

# 棉花内生真菌 CEF-373 菌株对棉花黄萎病的防效及其作用机理

赵 沛<sup>1,2</sup> 冯自力<sup>3</sup> 师勇强<sup>3</sup> 赵丽红<sup>3</sup> 胡小平<sup>1\*</sup> 朱荷琴<sup>2,3\*</sup>

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2. 郑州大学, 郑州科研基地, 棉花生物学国家重点实验室, 郑州 450001; 3. 中国农业科学院棉花研究所, 棉花生物学国家重点实验室, 河南 安阳 455000)

**摘要:** 为明确棉花内生真菌 CEF-373 菌株对棉花黄萎病的防效及其作用机理, 利用圆盘滤膜法和平板对扣培养法测定菌株 CEF-373 对大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 菌丝生长的抑制作用, 测定其对棉花黄萎病的温室和田间防效, 并通过活性氧含量及防御基因表达情况来分析其作用机理。结果表明, 菌株 CEF-373 的挥发性代谢产物和非挥发性代谢产物对大丽轮枝菌菌丝的生长均有显著抑制作用, 抑制率最高分别可达 37.75% 和 100.00%。用  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的菌株 CEF-373 分生孢子悬浮液灌根后, 对棉花黄萎病的温室防效可达 71.12%, 用质量比为 3% 的菌株 CEF-373 固体菌剂拌土栽培后, 对棉花黄萎病的温室防效可达 62.74%, 防治作用显著。菌株 CEF-373 的发酵液滴灌和微生物肥料处理 40 d 后, 对棉花黄萎病的田间防效达到最大, 分别为 36.23% 和 27.71%, 而在后期有所降低。菌株 CEF-373 可以诱导棉花叶片中细胞活性氧的爆发; 且菌株 CEF-373 成功激活了苯丙氨酸解氨酶、过氧化物酶、多酚氧化酶、几丁质酶和病程相关蛋白基因 *PR10* 的表达, 对大丽轮枝菌的侵染具有抵御作用。表明棉花内生真菌 CEF-373 菌株通过抑制大丽轮枝菌生长以及诱导寄主系统抗病性来有效防治棉花黄萎病, 具有较好的生物防治应用前景。

**关键词:** 棉花黄萎病; 内生真菌; 大丽轮枝菌; 生物防治; 诱导抗性

## Biological control effect and mechanism of cotton endophytic fungus *Fusarium solani* CEF-373 against *Verticillium* wilt in *Gossypium hirsutum*

Zhao Pei<sup>1,2</sup> Feng Zili<sup>3</sup> Shi Yongqiang<sup>3</sup> Zhao Lihong<sup>3</sup> Hu Xiaoping<sup>1\*</sup> Zhu Heqin<sup>2,3\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. State Key Laboratory of Cotton Biology, Zhengzhou Research Base, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan Province, China; 3. State Key Laboratory of Cotton Biology, Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000, Henan Province, China)

**Abstract:** In order to determine the control effect and mechanism of cotton endophytic fungus CEF-373 on *Verticillium* wilt, the inhibition rate of strain CEF-373 against *Verticillium dahliae* was assessed using the exudate filtering method and plate-to-plate culture method, and the control effect of *Verticillium* wilt on cotton was tested with greenhouse and field experiments. Meanwhile, the content of reactive oxygen species and the expression of defense genes were detected to analyze the mechanism of action. The results showed that the growth inhibition rates of volatile metabolites and non-volatile metabolites

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201906)

\* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: heqinanyang@sohu.com, xphu@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2018-12-28

of strain CEF-373 were up to 37.75% and 100.00% respectively. After root irrigation with  $1 \times 10^7$  CFU/mL strain CEF-373 conidia suspension, the greenhouse control efficiency on *Verticillium* wilt of cotton was up to 71.12%, and the solid bacterial strain CEF-373 with a mass ratio of 3% was mixed with soil and cultivated, the greenhouse control efficiency was up to 62.74%, which had a significant control effect on *Verticillium* wilt. The field control efficiency of strain CEF-373 on *Verticillium* wilt of cotton was maximized by drip irrigation and microbial fertilizer treatment for 40 days, which was 36.23% and 27.71% respectively, but decreased in the later stage. Strain CEF-373 could induce the outbreak of reactive oxygen species in cells of cotton leaves, and successfully activated the expression of phenylalanine aminolytic enzyme, peroxidase, polyphenol oxidase, chitinase and pathogenesis-related gene *RP10*, which had a protective effect against the infection of *V. dahliae*. The results indicated that strain CEF-373 of endophytic fungus in cotton could effectively control *Verticillium* wilt of cotton by inhibiting the growth of *V. dahliae* and inducing disease resistance of host, which has a good application prospect in biocontrol.

**Key words:** cotton *Verticillium* wilt; endophytic fungus; *Verticillium dahliae*; biological control; induced resistance

棉花是重要的天然纤维作物,具有很高的经济价值。由大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 引起的棉花黄萎病,对于棉花的生产常造成毁灭性危害(简桂良等,2003)。大丽轮枝菌通常由根部侵入,在组织中扩散,最后扩展至整个植株,导致系统性病害(赵凤轩和戴小枫,2009)。传统的化学防治方法对棉花黄萎病的防控效果有限,不仅花费较大,还会对人类健康和人类健康造成负面影响(周亚平和吴兰,2003)。而生物防治由于具有高度的选择性,对人类和动物安全,对环境影响小,不容易产生抗性,易开发且成本低(蔡奕,2018),可以长期持续性解决这些问题(林玲等,2014)。目前,用于植物病害生物防治的生防因子很多,包括拮抗微生物、抗生素和植物诱导子等(邱德文,2010),其中内生菌作为生防资源的研究更为热门(李强等,2006)。

内生菌定殖于健康植物组织中,却不会使寄主植株产生任何明显或者可察觉的症状,包括真菌、细菌和放线菌(宋薇薇等,2018)。根据内生菌的属性可以将其分为3类:一类是对自身寄主植物不致病,但却对其它寄主具有致病性;一类是对所有寄主均不致病;还有一类不是致病菌,但是仍然对寄主具有潜在的危害(Backman & Sikora, 2008)。在大多数情况下,内生菌和寄主之间的关系并不简单只是致病或者共生的关系。事实上,内生菌的存在会诱导寄主植株对于生物和非生物胁迫产生抗性(牛燕芬等,2015)。特别是植物内生真菌,可以通过抗生、竞争和重寄生作用直接抑制病原菌的侵染和增殖,或者间接通过诱导植物的内在抗性反应来抵御病原菌(Gond et al., 2010),如诱导植物产生多酚氧化酶

(polyphenol oxidase, PPO)、过氧化物酶(peroxidase, POD)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)和病程相关蛋白(pathogenesis-related protein, PR)等防御相关物质(赵秀娟等,2013)。目前,相关研究人员从一系列的作物中分离并证实了这些内生菌对于植物病害防治具有积极意义。如黎起秦等(2003)从番茄茎部分离出7株对番茄青枯病具有拮抗作用的内生菌,其中芽胞杆菌 *Bacillus* spp. 菌株 B47 的田间防效高达 74.98%;张立新等(2005)从番茄中分离出多株内生真菌,其中 Fq72 菌株的培养滤液对6种植物病原菌均有拮抗作用,尤其是对灰霉菌 *Botrytis cinerea* 和菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 的抑制率分别达到了 75.68% 和 66.11%;姜午春等(2018)从西洋参中分离出58株内生真菌,其中有14株对立枯病、根腐病、茎腐病等病害的病原菌表现出不同程度的拮抗性。这些内生菌都使寄主植株对于病原菌的抵御能力显著增强。

本研究拟对从健康棉花植株上分离到的内生真菌进行鉴定,明确其种属地位,通过检测该菌株挥发性和非挥发性代谢产物对大丽轮枝菌菌丝生长、分生孢子萌发、微菌核萌发和产孢量的影响来分析其对棉花黄萎病的防效;并通过检测其对棉花防御相关基因表达的影响,初步探讨该菌株防治棉花黄萎病的作用机理,以期研制防治棉花黄萎病的高效环保微生物制剂提供资源。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株及棉花品种:所用菌株为大丽轮枝菌

强致病力菌株 Vd080, 棉花品种为耐黄萎病品种鲁棉研 21 号, 均由中国农业科学院棉花研究所棉花病害课题组提供。

培养基: 马铃薯葡萄糖琼脂 (potato dextrose agar, PDA) 培养基: 200 g 去皮马铃薯煮沸过滤液、葡萄糖 20 g、琼脂 14 g、蒸馏水 1 L; 察氏培养基: 硝酸钠 3 g、磷酸氢二钾 1 g、七水硫酸镁 0.5 g、氯化钾 0.5 g、硫酸亚铁 0.01 g、蔗糖 30 g、蒸馏水 1 L; 布里斯托培养基: 葡萄糖 5 g、七水硫酸镁 0.52 g、磷酸氢二钾 1.31 g、硝酸钠 0.2 g、氯化钾 0.52 g、维生素 B<sub>1</sub> 3 μmol/L、维生素 H 0.1 μmol/L、蒸馏水 1 L。

试剂及仪器: Reverse Transcriptase M-MLV 反转录试剂盒、TransTaq<sup>®</sup>-T DNA Polymerase, 宝生物工程(大连)有限公司; 其余试剂均为国产分析纯。血球计数板, 上海化科实验器材有限公司; GZP-250 光照培养箱, 南京庚辰科学仪器有限公司; Nikon 光学显微镜, 上海富莱光学科技有限公司; T Gradient 96 PCR 仪, 德国艾本德有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 棉花内生真菌的分离及鉴定

于中国农业科学院棉花研究所棉花田采集表型无病症的棉花植株, 将其表面清洗后去皮, 再用 70% 乙醇消毒 1 min, 无菌水洗涤 3 次, 3% 次氯酸钠消毒处理 4 min, 无菌水洗涤 3 次, 将消毒后的棉花植株剪成 2~3 cm 长的小段, 置于直径 9 cm 的 PDA 平板上于 25℃ 黑暗培养。每天检查内生真菌的生长情况, 然后观察其菌落大小、颜色、表面特征, 待菌落长至 1/2 平板时进行单孢分离并继续在 PDA 平板上进行纯培养, 分离获得的内生真菌菌株命名为 CEF-373。

利用察氏培养基在 25℃、180 r/min 条件下摇培菌株 CEF-373 纯培养物, 摇培 5 d 后过滤获得其菌丝体, 采用 CTAB 法提取其基因组 DNA, 利用真菌 rDNA ITS 通用引物 ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGAT-ATCG-3')/ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACA-AGG-3') 扩增其 ITS 片段, 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。25 μL PCR 反应体系: 100 ng/μL DNA 模板 1 μL, 10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL, 10× TransTaq<sup>®</sup>-T Buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, TransTaq<sup>®</sup>-T DNA Polymerase 0.25 μL, ddH<sub>2</sub>O 18.25 μL。PCR 扩增程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至苏州金唯智生物科技有限公司进行测序。测序所得序列与 GenBank 数据库中相关菌株

的 ITS 序列进行同源性比对, 利用 Clustal X 2.0 进行序列比对, 采用 MEGA 5.0 软件以邻接法构建系统发育树, bootstrap 值为 1 000。

### 1.2.2 菌株 CEF-373 对大丽轮枝菌的抑制率测定

采用对扣培养法测定菌株 CEF-373 挥发性代谢产物对大丽轮枝菌强致病力菌株 Vd080 菌丝生长的影响。将菌株 Vd080 和 CEF-373 分别接种在 PDA 平板上进行活化培养, 待菌落形成后用打孔器在菌落边缘打取直径为 5 mm 的菌饼, 并分别转接到新的 PDA 平板上。将接种有菌株 Vd080 和 CEF-373 菌饼的 2 个平板对扣密封, 25℃ 恒温培养箱中黑暗培养 10 d 后 (Whipps & Magan, 1987), 利用十字交叉法测量菌落直径, 计算抑制率。以菌株 Vd080 与空白 PDA 平板对峙培养作为对照, 每个处理 3 次重复。抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100% (孟娜等, 2007)。采用圆盘滤膜法测定菌株 CEF-373 非挥发性代谢产物对大丽轮枝菌强致病力菌株 Vd080 菌丝生长的影响。将菌株 CEF-373 接种到铺有玻璃纸的 PDA 平板上, 待菌丝长满玻璃纸后, 去除玻璃纸, 在 PDA 平板中央接种 1 个直径为 5 mm 的菌株 Vd080 菌饼, 培养 15 d 后利用十字交叉法测量菌落直径, 计算抑制率 (王玲飞, 2014)。以空白 PDA 平板上接种菌株 Vd080 为对照, 每个处理 3 次重复。

采用悬滴法测定菌株 CEF-373 无菌滤液对大丽轮枝菌强致病力菌株 Vd080 分生孢子萌发的影响。取 1 个直径为 5 mm 的菌株 Vd080 菌饼转接到察氏培养基中, 于 25℃、180 r/min 条件下摇培 7 d, 用 4 层无菌纱布过滤, 滤液即为菌株 Vd080 分生孢子悬浮液, 利用血球计数板计算分生孢子浓度, 分别稀释至 1×10<sup>7</sup>、1×10<sup>6</sup>、2×10<sup>3</sup> CFU/mL, 备用。同时, 取 1 个直径为 5 mm 的菌株 CEF-373 菌饼转接到察氏培养基中, 于 25℃、180 r/min 条件下摇培 7 d 获得 CEF-373 培养液, 以 5 000 r/min 离心 10 min, 用 0.22 μm 滤芯过滤上清液去除菌丝体获得无菌滤液。试验设 3 个处理: 菌株 CEF-373 的无菌滤液原液、1/2 稀释液和 1/4 稀释液, 分别取 100 μL 与等量的 2×10<sup>3</sup> CFU/mL 菌株 Vd080 分生孢子悬浮液均匀混合, 各取 20 μL 混合液悬滴于凹玻片上, 在 25℃ 下保湿暗培养, 3 h 后镜检菌株 Vd080 分生孢子的萌发情况, 每个处理 3 次重复, 每个重复检查 5 个视野, 共观察 100 个分生孢子, 以察氏培养基与菌株 Vd080 分生孢子悬浮液的等体积混合液为对照 (Li et al., 2010)。

采用混合培养法测定菌株 CEF-373 无菌滤液对

大丽轮枝菌强致病力菌株 Vd080 产孢的影响。试验设 3 个处理:菌株 CEF-373 的无菌滤液原液、1/2 稀释液和 1/4 稀释液,分别取 5 mL 与等量的  $2 \times 10^3$  CFU/mL 菌株 Vd080 分生孢子悬浮液均匀混合,于 25℃ 振荡暗培养 4 d,利用血球计数板统计菌株 Vd080 分生孢子数,以察氏培养基与菌株 Vd080 分生孢子悬浮液的等体积混合液为对照,每个处理重复 3 次。

采用混合培养法测定菌株 CEF-373 无菌滤液对大丽轮枝菌强致病力菌株 Vd080 微菌核萌发的影响。用无菌透气的玻璃纸覆盖在制备好的布里斯托平板表面,取  $1 \times 10^6$  CFU/mL 菌株 Vd080 分生孢子悬浮液 100  $\mu$ L 涂布在玻璃纸上,20℃ 暗培养 30 d,制成大丽轮枝菌微菌核悬浮液(Hu et al., 2013; López-Escudero et al., 2007)。试验设 3 个处理:菌株 CEF-373 的无菌滤液原液、1/2 稀释液和 1/4 稀释液,分别取 100  $\mu$ L 与等量大丽轮枝菌微菌核悬浮液均匀混合,于 20℃ 暗培养 24 h,利用光学显微镜观察菌株 Vd080 微菌核萌发情况,每个处理 3 次重复,每个重复检查 5 个视野,共观察 100 个微菌核,并计算萌发率,以察氏培养基与大丽轮枝菌微菌核悬浮液的等体积混合液为对照。

### 1.2.3 菌株 CEF-373 对棉花黄萎病的温室防效测定

灌根接种法:取 1 个直径 5 mm 的菌株 CEF-373 菌饼接种在察氏培养基中,于 25℃、180 r/min 条件下振荡培养 5 d,得到菌株 CEF-373 液体菌剂,利用血球计数板计算浓度并将其稀释为  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  CFU/mL,备用。将蛭石:沙土:基质按体积比 3:3:4 均匀混合后装入营养钵;同时将经过 3% 次氯酸钠消毒的鲁棉研 21 号种子浸泡 12 h,以每钵 8 粒种子的密度种植在营养钵中,以每 6 个营养钵为 1 个处理。在温度 23~30℃、相对湿度 60% 以上的日光温室中培育 17 d 后,待 1 片真叶初现时每钵分别接种  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  CFU/mL 菌株 CEF-373 液体菌剂 50 mL,3 d 后再给每钵灌根接种 1.2.2 中制备好的  $1 \times 10^7$  CFU/mL 菌株 Vd080 分生孢子悬浮液 10 mL,以 10 mL 察氏培养基灌根作为对照,每个处理 3 次重复。接种大丽轮枝菌 25 d 后参照赵丽红等(2017)5 级分级标准进行鲁棉研 21 号幼苗的病情调查,同时计算病情指数和温室防效。病情分级标准为:0 级:发病面积占比为 0;1 级:0<发病面积占比 $\leq$ 33%;2 级:33%<发病面积占比 $\leq$ 66%;3 级:66%<发病面积占比 $\leq$ 100%;4 级:发病面积占比为 100%。病情指数= $\Sigma$ (级数 $\times$ 每级的病株数)/(调查的总株数 $\times$ 4) $\times$ 100;温室防效=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病

情指数 $\times$ 100%。

拌土接种法:装有质量比为 1:1 的玉米和蛭石的克氏瓶经灭菌后,接种活化好的直径约 1 cm 的菌株 CEF-373 菌块,25℃ 暗培养 7 d 后取出培养物,自然风干制成菌株 CEF-373 固体菌剂。首先将蛭石:沙土:基质按体积比 3:3:4 均匀混合,分别按质量比 1%、2% 和 3% 接种固体菌剂制作营养钵(李志芳等, 2013)。将 3% 次氯酸钠消毒的鲁棉研 21 号种子浸泡 12 h,以每钵 8 粒种子的密度种植在营养钵中,以每 6 个营养钵为 1 个处理,置于温室中栽培。待有 1 片真叶初现时每钵接种  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的菌株 Vd080 分生孢子悬浮液 10 mL,以蛭石沙土基质混合无菌培养物的营养钵为对照,每处理 3 次重复。接种大丽轮枝菌 25 d 后调查鲁棉研 21 号幼苗的病情,分级标准同上,计算病情指数和温室防效。

### 1.2.4 菌株 CEF-373 对棉花黄萎病的田间防效测定

发酵液滴灌:给发酵罐中加入察氏培养基,并按照培养基体积 5% 的量加入  $1 \times 10^8$  CFU/mL 菌株 CEF-373 分生孢子悬浮液,于常温下发酵培养 3 d 获得发酵液,备用。2017 年 5 月上旬在中国农业科学院棉花研究所连年发生黄萎病的棉花圃中种植鲁棉研 21 号,设计种植小区,随机排列,每个小区长 5 m,宽 3 m,种植密度为 3 万株/hm<sup>2</sup>,试验设 3 次重复,即 3 个重复小区。待棉花长到 3 叶期时,给每株棉花根部滴灌浓度为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的菌株 CEF-373 发酵液 100 mL,每隔 1 周滴灌 1 次,共滴灌 3 次,以滴灌清水为对照,最后 1 次滴管后 40、60、80 d 调查鲁棉研 21 号幼苗的发病情况。病情的调查统计和分级标准同 1.2.3。

微生物肥料:装有质量比为 1:1 的玉米和蛭石的克氏瓶经灭菌后,接种活化好的直径约 1 cm 的菌株 CEF-373 菌块,25℃ 暗培养 7 d 后取出培养物,自然风干制成固体菌剂。2017 年 4 月下旬在上述棉花圃中种植鲁棉研 21 号,种植小区设计和种植密度同上,在播种的时候将菌株 CEF-373 固体菌剂撒在种沟里,1 m 行长撒 20~30 g 菌剂,分别于播种后 40、60、80 d 调查鲁棉研 21 号幼苗的发病情况。病情的调查统计和分级标准同 1.2.3。

### 1.2.5 菌株 CEF-373 诱导棉花活性氧爆发的检测

鲁棉研 21 号的种植方法同 1.2.3,待 1 片真叶初现时每钵灌根接种  $1 \times 10^7$  CFU/mL 菌株 CEF-373 分生孢子悬浮液 10 mL,以 10 mL 察氏培养基灌根作为对照。培育 3 d 后再接种  $1 \times 10^7$  CFU/mL 菌株 Vd080 分生孢子悬浮液 10 mL,接种病原菌 3 d 后检测棉花叶片中活性氧的爆发情况。取长势相近的 5 片棉花

叶片用无菌水洗涤后置于离心管中,加入少量 3,3-二氨基联苯胺染液,室温避光染色 8 h;倒掉染液后加入 95% 乙醇沸水浴 2 min 脱去叶绿素,去除液体,加无水乙醇在沸水浴中继续脱色,直至绿色完全消除;然后将叶片浸于 70% 甘油中,赶出叶片细胞间气泡,3,3-二氨基联苯胺被氧化后,生成不溶性沉淀,显色为褐色,所以将叶片置于载玻片上观察有无褐色斑点的累积(周京龙等,2017),如出现褐色斑点,则代表诱导了活性氧的爆发。

### 1.2.6 菌株 CEF-373 诱导棉花防御相关基因表达测定

鲁棉研 21 号的种植方法同 1.2.3,待 1 片真叶初现时每钵灌根接种  $1 \times 10^7$  CFU/mL 菌株 CEF-373 分生孢子悬浮液 10 mL,以 10 mL 察氏培养基灌根为对照,4 d 后再接种  $1 \times 10^7$  CFU/mL 菌株 Vd080 分生孢子悬浮液 10 mL,接种后 12、24、48 和 72 h 采集棉花叶片进行后续试验。采用 CTAB/酚法提取棉花叶片总 RNA(蒋建雄和张天真,2003),利用 Reverse Transcriptase M-MLV 反转录制备 cDNA,具体操作按照说明书进行。利用 PCR 技术检测棉花叶片中防御相关基因 *PPO*、*POD*、*PAL*、*CHI*、*RPI10* 的表达量,以 *Ubiquitin* 基因为内参基因,所用特异性引物均由苏州金唯智生物科技有限公司合成(表 1)。20  $\mu$ L

PCR 反应体系:10  $\mu$ mol/L 上下游引物各 0.4  $\mu$ L、cDNA 2  $\mu$ L、 $2 \times$ Ultra SYBR Mixture (with ROX) 10  $\mu$ L,无菌水补足至 20  $\mu$ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环。熔解曲线程序设定为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 s;65 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;65 $^{\circ}$ C 上升到 97 $^{\circ}$ C 解链,每 0.11 s 上升 1 $^{\circ}$ C。试验重复 3 次,每次设 3 个技术重复,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法对所得  $C_t$  值进行分析(张芸等,2016)。

### 1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,应用单因素方差分析法(one way ANOVA)进行处理间的差异显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 棉花内生真菌的分离与鉴定结果

本试验分离获得的 1 株棉花内生真菌菌株命名为 CEF-373。利用真菌 rDNA ITS 通用引物进行 PCR 扩增,对扩增片段进行测序,经序列比对发现菌株 CEF-373 与腐皮镰孢菌 *Fusarium solani* 菌株 BC-3 (GenBank 登录号 MH782034) 的 ITS 序列同源性为 100.00%,置信度达 100.00% (图 1),确定内生真菌 CEF-373 为腐皮镰孢菌。

表 1 防御相关基因的特异性引物

Table 1 Specific primer sequences of related resistance genes

| 基因<br>Gene       | 引物序列(5'-3')<br>Primer sequence (5'-3')                 | 片段大小<br>Fragment size (bp) |
|------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------|
| <i>PPO</i>       | F: CCGCATAACCATCACAAG/R: ACTCTCATCACCTTCAACA           | 99                         |
| <i>POD</i>       | F: ATATCCTTGTTCTGTCTGCTA/R: CTCCTTCTACCGTCTCTTC        | 91                         |
| <i>PAL</i>       | F: TGGTGGCTGAGTTTAGGAAA/R: TGAGTGAGGCAATGTGTGA         | 323                        |
| <i>CHI</i>       | F: AATGACACGGCGACTCCCTT/R: TCCCACGAACCCCCACCTAT        | 167                        |
| <i>RPI10</i>     | F: ATGATTGAAGGTCGGCCTTTAGGG/R: CAGCTGCCACAACTGGTTCTCAT | 70                         |
| <i>Ubiquitin</i> | F: GAGTCTTCGGACACCATG/R: CTTGACCTTCTTCTTGTGC           | 246                        |

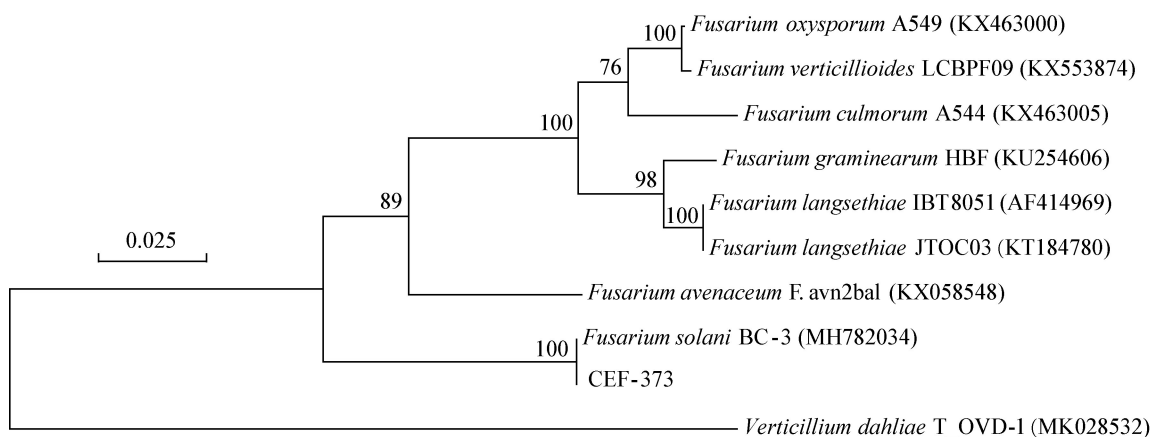


图 1 基于真菌 rDNA ITS 序列以邻接法构建菌株 CEF-373 及其它相关菌株的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain CEF-373 and other related strains based on rDNA ITS sequences with neighbor-joining method

## 2.2 菌株 CEF-373 对大丽轮枝菌的抑制作用

### 2.2.1 对大丽轮枝菌菌丝生长的抑制作用

对扣法培养结果表明,经菌株 CEF-373 挥发性代谢产物处理的大丽轮枝菌菌株 Vd080 菌落直径为 3.38 cm,未经菌株 CEF-373 处理的菌株 Vd080 菌落直径为 5.43 cm,菌株 CEF-373 挥发性代谢产物对菌

株 Vd080 菌丝生长的抑制率为 37.75%(图 2)。

圆盘滤膜法培养结果表明,经菌株 CEF-373 非挥发性代谢产物处理的大丽轮枝菌菌株 Vd080 菌落停止生长,未经菌株 CEF-373 处理的菌株 Vd080 菌落直径为 5.71 cm,表明菌株 CEF-373 非挥发性代谢产物对菌株 Vd080 菌丝生长的抑制率为 100.00%。

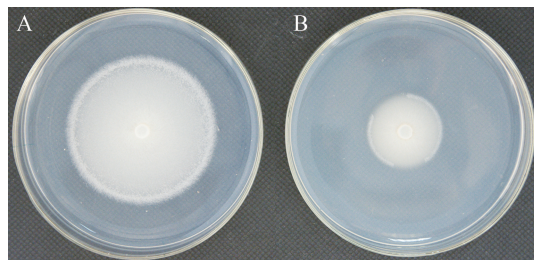


图 2 棉花内生真菌菌株 CEF-373 挥发性代谢产物对大丽轮枝菌菌株 Vd080 菌丝生长的抑制作用

Fig. 2 Effect of volatile organic compounds from cotton endophytic fungus CEF-373 on growth of *Verticillium dahliae* strain Vd080

A: PDA 培养基对照; B: 菌株 CEF-373 处理。A: Inoculated with strain Vd080 and treated with PDA; B: inoculated with strain Vd080 and treated with strain CEF-373.

### 2.2.2 对大丽轮枝菌产孢量的抑制作用

将大丽轮枝菌菌株 Vd080 分生孢子悬浮液与不同浓度的菌株 CEF-373 无菌滤液混合暗培养 72 h 后,空白培养基对照的菌株 Vd080 分生孢子数为  $1.18 \times 10^7$  CFU/mL,而加有菌株 CEF-373 无菌滤液原液、1/2 稀释液和 1/4 稀释液的菌株 Vd080 分生孢子数分别为  $0.27 \times 10^7$ 、 $0.41 \times 10^7$ 、 $0.53 \times 10^7$  CFU/mL,均显著低于对照;菌株 CEF-373 的无菌滤液原液、1/2 稀释液和 1/4 稀释液对菌株 Vd080 产孢的抑制率分别为 76.85%、65.42% 和 54.97%(表 2),以无菌滤液原液的抑制效果最好,显著高于 1/2、1/4 稀释液处理,表明内生真菌 CEF-373 可以抑制大丽轮枝菌产孢。

### 2.2.3 对大丽轮枝菌分生孢子萌发的抑制作用

将大丽轮枝菌菌株 Vd080 分生孢子悬浮液与不同浓度的菌株 CEF-373 无菌滤液混合培养 3 h 后,对照的菌株 Vd080 分生孢子萌发率为 52.87%,菌株 CEF-373 无菌滤液原液、1/2 稀释液和 1/4 稀释液处理的菌株 Vd080 分生孢子萌发率分别为 28.28%、39.08% 和 43.01%,均显著低于对照;菌株 CEF-373 的无菌滤液原液、1/2 稀释液和 1/4 稀释液对菌株 Vd080 分生孢子萌发的抑制率分别为 46.51%、26.09% 和 18.64%,以无菌滤液原液的抑制效果最好,显著高于 1/2、1/4 稀释液处理(表 2),表明内生真菌 CEF-373 可以抑制大丽轮枝菌分生孢子萌发。

表 2 棉花内生真菌菌株 CEF-373 对大丽轮枝菌菌株 Vd080 的抑制作用

Table 2 The inhibitory effect of cotton endophytic fungus strain CEF-373 on the growth of *Verticillium dahliae*

| 处理<br>Treatment                                 | 产孢量<br>Sporulation      |                        | 分生孢子萌发<br>Spore germination |                        | 微菌核萌发<br>Microsclerotium germination |                        |
|-------------------------------------------------|-------------------------|------------------------|-----------------------------|------------------------|--------------------------------------|------------------------|
|                                                 | 分生孢子数<br>Conidia        | 抑制率<br>Inhibition rate | 萌发率<br>Germination rate     | 抑制率<br>Inhibition rate | 萌发率<br>Germination rate              | 抑制率<br>Inhibition rate |
|                                                 | ( $\times 10^7$ CFU/mL) | (%)                    | (%)                         | (%)                    | (%)                                  | (%)                    |
| 培养基对照<br>Culture matrix control                 | 1.18 $\pm$ 0.09 a       | /                      | 52.87 $\pm$ 4.08 a          | /                      | 82.59 $\pm$ 6.46 a                   | /                      |
| 无菌滤液原液<br>Concentrate of sterile filtrate       | 0.27 $\pm$ 0.05 b       | 76.85 $\pm$ 9.22 a     | 28.28 $\pm$ 4.26 b          | 46.51 $\pm$ 4.75 a     | 67.50 $\pm$ 2.66 b                   | 18.27 $\pm$ 3.21 a     |
| 无菌滤液 1/2 稀释液<br>1/2 diluent of sterile filtrate | 0.41 $\pm$ 0.06 b       | 65.42 $\pm$ 7.71 b     | 39.08 $\pm$ 4.49 b          | 26.09 $\pm$ 4.33 b     | 65.04 $\pm$ 2.38 b                   | 21.25 $\pm$ 2.87 a     |
| 无菌滤液 1/4 稀释液<br>1/4 diluent of sterile filtrate | 0.53 $\pm$ 0.08 b       | 54.97 $\pm$ 7.55 b     | 43.01 $\pm$ 4.56 b          | 18.64 $\pm$ 5.44 b     | 76.47 $\pm$ 5.76 a                   | 7.41 $\pm$ 6.97 b      |

表中数据为平均数 $\pm$ 标准差。同列数据后不同字母表示经单因素方差分析法检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。Data are mean $\pm$ SD. Different letters in the same column indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by one way ANOVA.

### 2.2.4 对大丽轮枝菌微菌核萌发的抑制作用

将大丽轮枝菌菌株 Vd080 分生孢子悬浮液与不同浓度的菌株 CEF-373 无菌滤液混合暗培养 24 h 后, 对照的菌株 Vd080 微菌核萌发率为 82.59%, 添加有菌株 CEF-373 无菌滤液原液、1/2 稀释液和 1/4 稀释液的菌株 Vd080 微菌核萌发抑制率分别为 18.27%、21.25% 和 7.41%, 其中以无菌滤液原液和 1/2 稀释液处理的抑制效果较好, 显著高于 1/4 稀释液处理(表 2), 表明内生真菌 CEF-373 可以抑制大丽轮枝菌微菌核萌发。

### 2.3 菌株 CEF-373 对棉花黄萎病的温室防效

用  $1 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$  CFU/mL 的菌株 CEF-373 分生孢子悬浮液灌根处理鲁棉研 21 号后, 棉苗的病

情指数分别为 12.73、6.40 和 7.84, 均显著低于对照的病情指数 22.15, 温室防效分别为 42.53%、71.12% 及 64.60%, 其中  $1 \times 10^7$  CFU/mL 的菌株 CEF-373 分生孢子悬浮液灌根效果最好。

以质量比为 1%、2% 和 3% 的菌株 CEF-373 菌剂拌土种植鲁棉研 21 号, 接种大丽轮枝菌菌株 Vd080 分生孢子悬浮液 25 d 后, 调查棉苗的病情指数分别为 18.87、16.19 和 9.84, 均显著低于对照的病情指数 29.39, 温室防效分别为 28.51%、38.68% 和 62.74%, 以质量比 3% 的 CEF-373 菌剂拌土效果最好(表 3)。由于菌株 CEF-373 对棉花黄萎病有较好的控制作用, 拌土和灌根处理的棉苗长势相对良好, 仅有个别叶片枯萎变黄, 而对照棉苗叶片大量枯萎、凋落(图 3)。

表 3 棉花内生真菌 CEF-373 菌剂对棉花黄萎病的温室防效

Fig. 3 The protection of treatment with cotton endophytic fungus CEF-373 fertilizer on cotton against *Verticillium* wilt in laboratory

| 处理 Treatment                                            | 用量 Dose                | 病情指数 Disease index | 防效 Control efficacy (%) |
|---------------------------------------------------------|------------------------|--------------------|-------------------------|
| CEF-373 分生孢子悬浮液灌根                                       | $1 \times 10^6$ CFU/mL | 12.73±2.91 a       | 42.53±2.73 a            |
| CEF-373 conidia suspension was used for root irrigation | $1 \times 10^7$ CFU/mL | 6.40±0.70 a        | 71.12±1.28 b            |
|                                                         | $1 \times 10^8$ CFU/mL | 7.84±3.15 a        | 64.60±3.83 b            |
|                                                         | 对照 CK                  | 22.15±3.46 b       | /                       |
| CEF-373 菌剂拌土                                            | 1%                     | 18.87±2.60 a       | 28.51±4.58 a            |
| CEF-373 fertilizer mixed with soil                      | 2%                     | 16.19±2.26 a       | 38.68±2.47 a            |
|                                                         | 3%                     | 9.84±2.34 a        | 62.74±4.65 b            |
|                                                         | 对照 CK                  | 29.39±4.72 b       | /                       |

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经单因素方差分析法检验在  $P < 0.05$  水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at  $P < 0.05$  level by one way ANOVA.

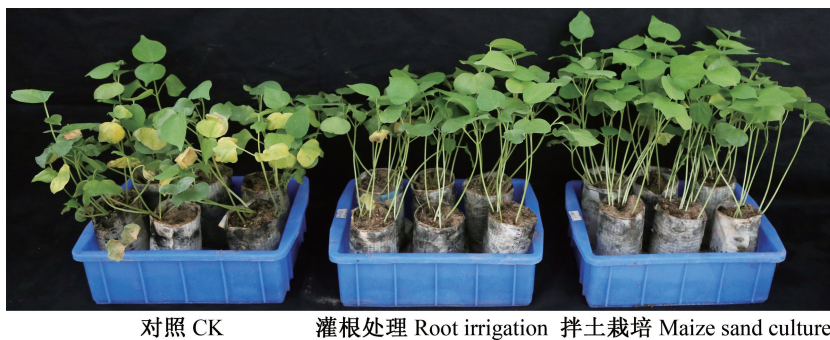


图 3 棉花内生真菌 CEF-373 菌剂对棉花黄萎病的温室防效

Fig. 3 The protection of treatment with cotton endophytic fungus CEF-373 fertilizer on cotton against *Verticillium* wilt in laboratory

### 2.4 菌株 CEF-373 对棉花黄萎病的田间防效

利用菌株 CEF-373 发酵液滴灌处理鲁棉研 21 号, 在处理 40 d(7 月 13 日)、60 d(7 月 27 日)、80 d(8 月 16 日)后, 棉苗的病情指数分别为 15.33、19.12 和 25.40, 而清水对照的病情指数分别为 24.04、27.65 和 32.43, 菌株 CEF-373 发酵液对棉花黄萎病的田间防效则分别为 36.23%、30.84% 和 21.64%(表 4)。表明菌株 CEF-373 发酵液对棉花黄萎病的田间防效在处

理后期有所降低。

播种时施加菌株 CEF-373 菌剂处理鲁棉研 21 号, 在处理 40 d(7 月 13 日)、60 d(7 月 27 日)、80 d(8 月 16 日)后, 棉苗的病情指数分别为 16.51、19.50 和 25.27, 培养基质对照的病情指数分别为 22.84、24.83 和 30.94, 菌株 CEF-373 菌剂对棉花黄萎病的田间防效分别为 27.71%、21.46% 和 18.32%(表 4)。表明菌株 CEF-373 菌剂对棉花黄萎病的田间防效在处理后期有所降低。

表4 棉花内生真菌菌株 CEF-373 发酵液对棉花黄萎病的田间防效

Table 4 Effect of fermentation broth of cotton endophytic fungus CEF-373 on control of *Verticillium* wilt in cotton field

| 处理<br>Treatment                                      | 40 d                                 |                          |                                  | 60 d                                 |                          |                                  | 80 d                                 |                          |                                  |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------|----------------------------------|
|                                                      | 病株率<br>Diseased<br>plant rate<br>(%) | 病情指数<br>Disease<br>index | 防效<br>Control<br>efficacy<br>(%) | 病株率<br>Diseased<br>plant rate<br>(%) | 病情指数<br>Disease<br>index | 防效<br>Control<br>efficacy<br>(%) | 病株率<br>Diseased<br>plant rate<br>(%) | 病情指数<br>Disease<br>index | 防效<br>Control<br>efficacy<br>(%) |
| 发酵液滴灌<br>Drip irrigation<br>of fermentation<br>broth | 26.21±<br>5.36 a                     | 15.33±<br>2.13 a         | 36.23±<br>3.56                   | 31.61±<br>6.77 a                     | 19.12±<br>4.36 a         | 30.84±<br>4.21                   | 49.53±<br>2.21 a                     | 25.40±<br>3.16 a         | 21.64±<br>3.84                   |
| 清水对照<br>Water control                                | 31.77±<br>4.93 b                     | 24.04±<br>4.61 b         | /                                | 45.20±<br>5.49 b                     | 27.65±<br>5.15 b         | /                                | 54.88±<br>4.51 b                     | 32.43±<br>5.95 b         | /                                |
| 固体菌剂<br>Solid inoculant                              | 22.50±<br>6.12 a                     | 16.51±<br>3.93 a         | 27.71±<br>2.68                   | 34.13±<br>7.12 a                     | 19.50±<br>5.32 a         | 21.46±<br>5.65                   | 59.65±<br>6.13 a                     | 25.27±<br>4.26 a         | 18.32±<br>4.61                   |
| 培养基质对照<br>Culture matrix<br>control                  | 29.82±<br>5.41 b                     | 22.84±<br>4.11 b         | /                                | 35.57±<br>4.55 a                     | 24.83±<br>3.85 b         | /                                | 65.31±<br>4.72 b                     | 30.94±<br>5.63 b         | /                                |

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经单因素方差分析法检验在  $P<0.05$  水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at  $P<0.05$  level by one way ANOVA.

## 2.5 菌株 CEF-373 诱导棉花活性氧的爆发

经菌株 CEF-373 分子孢子悬浮液处理棉花 3 d 后再接种大丽轮枝菌 Vd080 菌株,接种 3 d 后检测到棉花叶片中活性氧的爆发,即经菌株 CEF-373 分子

孢子悬浮液处理的棉花叶片上出现的褐色沉淀明显比对照叶片上的褐色沉淀多(图4),表明菌株 CEF-373 诱导了棉花叶片中活性氧的爆发。

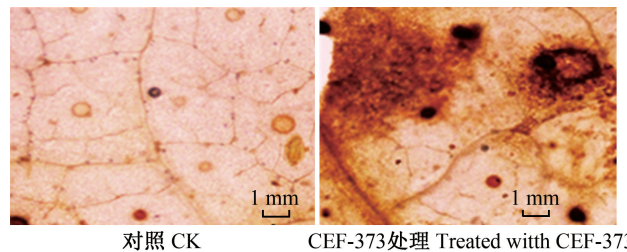


图4 棉花内生真菌菌株 CEF-373 培养液诱导棉花叶片活性氧的爆发

Fig. 4 The reactive oxygen species triggered in cotton leaves by induced with cotton endophytic fungal strain CEF-373 culture medium

## 2.6 菌株 CEF-373 对棉花防御相关基因表达量的影响

经菌株 CEF-373 分生孢子悬浮液处理棉花 4 d 后再接种大丽轮枝菌菌株 Vd080 分生孢子悬浮液,接种后 12、24、48 和 72 h 取样的分析结果表明,菌株 CEF-373 能成功诱导棉花植株中防御相关基因 *PAL*、*POD*、*PPO*、*CHI* 和 *PR10* 的表达。其中, *PR10* 和 *PAL* 基因在接种 12 h 后其表达量较对照上调的倍数达到最大,分别是对照的 5.6 倍和 4.9 倍, *CHI*、*POD* 和 *PPO* 基因在接种 24 h 后其表达量较对照上调的倍数达到最大,分别为对照的 8.8 倍、6.1 倍和 4.8 倍(图5)。表明棉花内生真菌菌株 CEF-373 分生孢子悬浮液处理棉花根部后,可激活棉花植株的防

御体系,显著诱导棉苗防御相关基因的表达。

## 3 讨论

目前对于棉花黄萎病生防菌的研究主要集中在内生细菌上,报道较多的是芽胞杆菌属真菌(孟立花,2008)。韩琴(2014)从棉花中分离出 1 株芽胞杆菌菌株 41B-1,发现其在大田能显著降低棉花黄萎病的病情指数,防效较高,为 28.09%;周京龙等(2017)从棉花中分离出了 1 株蜡状芽胞杆菌 *B. cereus* 菌株 YUPP-10,发现其代谢产物对大丽轮枝菌具有明显的抑制作用,且温室防效高达 80.60%。但目前还没有能够真正应用于实践和生产的拮抗微生物,仍需

继续筛选抑菌能力强且稳定的生防菌,并完善其施用方法。相比其它生防菌,植物内生真菌更易定殖和繁殖,并且能够产生多种可直接作用于黄萎病菌的活性物质(张芸等,2016)。本研究从棉花茎部分

离出内生真菌腐皮镰孢菌菌株 CEF-373,其非挥发性代谢产物对于大丽轮枝菌的菌丝生长、分生孢子产生及萌发和微菌核产生及萌发有明显的抑制作用,具有较好的开发应用潜力。

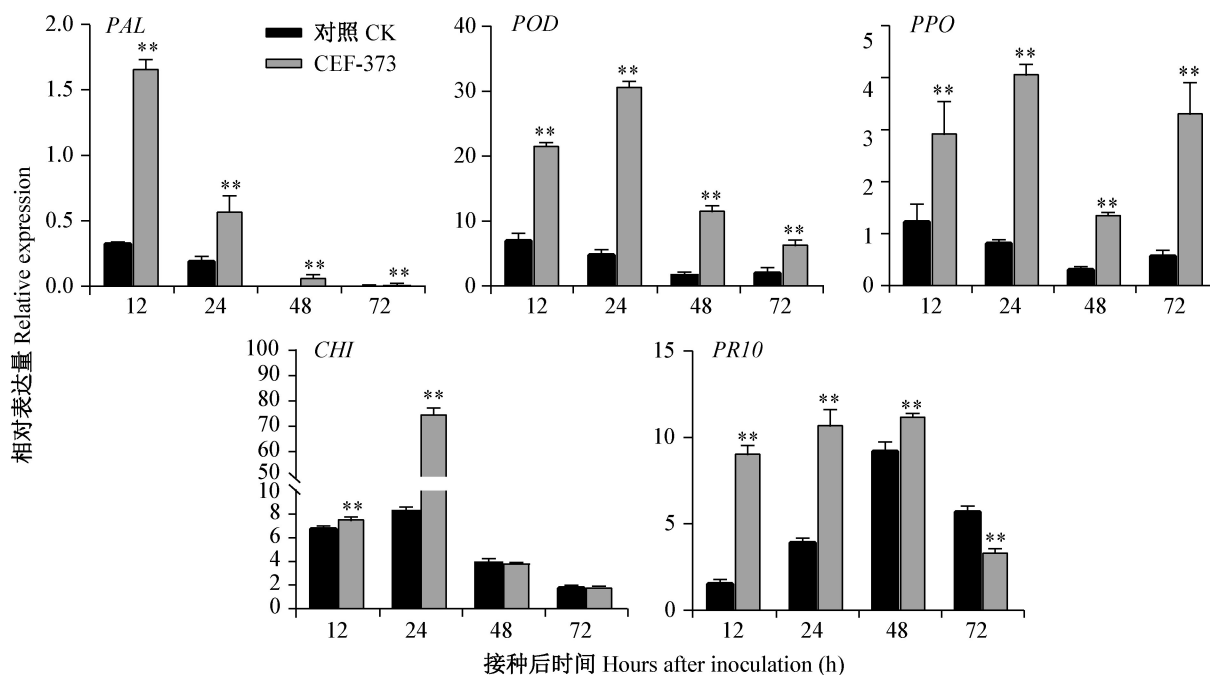


图5 棉花内生真菌菌株 CEF-373 诱导棉花防御相关基因的表达

Fig. 5 Expression levels of defense genes in leaves of cotton by cotton endophytic fungus strain CEF-373

图中数据为平均数±标准差。\*和\*\*分别表示经单因素方差分析法检验在 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SD. \* or \*\* indicates significant difference at  $P<0.05$  or  $P<0.01$  level by one way ANOVA.

Wang et al.(2007)发现棉花根部内生真菌具有多样性且根部的镰刀菌种类比较丰富;Li et al.(2014)在棉花上分离出了几百株内生真菌,并筛选出了对棉花黄萎病具有较高抑菌活性的菌株,其中就包括1株腐皮镰孢菌菌株 CEF-325,其产生的非挥发性代谢产物能够抑制大丽轮枝菌强致病力菌株 Vd080 的生长;张芸等(2016)从棉花中分离出1株内生球毛壳属真菌 *Chaetomium globosum* 菌株 CEF-082,对棉花黄萎病有明显的拮抗作用,温室防效高达66.88%。本研究分离到的内生真菌菌株 CEF-373 对棉花黄萎病的温室防效最高达71.12%,防效明显;对棉花黄萎病的田间防效在18.32%~36.23%之间,低于温室防效,推测大田试验存在诸多不可控因素,且土壤环境较复杂,对于试验结果具有很大的影响。此外,生防菌主要生活于植物组织内部,也就是说植物组织是其最适宜的生存环境,所以当其作为生防制剂作用于大田时活性可能会降低,入侵植物的能力可能会下降,使得植物抵御病原菌效果不理想,这也是生防制剂在研制和应用上的一大难题。

生防菌主要通过生存空间和营养竞争、分泌抗性物质、溶菌作用、诱导植物产生抗病性、重寄生等方式抑制植物病害(Krechel et al.,2002;石晶盈等,2006)。目前对于生防镰刀菌抑菌作用机制研究较少。本研究获得的菌株 CEF-373 为镰刀菌属真菌,其生长速率远远快于大丽轮枝菌,因此初步推测在大丽轮枝菌侵染棉花之前,菌株 CEF-373 可以抢先占据棉花根部的侵染位点,阻碍其侵入,从而使得棉花黄萎病的发生减轻。此外,生防菌防治植物病害的一个重要机制是激发植物自身的免疫应答系统,即生防菌的侵入可以激活植物的防卫反应,从而使得植物对于病原菌的抵御能力增加,即诱导系统抗病性(Compant et al.,2005)。植物识别入侵病原物后发生最早的事件之一就是细胞内的活性氧水平迅速提高,引发过敏性坏死反应。活性氧是一类第二信使分子,在细胞内通过改变细胞氧化还原状态调节信号传递途径,参与信号传递与放大,最终发生过敏性坏死和其它防卫反应(Qi et al.,2018)。本研究在诱导抗性试验中发现菌株 CEF-373 诱导了细胞活

性氧的爆发,经菌株 CEF-373 分生孢子悬浮液处理的棉花叶片中活性氧明显多于对照,说明内生真菌 CEF-373 可以诱导活性氧的产生,从而促进植物的过敏性坏死反应。同时,本研究还检测到棉花中与植物抗病相关的 *POD*、*PPO*、*PAL*、*CHI* 和 *PR10* 基因,在内生真菌菌株 CEF-373 诱导后均上调表达,表明菌株 CEF-373 可以通过诱导寄主系统抗性来增加棉花对黄萎病的防御。其中, *POD* 与木质素合成相关,阻碍病原物的入侵(梁艳荣等, 2003); *PPO* 催化醌类化合物形成,而醌类物质对于病原菌具有抑制作用(代丽等, 2007); *PAL* 是形成酚类物质和植保素的关键酶,而酚类物质及植保素又参与植物的初级防御反应(马俊彦等, 2007); *CHI* 的代谢产物可以分解真菌病原体细胞壁,从而抑制病原菌生长(郭玉莲, 2005); *PR10* 蛋白可提高植物的抗病能力(杨涛和王艳, 2017)。总之,棉花内生真菌菌株 CEF-373 可以诱导棉花产生系统抗病性,但本研究也只是初步探索了其防御机制,至于更深层次的防御机制如其引起的具体信号转导途径等有待进一步深入研究。

### 参 考 文 献 (References)

- Backman PA, Sikora RA. 2008. Endophytes: an emerging tool for biological control. *Biological Control*, 46(1): 1–3
- Cai Y. 2018. Current situation and development strategy of biological control of plant diseases in China. *Science & Technology Vision*, (20): 149–150 (in Chinese) [蔡奕. 2018. 我国植物病害生物防治的现状与发展策略. *科技视界*, (20): 149–150]
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clement C, BarKa EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 4951–4959
- Dai L, Gong CR, Shi L, Chen FJ, Gong PZ. 2007. Polyphenol oxidase in plants. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 23(6): 312–316 (in Chinese) [代丽, 宫长荣, 史霖, 陈付军, 巩培智. 2007. 植物多酚氧化酶研究综述. *中国农学通报*, 23(6): 312–316]
- Gond SK, Verma VC, Mishra A, Kumar A, Kharwar RN. 2010. Role of fungal endophytes in plant protection. // Arya A, Perrello AE. *Management of fungal plant pathogens*. UK: CAB International, pp. 183–200
- Guo YL. 2005. Chitinase and its effects on plant disease prevention. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 21(1): 283–285, 305 (in Chinese) [郭玉莲. 2005. 微生物几丁质酶及其在植物病害防治中的作用. *中国农学通报*, 21(1): 283–285, 305]
- Han Q. 2014. Isolation and characterization of biocontrol agents of cotton *Verticillium* wilt and study on its resistance mechanism. Ph. D Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [韩琴. 2014. 棉花抗黄萎病生防菌的筛选和鉴定及抗病机理研究. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Hu XP, Bai YW, Chen T, Hu DF, Yang JR, Xu XM. 2013. An optimized method for in vitro production of *Verticillium dahliae* microsclerotia. *European Journal of Plant Pathology*, 136(2): 225–229
- Jian GL, Zou YF, Ma C. 2003. Causes and countermeasures of cotton *Verticillium* wilt epidemic year after year. *China Cotton*, 30(3): 13–14 (in Chinese) [简桂良, 邹亚飞, 马存. 2003. 棉花黄萎病连年流行的原因及对策. *中国棉花*, 30(3): 13–14]
- Jiang JX, Zhang TZ. 2003. Extraction of total RNA in cotton tissues with CTAB-acidic phenolic method. *Cotton Science*, 15(3): 166–167 (in Chinese) [蒋建雄, 张天真. 2003. 利用 CTAB/酚法提取棉花组织总 RNA. *棉花学报*, 15(3): 166–167]
- Jiang WC, Xie XC, Peng H, Deng BW, Luo Q, Wang J. 2018. Isolation, identification and bio-control characteristics of endophytic fungi in *Panax quinquefolium*. *Heilongjiang Agricultural Science*, (3): 126–129, 138 (in Chinese) [姜午春, 解修超, 彭浩, 邓百万, 罗强, 王娇. 2018. 西洋参内生真菌分离鉴定及生防特性. *黑龙江农业科学*, (3): 126–129]
- Krechel A, Faupel A, Halhnann J, Ulrich A, Berg G. 2002. Potato-associated bacteria and their antagonistic potential towards plant-pathogenic fungi and the plant-parasitic bacteria and their *Meloido gynecognita* (Kofoid & White) Chitwood. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(9): 772–786
- Li Q, Liu J, Zhou DP, Zhu J. 2006. Advance on exploitation and research of endophyte. *Biotechnology Bulletin*, (3): 33–37 (in Chinese) [李强, 刘军, 周东坡, 朱婧. 2006. 植物内生菌的开发与研究进展. *生物技术通报*, (3): 33–37]
- Li QQ, Luo K, Lin W, Peng HY, Luo XM. 2003. Isolation of tomato endophytic antagonists against *Ralstonia solanacearum*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 33(4): 364–367 (in Chinese) [黎起秦, 罗宽, 林伟, 彭好文, 罗雪梅. 2003. 番茄青枯病内生拮抗细菌的筛选. *植物病理学报*, 33(4): 364–367]
- Li SK, Ji ZQ, Zhang JW, Guo ZY, Wu WJ. 2010. Synthesis of 1-acetyl-3-isopropenylbenzimidazolone derivatives and their activity against *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 58(5): 2668–2672
- Li ZF, Feng ZL, Zhao LH, Shi YQ, Zhu HQ. 2013. A new method for resistance identification of cotton varieties to *Fusarium* wilt. *China Cotton*, 40(10): 15–18 (in Chinese) [李志芳, 冯自力, 赵丽红, 师勇强, 朱荷琴. 2013. 一种棉花枯萎病抗性鉴定的新方法. *中国棉花*, 40(10): 15–18]
- Li ZF, Wang LF, Feng ZL, Zhao LH, Shi YQ, Zhu HQ. 2014. Diversity of endophytic fungi from different *Verticillium*-wilt-resistant *Gossypium hirsutum* and evaluation of antifungal activity against *Verticillium dahliae* in vitro. *Journal Microbiology and Biotechnology*, 24(9): 1149–1161
- Liang YR, Hu XH, Zhang YL, Liu XP. 2003. Progress on physiological function research of plant peroxidase. *Journal of Inner Mongolia Agricultural University*, 24(2): 110–113 (in Chinese) [梁艳荣, 胡晓红, 张颖力, 刘湘萍. 2003. 植物过氧化物酶生理功能研究进展. *内蒙古农业大学学报*, 24(2): 110–113]
- Lin L, Zhang X, Deng S. 2014. Research advances in cotton *Verticilli-*

- um wilt. Cotton Science, 26(3): 260–267 (in Chinese) [林玲, 张昕, 邓晟. 2014. 棉花黄萎病研究进展. 棉花学报, 26(3): 260–267]
- López-Escudero FJ, Mwanza C, Blanco-López MA. 2007. Reduction of *Verticillium dahliae* microsclerotia viability in soil by dried plant residues. Crop Protection, 26(2): 127–133
- Ma JY, Yang RD, Ao LG. 2007. Progress in biological research of phenylalanine ammonia-lyase (E.C.4.3.1.5). Modern Food Science and Technology, 23(7): 71–74 (in Chinese) [马俊彦, 杨汝德, 敖利刚. 2007. 植物苯丙氨酸解氨酶的生物学研究进展. 现代食品科技, 23(7): 71–74]
- Meng LH. 2008. Purification and characteristic analysis of antifungal substances from antagonistic *Bacillus subtilis* NCD-2 against *Verticillium dahliae*. Master Thesis. Baoding: Hebei Agricultural University (in Chinese) [孟立花. 2008. 棉花黄萎病拮抗枯草芽孢杆菌 NCD-2 抑菌物质的分离及性质分析. 硕士学位论文. 保定: 河北农业大学]
- Meng N, Tang B, Ouyang M, Wang LL, Liu HT. 2007. Study on the antagonism of *Trichoderma* species on *Verticillium dahliae*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 23(1): 88–91 (in Chinese) [孟娜, 汤斌, 欧阳明, 王岚岚, 刘海涛. 2007. 木霉菌对棉花黄萎病菌拮抗的作用. 中国农学通报, 23(1): 88–91]
- Niu YF, Li YP, Luo FC, Chen ZB, Peng SJ, Chen WR, Zi TP. 2015. Promotion mechanisms on endophyte of plant to growth and stress tolerance of host plants. Grassland and Turf, 35(2): 91–96 (in Chinese) [牛燕芬, 李扬苹, 罗富成, 陈泽斌, 彭声静, 陈武荣, 字泰平. 2015. 植物内生真菌对寄主生长及抗逆性的增效机理研究进展. 草原与草坪, 35(2): 91–96]
- Qi J, Song CP, Wang B, Zhou J, Kangasjärvi J, Zhu JK, Gong Z. 2018. Reactive oxygen species signaling and stomatal movement in plant responses to drought stress and pathogen attack. Journal of Integrative Plant Biology, 60(9): 805–826
- Qiu DW. 2010. Current situation and development strategy of biological control of plant diseases in China. Plant Protection, 36(4): 15–18 (in Chinese) [邱德文. 2010. 我国植物病害生物防治的现状 & 发展策略. 植物保护, 36(4): 15–18]
- Shi JY, Chen WX, Liu AY. 2006. Advances in the study of endophytes and their effects on control of plant diseases. Acta Ecologica Sinica, 26(7): 2395–2401 (in Chinese) [石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 2006. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展. 生态学报, 26(7): 2395–2401]
- Song WW, Zhu H, Yu FY, Niu XQ, Tang QH, Qin WQ. 2018. A review of endophytic bacteria and their control of plant diseases. Jiangsu Agricultural Science, 46(6): 12–16 (in Chinese) [宋薇薇, 朱辉, 余凤玉, 牛晓庆, 唐庆华, 覃伟权. 2018. 植物内生菌及其对植物病害的防治作用综述. 江苏农业科学, 46(6): 12–16]
- Wang B, Priest MJ, Davidson A, Brubaker CL, Woods MJ, Burdon JJ. 2007. Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. Mycological Research, 111(3): 347–354
- Wang LF. 2014. Diversity of endophytic fungi from cotton and evaluation of antifungal activity against cotton *Verticillium* wilt. Master Thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [王玲飞. 2014. 棉花内生真菌多样性分析及对黄萎病生防潜力评估. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]
- Whipps JM, Magan N. 1987. Effects of nutrient status and water potential of media on fungal growth and antagonist-pathogen interactions. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 17: 581–591
- Yang T, Wang Y. 2017. Research progress of plant pathogenesis related protein PR-10. Plant Physiology Journal, 53(12): 2057–2068 (in Chinese) [杨涛, 王艳. 2017. 植物病程相关蛋白 PR-10 的研究进展. 植物生理学报, 53(12): 2057–2068]
- Zhang LX, Liu HP, Han JC, Gao JM, Cheng MF. 2005. Isolation and screen of endophytic antifungal fungi from tomato. Journal of Shanxi Agricultural University, 25(1): 30–33 (in Chinese) [张立新, 刘慧平, 韩巨才, 高俊明, 程麦风. 2005. 番茄内生真菌的分离和拮抗生防菌的筛选. 山西农业大学学报, 25(1): 30–33]
- Zhang Y, Feng ZL, Feng HJ, Li ZF, Shi YQ, Zhao LH, Zhu HQ, Yang JR. 2016. Control effect of endophytic fungus *Chaetomium globosum* CEF-082 against *Verticillium* wilt in *Gossypium hirsutum*. Acta Phytopathologica Sinica, 46(5): 697–706 (in Chinese) [张芸, 冯自力, 冯鸿杰, 李志芳, 师勇强, 赵丽红, 朱荷琴, 杨家荣. 2016. 内生球毛壳属真菌 CEF-082 对棉花黄萎病的控制作用. 植物病理学报, 46(5): 697–706]
- Zhao FX, Dai XF. 2009. Infection process of *Verticillium dahliae* Klebahn in cotton. Genomics and Applied Biology, 28(4): 786–792 (in Chinese) [赵凤轩, 戴小枫. 2009. 棉花黄萎病菌的侵染过程. 基因组学与应用生物学, 28(4): 786–792]
- Zhao LH, Feng ZL, Li ZF, Feng HJ, Shi YQ, Zhang Y, Zhu H. 2017. Development of an improved standard for identifying and evaluating *Verticillium* wilt resistance in cotton. Cotton Science, 29(1): 50–58 (in Chinese) [赵丽红, 冯自力, 李志芳, 冯鸿杰, 师勇强, 张芸, 朱荷琴. 2017. 棉花抗黄萎病鉴定与评价标准的商榷. 棉花学报, 29(1): 50–58]
- Zhao XJ, Tang X, Cheng JW, Li WP, Tan S, Hu KL. 2013. The relationship between malonaldehyde content, enzymatic changes and the resistance of bitter melon to *Fusarium* wilt. Journal of South China Agricultural University, 34(3): 372–377 (in Chinese) [赵秀娟, 唐鑫, 程蛟文, 李卫鹏, 谭澍, 胡开林. 2013. 酶活性、丙二醛含量变化与苦瓜抗枯萎病的关系. 华南农业大学学报, 34(3): 372–377]
- Zhou JL, Feng ZL, Feng HJ, Li YQ, Yuan Y, Li ZF, Wei F, Shi YQ, Zhao LH, Sun ZX, et al. 2017. Biocontrol effect and mechanism of cotton endophytic bacterium *Bacillus cereus* YUPP-10 against *Verticillium* wilt in *Gossypium hirsutum*. Scientia Agricultura Sinica, 50(14): 2717–2727 (in Chinese) [周京龙, 冯自力, 冯鸿杰, 李云卿, 袁媛, 李志芳, 魏锋, 师永强, 赵丽红, 孙正详, 等. 2017. 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. 中国农业科学, 50(14): 2717–2727]
- Zhou YP, Wu L. 2003. Negative effects of pesticides on biodiversity and its countermeasures. Jiangxi Plant Protection, (4): 156–157 (in Chinese) [周亚平, 吴兰. 2003. 农药对生物多样性的负面影响及其对策. 江西植保, (4): 156–157]

(责任编辑: 李美娟)