

# 西瓜枯萎病内生拮抗细菌 YGRE24 的分离鉴定及其特性研究

赵 焯<sup>1</sup>, 杨恩东<sup>1</sup>, 牛晓伟<sup>2</sup>, 孙乐妮<sup>1</sup>, 曹媛媛<sup>1</sup>, 唐欣昀<sup>1\*</sup>

(1. 安徽农业大学生命科学学院, 合肥 230036; 2. 浙江省农业科学院蔬菜研究所, 杭州 310021)

**摘 要:** 采用稀释涂布平板法结合平板对峙法, 从表面消毒的西瓜根中筛选到一株能够高效抑制尖孢镰刀菌西瓜专化型 3 种生理小种的内生细菌 YGRE24。菌株 YGRE24 对尖孢镰刀菌西瓜专化型 3 种生理小种的抑制率分别为 54.76%、55.95% 和 55.24%, 且其除菌后的培养液也具有明显的抑菌效果。该菌株对小麦赤霉病菌、水稻纹枯病菌等也具有很强的拮抗作用。此外, 菌株 YGRE24 还具有溶磷、产吲哚乙酸、产铁载体的促生特性。盆栽试验表明, 该菌株能够在接种病原菌的情况下促进西瓜苗的生长, 使地上部分的鲜重和干重分别增加 44.75% 和 30.32%, 可以缓解病害对西瓜苗生长的影响。经形态特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列分析初步确定菌株 YGRE24 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

**关键词:** 西瓜枯萎病; 内生细菌; 拮抗作用; 促生特性; 鉴定

中图分类号: S436.5

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)05-0765-06

## Screening and identification of endophytic antagonistic bacteria strain YGRE24 against watermelon *Fusarium* Wilt and its characteristics

ZHAO Ye<sup>1</sup>, YANG En-dong<sup>1</sup>, NIU Xiao-wei<sup>2</sup>, SUN Le-ni<sup>1</sup>, CAO Yuan-yuan<sup>1</sup>, TANG Xin-yun<sup>1</sup>

(1. School of Life Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

**Abstract:** An endophytic bacterium, YGRE24, isolated from surface sterilized root of watermelon by dilution plate method and flat confrontation method, could inhibit mycelial growth of three physiological races of *Fusarium oxysporum* f.sp.*niveum* with inhibition rates of 54.76%, 55.95% and 55.24%, respectively. The antagonistic activity was detected in the fermentation broth of YGRE24 as well. The strain YGRE24 displayed a broad-spectrum antagonistic activity to five pathogens, like *Fusarium graminearum* and *Rhizoctonia solani* and so on. Furthermore, the strain had the capacity of phosphate-solubilizing, indole acetic acid-producing and siderophore-producing. The results of pot culture experiments showed that the fresh weight and dry weight of shoot were increased by 44.75% and 30.32% after incubated with strain YGRE24. The lesions caused by watermelon *Fusarium* wilt were obviously reduced by inoculating the strain. According to morphology, bio-physiological and biochemical characteristics and 16S rDNA sequence, the strain YGRE24 was identified as *Bacillus subtilis*.

**Key words:** watermelon *Fusarium* wilt; endophytic bacteria; antagonism; growth-promoting characteristics; identification

西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型菌株 (*Fusarium oxysporum* f.sp.*niveum*) 引起的, 该病害在我国的发生面积占总栽培面积的 42% 左右, 其中 15% 造成减产, 严重者减产达 85%, 甚至绝收<sup>[1]</sup>。

我国作为全球西瓜种植面积最大的国家, 西瓜枯萎病造成的灾害为我国的西瓜种植业带来了巨大的损失<sup>[2]</sup>。生物防治不但具有高效、安全、低成本的优点, 而且可以提高产品产量和品质, 是目前最具发

收稿日期: 2013-03-26

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (1208085QC62), 安徽农业大学稳定和引进人才基金 (yj2011-25) 和安徽农业大学校青年科研基金 (2012zr006) 共同资助。

作者简介: 赵 焯, 女, 硕士研究生。E-mail: zhao.ye.1003@gmail.com

\* 通信作者: 孙乐妮, 女, 博士, 讲师。E-mail: sunleni@126.com

唐欣昀, 男, 教授, 博士生导师。E-mail: txyah@126.com

展潜力的防治方法<sup>[3]</sup>。但以往大多数拮抗菌株都是从土壤或植物根际筛选得到的,这使得生物菌剂的作用极易受到外界环境因素的影响,且他们在与土著微生物竞争时也不占优势,从而无法长期定殖,很大程度上降低了他们应有的防病促生效果<sup>[4]</sup>。

植物内生菌与植物体的生长密切相关,由于存在于植物体内,生存环境相对稳定,受温度、渗透压、紫外辐射等环境因素的影响较小,可以在植物体内长期定殖并发挥稳定的作用<sup>[5]</sup>。目前国内对玉米,大豆,小麦等内生菌株筛选已有报道,而对西瓜这一园艺作物的内生细菌的研究相对较少<sup>[6]</sup>,其生物防治大多数仍停留在植物根际菌上。本试验以尖孢镰刀菌西瓜专化型生理小种为指标菌,从西瓜根内分离内生细菌,并进行拮抗菌的初筛和复筛,筛选出对尖孢镰刀菌西瓜专化型3种生理小种均具有较高抑菌活性的菌株,并进行鉴定,同时研究了菌株促生特性及对西瓜苗生长的影响,为进一步开发安全高效的微生物制剂提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试病原菌:尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp.*niveum*) 0、1、2号生理小种由浙江省农业科学院蔬菜研究所惠赠。小麦赤霉病菌(*Fusarium gramineum*),水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*),玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*),棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*),番茄青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)由安徽农业大学植物保护学院提供。

培养基:病原真菌的培养及拮抗试验用马铃薯琼脂培养基(PDA);细菌的分离培养用营养肉汁培养基(NA)。

西瓜品种:丰抗8号,购买自合肥丰乐种业公司。

### 1.2 内生菌株的分离

将10g西瓜根用无菌水冲洗干净,根据根的幼嫩程度,分别用75%乙醇溶液和35%NaClO溶液各浸泡1~3min,经无菌水冲洗多次后,将西瓜根放在灭菌研钵中研磨成匀浆,经10倍梯度稀释得到 $10^{-1}$ ~ $10^{-4}$ 稀释液。并收集最后一次洗液,用NA平板培养,设置3个重复,以检测表面消毒是否彻底。

取0.1mL稀释度不同的菌悬液,涂布在营养肉汁培养基上,28℃培养3d后计数,重复3次。观察菌落,挑取表型性状不同的菌落,经多次划线分纯后于4℃斜面下存放备用。

### 1.3 内生拮抗菌株的筛选

初筛:分别制备尖孢镰刀菌0、1、23种生理小种孢子悬液( $10^5$ 个·mL<sup>-1</sup>)。吸取1μL孢子悬液,加入到PDA平板中心位置,分别于四周约3cm的位置上点种供试内生细菌,28℃培养4~5d后观察并记录结果。

复筛:选择对病原真菌抑制作用明显的抗菌菌株作为试验对象。活化后接种培养基中心3cm的位置上,设置3个重复,以未接细菌的处理作为空白对照。用打孔器( $d=5$ mm)取新培养的病原真菌的菌饼贴在培养基中心,28℃培养。当空白对照的真菌长满平板时记录真菌菌苔的半径R,以及真菌菌落相对细菌的半径r,根据公式计算抑制率<sup>[7]</sup>:

$$\text{抑制率}/\% = \left[ \frac{(R-r)}{R} \right] \times 100$$

### 1.4 菌株拮抗特性

**1.4.1 菌株对病原菌菌丝形态的作用** 在已涂布2号生理小种孢子悬液( $10^5$ 个·mL<sup>-1</sup>)的PDA平板上接种复筛菌株,并在距离接种菌株1cm的位置上插入灭菌盖玻片。28℃培养3~4d后用显微镜观察菌丝生长状况。以未接种细菌处理作为空白对照。

**1.4.2 发酵液抑制率的测定** 将复筛试验菌株28℃,160r·min<sup>-1</sup>培养48h后,培养液离心取上清液过滤除菌。取150μL无菌培养液,加在距培养基中心3cm的位置上的牛津杯中,设置3个重复。用打孔器( $d=5$ mm)取新培养的病原真菌的菌饼贴在培养基中心。以未接种细菌处理作为空白对照。28℃培养若干天后,记录结果。

**1.4.3 菌株及其发酵液抗菌谱的测定** 试验对象同复筛试验,供试病原菌包括:小麦赤霉病菌、水稻纹枯病菌、玉米小斑病菌、棉花枯萎病菌、番茄青枯病菌。方法同1.3。

### 1.5 促生特性的测定

根据Nautiyal<sup>[8]</sup>的方法测定菌株解磷活性;参考Sachdev<sup>[9]</sup>的方法测定菌株产吲哚乙酸(IAA)能力;参考王平等<sup>[10]</sup>的方法测定菌株产铁载体(siderophore)能力;参考Penrose和Glick<sup>[11]</sup>的方法测定ACC脱氨酶的活性。

### 1.6 盆栽试验

西瓜种子冷水浸泡3h后,55℃水浴30min,潮湿的纱布包裹后32℃催芽24h。挑选萌发状态均一的种子,于供试菌悬液( $10^8$ CFU·mL<sup>-1</sup>)中浸种3h,作为试验组,同时以浸泡无菌水的种子作为空白对照。每盆种植3粒西瓜种子,每个处理种植10盆。培养至西瓜苗长出2片真叶后,取5盆试验

组和 5 盆对照组喷洒尖孢镰刀菌西瓜专化型 2 号生理小种的孢子悬液 ( $10^5$  个·mL<sup>-1</sup>)。以定量的斯泰耐广谱性作物营养液补充矿物质元素, 继续培养 30 d 后测量西瓜苗的生物量。

### 1.7 菌株的鉴定及系统发育树的构建

生理生化及形态鉴定: 参阅《常见细菌系统鉴定手册》进行<sup>[12]</sup>。

细菌总 DNA 的提取: 菌株 28℃ 培养 20 h 后离心, 收集菌体, SDS 法提取基因组 DNA。

16S rDNA 的扩增: PCR 引物采用通用引物<sup>[13]</sup>, 由上海生工合成。分别为

27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)

1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT)

PCR 反应体系: 5 μL 5×PCR Master mix (TaKaRa), 引物 1 μL (25 pmol·μL<sup>-1</sup>), 基因组 DNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 定容至 50 μL。PCR 扩增条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 1 min, 56℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 90 s, 30 个循环; 然后 72℃ 延伸 10 min。

16S rDNA 的测序及系统发育树的构建: 16S rDNA 的测序由上海生工生物公司完成, 将所得长度约为 1.5 kb 的序列, 采用 BLAST 软件与 GenBank 数据库中的 16S rDNA 序列进行相似性对比, 使用 ClustalX 1.81 程序包将测得序列与 GenBank 数据库中下载的标准菌株序列进行多重序列匹配排列分析, 再采用 MEGA 4.1 软件中的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌株的筛选

从西瓜根中共分离筛选到 41 株内生细菌, 结合平板对峙培养法共得到 7 株菌株对尖孢镰刀菌 3 种生理小种表现出不同程度的抑制作用, 以 YGRE24 的抑制作用最为明显。

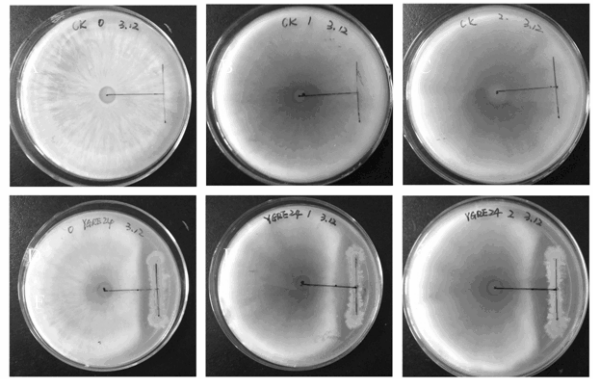
以尖孢镰刀菌西瓜专化型 3 种生理小种为指示菌, 测定了菌株 YGRE24 及其发酵液对病菌的抑制作用。如图 1 所示, 菌株为 YGRE24 对尖孢镰刀菌 0~2 号 3 种生理小种的生长表现出明显的抑制作用, 其对病原菌 0、1、2 号生理小种的抑制率分别为 54.76%、55.95%和 55.24%。

同时如图 2 所示, 菌株的发酵液对 3 种生理小种的生长抑制效果也十分明显, 其对病原菌的抑制率分别为 29%、22.86%和 17.43%。

### 2.2 菌株拮抗特性

菌株 YGRE24 与尖孢镰刀菌西瓜专化型对峙培养后显微镜观察发现: 病原菌菌丝的形态发生较大

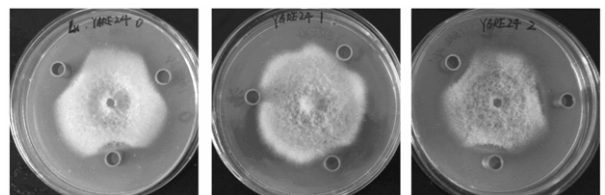
变化, 如图 3 中 B 图所示, 西瓜枯萎病尖孢镰刀菌 2 号生理小种的菌丝生长受到严重影响, 菌丝形态发生了较大改变, 主要表现为菌丝中空干枯, 直至断裂, 失去生长能力等; 而尖孢镰刀菌在 PDA 平板上单独培养时菌丝边缘光滑, 且菌丝形态规则 (图 3, A)。



A, D: 尖孢镰刀菌 0 号生理小种; B, E: 尖孢镰刀菌 1 号生理小种; C, F: 尖孢镰刀菌 2 号生理小种。A、B、C: 空白对照; D、E、F: 接种分离菌株 YGRE24

A, D: physiological race 0 of *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum; B, E: physiological race 1 of *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum; C, F: physiological race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum. A, B, C: control treatment; D, E, F: the strain YGRE24

图 1 菌株 YGRE24 对尖孢镰刀菌西瓜专化型的拮抗作用  
Figure 1 Antagonism of the strain YGRE24 to *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum



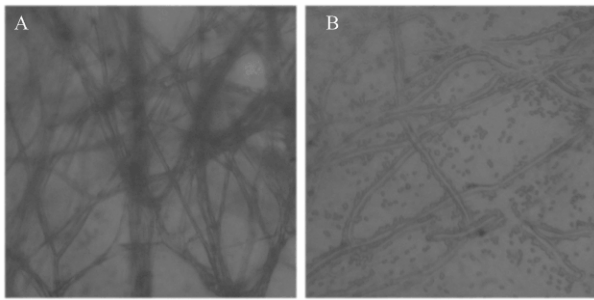
A: 尖孢镰刀菌 0 号生理小种; B: 尖孢镰刀菌 1 号生理小种; C: 尖孢镰刀菌 2 号生理小种

A: physiological race 0 of *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum; B: physiological race 1 of *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum; C: physiological race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum.

图 2 菌株 YGRE24 发酵液对尖孢镰刀菌西瓜专化型的拮抗作用

Figure 2 Antagonism of fermentation broth of the strain YGRE24 to *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum

菌株 YGRE24 对其他 5 种真菌病原菌也具有较强拮抗作用。同时菌株 YGRE24 的发酵液对这 5 种病原菌也有较强的抑制作用, 说明该菌株具有广泛抗菌谱。



A: 对照; B: 菌株 YGRE24 与尖孢镰刀菌西瓜专化型对峙培养

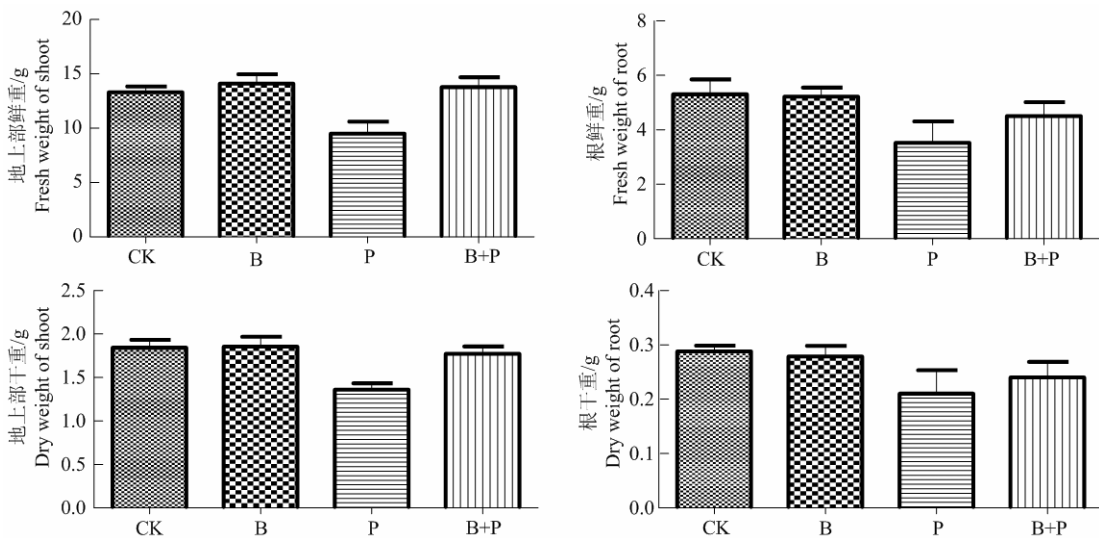
A: control; B: confrontation cultivation of the strain YGRE24 and *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum

图 3 菌株 YGRE24 对尖孢镰刀菌西瓜专化型菌丝形态的影响

Figure 3 Effect of the strain YGRE24 on mycelium of *Fusarium oxysporum* f.sp.niveum

### 2.3 菌株 YGRE24 促生特性

对分离筛选的内生拮抗菌株 YGRE24 进行促生



CK: 空白对照; B: 菌株 YGRE24; P: 病原菌; B+P: 病原菌和菌株 YGRE24

CK: control treatment; B: the strain YGRE24; P: pathogen; B+P: the strain YGRE24 and pathogeny

图 4 菌株 YGRE24 提高西瓜抗病能力的效果

Figure 4 Effect of the strain YGRE24 on enhancing disease resistance in watermelon

### 2.4 菌株 YGRE24 对西瓜苗生长的作用

根据盆栽试验的结果, 统计不同处理后栽培的西瓜苗的生物量, 得出如图 4 所示结果。可以看出, 接种菌株 YGRE24 的处理和空白对照没有很明显的差别, 仅提高了茎叶鲜重和干重的 5.9% 和 0.5%。菌株 YGRE24 在正常环境条件下对西瓜没有明显的促生长作用。接种病原菌后可以发现, 病原菌很大程度上影响了植株的正常生长, 使茎叶鲜重和干重分别下降了 28.6% 和 26.3%, 且呈显著差异, 同时根的鲜重和干重也分别下降了 33.5% 和 27.0%。

特性的测定, 结果如下。

溶磷特性的测定: 在以磷酸钙为唯一的磷元素来源的培养液中接种菌株 YGRE24, 培养 7 d 后, 可以观察到菌株可以在培养液中富集。通过钼蓝比色法测定培养液中磷的含量为  $42.198 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 同时观察到培养液的 pH 由 6.42 降低至 5.57。

产 IAA 能力的测定: 在含有 L-色氨酸的培养液中培养 7 d 后, 发酵液中的 IAA 含量为  $30.180 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

铁载体产量的测定: 在 MKB 培养液中培养 2 d 后, 加入 CAS 检测液测量 630 nm 处的光吸收值为 0.152, 和空白对照的参比值 (A/Ar) 为 0.252。根据文献描述, 其铁载体产量为“++++”。

ACC 脱氨酶的测定: 在以 ACC 为唯一氮源的培养基中, 菌株 YGRE24 不能生长, 可知其不能表达 ACC 脱氨酶。

菌株 YGRE24 的接种却能大大减缓病原菌对植株的侵害。相较于 CK, 同时接种菌株 YGRE24 和病原菌的植株的根鲜重和干重仅下降了 15.1% 和 16.6%, 而地上部分的鲜重和干重几乎和 CK 相同。此外, 与单独接种病原菌相比, 同时接种菌株 YGRE24 和病原菌的植株时植株地上部分的鲜重和干重分别增加了 44.75% 和 30.32%, 且达显著差异; 而地下部分根鲜重和干重也分别增加了 27.71% 和 14.29%。综合盆栽试验结果, 可以看出菌株 YGRE24 可以降低由西瓜枯萎病菌引起的减产。

表 1 菌株 YGRE24 生理生化特性  
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the strain YGRE24

试验项目 Test item	结果 Result	试验项目 Test item	结果 Result
革兰氏染色 Gram staining	+	纤维素酶 Cellulase	+
芽孢染色 Spore staining	+	形成吲哚 Indole production	-
细胞直径 Cell diameter >1.0 μm	-	生长 NaCl Growth NaCl concentration 2%	+
形状 Shape	杆形 Rod shape	5%	+
接触酶 Catalase	+	7%	+
厌氧生长 Anaerobic growth	-	10%	-
葡萄糖产酸 Acid production of glucose	+	生长温度 Growth temperature 4℃	-
葡萄糖产气 Air production of glucose	-	30℃	+
VP 测定 VP test	+	40℃	+
甲基红试验 Methyl red	+	55℃	+
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+	生长 pH 5.6 Growth under pH 5.6	+

注：“+” 阳性反应；“-”阴性反应。Note: “+” Positive reaction; “-” Negative reaction.

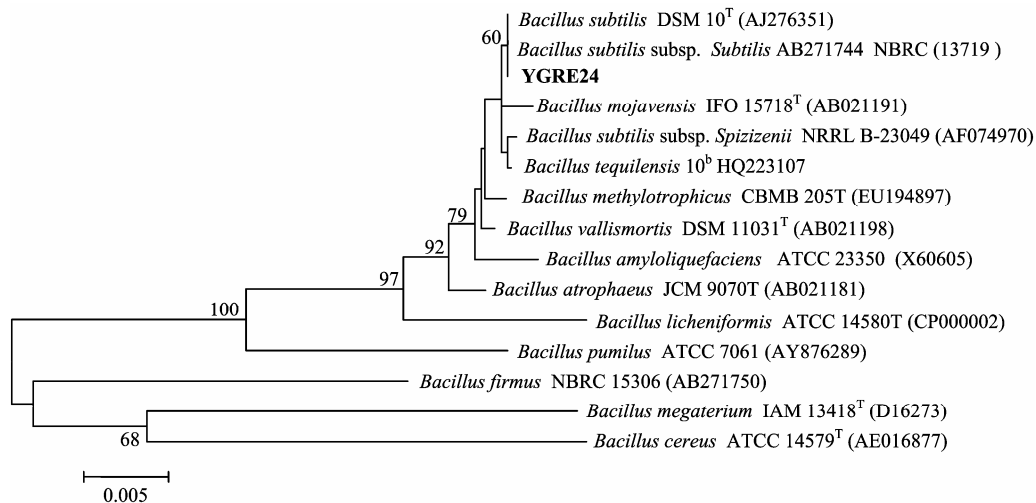


图 5 菌株 YGRE24 的系统发育树状图

Figure 5 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence of the strain YGRE24

## 2.5 菌株 YGRE24 鉴定及序列分析

菌株 YGRE24 革兰氏染色呈阳性；在 NA 和 PDA 上均生长良好，菌落呈放射状，白色，扁平，表面粗糙，有褶皱，边缘突出。该菌株的生理生化指标见表1，根据伯杰氏细菌鉴定手册，将该菌株初步鉴定为枯草芽孢杆菌。

以 YGRE24 基因组 DNA 为模板，经 PCR 扩增和 1%琼脂糖凝胶电泳检测，获得 1.5 kb 左右的特异性片段。采用双向测定法测得 YGRE24 菌株的 16S rDNA 序列长为 1 393 bp，GenBank 中的序列登录号为：KC315895。

经 BLAST 同源序列检索，以 16S rDNA 同源性为基础，选取 15 个典型菌株的 16S rDNA 用 MAGE 4.1 软件进行系统进化分析，结果如图 5。YGRE24 与 *Bacillus subtilis* (AJ276351) 及 *Bacillus*

*subtilis* subsp. *Subtilis* (AB271744) 的同源性最高，达 100%，且与它们二者单独构成一个小分支，反映出两者的亲缘关系最近。菌株 YGRE24 与 *Bacillus tequilensis* (HQ223107)、*Bacillus subtilis* subsp. *Spizizenii* (AF074970) 及 *Bacillus mojavensis* (AB021191) 的相似性分别高达 99.93%、99.78% 和 99.57%，同时与它们聚在一起形成一个大分支。

## 3 讨论

植物内生细菌 (endophy) 是一类栖居在植物组织内，不影响植物的生长，在某些情况下可以促进植物的生长或增强植物抵御病虫害或干旱等不利环境的细菌。植物内生菌与植物宿主的代谢活动密切联系，是研究植物生长和微生态不容忽视的重要环节，也是植物病害生物防治的重要资源，具有十分

广阔的前景。

引起西瓜枯萎病的病原菌是尖孢镰刀菌西瓜专化型,国际上公认该菌存在3个生理小种,分别为0、1、2号,且其致病力逐渐增强<sup>[14]</sup>。目前认为中国以1号生理小种引发的枯萎病占主导地位。而生理小种2号能够侵染除了野生栽培种以外的所有西瓜品种,其致病能力最强<sup>[15-16]</sup>。虽然2号生理小种在我国尚未成为优势小种,但仍具有潜在威胁<sup>[17]</sup>。本文首次同时以尖孢镰刀菌西瓜专化型0、1、23种生理小种为靶标菌,从西瓜根内分离筛选到一株具有较高抑菌活性的内生拮抗菌株 YGRE24。经进一步研究发现菌株 YGRE24 能使病原菌 2 号生理小种菌丝畸形,呈无规则结构;室内盆栽试验表明菌株 YGRE24 的接种能够有效改善枯萎病原菌胁迫下的西瓜苗的生长状况。但微生物菌剂的作用会受到土壤微生物种类数量、土壤类型、土壤理化特性等诸多环境因素的影响<sup>[18]</sup>。因此本试验筛选获得的拮抗菌的田间试验有待后续进一步研究。

本试验筛选到的内生拮抗菌株 YGRE24 经形态特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列测定,其分类地位可能为枯草芽孢杆菌。芽孢杆菌是公认的抗逆性强、抗菌谱广菌株。近年来已成为生防促生菌研究中最热门细菌之一。孙正祥<sup>[19]</sup>、辜运福<sup>[20]</sup>和 Yang<sup>[21]</sup>等也从香蕉、玉米和番茄植物体内筛选得到了具有高效抑菌作用的芽孢杆菌。芽孢杆菌生防作用机制多样,包括种群竞争、产生抗菌物质、溶菌、诱导植物抗性和促进植物生长等<sup>[22]</sup>。本试验筛选的内生拮抗菌株的抑菌机理有待进一步详细阐明。

## 参考文献:

- [1] 苗琛, 尚富德, 江静, 等. 西瓜枯萎病抗性的细胞学研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2004, 41(4): 196-199.
- [2] 管怀骥, 陈莉. 几种药剂防治西瓜枯萎病的初步研究[J]. 安徽农学通报, 2001, 7(6): 43-45.
- [3] 章家恩, 刘文高. 微生物资源的开发利用与农业可持续发展[J]. 土壤与环境, 2001, 10(2): 154-157.
- [4] 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.
- [5] Senthilkumar M, Anandham R, Madhaiyan M, et al. Endophytic bacteria: perspectives and applications in agricultural crop production[M]//Bacteria in Agrobiolgy. Crop Ecosystems, 2011: 61-96.
- [6] 张淑梅, 沙长青, 王玉霞, 等. 大豆内生细菌的分离及根腐病拮抗菌的筛选鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1593-1599.
- [7] Idris H A, Labuschagne N, Korsten L. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia[J]. Biological Control, 2007, 40(1): 97-106.
- [8] Nautiyal C S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 170(1): 265-270.
- [9] Sachdev D P, Chopade B A, Kasture V M, et al. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing *Klebsiella pneumoniae* strains from rhizosphere of wheat (*Triticum aestivum*) and their effect on plant growth[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2009, 47(12): 993.
- [10] 王平, 董颺. 小麦根圈细菌铁载体的检测[J]. 微生物学通报, 1994, 21(6): 323-326.
- [11] Penrose D M, Glick B R. Methods for isolating and characterizing ACC deaminase - containing plant growth - promoting rhizobacteria[J]. Physiologia Plantarum, 2003, 118(1): 10-15.
- [12] 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.
- [13] Claudia M, Jaime R, Romilio T. Polymorphism in repeated 16S rRNA genes is a common property of type strains and environmental isolates of the genus *Vibrio*[J]. Microbiology, 2002, 148(4): 1233-1239.
- [14] Martyn R D, Netzer D. Resistance to races 0, 1, and 2 of fusarium wilt of watermelon in *Citrullus* sp. PI-296341-FR[J]. Hort Science, 1991, 35(26): 429-432.
- [15] 段会军, 张彩英, 李喜焕, 等. 河北省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定与 AFLP 分析[J]. 中国农业科学, 2007, 40(5): 925-931.
- [16] 安美君, 吴凤芝, 刘博. 黑龙江省西瓜枯萎病菌生理小种鉴定及部分西瓜品种抗病鉴定[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2009, 27(5): 494-500.
- [17] 邹小花, 张海英, 李胜, 等. 野生西瓜种质 PI296341-FR 抗枯萎病菌生理小种 2 的遗传规律[J]. 园艺学报, 2011, 38(9): 1699-1706.
- [18] Silva A P, Babujia L C, Franchini J C, et al. Microbial biomass under various soil-and crop-management systems in short-and long-term experiments in Brazil[J]. Field Crops Research, 2010, 119(1): 20-26.
- [19] 孙正祥, 纪春艳, 李云锋, 等. 香蕉枯萎病拮抗菌的分离筛选与鉴定[J]. 中国生物防治, 2008, 24(2): 143-147.
- [20] 辜运富, 张云飞, 张小平. 一株抗玉米纹枯病内生细菌的分离鉴定及其抗病促生作用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1240-1245.
- [21] Yang C J, Zhang X G, Shi G Y, et al. Isolation and identification of endophytic bacterium W4 against tomato *Botrytis cinerea* and antagonistic activity stability[J]. African Journal of Microbiology Research, 2011, 5(2): 131-136.
- [22] 黄曦, 许兰兰, 黄荣韶, 等. 枯草芽孢杆菌在抑制植物病原菌中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2010(1): 24-29.