

研究报告

## 新疆棉花黄萎病菌拮抗细菌的分离、筛选与鉴定

张涛<sup>1</sup> 李雪艳<sup>1</sup> 杨红梅<sup>2</sup> 楚敏<sup>2</sup> 史应武<sup>2\*</sup>

(1. 新疆大学生命科学与技术学院 新疆 乌鲁木齐 830046)

(2. 新疆农业科学院微生物应用研究所 新疆 乌鲁木齐 830091)

**摘要:**【背景】棉花黄萎病是由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)引起的一种世界性病害,近年来对该病害的生物防治因具有环境友好和人畜安全的特性而倍受关注。【目的】筛选棉花黄萎病高效拮抗细菌并对其进行鉴定,为棉花黄萎病的生物防治扩充菌种资源。【方法】采用稀释涂布平板法分离细菌,并进行拮抗细菌的初筛和复筛,通过形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析对筛选到的细菌进行鉴定,确定其分类地位。【结果】初筛分离到 535 株对病原菌具有拮抗作用的细菌,并选取了 108 株拮抗细菌进行复筛,最终筛选到了 4 株优势拮抗细菌。通过形态观察、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析,将菌株 BHZ-29、SHT-15、SHZ-24 和 SMT-24 分别鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)、枯草芽孢杆菌斯皮兹仁亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*)、萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)和香草芽孢杆菌(*Bacillus vanillea*)。【结论】获得了 4 株高效拮抗细菌,并且首次报道了香草芽孢杆菌对棉花黄萎病菌具有抑制作用。

**关键词:** 棉花黄萎病, 鉴定, 贝莱斯芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌斯皮兹仁亚种, 萎缩芽孢杆菌, 香草芽孢杆菌

## Isolation, screening and identification of antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae* Kleb. in Xinjiang

ZHANG Tao<sup>1</sup> LI Xue-Yan<sup>1</sup> YANG Hong-Mei<sup>2</sup> CHU Min<sup>2</sup> SHI Ying-Wu<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046, China)

(2. Institute of Microbiology, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, Xinjiang 830091, China)

**Abstract:** [Background] Cotton *Verticillium* wilt, caused by *Verticillium dahliae* Kleb., is one of the most devastating diseases. Biological control has been drawn more and more attention in recent years for its safety to environment, human and animal. [Objective] In order to expand strain resources for

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (41471220); Xinjiang Uygur Autonomous Region Outstanding Young Talent Training Program (qn2005yx023); China Postdoctoral Science Foundation Program (2016M602953XB)

\*Corresponding author: E-mail: syw1973@126.com

Received: January 02, 2018; Accepted: May 04, 2018; Published online (www.cnki.net): June 04, 2018

基金项目: 国家自然科学基金(41471220); 新疆维吾尔自治区优秀青年科技人才培养项目(qn2005yx023); 中国博士后科学基金(2016M602953XB)

\*通信作者: E-mail: syw1973@126.com

收稿日期: 2018-01-02; 接受日期: 2018-05-04; 网络首发日期(www.cnki.net): 2018-06-04

biological control of cotton *Verticillium* wilt, we urge to isolate, screen and identify highly efficient antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae* Kleb. **[Methods]** The bacteria were isolated by spread plate method, the antagonistic bacteria were obtained by primary screening and subsequent screening. Strains were identified based on morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. **[Results]** 535 strains of antagonistic bacteria were primarily isolated and 108 strains of them were further tested. Finally, four highly efficient antagonistic bacteria were screened. Based on morphological, physiological and biochemical characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis, strains BHZ-29, SHT-15, SHZ-24 and SMT-24 were preliminarily identified as *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus atrophaeus* and *Bacillus vanillea*, respectively. **[Conclusion]** Four highly efficient antagonistic bacteria were obtained and the inhibition effect of *Bacillus vanillea* on cotton *Verticillium* wilt was reported for the first time.

**Keywords:** Cotton *Verticillium* wilt, Identification, *Bacillus velezensis*, *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus vanillea*

新疆是我国最大的产棉基地, 棉花黄萎病是新疆棉花产业中最主要的病害之一, 严重阻碍了新疆棉花产业的发展<sup>[1]</sup>。同时, 由于常年连作、棉杆还田以及品种抗病性差等不利因素使新疆棉花黄萎病的发生日趋严重<sup>[2]</sup>, 造成了巨大的经济损失<sup>[3]</sup>。而生物防治以无污染、无残留、对人畜安全无害且不易使病原菌产生耐药性等优点, 已成为棉花黄萎病研究工作中的热点<sup>[4]</sup>。利用生防菌防治棉花黄萎病是生物防治研究的主要内容, 而拮抗细菌以种类多、分布广、生长快、抗逆性强和次生代谢产物多而著称, 是生物防治棉花黄萎病的主要菌群<sup>[5]</sup>。因此, 筛选棉花黄萎病高效拮抗细菌对棉花黄萎病的生物防治具有重要意义。近年来, 国内外关于棉花黄萎病的生物防治已有很多研究。Erdogan 等<sup>[6]</sup>分离了 4 株荧光假单胞菌并研究了其对棉花黄萎病的防治效果。Tehrani 等<sup>[7]</sup>分离的 2 株芽孢杆菌不仅对棉花黄萎病有拮抗作用, 而且能够提高棉花的产量。张冬冬等<sup>[8]</sup>获得了一株拮抗细菌 Z-5, 其对大丽轮枝菌的防治效果达到 76.05%。刘海洋等<sup>[9]</sup>的研究结果表明拮抗细菌 AL7 对棉花黄萎病的防治效果达到 77.1%。周京龙等<sup>[10]</sup>分离的一株拮抗细菌 YUPP-10 对棉花黄萎病的防治效果高达 80.60%。

生物防治是目前防控棉花黄萎病最有效的方法, 但是拮抗细菌定殖能力差是棉花黄萎病防治中普遍存在的问题<sup>[11-17]</sup>。因此, 不断地大量挖掘拮抗

细菌资源是筛选具有高定殖潜力拮抗细菌的基础。本文通过对新疆棉区 8 个采样点样品的分离、筛选和鉴定工作的研究, 以期筛选出对大丽轮枝菌具有明显抑制作用的拮抗细菌, 为新疆棉花黄萎病的生物防治扩充菌种资源, 同时为研究该拮抗细菌的定殖潜力奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 供试病原菌和模式菌株

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)和模式菌株由新疆农业科学院植物保护研究所提供。

#### 1.1.2 培养基

NA 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉粉 3.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.3±0.1。1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

NB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉浸出粉 3.0, 氯化钠 5.0, pH 7.2±0.2。1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

PDA 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0, 自然 pH。1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

TSA 培养基(g/L): 胰酪胨 15.0, 大豆木瓜蛋白酶水解物 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0, pH 7.3±0.2。1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

Czapek's 培养基(g/L): NaNO<sub>3</sub> 3.00, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.00, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.50, KCl 0.50, FeSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.01, 蔗糖 30.00, pH 6.5。1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

菌种鉴定培养基: 参见东秀珠等<sup>[18]</sup>的《常见细

菌系统鉴定手册》。

### 1.1.3 供试棉株和土样

选择新疆石河子、博乐、乌苏、精河、库尔勒、图木舒克、阿拉尔和哈密为采样点。采用5点取样法分别采集棉花重病田中发病棉株和健康棉株及其根际10 cm–15 cm的土壤。土样在室内经自然晾干后,用直径2 mm的筛网过筛,混匀,然后装入密封袋中,置于4 °C保存备用,棉株置于6 °C保存备用。

### 1.1.4 主要试剂和仪器

Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、溶菌酶、Premix Taq™ 购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

落地普通型大容量全温度恒温培养振荡器,上海智诚分析仪器制造有限公司;PCR 仪,耶拿分析仪器股份公司;电泳仪和凝胶成像分析仪,北京市六一仪器厂。

## 1.2 方法

### 1.2.1 根际拮抗细菌的分离

采用稀释涂布平板法<sup>[19]</sup>分离根际拮抗细菌。准确称取10 g土壤样品装入有适量玻璃珠和90 mL 无菌水的500 mL三角瓶中,将三角瓶置于摇床上以150 r/min 振荡30 min,使微生物细胞分散,静置30 s,连续10倍比稀释制成 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 稀释菌液,分别取0.2 mL稀释菌液涂布在TSA培养基上,每个处理重复3次,静置20–30 min,然后倒置于33 °C恒温培养箱中培养。培养24 h后在TSA培养基上挑取不同形态的单菌落,经过纯化后接种在TSA试管斜面中,4 °C保存备用。

### 1.2.2 内生拮抗细菌的分离

采用稀释涂布平板法<sup>[19]</sup>分离内生拮抗细菌。将棉株的根、茎、叶用流水冲洗过夜,剥去根、茎的表皮,用70%的乙醇浸泡消毒30 s,再用2%的次氯酸钠溶液浸泡消毒5–10 min,用无菌水冲洗3–4次,用剪刀将样品剪成0.5 cm–1.0 cm的小段,置于粉碎机中粉碎。称取1 g粉碎后的样品于无菌研钵中,加入9 mL 无菌水并用研棒研磨均匀,连

续10倍比稀释制成 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 稀释菌液,分别吸取0.2 mL稀释菌液涂布在TSA培养基上,每个处理重复3次,静置20–30 min,然后倒置于33 °C恒温培养箱中培养。培养24 h后在TSA培养基上挑取不同形态的单菌落,经过纯化后接种在TSA试管斜面中,4 °C保存备用。

### 1.2.3 大丽轮枝菌平板的制作

打孔挑取大丽轮枝菌菌饼接种到装有200 mL Czapek's 液体培养基的500 mL三角瓶中,25 °C、150 r/min 振荡培养7 d。吸取0.5 mL发酵液稀释成 $10^{-2}$ 稀释液,吸取0.1 mL涂布在PDA培养基上,即为病原菌平板。

### 1.2.4 拮抗细菌的初筛

采用平板对峙法<sup>[20]</sup>初筛拮抗细菌。把1.2.1和1.2.2中分离得到的拮抗细菌点接在病原菌平板上,每个平板点接5个,每个处理重复3次,静置20–30 min,置于25 °C恒温培养。5–7 d后观察是否有抑菌圈产生,记录产生抑菌圈的菌株并测量抑菌圈直径,初步筛选出对病原菌有拮抗作用的菌株。

### 1.2.5 拮抗细菌的复筛

采用牛津杯法<sup>[21]</sup>复筛拮抗细菌。将初筛得到的拮抗细菌以NA培养基活化后接种于NB培养基中,33 °C、180 r/min 摇床培养48 h,即为拮抗细菌发酵液。向放置在病原菌培养基表面上的牛津杯中加入拮抗细菌发酵液0.2 mL,每个处理重复3次,25 °C恒温培养5–7 d后,测量抑菌圈的直径并拍照保存。

### 1.2.6 拮抗细菌的形态鉴定

将活化后的菌株接种在装有已灭菌的100 mL NB培养基的500 mL三角瓶中,33 °C、180 r/min 振荡培养48 h,依次稀释获得不同的稀释度,取 $10^{-4}$ 和 $10^{-5}$ 的稀释液0.2 mL分别涂布在TSA培养基上,然后倒置于33 °C培养箱中培养24 h观察菌落形态特征。挑选TSA培养基上的菌落进行革兰氏染色,显微镜下观察其菌体形态特征。

### 1.2.7 拮抗细菌的生理生化鉴定

参照东秀珠等<sup>[18]</sup>《常见细菌系统鉴定手册》中

的方法对拮抗细菌进行生理生化鉴定。

### 1.2.8 拮抗细菌的分子生物学鉴定

#### (1) 拮抗细菌基因组 DNA 的提取

采用 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒的方法提取基因组 DNA 并稍作改进。将复筛得到的拮抗细菌以 NA 培养基活化后, 挑选半个米粒大小的菌落加入 1.5 mL 离心管中, 加入 50 mg/mL 的溶菌酶溶液 180  $\mu$ L 重悬菌液, 37  $^{\circ}$ C 水浴过夜, 再加入 20  $\mu$ L Proteinase K 溶液, 振荡混匀, 56  $^{\circ}$ C 水浴 30–60 min 至细胞完全裂解, 加入 200  $\mu$ L BD buffer 充分混匀, 再加入 200  $\mu$ L 无水乙醇充分混匀。将吸附柱放入收集管中, 用移液器将溶液和半透明纤维状悬浮物全部加入吸附柱中, 静置 2 min, 12 000 r/min 离心 1 min 后倒掉收集管中的废液; 将吸附柱放回收集管, 加入 500  $\mu$ L PW solution, 10 000 r/min 离心 30 s 倒掉滤液; 将吸附柱放回收集管, 加入 500  $\mu$ L Wash solution, 10 000 r/min 离心 30 s 倒掉滤液; 将吸附柱重新放回收集管中, 于 12 000 r/min 离心 2 min 去除残留的 Wash solution; 取出吸附柱, 放入一个新的 1.5 mL 离心管中, 加入 50–100  $\mu$ L CE buffer 静置 3 min, 12 000 r/min 离心 2 min, 收集 DNA 溶液。提取出的 DNA 置于–20  $^{\circ}$ C 保存。

#### (2) 16S rRNA 基因片段的扩增

以拮抗细菌基因组 DNA 为模板, 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 扩增目的片段, 正向引物 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 反向引物 1492R: 5'-ACGCTACCTGTACGACTT-3'。25  $\mu$ L PCR 反应体系: Premix Taq<sup>TM</sup> 12.5  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 27F/1492R 引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10.5  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 45 s, 50  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 目标条带送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

#### (3) 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建

将所测的 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank 数据库并获得登录号, 同时用 BLAST 软件与 GenBank

数据库进行同源性比对分析, 选取几个相似性较高的菌株通过 Neighbor-Joining 法构建系统发育树, 并用 DNAMAN 8.0 软件计算序列的相似性值。

### 1.2.9 数据处理和分析

采用 Origin 2017、Sequin 9.20、DNAMAN 8.0、MEGA 6.06 等软件对数据进行处理和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 新疆棉花黄萎病拮抗细菌的分离与筛选

采用稀释涂布平板法对新疆地区 8 个采样点的样品进行分离, 挑选不同形态的单菌落经过纯化后采用平板对峙法初筛拮抗细菌, 初步筛选出了 535 株对棉花黄萎病具有拮抗作用的细菌, 从 535 株拮抗细菌中选取了 108 株抑菌效果较好的拮抗细菌。采用牛津杯法进行复筛, 按照抑菌圈直径大小将 108 株拮抗细菌分为 5 类。结果显示, 抑菌圈直径在 0–5 mm 的有 51 株, 5 mm–10 mm 的有 2 株, 10 mm–15 mm 的有 11 株, 15 mm–20 mm 的有 36 株, 20 mm–30 mm 的有 8 株, 其中抑菌活性最高的菌株仅占总菌株的 7.4%, 抑菌活性最低的菌株最多, 占 47.2% (表 1)。

### 2.2 新疆棉花黄萎病优势拮抗细菌的确定

从 108 株拮抗细菌中筛选出了 4 株优势拮抗细菌(图 1), 分别命名为 SHT-15、BHZ-29、SHZ-24 和 SMT-24, 它们的抑菌圈直径依次为 20.35、25.59、22.62 和 29.29 mm (表 2)。

表 1 108 株拮抗细菌对棉花黄萎病病原菌株的抑菌活性

Table 1 Antifungal activity of 108 strains of antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae* Kleb.

抑菌活性 Antifungal activity	抑菌圈直径 Inhibition diameter (mm)	菌株数 Number of strains	比例 Percentage (%)
++++	20–30	8	7.4
+++	15–20	36	33.3
++	10–15	11	10.2
+	5–10	2	1.9
–	0–5	51	47.2

注: ++++: 很强; +++: 强; ++: 中; +: 弱; -: 很弱。

Note: ++++: Very strong; +++: Strong; ++: Middle; +: Weak; -: Very weak.

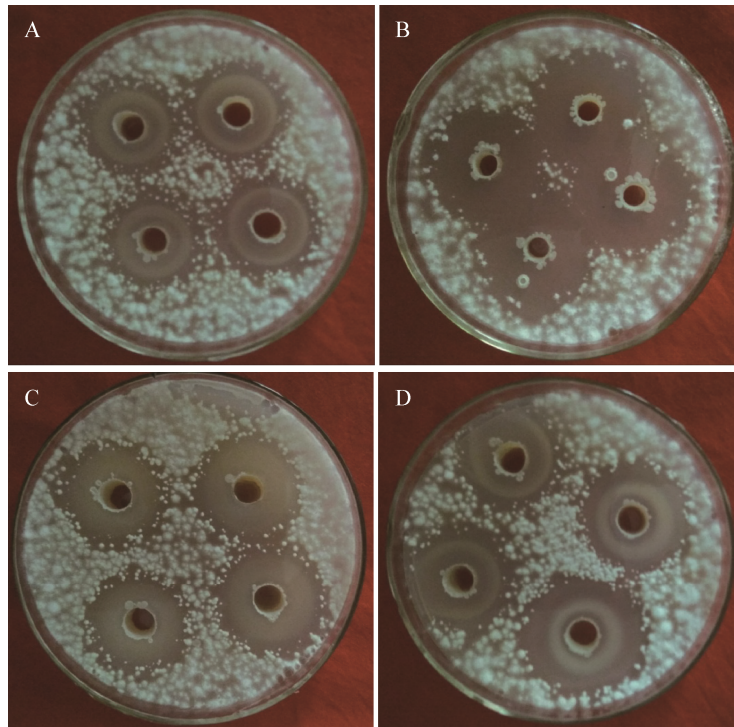


图 1 4 株拮抗细菌对棉花黄萎病菌的抑制效果

Figure 1 Inhibition effect of four strains of antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae* Kleb.

Note: A: SHT-15; B: BHZ-29; C: SHZ-24; D: SMT-24.

表 2 4 株拮抗细菌对棉花黄萎病原菌株的抑菌效果

Table 2 Antifungal activity of four strains of antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae* Kleb.

序号 Number	菌株编号 Tested strains	抑菌圈直径 Inhibition diameter (mm)	菌株来源 Source of strains
1	BHZ-29	25.59±1.54 <sup>b</sup>	Bole
2	SHT-15	20.35±1.72 <sup>c</sup>	Shihezi
3	SHZ-24	22.62±1.98 <sup>bc</sup>	Shihezi
4	SMT-24	29.29±1.84 <sup>a</sup>	Shihezi

注: 同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在  $P<0.05$  水平差异显著。

Note: Values followed by different letters within a column are significantly different ( $P<0.05$ ) according to Duncan's new multiple range test.

## 2.3 新疆棉花黄萎病拮抗细菌的鉴定

### 2.3.1 4 株拮抗细菌的形态特征和生理生化特征

4 株拮抗细菌在 TSA 培养基上生长良好, BHZ-29 菌落呈圆形, 边缘整齐, 表面光滑干燥, 乳白色, 不透明, 中间有凹陷, 菌体呈杆状, 大小为  $0.63 \mu\text{m} \times 2.40 \mu\text{m}$ , 革兰氏染色阳性, 芽孢椭圆形; SMT-24 菌落呈圆形, 边缘整齐, 白色不透明, 表面有褶皱, 中间有火山状突起, 菌体呈杆状, 大小为  $0.78 \mu\text{m} \times 3.25 \mu\text{m}$ , 革兰氏染色阳性, 芽孢

圆形; SHT-15 菌落边缘不整齐, 淡黄色, 中间有凹陷, 菌体呈杆状, 大小为  $0.55 \mu\text{m} \times 2.34 \mu\text{m}$ , 革兰氏染色阳性, 芽孢圆形; SHZ-24 菌落呈圆形, 淡黄色, 边缘光滑整齐, 菌体呈杆状, 大小为  $0.58 \mu\text{m} \times 2.78 \mu\text{m}$ , 革兰氏染色阳性, 芽孢椭圆形。4 株拮抗细菌生理生化特征如表 3 所示。根据 4 株拮抗细菌的形态特征和生理生化特征, 结合东秀珠等<sup>[18]</sup>《常见细菌系统鉴定手册》初步将 4 株拮抗细菌鉴定为芽孢杆菌属。

表 3 菌株 SHZ-24、SHT-15、SMT-24 和 BHZ-29 与其相关模式菌株之间生理生化特征的比较

Table 3 Phenotypic comparison of strains SHZ-24, SHT-15, SMT-24, BHZ-29 and closely related species

项目 Items	菌株代号 Strains No.							
	1	2	3	4	5	6	7	8
V-P 试验 V-P test	+	+	+	+	+	+	+	+
接触酶试验 Catalase test	+	+	+	+	+	+	+	+
淀粉水解 Amyolysis	+	+	+	+	+	+	+	+
甲基红反应 Methyl red test	-	-	+	+	-	-	+	+
吲哚试验 Indole test	-	-	-	-	-	-	-	-
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+
H <sub>2</sub> S 产气试验 H <sub>2</sub> S production	-	-	-	-	-	-	-	-
柠檬酸盐 Citrate solution test	+	+	+	+	+	+	+	+
氧化酶试验 Oxidase test	+	+	+	+	+	+	+	+
酪蛋白水解 Casein hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+	+
D-甘露糖 D-mannose	+	-	+	+	+	-	+	+
D-甘露醇 D-mannitol	-	+	+	+	-	+	+	+
D-葡萄糖 D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
D-木糖 D-xylose	+	+	+	+	+	+	+	+
L-阿拉伯糖 L-arabinose	+	+	-	+	+	+	-	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+	+	+	+	+	+	+	+
D-阿拉伯糖 D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
酪氨酸 Tyrosine	+	-	-	-	+	-	-	-
苯丙氨酸 Phenylalanine	-	-	-	-	-	-	-	-

注: 1: SHZ-24; 2: SHT-15; 3: SMT-24; 4: BHZ-29; 5: *Bacillus atrophaeus* JCM 9070<sup>T</sup>; 6: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049<sup>T</sup>; 7: *Bacillus vanillea* XY18<sup>T</sup>; 8: *Bacillus velezensis* CR-502<sup>T</sup>. +: 阳性反应; -: 阴性反应.

Note: 1: SHZ-24; 2: SHT-15; 3: SMT-24; 4: BHZ-29; 5: *Bacillus atrophaeus* JCM 9070<sup>T</sup>; 6: *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* NRRL B-23049<sup>T</sup>; 7: *Bacillus vanillea* XY18<sup>T</sup>; 8: *Bacillus velezensis* CR-502<sup>T</sup>. +: Positive; -: Negative.

### 2.3.2 4 株拮抗细菌的 16S rRNA 基因扩增

以拮抗细菌基因组 DNA 为模板, 利用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F/1492R 扩增目的片段。PCR 产物经 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 在 WD-9413B 型凝胶成像分析仪系统中成像并拍照。结果显示, 4 株拮抗细菌均能扩增出约 1 500 bp 的目标片段(图 2)。

### 2.3.3 4 株拮抗细菌的 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树构建

将 4 株拮抗细菌 BHZ-29、SHT-15、SHZ-24 和 SMT-24 的 16S rRNA 基因序列提交至 GenBank 数据库, 获得登录号分别为 MG470759、MG470679、MG470659 和 MG470750, 分别将 4 株拮抗细菌的 16S rRNA 基因序列通过 BLAST 软件与 GenBank 数据库进行相似性比对分析, 选取相似性较高的模式菌株(表 4), 通过 MEGA 6.06 软件采用 Neighbor-Joining

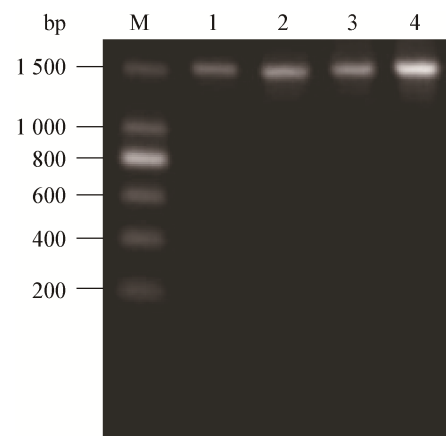


图 2 引物 27F/1492R 对 4 株拮抗细菌的 16S rRNA 基因 PCR 扩增结果

Figure 2 Results of 16S rRNA gene PCR amplification of four strains by primers 27F and 1492R

Note: M: DNA marker E; 1: SHZ-24; 2: SHT-15; 3: SMT-24; 4: BHZ-29.



表 4 4 株拮抗细菌的 16S rRNA 基因序列与 GenBank 数据库中其他相关菌株序列相似性的比较

Table 4 Homology comparison of the 16S rRNA gene sequences of four strains of antagonistic bacteria with those of other closely related strains in GenBank

菌株 Strains	登录号 Accession No.	种名 Species names	菌种号 Strain No.	相似性 Similarity (%)	菌株来源 Strain origins	参考文献 References
SHZ-24	AB021181	<i>Bacillus atrophaeus</i>	JCM 9070(T)	99.31	—	[22]
	JH600280	<i>Bacillus Mojavensis</i>	RO-H-1(T)	98.56	Desert soil	[23]
	JH600273	<i>Bacillus vallismortis</i>	DV1-F-3(T)	98.56	Soil	[24]
	LBMN01000156	<i>Bacillus paralicheniformis</i>	KJ-16(T)	98.34	Soybean paste	[25]
SHT-15	AMXN01000021	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>inaquosorum</i>	KCTC 13429(T)	99.11	—	[26]
	CP002905	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	NRRL B-23049(T)	99.11	Tunisian desert soil	[27]
	AYTO01000043	<i>Bacillus tequilensis</i>	KCTC 13622(T)	99.11	—	[28]
	LPVF01000003	<i>Bacillus halotolerans</i>	ATCC 25096(T)	98.97	—	[29]
SMT-24	KF986320	<i>Bacillus vanillea</i>	XY18(T)	99.29	Vanilla bean	[30]
	AJVF01000043	<i>Bacillus siamensis</i>	KCTC 13613(T)	99.10	Salted crab	[31]
	LSAZ01000028	<i>Bacillus nakamurai</i>	NRRL B-41091(T)	98.83	Soil	[32]
	FN597644	<i>Bacillus amylolique</i>	DSM 7(T)	98.83	—	[33]
BHZ-29	AY603658	<i>Bacillus velezensis</i>	CR-502(T)	99.22	The mouth of the river	[34]
	ABQL01000001	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	NCIB 3610(T)	98.83	—	[27]
	LECW01000063	<i>Bacillus glycinifermentans</i>	GO-13(T)	97.46	Soybean paste	[35]
	MRBL01000076	<i>Bacillus haynesii</i>	NRRL B-41327(T)	97.11	Desert soil	[36]

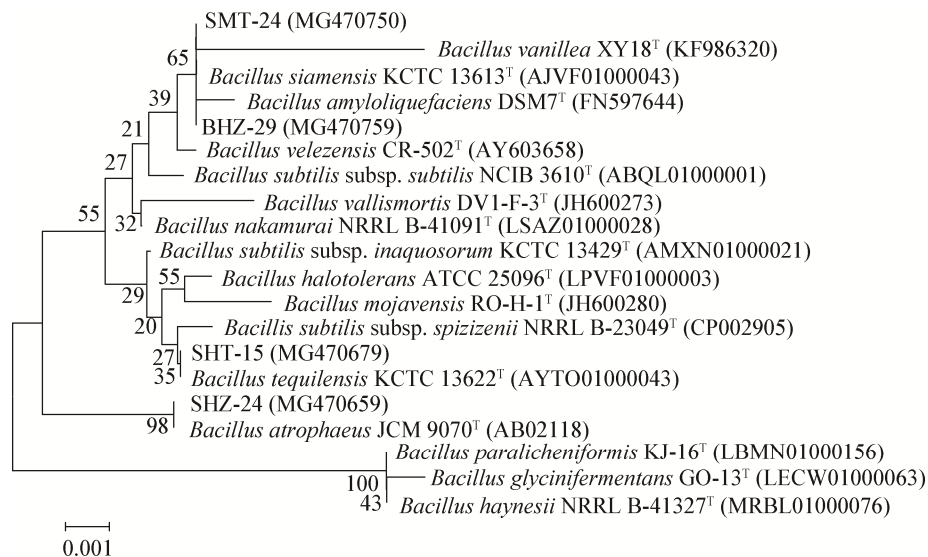


图 3 基于 16S rRNA 基因序列建立的菌株 SHZ-24、SHT-15、SMT-24、BHZ-29 与相关菌株的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree of strain SHZ-24, SHT-15, SMT-24, BHZ-29 and other related strains based on the 16S rRNA gene sequences

注：菌株名称后括号内的序号为 NCBI 序列编号；分支点上数字为重复 1 000 次的自展值；标尺 0.001 为核苷酸替换率。

Note: NCBI accession numbers were listed behind strain numbers; Numbers at nodes indicate percentage levels of bootstrap support based on a Neighbor-Joining analysis of 1 000 resampled datasets; The scale bar indicates 0.001 substitutions per nucleotide position.

法构建系统发育树(图 3), 并用 DNAMAN 8.0 软件计算序列的相似性值。结果表明, 菌株 BHZ-29 与 *Bacillus velezensis* (AY603658) 高度相似, 相似性高达 99.22%; 菌株 SHT-15 与 *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* (CP002905)、*Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* (AMXN01000021)、*Bacillus tequilensis* (AYTO01000043) 高度相似, 相似性均为 99.11%; 菌株 SHZ-24 与 *Bacillus atrophaeus* (AB021181) 高度相似, 相似性高达 99.31%; 菌株 SMT-24 与 *Bacillus vanillea* (KF986320) 高度相似, 相似性高达 99.29%。结合形态特征及生理生化鉴定结果, 最终将菌株 BHZ-29、SHT-15、SHZ-24 和 SMT-24 分别鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)、枯草芽孢杆菌斯皮兹仁亚种(*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*)、萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)和香草芽孢杆菌(*Bacillus vanillea*)。

### 3 讨论与结论

棉花黄萎病(Cotton *Verticillium* wilt)是由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)引起的一种土传病害, 具有发病率高、流行性强、发病范围广等特点, 被称为棉花的“癌症”, 已成为制约新疆棉花产业发展的主要问题<sup>[37-38]</sup>。随着人们环保意识的增强, 棉花黄萎病的生物防治已成为目前研究的重要方向<sup>[39-40]</sup>。新疆具有特殊的自然环境以及广阔的地貌<sup>[41]</sup>, 蕴藏着丰富多样的微生物资源<sup>[42]</sup>, 具有巨大的研究和开发价值<sup>[43]</sup>, 通过不断地大量挖掘可利用的微生物资源对于扩充新疆棉花黄萎病生防资源具有重要意义。本文通过对新疆棉区 8 个采样点样品进行分离和筛选, 最终筛选到 4 株优势拮抗细菌。平板对峙实验结果表明, 4 株优势拮抗细菌对棉花黄萎病菌具有明显的抑制作用, 是棉花黄萎病生物防治的优良菌种资源。虽然平板对峙实验表明了 4 株拮抗细菌对大丽轮枝菌的抑菌效果, 但是由于拮抗细菌对黄萎病菌室内盆栽试验和室外大田试验的定殖能力受多种因素影响<sup>[11]</sup>, 因此, 探究其对黄萎病菌防病效应及其稳定性是下一步研究工作的

的重点。

芽孢杆菌以其生长速度快、营养需求简单、抗逆性强、耐热性强<sup>[44]</sup>以及可以产生多种拮抗物质<sup>[45-46]</sup>等优点已成为近年来生防微生物研究的热点。李全胜等<sup>[47]</sup>筛选的一株枯草芽孢杆菌对棉花黄萎病菌的抑菌率为 56%, 抑菌圈直径达 20.00 mm。王伟等<sup>[48]</sup>、田祖光<sup>[49]</sup>和吴国江等<sup>[50]</sup>研究表明, 贝莱斯芽孢杆菌对大丽轮枝菌具有明显的抑制作用, 抑菌圈直径分别为 18.50、16.10 和 13.60 mm。孙崇思等<sup>[51]</sup>从新疆棉花主产区的土壤中分离出一株对重要植物病原菌大丽轮枝菌具有抑制作用的拮抗菌, 其抑菌圈直径为 15.80 mm, 将其鉴定为萎缩芽孢杆菌。与以上结果相比, 本文所筛选的枯草芽孢杆菌斯皮兹仁亚种 SHT-15、贝莱斯芽孢杆菌 BHZ-29 和萎缩芽孢杆菌 SHZ-24 对棉花黄萎病菌抑菌圈直径分别为 20.35、25.59 和 22.62 mm, 其应用价值值得进一步探索。香草芽孢杆菌对棉花黄萎病菌的抑制作用未见报道, 而本文筛选的香草芽孢杆菌 SMT-24 对棉花黄萎病菌的抑菌圈直径高达 29.29 mm, 是一株潜力巨大的拮抗细菌, 这也是香草芽孢杆菌具有抑制棉花黄萎病菌的首次报道, 为新疆棉花黄萎病的生物防治提供了新的菌种资源。

本研究从新疆棉区 8 个采样点的样品中分离到 4 株对棉花黄萎病菌具有明显抑制作用的拮抗细菌。通过形态观察、生理生化试验和 16S rRNA 基因全序列分析, 将菌株 BHZ-29、SHT-15、SHZ-24 和 SMT-24 分别鉴定为 *Bacillus velezensis*、*Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*、*Bacillus atrophaeus* 和 *Bacillus vanillea*, 为新疆棉花黄萎病的生物防治扩充了菌种资源。

### REFERENCES

- [1] Xue L, Xue QH, Chen Q, et al. Isolation and evaluation of rhizosphere actinomycetes with potential application for biocontrol of *Verticillium* wilt of cotton[J]. *Crop Protection*, 2013, 43: 231-240
- [2] Liu HY, Wang W, Zhang RF, et al. Occurrence overviews of cotton *Verticillium* wilt in Xinjiang[J]. *Plant Protection*, 2015, 41(3): 138-142 (in Chinese)  
刘海洋, 王伟, 张仁福, 等. 新疆主要棉区棉花黄萎病发生



- 概况[J]. 植物保护, 2015, 41(3): 138-142
- [3] Ma C. Study on *Fusarium* Wilt and *Verticillium* Wilt of Cotton[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007: 185-246 (in Chinese)  
马存. 棉花枯萎病和黄萎病的研究[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 185-246
- [4] Zeng H, Yang SQ. Isolation, identification, and antifungal activity of the antagonistic bacterial strain TUBP1 against *Verticillium dahliae* Kleb.[J]. Cotton Science, 2014, 26(5): 445-451 (in Chinese)  
曾红, 杨生强. 棉花黄萎病菌拮抗细菌 TUBP1 的分离鉴定及其防病作用[J]. 棉花学报, 2014, 26(5): 445-451
- [5] Liang H, Huang J, Zhao J, et al. Studies on biocontrol of cotton *Verticillium* wilt[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(5): 1-6 (in Chinese)  
梁宏, 黄静, 赵佳, 等. 生物防治棉花黄萎病的研究进展[J]. 生物技术通报, 2015, 31(5): 1-6
- [6] Erdogan O, Benlioglu K. Biological control of *Verticillium* wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions[J]. Biological Control, 2010, 53(1): 39-45
- [7] Tehrani AS, Disfani FA, Hedjaroud GA, et al. Antagonistic effects of several bacteria on *Verticillium dahliae* the causal agent of cotton wilt[J]. Mededelingen (Rijksuniversiteit te Gent. Fakulteit van de Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen), 2001, 66(2a): 95-101
- [8] Zhang DD, Li SN, Guo XJ, et al. Isolation, identification and activity of an antagonistic spore bacterium against cotton *Verticillium* wilt[J]. Cotton Science, 2012, 24(4): 358-362 (in Chinese)  
张冬冬, 李术娜, 郭晓军, 等. 一株棉花黄萎病拮抗芽孢细菌的分离鉴定及活性检测[J]. 棉花学报, 2012, 24(4): 358-362
- [9] Liu HY, Yao J, Zhang RF, et al. Effect of *Bacillus methylotrophicus* AL7 against cotton *Verticillium* wilt and its colonization in rhizosphere of cotton[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017, 33(2/3): 378-384 (in Chinese)  
刘海洋, 姚举, 张仁福, 等. 甲基营养型芽孢杆菌 AL7 对棉花黄萎病的盆栽防治效果及定殖能力[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(2/3): 378-384
- [10] Zhou JL, Feng ZL, Feng HJ, et al. Biocontrol effect and mechanism of cotton endophytic bacterium *Bacillus cereus* YUPP-10 against *Verticillium* wilt in *Gossypium hirsutum*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(14): 2717-2727 (in Chinese)  
周京龙, 冯自力, 冯鸿杰, 等. 棉花内生蜡状芽孢杆菌 YUPP-10 对棉花黄萎病的防治作用及机制[J]. 中国农业科学, 2017, 50(14): 2717-2727
- [11] Wang J, Huang Y, Yao J, et al. Identification and control effects of two antagonistic actinomycetes against clubroot[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(13): 2692-2700 (in Chinese)  
王靖, 黄云, 姚佳, 等. 两株根肿病生防放线菌的鉴定及其防病效果[J]. 中国农业科学, 2011, 44(13): 2692-2700
- [12] Narisawa K, Tokumasu S, Hashiba T. Suppression of clubroot formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*[J]. Plant Pathology, 1998, 47(2): 206-210
- [13] Ji XL, Lu GB, Gai YP, et al. Biological control against bacterial wilt and colonization of mulberry by an endophytic *Bacillus subtilis* strain[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2008, 65(3): 565-573
- [14] Yang W, Liu SM, Guo JH. Relationship between bacterial colonization and biocontrol efficacy[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(S1): 90-94 (in Chinese)  
杨威, 刘苏闵, 郭坚华. 细菌定殖能力与其生物防治功能相关性研究进展[J]. 中国生物防治, 2010, 26(S1): 90-94
- [15] Feng ZG, Ma P, Li SZ, et al. Screening and colonization of antagonists from microsclerotinisphere of *Verticillium dahliae*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2013, 28(S1): 384-387 (in Chinese)  
冯争光, 马平, 李社增, 等. 棉花黄萎菌微菌核际拮抗细菌的筛选及其定殖能力研究[J]. 华北农学报, 2013, 28(S1): 384-387
- [16] Kloepper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1992, 38(12): 1219-1232
- [17] Uppal AK, El Hadrami A, Adam LR, et al. Pathogenic variability of *Verticillium dahliae* isolates from potato fields in Manitoba and screening of bacteria for their biocontrol[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2007, 29(2): 141-152
- [18] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterium Determinative Handbook[M]. Beijing: Science Press, 2001: 349-388 (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: 349-388
- [19] Niemann H, Lösekann T, de Beer D, et al. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink[J]. Nature, 2006, 443(7113): 854-858
- [20] Feng ZZ, Chen TC, Duan JN, et al. Screening, identification and antifungal activity of antagonistic rhizospheric *Bacillus* FB-16 against tobacco black shank[J]. Acta Phytopythologica Sinica, 2012, 39(3): 224-230 (in Chinese)  
冯志珍, 陈太春, 段军娜, 等. 烟草黑胫病拮抗根际芽孢杆菌 FB-16 的筛选鉴定及其抑菌活性[J]. 植物保护学报, 2012, 39(3): 224-230
- [21] Liu DM, Li L, Yang XQ, et al. Determination of the antimicrobial activity of probiotic by Oxford plate assay system[J]. Food Research and Development, 2006, 27(3): 110-111 (in Chinese)  
刘冬梅, 李理, 杨晓泉, 等. 用牛津杯法测定益生菌的抑菌活力[J]. 食品研究与开发, 2006, 27(3): 110-111
- [22] Nakamura LK. Taxonomic relationship of black-pigmented *Bacillus subtilis* strains and a proposal for *Bacillus atrophaeus* sp. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology,

- 1989, 39(3): 295-300
- [23] Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM. *Bacillus mojavensis* sp. nov., distinguishable from *Bacillus subtilis* by sexual isolation, divergence in DNA sequence, and differences in fatty acid composition[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(2): 256-264
- [24] Roberts MS, Nakamura LK, Cohan FM. *Bacillus vallismortis* sp. nov., a close relative of *Bacillus subtilis*, isolated from soil in Death Valley, California[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1996, 46(2): 470-475
- [25] Dunlap CA, Kwon SW, Rooney AP, et al. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(10): 3487-3492
- [26] Rooney AP, Price NPJ, Ehrhardt C, et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(10): 2429-2436
- [27] Nakamura LK, Roberts MS, Cohan FM. Note: Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(3): 1211-1215
- [28] Gatson JW, Benz BF, Chandrasekaran C, et al. *Bacillus tequilensis* sp. nov., isolated from a 2000-year-old Mexican shaft-tomb, is closely related to *Bacillus subtilis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(7): 1475-1484
- [29] Dunlap CA, Bowman MJ, Schisler DA, et al. Genome analysis shows *Bacillus axarquiensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus mojavensis*; reclassification of *Bacillus malacitensis* and *Brevibacterium halotolerans* as heterotypic synonyms of *Bacillus axarquiensis*[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(6): 2438-2443
- [30] Chen YG, Gu FL, Li JH, et al. *Bacillus vanillea* sp. nov., isolated from the cured vanilla bean[J]. Current Microbiology, 2015, 70(2): 235-239
- [31] Sumpavapol P, Tongyong L, Tanasupawat S, et al. *Bacillus siamensis* sp. nov., isolated from salted crab (*poo-khem*) in Thailand[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(10): 2364-2370
- [32] Dunlap CA, Saunders LP, Schisler DA, et al. *Bacillus nakamurai* sp. nov., a black-pigment-producing strain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2016, 66(8): 2987-2991
- [33] Priest FG, Goodfellow M, Shute LA, et al. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov., nom. rev.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1987, 37(1): 67-71
- [34] Ruiz-García C, Béjar V, Martínez-Checa F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2005, 55(1): 191-195
- [35] Kim SJ, Dunlap CA, Kwon SW, et al. *Bacillus glycinifermentans* sp. nov., isolated from fermented soybean paste[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2015, 65(10): 3586-3590
- [36] Dunlap CA, Schisler DA, Perry EB, et al. *Bacillus swezeyi* sp. nov. and *Bacillus haynesii* sp. nov., isolated from desert soil[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2017, 67(8): 2720-2725
- [37] Zhu HQ, Li ZF, Feng ZL, et al. Overview of cotton *Verticillium* wilt research over the past decade in China and its prospect in future[J]. Cotton Science, 2017, 29(S1): 37-50 (in Chinese)  
朱荷琴, 李志芳, 冯自力, 等. 我国棉花黄萎病研究十年回顾及展望[J]. 棉花学报, 2017, 29(S1): 37-50
- [38] Liu L, Zhang X, Deng C. Research advances in cotton *Verticillium* wilt[J]. Cotton Science, 2014, 26(3): 260-267 (in Chinese)  
林玲, 张昕, 邓晟. 棉花黄萎病研究进展[J]. 棉花学报, 2014, 26(3): 260-267
- [39] Zhang D, Xie L, Zhang LP, et al. Study on biological control of cotton *Verticillium* wilt[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2007, 35(11): 3302-3303,3357 (in Chinese)  
张铎, 解莉, 张丽萍, 等. 棉花黄萎病生物防治研究[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(11): 3302-3303,3357
- [40] Ma ZB, Yan GT, Liu GZ, et al. Advances in control techniques of cotton *Verticillium* wilt[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2012, 41(2): 12-17 (in Chinese)  
马宗斌, 严根土, 刘桂珍, 等. 棉花黄萎病防治技术研究进展[J]. 河南农业科学, 2012, 41(2): 12-17
- [41] Li HB, Suo FY. Progress in the research on microorganism resources in special ecological environments of Xinjiang[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2004, 22(4): 198-202 (in Chinese)  
李宏彬, 索菲娅. 新疆特殊生境下微生物资源[J]. 干旱地区农业研究, 2004, 22(4): 198-202
- [42] Mao PH, Jin X, Wang Y, et al. Research and development on the resources of microorganisms in Xinjiang specific environment[J]. Biotechnology, 2006, 16(5): 88-91 (in Chinese)  
毛培宏, 金湘, 王芸, 等. 新疆特殊环境微生物资源的研究与发展[J]. 生物技术, 2006, 16(5): 88-91
- [43] Wei D. Significance and recommendation of Xinjiang special environmental microorganism resources research and exploitation[J]. Xingjiang Agricultural Sciences, 2004, 41(S1): 1-4 (in Chinese)  
魏东. 论新疆特殊环境微生物资源研究开发意义及建议[J]. 新疆农业科学, 2004, (S1): 1-4
- [44] Zhu YY, Liu J, Du CM. Research progress of biological control in plant diseases by *Bacillus* spp.[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(34): 16635-16638 (in Chinese)  
朱玥妍, 刘皎, 杜春梅. 芽孢杆菌生物防治植物病害研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(34): 16635-16638
- [45] Raza W, Yang W, Shen QR. *Paenibacillus polymyxa*: antibiotics, hydrolytic enzymes and hazard assessment[J].

- Journal of Plant Pathology, 2008, 90(3): 419-430
- [46] Niu B, Vater J, Rueckert C, et al. Polymyxin P is the active principle in suppressing phytopathogenic *Erwinia* spp. by the biocontrol rhizobacterium *Paenibacillus polymyxa* M-1[J]. BMC Microbiology, 2013, 13: 137
- [47] Li QS, Xie ZM, Zhang GL, et al. Screening and identification of antagonistic spore bacterium S12 against cotton *Verticillium* wilt and preliminary study on its antagonistic mechanisms[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2015, 38(3): 402-408 (in Chinese)  
李全胜, 谢宗铭, 张国丽, 等. 棉花黄萎病拮抗芽孢杆菌 S12 的筛选鉴定及拮抗机制的分析[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(3): 402-408
- [48] Wang W, Li SN, Li HY, et al. Screening, identification of the antagonistic bacteria against *Verticillium dahliae* Kleb. and characteristic analyses of antagonistic substance[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(19): 14-19 (in Chinese)  
王伟, 李术娜, 李红亚, 等. 大丽轮枝菌拮抗细菌菌株 12-51 的筛选鉴定与抗菌物性质分析[J]. 中国农学通报, 2009, 25(19): 14-19
- [49] Tian ZG. Isolation, identification of antagonistic strain 12-34 against cotton *Verticillium* wilt and purification of antifungal protein[D]. Baoding: Master's Thesis of Agriculture University of Hebei, 2009 (in Chinese)  
田祖光. 棉花黄萎病拮抗细菌 12-34 菌株的分离鉴定及抗菌蛋白纯化[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2009
- [50] Wu GJ, Wang ZL, Li SN, et al. Screening and identification of antagonistic bacterium strain 8-52 against *Verticillium dahliae*[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2009, 32(4): 66-70 (in Chinese)  
吴国江, 王占利, 李术娜, 等. 大丽轮枝菌拮抗细菌 8-52 菌株的筛选与鉴定[J]. 河北农业大学学报, 2009, 32(4): 66-70
- [51] Sun CS, Chen XM, Shu CL, et al. Isolation and identification of *Bacillus atrophaeus* antagonistic against *Verticillium dahliae*[J]. Plant Protection, 2014, 40(1): 30-37 (in Chinese)  
孙崇思, 陈晓敏, 束长龙, 等. 对大丽轮枝菌具有拮抗作用的萎缩芽孢杆菌的分离和鉴定[J]. 植物保护, 2014, 40(1): 30-37

## 征 稿 简 则

### 1 刊物简介与栏目设置

《微生物学通报》是由中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办的, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 工业、海洋、环境、基础、农业、食品、兽医、水生、药物、医学微生物学和微生物蛋白质组学、功能基因组、工程与药物等领域的最新研究成果、产业化新技术和新进展, 以及微生物学教学研究改革等。设置的栏目有: 研究报告、专论与综述、生物实验室、高校教改纵横、专栏等。

### 2 投稿方式

投稿时请登录我刊主页 <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>, 点击作者投稿区, 第一次投稿请先注册, 获得用户名和密码, 然后依照提示提交稿件, 详见主页“投稿须知”。

### 3 写作要求

3.1 来稿要求论点明确, 数据可靠, 简明通顺, 重点突出。

3.2 英文摘要写作注意事项: (1) 建议使用第一人称, 以此可区分研究结果是引用文献还是作者所得; (2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊, 尽量不用, 这样可以避免长句, 以求简单清晰; (3) 建议使用过去时态, 要求语法正确, 句子通顺; (4) 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但可比中文摘要更详尽, 写完后务必请英文较好且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部; (5) 摘要中不要使用缩写语, 除非是人人皆知的, 如: DNA, ATP 等; (6) 在英文摘要中不要使用中文字体标点符号。

3.3 关键词: 应明确、具体, 一些模糊、笼统的词语最好不用, 如“基因”、“表达”等。

### 3.4 脚注(正文首页下方):

Foundation items:

\*Corresponding author: Tel: ; E-mail:

Received: January 01, 20xx; Accepted: March 01, 20xx; Published online (www.cnki.net): March 31, 20xx

基金项目: 基金项目(编号)

\*通信作者: Tel: ; E-mail:

收稿日期: 20xx-01-01; 接受日期: 20xx-03-01; 网络首发日期(www.cnki.net): 20xx-03-31

(下转 p.2448)