生长有抑制作用^[12]。由于细菌与真菌病原菌的侵染、危害及其控制方法有较大的差异,因此本文的研究结果具有较好的创新性。

生物防治土传病害是未来农业生产中的重要措施,分离筛选高效拮抗菌是进行生物防治研究工作的基础。土壤是微生物生活的大本营,尽管通过可培养方式只能获得土壤微生物总量的 0.1%^[13],但可供筛选利用的有益微生物资源还是相当丰富的。我们从棉花黄萎病发生严重的土壤中分离筛选到 3 株拮抗菌 HJ-5、DF-14、DF-15,在平板对峙试验中对棉花黄萎病致病菌大丽轮枝菌均有显著拮抗效果(图 1)。近年来很多报道,高效拮抗菌常常是在实验室平板效果明显,在盆栽和田间效果不稳定。因此,目前采用多株拮抗菌复配使用提高防治效果的策略的研究报道较多^[14],有细菌与真菌、细菌与酵母、细菌与细菌等多种形式^[15-17]。我们将筛选到的 3 株拮抗细菌进行细菌与细菌的复配研究,综合防治效果有了提高,这与前人的研究结果是一致的^[14],可能与三株拮抗菌之间的拮抗方式互补有一定关系。另一个重要因素是拮抗菌赖以生存并发挥作用的环境条件与营养状况、气候变化等因素的影响,通过人为技术,直接为拮抗菌创造宜居微环境提高了拮抗效果。目前利用有机肥施肥过程向土壤中添加有助拮抗菌定植、促进生长的研究报道不多见。本盆栽试验表明,HJ-5、DF-14、DF-15 三株拮抗菌发酵液的复合菌剂与有机肥结合施用对

棉花黄萎病防治效果高达 57%(表 4),可能是由于土壤中加入有机物等措施提高原有的拮抗微生物的活性,从而降低土壤中病原菌的密度,抑制病原菌的活动,减轻病害的发生^[18]。同时对植株的生长也有一定的促进作用,这与前人研究施用抗生素剂缓解大豆重迎茬根际微生态障碍并能促进植株生长发育的结果一致^[19]。

土壤微生物是土壤中最活跃的肥力因子之一,在土壤生态系统中占重要位置^[20,21],对土壤结构的改善和养分积累、转化以及维持和促进植物生长起重要作用^[22]。细菌是土壤物质转化的主要动力,在土壤中占绝对优势。放线菌产生抗生素和激素类物质,有利于抑制有害微生物的生长。真菌虽在物质分解中也起重要作用,但往往与土传病害有关。所以土壤中细菌、放线菌数量与土壤养分含量及作物产量呈显著正相关,而真菌数量与养分含量之间相关性较差^[23]。土壤微生物区系失去平衡(细菌数量减少、真菌数量增加)是作物连作产生障碍的主要因素之一,因此在研究克服连作障碍的施肥过程中,不仅要抑制土传病原菌的数量,而且要提高有益细菌和放线菌的数量。本试验结果表明:在棉花连作土壤中使用拮抗菌和与之匹配的有机肥能够明显改变土壤微生物区系组成,拮抗菌和有机肥的施入能够改变土壤中微生物数量,使连作土壤中真菌数量降低,细菌和放线菌的数量有所上升。细菌可分解有机物料带来大量可溶性物质,从而大量繁殖^[24]。细菌数量较 CK 增加 7.3 倍~13.4 倍、放线菌数量较 CK 增加 3.2 倍~5.9 倍、而真菌的数量略有减少、病原菌(大丽轮枝菌微菌核)数量下降 34%(表 5),障碍土壤的微生物区系能够逐步向健康土壤的微生物区系方向发展。

棉花黄萎病致病菌大丽轮枝菌在土壤中产生的休眠体——微菌核是其侵染下茬棉花的主要方式,在土壤中和作物病残体中可存活十几年之久^[25,26]。本试验中微菌核数量虽然减少,但下降幅度不大,未达到临界值,这可能与我们的分离筛选的拮抗菌是抑制病原菌营养体而不是微菌核寄生菌有关^[27]。所以在以后的试验中不但要筛选对病原菌营养体有抑制作用的拮抗菌,而且也要筛选对休眠体有作用的拮抗菌株,两者结合效果会更好。同时拮抗菌接种连作土壤后,定植行为和位点、与病原菌之间的关系需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] 简桂良,邹亚飞,马存,等,棉花黄萎病连年流行的原因及

- 对策. 中国棉花, 2003, 30(3): 13~14. Jian G L, Zou Y F, Ma C, *et al*. The reasons for the prevalence of cotton Verticillium wilt and the controlling strategy (In Chinese). China Cotton, 2003, 30(3): 13~14
- [2] Tjamos E C, Tsitsiyannis D I, Tjamos S E, *et al*. Selection and evaluation of rhizosphere bacteria as biocontrol agents against *Verticillium dahliae*. In: Tjamos E C ed. Advances in *Verticillium*: Research and Disease Management. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. 244~248
- [3] Berg J, Lotmann J. Bacterial antagonists to *Verticillium longisporum* in the rhizosphere of oilseed rape. In: Tjamos E C ed. Advances in *Verticillium*: Research and Disease Management. Saint Paul: American Phytopathological Society Press, 2000. 240~243
- [4] 方中达. 植病研究方法(第三版). 北京: 中国农业出版社, 1998. Fang Z D. Methods of Plant Pathology Research (In Chinese). 3rd Ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998
- [5] 沈萍, 范秀荣, 李广武. 微生物学实验(第三版). 北京: 高等教育出版社, 1999. 69~72. Shen P, Fan X R, Li G W. Laboratory Experiments in Microbiology (In Chinese). 3rd Ed. Beijing: Higher Education Press, 1999. 69~72
- [6] Li F L, Yu Z N, He S J. Experimental Technique for Agriculture Microbiology. Beijing: China Agriculture Press, 1996. 178~181
- [7] 杨家荣, 商鸿生. 分离土壤棉花黄萎病菌选择性培养基的筛选. 植物病理学报, 2002, 32(3): 236~240. Yang J R, Shang H S. Screening the selective medium for isolating *Verticillium dahliae* of cotton from naturally infested soil (In Chinese). Acta Phytopathologica Sinica, 2002, 32(3): 236~240
- [8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001. Dong X Z, Cai M Y. Manual of Systematic and Determinative Bacteriology (In Chinese). Beijing: Science Press, 2001
- [9] Edwards U, Rogall T B, Emde H, *et al*. Isolation and direct complete determination of entire genes. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 7843~7853
- [10] Wilson K H, Blitchington R B, Green R C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol, 1990, 28: 1942~1946
- [11] Roberts M S, Nakamura L K, Cohan F M. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California. Microbiological Societies, 1996, 46(2): 470~475
- [12] Park K, Paull D, Kim I Y K, *et al*. Induced systemic resistance by *Bacillus vallismortis* EXTN-1 suppressed bacterial wilt in tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. The Plant Pathology Journal, 2007, 23(1): 22~25
- [13] Ihekwe A M, Kennedy A C. Role of antibiotic biosynthesis in the inhibition of *Pythium ultimum* in the cotton spermosphere and rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens*. Mol. Plant-Microbe Interact, 1998, 4: 393~399
- [14] Mew T W, Rosales A M. Bacterization of rice plants for control sheath blight caused by *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 1986, 76: 1260~1264
- [15] Leibinger W, Beukker B, Hahn M, *et al*. Control of postharvest pathogens and colonization of *Fluorescent pseudomonas* spp. and root-colonizing fungi. Eur. J. Plant Pathol, 1997, 102: 21~31
- [16] Rauach G S, Kloepper J W. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. Phytopathology, 1998, 88: 1158~1164
- [17] Singh P P, Shin Y C, Park C S, *et al*. Biological control of fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. Phytopathology, 1999, 89: 92~99
- [18] Ouhdouch D. Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. European Journal of Soil Science, 2001, 37(2): 69~74
- [19] 邹德勋, 徐凤花, 潘俊波. 抗菌剂在缓解大豆重迎茬根际微生态障碍中的作用. 大豆科学, 2007, 26(2): 280~283. Zou D X, Xu F H, Pan J B, *et al*. Function of antimicrobial agent on delaying rhizosphere microbe obstacle of continuous and one year intermittent cropping soybean (In Chinese). Soybean Science, 2007, 26(2): 280~283
- [20] 刘更另, 金维续. 中国有机肥料. 北京: 农业出版社, 1991. 238~248. Liu G L, Jin W X. China Organic Fertilizer (In Chinese). Beijing: Agriculture Press, 1991. 238~248
- [21] 陈文新, 胡正嘉. 土壤和环境微生物学. 北京: 北京农业大学出版社, 1990. Chen W X, Hu Z J. Microbiology of Soil and Environment (In Chinese). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1990
- [22] 骆世明, 彭少麟. 农业生态系统分析. 广州: 广东科学技术出版社, 1996. Luo S M, Peng S L. Analysis of Agricultural Ecology System (In Chinese). Guangzhou: Guangdong Science Technology Press, 1996
- [23] 王超, 吴凡, 刘训理, 等. 不同肥力条件下烟草根际微生物的初步研究. 中国烟草科学, 2005(2): 12~14. Wang C, Wu F, Liu X L, *et al*. Tobacco rhizosphere microorganism in different fertility of soil (In Chinese). China Tobacco Science, 2005(2): 12~14
- [24] 郭荣君, 刘杏忠, 杨怀文. 大豆根际细菌拮抗大豆根腐病菌研究. 大豆科学, 1998, 17(1): 53~58. Guo R J, Liu X Z, Yang H W. Soybean Rhizobacterial studies on control of soybean root rot disease (In Chinese). Soybean Science, 1998, 17(1): 53~58
- [25] Ellis R J, Morgan P, Weightman A J, *et al*. Cultivation-dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(6): 3223~3230
- [26] Powelson R L. Significance of population level of *Verticillium* in soil. Root Diseases and soil-borne Pathogens. California: Univ. of California Press, 1970. 31~33
- [27] Menzies J D, Griebel G E. Survival and saprophyte growth of *Verticillium dahliae* in uncropped soil. Phytopathology, 1967, 57: 703~709

SCREENING OF BACTERIA ANTAGONISTIC AGAINST SOIL-BORNE COTTON VERTICILLIUM WILT AND THEIR BIOLOGICAL EFFECTS ON THE SOIL-COTTON SYSTEM

Zhang Hui Yang Xingming Ran Wei[†] Xu Yangchun Shen Qirong

(Jiangsu Key Laboratory for Organic Solid Waste Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract In an experiment using the flat-stand method, 11 strains of bacteria antagonistic against *Verticillium dahliae* Kleb (Vd) were isolated from healthy cotton plants growing in cotton fields seriously infected with verticillium wilt. Their verticillium inhabiting rates ranged from 70% to 87.4%. Cotton Verticillium wilt disease was effectively suppressed by 57% over the control by application of a mixture of the antagonistic bacteria along with organic fertilizer. Microbial communities were significantly changed in cotton rhizospheric soils in Treatment VS (application of mixed antagonistic strain solution), Treatment VF (organic manure), and Treatment VFS (strain solution plus organic manure), among which Treatment VFS was the highest in disease inhabiting rate, reaching 57%. Significant increase in population of bacteria and actinomyces and decrease in population of pathogen microsclerotia were found in these treatments, as compared with that in the control. Based on the physiological and biochemical determination and the 16S rDNA sequence analysis, HJ-5 and DF-15 strains were identified as *Bacillus vallismortis*, while DF-14 strain as *Bacillus subtilis*. This is the first paper that reports *Bacillus vallismortis* is antibiotic against *Verticillium dahliae*.

Key words Cotton Verticillium wilt; Antagonistic bacteria; Rhizosphere microbe