

王雅雅,付瑞敏,于 烽,等. 植物土传疾病拮抗菌的筛选及其生防潜力评价[J]. 江苏农业科学,2015,43(7):102-106.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.07.034

植物土传疾病拮抗菌的筛选及其生防潜力评价

王雅雅¹, 付瑞敏^{1,2}, 于 烽¹, 陈五岭¹

(1. 西北大学,陕西西安 710069;2. 河南教育学院,河南郑州 450046)

摘要:通过筛选出对植物土传疾病具有良好拮抗效果的菌株 BS-17,对其生防效果进行测定,旨在为开发植物土传疾病广谱抗菌生物制剂提供一定依据。采用平板对峙法,筛选出对 9 种常见植物土传疾病具有拮抗效果的拮抗菌,抑菌率均在 80% 以上。利用形态学、生理生化及分子生物学的方法对其进行了鉴定,并对拮抗物质产生的位置以及性质进行初步研究;通过土壤定殖试验对其生防潜力作出评价。通过形态学、生理生化及分子生物学的方法鉴定菌株 BS-17 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。该菌产生的主要抗菌物质分布于胞外,拮抗物质对热、pH 值、紫外线以及蛋白酶均不敏感。此外,菌株 BS-17 具有较好的产纤维素酶及蛋白酶的能力。土壤定殖试验证明,该菌表现出良好的定殖能力以及抑制病原菌生长的能力。菌株 BS-17 作为生防菌用于防治植物土传疾病,具有较好的开发和利用价值。

关键词:土传疾病;拮抗菌;生防制剂;纤维素酶;蛋白酶;土壤定殖

中图分类号:Q939.92 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2015)07-00102-05

土传病害种类很多,目前已经发现的病害有 100 多种,其中危害比较严重的有 50 余种^[1]。土传病害发生严重时难以控制会导致作物减产甚至绝收^[2-3]。目前,对于土传病害主要采用轮作倒茬和化学农药的方法进行防治^[4]。但由于土地资源有限以及化学农药防效差,因而寻求新的防治土传病害的途径已变得尤为重要。利用拮抗微生物防治作物土传疾病病原菌生长繁殖,不仅能从源头有效防治土传病害,也是一种符合微生态原理的安全可靠的方法^[5]。

生物防治由于其对人畜安全,环境友好,并且不易引起病菌抗药性的产生,因而备受人们的关注^[6]。目前,已报道的作为生防菌的主要微生物有芽孢杆菌、假单胞菌和链霉菌等^[7-9]。生防细菌能够通过自然竞争实现低毒、无污染、高效、稳定的生物防控^[10]。目前,用于抑制常见土传疾病的广谱抗菌效果的生防菌报道并不多见,通过筛选出具有广谱高效抑制土传疾病的生防菌并应用于实际防治中,具有十分重要的意义。从陕西阎良大棚甜瓜种植区以及陕西周至、眉县猕猴桃田间所取的根际土壤样品中分离出对常见的植物土传疾病病原菌均具有良好拮抗效果的菌株,通过对其拮抗物质产生部位以及性质、土壤定殖情况研究来评价其生防潜力,旨在为开发各种生防制剂用于土传疾病的实际防控奠定一定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种

拮抗菌:从陕西阎良地区甜瓜种植大棚及陕西周至、眉县猕猴桃田间所取的植物根际土壤样品中分离筛选出。

病原菌:葡萄灰霉病(*Botrytis cinerea* Pers)、甜瓜叶枯病(*Alternaria cucumerina* (Ell. et Ev.) Elliott.)、辣椒疫病(*Phytophthora capsici*)、黄瓜枯萎病(*Cucumber fusarium* Wilt)、番茄青枯病(*Ralstonia solanacearum*)、桃根霉菌菌(*Rhizopus* sp.)、小麦曲根霉(*Rhizopustritic* sp.)、甘蓝黑腐病(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、猕猴桃白纹羽病(*Dematophora nectatrix*),西北大学农业及环境微生物技术工程实验室保存。

1.2 培养基

PDA 培养基、牛肉膏蛋白胨培养以及 LB 培养基配方参照《微生物学实验》^[11]。纤维素培养基: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25 g、 KH_2PO_4 0.5 g、琼脂 20.0 g、羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 2.0 g、刚果红染料 0.2 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 值 7.0。酪素培养基:干酪素 4.0 g、 ZnCl_2 0.14 g、NaCl 0.16 g、 CaCl_2 0.002 g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g、 FeSO_4 0.002 g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.07 g、酪素水解液 0.05 g、 KH_2PO_4 0.36 g、琼脂 20.0 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 值 6.5~7.0。

1.3 菌株分离与拮抗菌筛选

将取自各地的植物根际土壤样本混合均匀,采用平板稀释涂布法^[12]进行分离,32℃倒置培养,将分离的菌株编号保存。采用平板对峙法,以甜瓜叶枯病为靶标筛选拮抗菌,相距 2.5 cm 处接种待筛菌株,28℃倒置培养 3 d,重复 3 次试验,以抑菌圈的大小作为筛选标准。待对照组未接拮抗菌的平板长满病原菌,测量各试验组的病原菌生长半径 r_2 ,以对照组生长半径为 r_1 ,则抑菌率 = $(r_1 - r_2)/r_1 \times 100\%$ 。以抑菌率大小作为平板拮抗菌拮抗能力强弱的标准,保存所得复筛菌株。

1.4 拮抗菌的鉴定

1.4.1 形态学鉴定及生理生化鉴定 通过对拮抗菌进行显微镜下形态、菌落形态的观察,以及生理生化指标测定,参照《常见细菌系统鉴定手册》^[13]对拮抗菌进行鉴定。

1.4.2 分子生物学鉴定 细菌基因组总 DNA 的提取参照《微生物学实验》,PCR 扩增引物序列正向引物为:5'-AGAGTTGATCCTG-GCT-CAGAACGAACGCT-3',反向引

收稿日期:2015-02-08

基金项目:河南教育学院青年科研项目(编号:20100103);陕西省重大创新项目(编号:2009ZKC04-16)。

作者简介:王雅雅(1988—),女,河北石家庄人,硕士研究生,研究方向为应用微生物。E-mail: yayawang_029@yeah.net。

通信作者:陈五岭。E-mail: wuling.chen@yeah.net。

物为:5'-TACGGCTACCTTGTTAC-GACTTCACCCC-3'。扩增条件:95℃预变性 5 min;95℃ 1 min,56℃ 1 min,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 10 min,然后送生物公司进行测序。将所得序列在 NCBI 利用 Blast 进行序列相似性比对分析,然后利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

1.5 抑菌谱的测定

以 9 种土传疾病的病原为靶标,采用平板对峙法,测定拮抗菌的抑菌谱。每组试验重复 3 次,28℃ 恒温培养,待对照组病原菌铺满平板,计算各组抑菌率大小。

1.6 拮抗物质存在位置的确定

1.6.1 无菌发酵液的检测 将分离筛选得到的拮抗菌 BS-17 接种到 NA 液体培养基中,32℃ 170 r/min 培养 72 h,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。以 0.22 μm 过滤器过滤即为无菌发酵液,以杯碟法对无菌发酵液的拮抗活性进行检测。

1.6.2 细胞提取物的检测 将拮抗菌 BS-17 接种到 NA 液体培养基中,32℃ 170 r/min 培养 48 h,备用。采用康为世纪生物科技有限公司革兰氏阳性菌蛋白抽提试剂盒(目录号: CW0890)对拮抗菌 BS-17 进行胞内物质提取。提取过程:拮抗菌发酵液 3 000 g,4℃ 下离心 5 min,以 500 mg 菌体加入 500 μL 抽提试剂使菌体重悬,冰上孵育 20 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清。0.22 μm 过滤器过滤,以杯碟法对细胞提取物的拮抗活性进行检测。

1.7 抑菌物质的性质研究

1.7.1 拮抗物质对热稳定性 按照“1.6.1”节的方法制备无菌发酵液,取 10 mL 于 7 支试管中,分别在温度为 0、20、40、60、80、100、121℃ 下处理 30 min,然后以 0.22 μm 过滤器过滤。以杯碟法检测其拮抗活性,以抑菌率作为指标。

1.7.2 拮抗物质对酸碱稳定性 按“1.6.1”节方法制备无菌发酵液,取 10 mL 于 7 支试管中,分别在 pH 值 3、4、5、6、7、8、9 下处理 2 h,再调节发酵液为初始 pH 值,以 0.22 μm 过滤器过滤。以杯碟法检测其拮抗活性,以抑菌率作为指标。

1.7.3 拮抗物质对紫外线敏感性 按照“1.6.1”节的方法制备无菌发酵液,取 10 mL 于 7 支试管中,分别在 40 W 紫外灯下照射 0、2、4、6、8、10、12 h,然后以 0.22 μm 过滤器过滤。以杯碟法检测其拮抗活性,以抑菌率作为指标。

1.7.4 拮抗物质对蛋白酶的稳定性 按照“1.6.1”节的方法制备无菌发酵液,取 10 mL 于 4 支试管中,分别加入蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶在恒温 37℃ 下处理 1 h,然后以 0.22 μm 过滤器过滤。以杯碟法检测其拮抗活性,以抑菌率作为指标。

1.8 BS-17 产纤维素酶、蛋白酶活性研究

1.8.1 BS-17 产纤维素酶及蛋白酶平板检测 纤维素酶平板检测:将拮抗菌 BS-17 接种于纤维素平板上,32℃ 培养 72 h,观察有无透明圈,若出现透明圈,则说明有纤维素酶的存在,反之,则说明无纤维素酶。

蛋白酶平板检测:将拮抗菌 BS-17 接种于酪素培养基平板上,32℃ 培养 72 h,观察有无透明圈,若出现透明圈,则说明有蛋白酶的存在,反之,则说明无蛋白酶。

1.8.2 BS-17 产纤维素酶及蛋白酶活力检测 粗酶液的制备:将拮抗菌 BS-17 接种于 NA 液体培养基,放置于 37℃、

170 r/min 摇床中培养,发酵液 4 000 r/min 离心取上清,为粗酶液。分别从 2 d 开始,每隔 1 d 测定一次直至 7 d。

纤维素酶活力测定采用 3,5-二硝基水杨酸比色定糖法(DNS)测定酶解液中还原糖含量。具体如下:加入含 1% CMC-Na 柠檬酸缓冲液稀释酶液,每 0.5 mL 粗酶液加入 1.5 mL 缓冲液,50℃ 水浴 30 min,加入 3 mL DNS 试剂,沸水浴 5 min,迅速冷却并于 540 nm 处测定其吸光度。在上述条件下,每分钟酶液催化纤维素水解生成 1 μg 葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活性单位(U)。葡萄糖标准曲线见图 1。

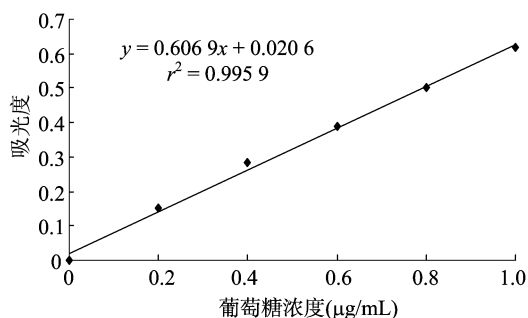


图1 葡萄糖标准曲线

蛋白酶活性测定:采用福林法测定蛋白酶的活性,参照 SB/T 10317—1999《蛋白酶活力测定法》,酶活定义为:1 mL 发酵液在 40℃ 和 pH 值 7.2 条件下,1 min 水解酪蛋白产生 1 μg 酪氨酸为 1 个酶活单位。酪氨酸标准曲线见图 2。

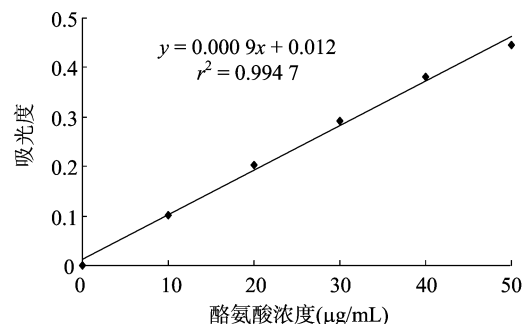


图2 酪氨酸标准曲线

1.9 土壤定殖能力测定

1.9.1 双抗法标记菌株 采用抗利福平和抗病原菌双抗法标记拮抗菌 BS-17,将菌株 BS-17 接种到含 5 μg/mL 利福平的 NA 培养基上,逐步筛选出能够在 300 μg/mL 利福平的 NA 培养基稳定生长且对病原菌拮抗效果较之前相同的 BS-17 突变菌株。

1.9.2 定殖试验 孢子悬液制备:以甜瓜叶枯病原菌为靶标,接种于 PDA 培养基上,倒置于 28℃ 恒温培养箱中培养 4 d,以无菌水冲洗菌落表面,经双层灭菌纱布过滤,利用血球计数板计数,以无菌水配置成 8.0×10^4 CFU/mL 的病原菌孢子悬液,备用^[14]。

菌悬液制备:将 BS-17 突变株接种于装有 5 mL 生理盐水的比浊管中,振荡均匀,采用麦氏比浊仪测定其菌体浓度,取 0.5 麦氏的菌悬液备用,即浓度为 1×10^8 CFU/mL。

将取自甜瓜大棚种植区内同一地点的健康土分成 3 组,分别做如下处理:接种甜瓜叶枯病原菌,病原菌孢子悬液接

种量为 1×10^8 CFU/g;接种拮抗菌 BS-17 突变株,接种量为 1×10^8 CFU/g;未接种病原菌以及拮抗菌 BS-17 的健康土。

试验组设置如下:将 200 g 接种病原菌的病土与 BS-17 突变菌菌悬液进行混合,使 BS-17 菌体接种量为 1×10^8 CFU/g;以加入相同体积的生理盐水的病土为对照组;拮抗菌 BS-17 浓度为 1×10^8 CFU/g 健康土。放置于温度为 30 ℃ 恒温培养箱,每试验组平行 3 次,测定初始各实验组中病原菌以及拮抗菌 BS-17 的菌体浓度,然后每 3.5 d 测定 1 次菌体数目的变化情况。

1.9.3 定殖情况检测 每隔 3.5 d 取各试验组 10 g 土于 90 mL 装有灭菌玻璃珠的无菌水中,震荡均匀,采用梯度稀释法,配制不同浓度菌悬液,分别取 1 000 μL 涂布于含 300 μg/mL 利福平的 NA 培养基,对菌株 BS-17 数量进行统计,以血球计数法对病原菌进行统计,观察 BS-17 菌的定殖情况。

2 结果与分析

2.1 菌株分离与拮抗菌筛选

从采集的土样中分离出了 289 株菌,其中 43 株菌具有拮抗效果,抑菌圈直径较明显的有 18 株菌,分别命名为 BS-1 至 BS-18。抑菌率在 50% 以上的拮抗菌有 9 株,其中 BS-17 抑菌效果最佳,并且性质稳定(表 1)。经过 10 次传代培养后,抑菌效果无明显变化;因此,将 BS-17 用作后续研究。

表 1 以甜瓜叶枯病病原菌为靶标的拮抗菌筛选结果		
菌株	抑菌圈直径 (cm)	抑菌率 (%)
BS-2	2.3	51.1
BS-3	2.45	54.4
BS-5	2.7	60.0
BS-8	2.5	55.6
BS-11	3.0	66.7
BS-12	2.6	57.8
BS-15	3.2	71.1
BS-16	2.4	53.3
BS-17	4.0	88.9

2.2 拮抗菌 BS-17 的鉴定

2.2.1 形态学及生理生化鉴定 利用梯度稀释法获取菌株单菌落,BS-17 单菌落形态表现为菌落呈白色不透明、边缘不整齐、表面褶皱,中间可形成近圆形褶皱。革兰氏染色呈阳性,杆状,产芽孢,菌株的淀粉反应呈阳性。

2.2.2 BS-17 菌株 16S rDNA 序列分析 将 BS-17 菌株 16S rDNA 测序序列与 GenBank 数据库中数据进行比对,利用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树(图 3)。结果表明,菌株 BS-17 与已知解淀粉芽孢杆菌的同源性为 99%,结合形态学及生理生化鉴定,将菌株 BS-17 鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

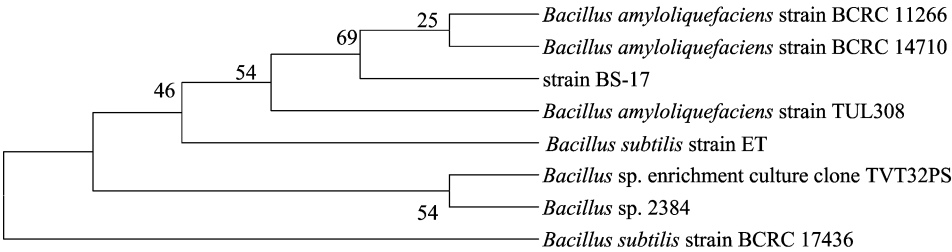


图3 菌株BS-17 16S rDNA 系统发育树

2.3 抑菌谱的测定

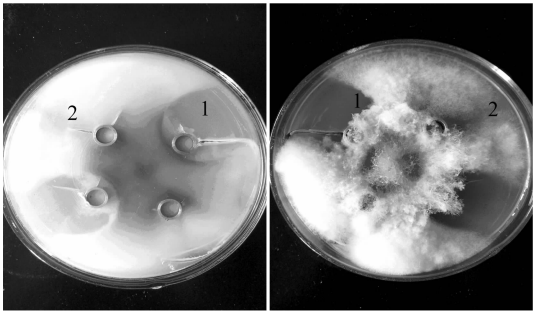
采用平板对峙法,以常见的 9 种植物土传疾病的病原菌为靶标,以菌株 BS-17 为拮抗菌的抑菌谱的测定,结果表明,BS-17 对 9 种土传疾病的病原菌均具有良好的抑制效果(表 2)。

表 2 菌株 BS-17 对 9 种病原菌抑菌谱的测定

病原菌种类	抑菌率 (%)
葡萄灰霉病(<i>Botrytis cinerea</i>)	93.2
甜瓜叶枯病(<i>Alternaria cucumerina</i>)	88.9
辣椒疫病(<i>Phytophthora capsici</i>)	85.6
黄瓜枯萎病(<i>Cucumber fusarium</i>)	87.9
番茄青枯病(<i>Ralstonia solanacearum</i>)	90.5
桃根霉菌(<i>Rhizopus</i> sp.)	91.4
小麦曲霉(<i>Rhizopusstirici</i> sp.)	83.2
甘蓝黑腐病(<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>)	86.5
猕猴桃白纹羽病(<i>Dematophora nectatrix</i>)	80.4

2.4 拮抗物质存在位置

由图 4 可以看出,BS-17 无菌发酵液对病原菌抑菌作用远远大于细胞提取物,细胞提取物对病原菌抑制作用不明显,说明抑菌物质主要存在于菌株 BS-17 胞外分泌物中。



1—胞外物质; 2—细胞提取物

图4 菌株 BS-17 无菌发酵液及胞内提取物抑菌作用

2.5 抑菌物质的性质研究

2.5.1 拮抗物质对热稳定性 以杯碟法分别对温度为 0、20、40、60、80、100、121 ℃ 处理的无菌发酵液抑菌活性进行检测。由图 5 可知,抑菌物质对热稳定性好,经过高温 100 ℃ 处理,抑菌活性降低,而在 121 ℃ 时仍有一定活性。

2.5.2 拮抗物质对酸碱稳定性 以杯碟法分别对 pH 值为 3、4、5、6、7、8、9 处理的无菌发酵液拮抗活性进行检测。由图 6 可知,拮抗物质对酸碱稳定性好,在较广 pH 范围内均具有

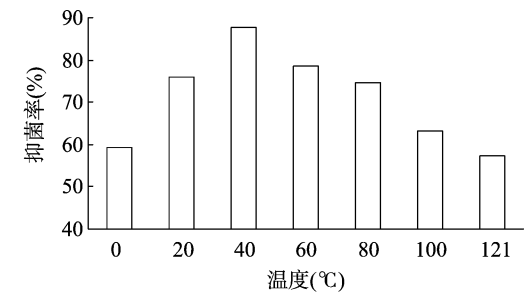


图5 拮抗物质对热稳定性

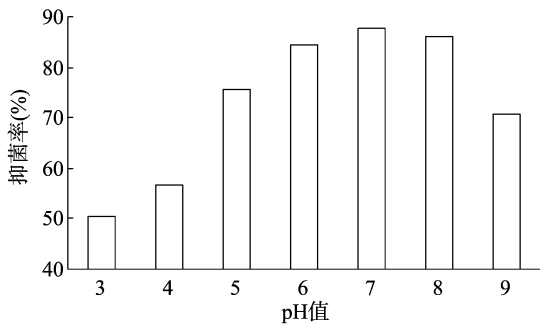


图6 拮抗物质对酸碱稳定性

拮抗活性。

2.5.3 拮抗物质对紫外线敏感性 以杯碟法分别对紫外灯照射 0、2、4、6、8、10、12 h 处理的无菌发酵液进行拮抗活性检测。由图 7 可知,拮抗物质对紫外线不敏感。

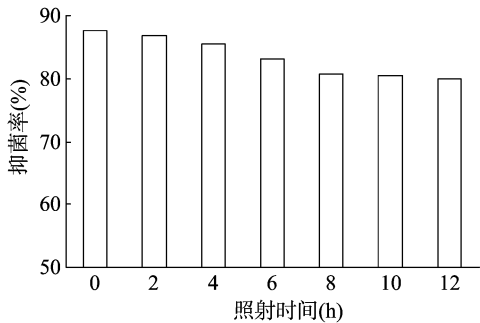


图7 拮抗物质对紫外线敏感性

2.5.4 拮抗物质对蛋白酶稳定性 以杯碟法分别检测拮抗物质对蛋白酶 K、胰蛋白酶、胃蛋白酶、木瓜蛋白酶的稳定性。由图 8 可知,拮抗物质对蛋白酶不敏感。

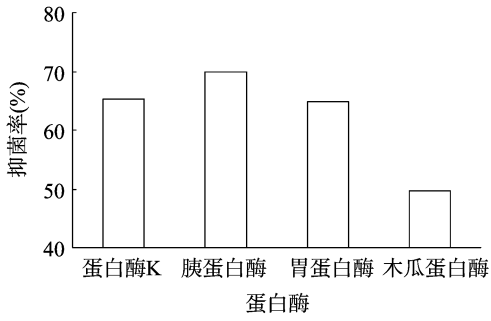


图8 拮抗物质对蛋白酶的稳定性

2.6 BS-17 产纤维素酶、蛋白酶活性研究

2.6.1 BS-17 产纤维素酶及蛋白酶平板检测 将所筛选的

拮抗菌 BS-17 分别接种到纤维素培养基以及酪素培养基上进行培养,72 h 后观察透明圈。由图 9 可知,BS-17 均能够产生纤维素酶以及蛋白酶。左图为纤维素酶检测结果,右图为蛋白酶检测结果。

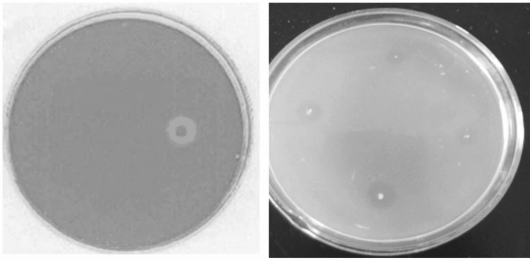


图9 纤维素酶以及蛋白酶平板检测结果

2.6.2 BS-17 产纤维素酶及蛋白酶酶活力检测 由表 3 可以看出,纤维素酶的活力随着发酵时间的延长而增加,酶活力 4 d 后增加缓慢。从酶活力可以看出,BS-17 具有较高的纤维素酶产生能力。

表 3 菌株 BS-17 纤维素酶活力的检测结果

发酵时间 (d)	纤维素粗酶活力 (U/mL)
2	28.2
3	35.4
4	58.6
5	59.7
6	60.6
7	61.2

由表 4 可以看出,蛋白酶的活力随着发酵时间的延长而增加,酶活力从发酵 5 d 开始增加缓慢,说明 BS-17 具有较高的蛋白酶产生能力。

表 4 菌株 BS-17 纤维素酶活力的检测结果

发酵时间 (d)	蛋白酶活力 (U/mL)
2	76.5
3	80.4
4	99.8
5	102.5
6	109.7
7	103.2

2.7 菌株 BS-17 土壤定殖能力测定

2.7.1 BS-17 突变菌株的获得 通过抗药性筛选,最终获得能够在 300 $\mu\text{g/mL}$ 利福平抗性平板上稳定生长的突变菌株。突变菌株较原菌株菌落小,菌落形态无太大差异(表 5)。以甜瓜叶枯病病原菌为靶标,经过对峙法及杯碟法等抑菌活性检测,发现其跟原菌株无差异。

表 5 原 BS-17 菌株与 BS-17 突变菌株比较

菌株	菌落直径 (mm)	抑菌圈 (cm)	抑菌率 (%)
BS-17 菌株	13.6	4.0	88.9
BS-17 突变菌株	12.5	4.0	88.2

2.7.2 土壤定殖检测 菌株 BS-17 在土壤中数量的动态变化如图 10。BS-17 菌株在健康土与病土中定殖情况大致

为:先降低,再上升,再降低,最后趋于平稳。在 14.5 d 之后,病土中 BS-17 菌株的数目高于健康土,这可能是由于病原菌生长代谢产物刺激了拮抗菌的快速繁殖。

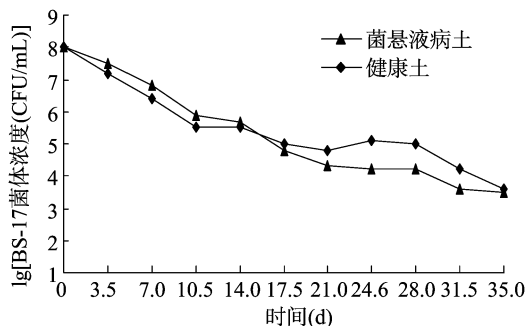


图10 菌株 BS-17 在土壤中的定殖动态

由图 11 可知,未接拮抗菌的对照组病原菌在土壤中呈波浪线趋势变化,菌悬液处理的病土中病原菌数量大幅度下降,说明拮抗菌对病原菌具有抑制效果。在 21 d 以后,对照组病原菌的数目逐渐趋于稳定,菌悬液处理的病土中病原菌数量逐渐增加,说明在 35 d 时拮抗菌的数目不足以抑制病原菌的生长。

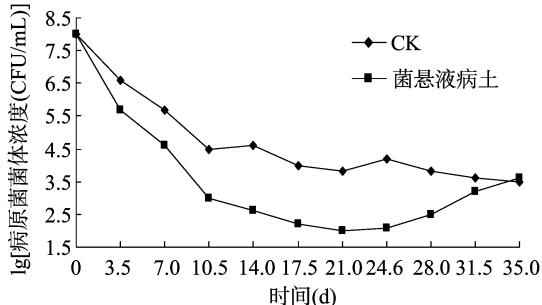


图11 病原菌在不同处理的土壤中数量动态变化

3 讨论与结论

本研究分离筛选出对常见植物土传疾病具有较好拮抗效果的菌株 BS-17,通过鉴定该拮抗菌为解淀粉芽孢杆菌。菌株 BS-17 的主要拮抗活性物质存在于胞外物质中,经过试验研究发现拮抗物质对热、pH 值、紫外线以及蛋白酶的稳定性好,说明该菌具有开发研制成生防菌剂的潜力。

另外,该拮抗菌有较高的产纤维素酶及蛋白酶的能力,够抑制多种病原菌以及土壤中的病虫害。例如纤维素酶对卵菌纲真菌具有重要的抑制作用^[15],蛋白酶对土壤中多种病害以及线虫都具有显著抑制和杀灭的作用^[16-18]等。经过利福平及抗病原菌双抗标记法,筛选出的突变株用于土壤定殖试验,结果表明,菌株 BS-17 的定殖能力强,在土壤中表现出较高的抑菌活性。由于在实际大田应用中,自然田间差别很大,生防菌在施用过程中受多种条件的影响,因此,在生防菌应用于实际田间抗病试验时,需进一步确定生防菌在土壤中的定殖情况以确定最佳的施用量。

本研究筛选出的拮抗菌不仅具有广泛的抑制植物土传疾病病原菌的效果,并且其拮抗物质性质稳定,对热、酸碱、紫外

线以及蛋白酶均有良好的耐性。该拮抗菌具有较好的产纤维素酶及蛋白酶的能力,因此,具有广泛抑制土壤中多种病菌的潜力。

参考文献:

- [1] 陈丽园,詹凯,鲁恒星,等. 土传病害生防菌的分离筛选及鉴定[J]. 中国农学通报,2014,30(29):8-14.
- [2] 李萍萍. 设施园艺中的土壤生态问题分析及清洁生产对策[J]. 农业工程学报,2011,27(增刊2):346-351.
- [3] 刘宏军. 关于我国设施农业、设施园艺业发展现状与对策研究[J]. 农业与技术,2007,27(4):5-8.
- [4] Atkinson D, Thornton M K, Miller J S. Development of rhizoctonia solani on stems, stolons and tubers of potatoes I. Effect of inoculum source[J]. American Journal of Potato Research, 2010, 87(4): 374-381.
- [5] 陈杰,汤琳,郭天文,等. 马铃薯土传病原真菌拮抗放线菌的抗病促生作用[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2014,4(1):111-119.
- [6] 梁雪杰,张婷婷,乔俊卿,等. 番茄土传病害拮抗菌的筛选、评价及鉴定[J]. 西南农业学报,2014,27(3):1096-1103.
- [7] Tan S Y, Jiang Y, Song S, et al. Two *Bacillus amyloliquefaciens* strain isolated using the competitive tomato root enrichment method and their effects on suppressing *Ralstonia solanacearum* and promoting tomato plant growth[J]. Crop Protection, 2013, 43:134-140.
- [8] Zhou T T, Chen D, Li C Y, et al. Isolation and characterization of *Pseudomonas brassicacearum* J12 as an antagonist against *Ralstonia solanacearum* and identification of its antimicrobial components[J]. Microbiological Research, 2012, 167(7):388-394.
- [9] Köberl M, Ramadan E M, Adam M, et al. *Bacillus* and *Streptomyces* were selected as broad-spectrum antagonists against soil-borne pathogens from arid areas in Egypt[J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 342(2):168-178.
- [10] de Boer W, Verheggen P, Klein Gunnewiek P J, et al. Microbial community composition affects soil fungistasis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(2):835-844.
- [11] 范秀容,沈萍. 微生物学实验[M]. 北京:人民教育出版社, 1980:241-249.
- [12] 陈雪,万科,张传萍,等. 烟草赤星病拮抗细菌的筛选、鉴定及机制初步研究[J]. 生物学通报,2013,48(7):51-54,封3.
- [13] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:58-64.
- [14] 牛春艳,喻国辉,程萍,等. 枯草芽孢杆菌 TR21 叶腋喷施防治巴西蕉枯萎病[J]. 热带作物学报,2010,31(11):1986-1990.
- [15] 臧超群. 葡萄霜霉病生防细菌 SY286 及抗病机理研究[D]. 沈阳:沈阳农业大学,2014:1-101.
- [16] 黎波,魏学军,李亚宁,等. 解淀粉芽孢杆菌 X-278 菌株抗菌蛋白初步分析[J]. 河南农业科学,2013,42(7):68-71,83.
- [17] 肖同建. *Bacillus cereus* X5 的杀线活性及其生物有机肥对南方根结线虫的防治作用研究[D]. 南京:南京农业大学,2011:1-123.
- [18] 李娟,彭德良,廖金铃,等. 农作物重要病原线虫生物防控的研究进展[J]. 生命科学,2013,25(1):8-15.