

魏 蜜, 张 伟, 管维轩, 等. 1 株油茶真菌病害拮抗菌株的筛选鉴定及其拮抗作用[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(18): 100–104.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.18.026

# 1 株油茶真菌病害拮抗菌株的筛选鉴定及其拮抗作用

魏 蜜, 张 伟, 管维轩, 朱洁倩, 傅本重, 王立华, 李国元

(特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室/湖北工程学院生命科学技术学院, 湖北孝感 432000)

**摘要:**为获得并鉴定高效拮抗油茶主要真菌病害的拮抗菌, 研究其拮抗作用, 采用点接法和发酵培养法从油茶根部土壤分离获得 1 株能同时拮抗 6 种油茶病害真菌的拮抗菌。通过生理生化鉴定和 16S rDNA 序列分析, 将该拮抗菌鉴定为解淀粉芽孢杆菌, 并命名为 *Bacillus amyloliquefaciens* D2WM。该拮抗菌能拮抗油茶炭疽病菌 (*Colletotrichum nicotianae*)、胶孢炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*)、叶斑病菌 (*Phyllosticta capitalensis*)、软腐病菌 (*Agaricodochium camellia*)、黑斑病菌 (*Alternaria alternata*) 和溃疡病菌 (*Bothyosphaeria dothidea*) 6 种油茶病害病原菌, 且拮抗菌发酵产生的无菌滤液对以上 6 种病原菌的抑菌率均高于 95%。同时, D2WM 菌株发酵产生的 10 倍稀释菌液还对细菌性软腐病病原菌欧文氏菌 3 个亚种的抑菌圈均大于 22 mm, 是 1 株具有广谱拮抗作用的生防菌株。D2WM 菌株发酵液耐酸碱范围广, 在 pH 值为 9 时拮抗作用最佳; 不耐高温, 温度达到 80 ℃ 及以上时抑菌活性完全丧失。研究结果对细菌性软腐病及油茶无公害防治提供了理论基础和参考依据。

**关键词:**解淀粉芽孢杆菌; 鉴定; 油茶病害; 拮抗作用

**中图分类号:** S435.659 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)18-0100-05

油茶 (*Camellia oleifera*) 属山茶科 (Theaceae) 山茶属 (*Camellia*), 是我国特有的一种高级油料作物, 主要生长于中国南方亚热带地区高山及丘陵地带, 是重要的木本油料树种之一<sup>[1]</sup>。油茶病害种类繁多, 油茶炭疽病、油茶叶枯病、油茶软腐病是油茶生产中 3 种毁灭性病害, 在我国各油茶产区普遍发生, 油茶的地上各部位均可受害<sup>[2]</sup>, 且油茶黑斑病、油茶溃疡病等也时常发生, 每年油茶产业因上述真菌性病害造成了巨大的经济损失。

芽孢杆菌 (*Bacillus*) 是一类理想的生防菌, 在目前生防细菌中研究较多。周盈等报道了 1 种对胡萝卜软腐欧文氏菌具有抑菌活性的枯草芽孢杆菌 BSn5 及其产生的抑菌蛋白 APn5, 但该菌只能拮抗胡萝卜软腐欧文氏菌亚种, 其生防范围较窄<sup>[3]</sup>。刘君昂等公开了 1 种拮抗油茶病害的短芽孢杆菌 Z26, 它能有效抑制油茶炭疽病菌、根腐病菌、半边疯病菌等病原菌的生长, 该生防菌剂对油茶炭疽病的最大抑制率达到 83.4%<sup>[4]</sup>。陈琼珍等利用枯草芽孢杆菌对有害真菌的生防作用及最佳发酵条件进行研究, 结果显示枯草芽孢杆菌只对红镰刀菌的拮抗作用明显<sup>[5]</sup>。目前, 关于解淀粉芽孢杆菌能同时在油茶主要真菌性病害及细菌性软腐病上的防治研究及应用报道较少。

本研究从油茶根部土壤分离获得 1 株能拮抗油茶主要病害真菌的解淀粉芽孢杆菌 D2WM。采用平板对峙法和发酵培养法研究该拮抗菌对油茶 6 种病害真菌的拮抗作用。另外, 使用管碟法测定该拮抗菌的无菌发酵液对细菌性软腐病菌的拮抗作用。最后本研究对拮抗菌发酵菌液的理化性质进行了初步研究, 为油茶真菌病害及蔬菜细菌性软腐病的无公害防治提供了一定的理论基础和参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

菌株来源: 油茶炭疽病菌 (*Colletotrichum nicotianae*)、油茶胶孢炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*)、油茶叶斑病菌 (*Phyllosticta capitalensis*)、油茶软腐病菌 (*Agaricodochium camellia*)、油茶黑斑病菌 (*Alternaria alternata*)、油茶溃疡病菌 (*Bothyosphaeria dothidea*), 均分离自湖北孝感大悟油茶林地; 胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜亚种 (*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora*)、胡萝卜软腐欧文氏菌黑胫亚种 (*E. carotovora* ssp. *atroseptica*)、菊欧文氏菌 (*E. chrysanthemi*), 均分离自湖北孝感当地蔬菜田中腐烂的蔬菜。所有菌株均保存于湖北工程学院特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室。

### 1.2 培养基<sup>[6]</sup>及主要试剂和仪器

LB 培养基 (筛选培养基): 1 L 中含有 10 g 蛋白胨、5 g 酵母粉、10 g NaCl、15~20 g 琼脂, pH 值 7.0~7.2, 用去离子水调至总体积为 1 L; 牛肉膏蛋白胨培养基 (分离培养基): 1 L 中含有 3.0 g 牛肉膏、10.0 g 蛋白胨、5.0 g NaCl、15.0 g 琼脂, pH 值 7.2~7.4, 用去离子水调至总体积为 1 L。上述培养基分装后于 121 ℃ 灭菌 20 min, 备用。

DNA 凝胶回收试剂盒、PCR 反应的各种试剂, 均购自

收稿日期: 2016-04-24

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31200488); 湖北省教育厅中青年人才项目 (编号: Q20152707); 湖北省教育厅重点项目 (编号: D20102704); 特色果蔬质量安全控制湖北省重点实验室开放基金重点项目 (编号: 2016K07)。

作者简介: 魏 蜜 (1987—), 女, 湖北孝感人, 博士, 讲师, 主要从事微生物学和植物病害防治等方面的研究。Tel: (0712) 2345155; E-mail: weimi555@163.com。

生工生物工程(上海)股份有限公司;蛋白粉、酵母粉、NaCl、琼脂等,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.3 拮抗菌的筛选、分离及拮抗作用研究

采用稀释分离法<sup>[7]</sup>从油茶根部土壤分离拮抗细菌,取 10 g 健康油茶根际土样加入到盛有 90 mL 无菌水和玻璃珠(直径 0.5 cm,每瓶 30~50 个)的三角瓶中,在 28 ℃、180 r/min 摇床中振荡 20 min 后,将菌悬液放置在 80 ℃ 水浴中保持 15 min。将 1 mL 土壤悬浮液移入盛有 9 mL 无菌水的试管中,制成  $10^{-1}$  菌悬液,依此类推,获得  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$  菌悬液。梯度稀释后,吸取 100  $\mu$ L 稀释度为  $10^{-6}$ ~ $10^{-3}$  的菌悬液均匀涂布在分离培养基上,将涂布有菌悬液的平板置于 30 ℃ 培养箱内培养,24 h 后观察分离培养基上菌落的状态,用三步划线法进行分离纯化,统一编号登记。接种斜面后,可在 4 ℃ 短暂保藏,用 50% 甘油作为保护剂,可在 -80 ℃ 长久保藏。

采用平板对峙法<sup>[8]</sup>筛选能同时拮抗各油茶病原真菌的拮抗细菌,将直径为 7 mm 的病原菌饼置于 PDA 平板中心,然后用无菌牙签蘸取待测菌,于等距离点(距平板中央 1.5 cm)接拮抗菌,置于 28 ℃ 恒温培养箱培养,5 d 后观察抑菌带的大小,每个处理重复 3 次,筛选抑菌带宽大于 5 mm 的菌株。

将初筛有拮抗作用的菌株在 LB 液体培养基中于 150 r/min 适温培养 24 h,发酵菌液以 8 000 r/min 离心 10 min,上清用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤至灭菌 EP 管中。将初筛拮抗菌滤液与约 50 ℃ 的 PDA 固体培养基按体积比 1:19 混匀后倒入培养皿,冷却后在平板中央放入直径为 7 mm 的油茶病原真菌菌饼,以无菌水为对照,每个处理 3 次重复,5 d 后测量病原菌菌落直径。无菌滤液抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-0.7)×100%。

采用平板对峙法分析拮抗菌对真菌主要病害的拮抗作用<sup>[8]</sup>:将打好的直径为 7 mm 的油茶炭疽病等病原菌饼置于 PDA 平板中心,然后用无菌牙签蘸取待测菌,于等距离点(距平板中央 1.5 cm)接拮抗菌,置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养,5 d 后观察抑菌带的大小,每个处理重复 3 次。采用管碟法<sup>[9]</sup>分析拮抗菌对欧文氏菌的拮抗作用:在涂布有 100  $\mu$ L 病原菌(约  $1 \times 10^7$  CFU/mL)的 LB 琼脂平板上等距离用打孔器打直径为 7 mm 的孔。每个孔中接入 50  $\mu$ L 发酵液 10 倍稀释液,以无菌水为对照,每个处理设置 3 次重复。在 30 ℃ 恒温箱中培养 20~28 h 后测量抑菌圈直径,根据数值大小确定拮抗程度。

### 1.4 拮抗菌株鉴定

1.4.1 拮抗菌的形态特征和生理生化鉴定 将纯化后的菌种转接到 LB 平板上,于 30 ℃ 培养 24 h 后,对菌落形态、颜色、基质颜色及有无运动性等进行形态特征鉴定,并依据东秀珠等的方法<sup>[10]</sup>对拮抗菌株进行生理生化鉴定。

1.4.2 拮抗菌株的 16S rDNA PCR 扩增和序列测定 拮抗菌株基因组 DNA 的提取方法参考文献<sup>[11]</sup>。采用生工生物工程(上海)股份有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒(编号:B518225)提取细菌基因组 DNA, -20 ℃ 保存。

采用细菌的通用引物 F27 (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 和 R1492 (TACGGCTACCTGTGTTACGACTT) 进行 PCR 扩增,得到该细菌的 16S rDNA。PCR 反应总体积为 50  $\mu$ L:各

2  $\mu$ L 引物 F27 和 R1492 (由天一辉远生物科技有限公司合成)、5  $\mu$ L 10×buffer、2  $\mu$ L dNTP、1  $\mu$ L Taq 酶、5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>、33  $\mu$ L 双蒸水。PCR 扩增条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,56 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,共设 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃ 保存。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳,通过凝胶成像系统显示并记录电泳结果。PCR 产物委托天一辉远生物科技有限公司进行纯化和测序。

### 1.5 拮抗菌株无菌发酵液的特性研究

酸碱稳定性测定<sup>[12]</sup>:将拮抗菌株菌液经无菌滤器过滤,吸取 5 mL 无菌滤液转入无菌试管中,用 1 mol/L NaOH 或 HCl 调 pH 值分别至 1、3、5、7、9、11、13,静置 1 h 后,测试不同 pH 值拮抗菌株菌液对欧文氏菌的抑制作用。以不调 pH 值的滤液作为对照,每个处理重复 3 次。

热稳定性研究<sup>[13]</sup>:将拮抗菌液经无菌滤器过滤,取 5 mL 无菌滤液转入无菌试管中,分别在 20、40、60、80、100 ℃ 下处理 2 h,测试不同温度处理的拮抗菌株菌液对欧文氏菌的抑制作用。

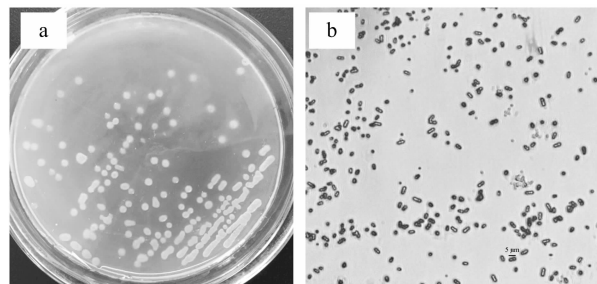
## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗菌的筛选和分离

以实验室分离到的油茶炭疽病病菌(*C. nicotianae*)为指示菌,以分离得到的菌株为待检菌,将分离纯化得到的细菌利用平板对峙法依次筛选,初步确定对油茶主要真菌病害有拮抗作用的 3 株菌株 D2WM、D9WM、D21WM。然后采用发酵法进行复筛,最终确定 D2WM 的拮抗作用最强。

### 2.2 拮抗菌株 D2WM 的形态学及生理生化特性分析

如图 1 所示,D2WM 菌株的菌体呈杆状,周生鞭毛,并具有运动性;菌落为乳白色,呈近圆形,表面粗糙有褶皱,边缘不规则,不产生可溶性色素。生理生化鉴定结果表明,该菌株属于革兰氏阳性菌,具有接触酶活性,能水解淀粉,能利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-甘露糖产酸,能利用柠檬酸盐,能够水解酪素并使明胶液化,能够还原石蕊牛奶和硝酸盐,伏-普(V-P)反应呈阳性,不具有卵磷脂酶活性,不能水解马尿酸盐和酪氨酸,不能利用葡萄糖产气。



a. D2WM 菌株的菌落形态 b. D2WM 菌株的显微形态

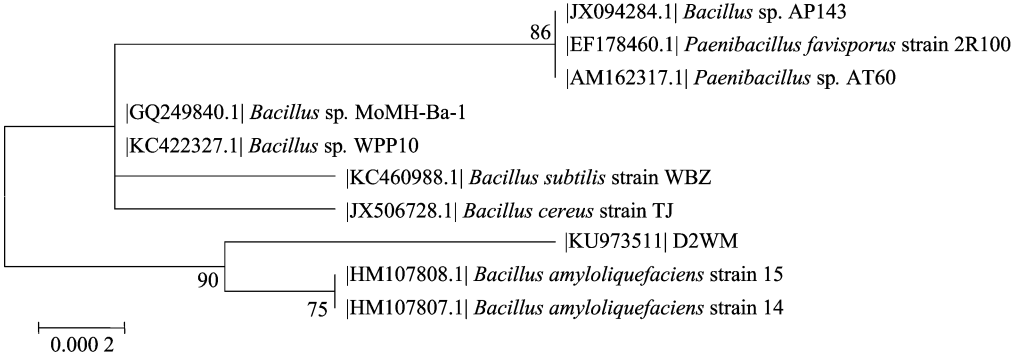
图1 D2WM 菌株的菌落和显微形态

### 2.3 拮抗菌株 D2WM 的分子鉴定及系统发育树构建

对菌株 D2WM 进行分子鉴定,将测得的 16S rDNA 序列(片段长度为 1 439 bp)与 GenBank 数据库中的序列进行 BLAST 分析,选取 9 株菌株用 ClustalX 2.1 进行多序列比对分析,利用 MEGA 6.0 软件采用邻接法(Neighbor-Joining)进行系统发育树构建和聚类分析,如图 2 所示。菌株 D2WM

(登录号为 KU973511) 与 GenBank 中登录号为 HM107808.1 [解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*) strain 15] 菌株的同源性达到 99%。依据 16S rDNA 分类标准,一般认为 16S

rDNA 序列同源性大于 97%,可认为属于同一个种。结合上述形态和部分生理生化特征,可初步判定拮抗菌株 D2WM 属于解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*)。



*Paenibacillus favisporus*—蜜梳状胞类芽孢杆菌; *Paenibacillus* sp.—类芽孢杆菌属; *Bacillus subtilis*—枯草芽孢杆菌; *Bacillus cereus*—蜡样芽孢杆菌

图2 D2WM 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

2.4 拮抗菌株 D2WM 的拮抗作用分析

采用平板对峙法和发酵菌液培养法开展解淀粉芽孢杆菌 D2WM 与多种油茶病原菌拮抗作用研究。由图 3 可知,解淀粉芽孢杆菌 D2WM 对油茶炭疽病、油茶胶孢炭疽病、油茶叶斑病、油茶软腐病、油茶黑斑病和油茶溃疡病 6 种油茶病害致病菌均有较好的拮抗作用,尤其是对油茶炭疽病病菌、叶斑病

病菌、黑斑病病菌的拮抗效果明显。由表 1 可知,解淀粉芽孢杆菌 D2WM 对油茶主要病害致病菌的抑菌率均高于 95%,尤其是对叶斑病病菌的抑菌率达到 100.00%。上述结果表明,解淀粉芽孢杆菌 D2WM 的抗菌谱较广,是 1 株针对油茶主要病害的高效生防菌株。

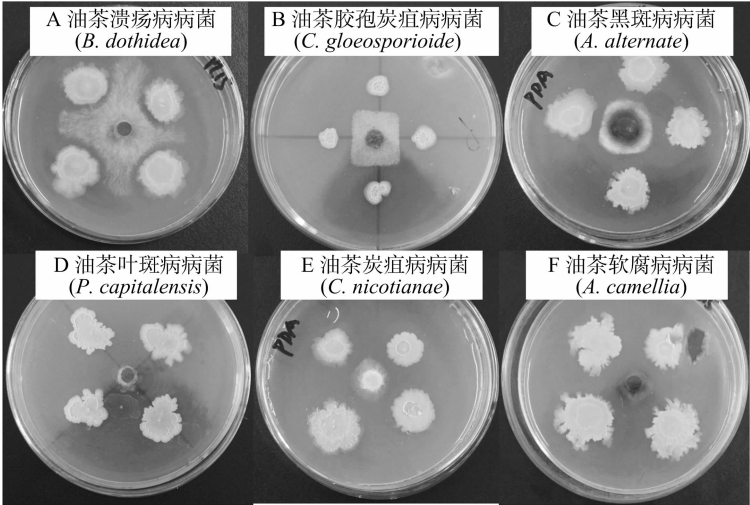


图3 解淀粉芽孢杆菌 D2WM 对油茶主要病原菌的平板对峙拮抗作用

表 1 解淀粉芽孢杆菌 D2WM 对油茶主要病原真菌的抑制直径及抑菌率

病原真菌	抑制直径 (mm)	无菌滤液抑菌率 (%)
油茶炭疽病病菌 ( <i>C. nicotianae</i> )	40.2 ± 1.2a	97.67 ± 0.92bc
油茶胶孢炭疽病病菌 ( <i>C. gloeosporioides</i> )	37.4 ± 0.6b	95.87 ± 1.34bc
油茶叶斑病病菌 ( <i>P. capitalensis</i> )	40.1 ± 1.0a	100.00 ± 1.28a
油茶软腐病病菌 ( <i>A. camellia</i> )	37.6 ± 1.1b	95.89 ± 0.92c
油茶黑斑病病菌 ( <i>A. alternate</i> )	39.7 ± 0.6a	99.46 ± 0.88ab
油茶溃疡病病菌 ( <i>B. dothidea</i> )	39.9 ± 0.9a	96.85 ± 1.09bc

注:表中数据为“平均值 ± 标准差”;抑制直径 = 未处理病原菌直径 - 处理后病原菌直径。

另外,本研究还考察了解淀粉芽孢杆菌 D2WM 发酵液对细菌性软腐病菌欧文氏菌的拮抗作用。由图 4 可知,D2WM 发酵液的 10 倍稀释液对胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜亚种、胡萝卜软腐欧文氏菌黑胫亚种、菊欧文氏菌 3 个亚种的抑菌圈直径均大,抑制效果较好,其无菌水对照处理组均未出现抑菌圈。

2.5 拮抗菌株 D2WM 的拮抗物质特性研究

2.5.1 酸碱稳定性研究 由图 5 可知,D2WM 菌株发酵液的无菌滤液酸碱耐受范围较广,在 pH 值为 1 ~ 11 范围内对软腐病病原菌均有一定的抑制效果,并且在 pH 值为 9 时,其抑制效果最佳,证明偏碱性的环境更有利于无菌滤液中的有效成分发挥拮抗作用。

2.5.2 热稳定性研究 由图 6 可知,D2WM 菌株发酵液的无菌滤液在 20 ~ 60 ℃ 范围内保留抑菌活性。试验同时得到未

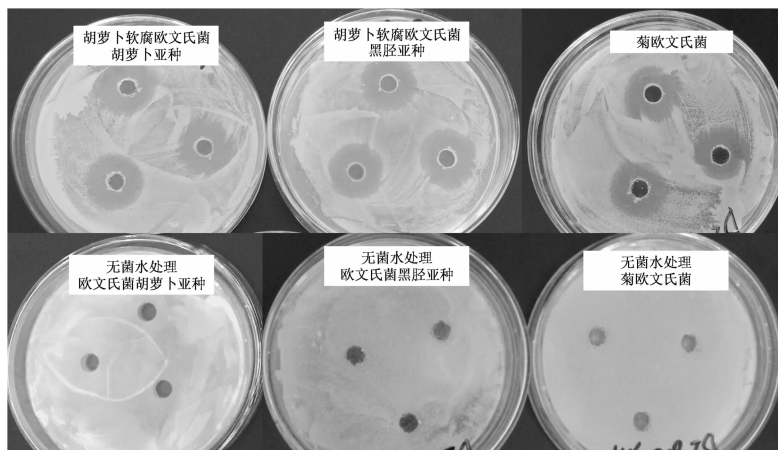


图4 解淀粉芽孢杆菌 D2WM 发酵液的 10 倍稀释液对欧文氏菌的抑制效果

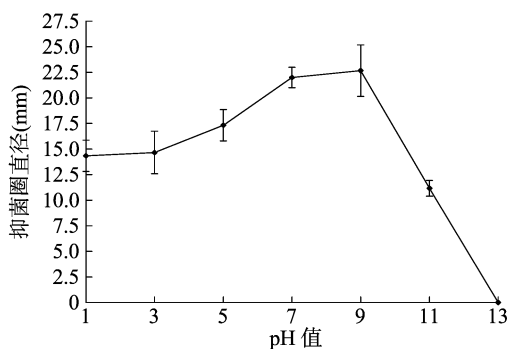


图5 pH 值对 D2WM 菌株发酵无菌滤液拮抗效果的影响

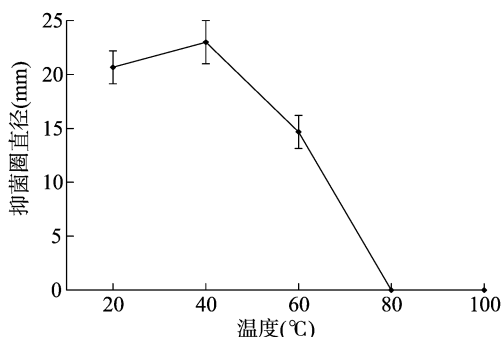


图6 温度对 D2WM 菌株发酵无菌滤液拮抗效果的影响

经处理的无菌滤液在室温 25 ℃ 条件下的抑菌圈直径为 (31.2 ± 0.4) mm。结果表明,温度大于 40 ℃ 时会减弱无菌滤液的拮抗效果,当温度高于 80 ℃ 时,抑菌活性丧失,说明该无菌滤液中的有效成分不耐高温。

### 3 讨论与结论

本试验通过对油茶主要病害的拮抗菌进行双重筛选,最终获得 1 株能同时高效拮抗油茶主要病害和欧文氏菌的解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) D2WM。该菌株分离自油茶健康植株根际土壤,经检测无致病性,具有较稳定的生防作用。现有报道中解淀粉芽孢杆菌多见于对真菌的抑制,王英国等从堆肥中分离到 1 株解淀粉芽孢杆菌,通过产生抗菌多肽类物质拮抗尖孢镰刀菌、草莓蛇病菌、毛霉和黑曲霉等多

种真菌<sup>[14]</sup>。勾长龙等分离获得 1 株对人参根腐病原菌拮抗作用较强的解淀粉芽孢杆菌 HB-3,其无菌发酵液对人参根腐病病菌菌丝生长和孢子萌发均有显著的抑制作用<sup>[15]</sup>。同时也有利用解淀粉芽孢杆菌对采后柑橘绿霉病的生防效果的相关研究等<sup>[16]</sup>。本研究筛选得到的解淀粉芽孢杆菌对油茶的 6 种主要病害真菌均有较好的抑制作用,同时还能较好地抑制细菌性软腐病欧文氏菌的 3 个亚种,说明解淀粉芽孢杆菌确实是理想的生防菌株来源。

研究表明,解淀粉芽孢杆菌可产生抑菌蛋白类、脂肽类抗生素、大环内酯类、寡肽酶、肽类和聚酮化合物等<sup>[17-21]</sup>。本研究对解淀粉芽孢杆菌 D2WM 的抑菌物质特性研究表明,其无菌滤液耐酸碱范围较广,在偏碱性条件下的抑菌活性更高,但是其热稳定性较差,推测其抑菌物质成分中含有蛋白类<sup>[18]</sup>。下一步将分别采用有机溶剂提取法和硫酸铵沉淀法从菌株发酵液中制备出抑菌物质粗提液和粗蛋白液,并对活性粗提物进行高效液相色谱 (HPLC) 法、高效液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 分析<sup>[22-23]</sup>,为揭示拮抗菌的物质基础和拮抗机制奠定基础。另外,该拮抗菌液体培养代谢产物只需要在 LB 液体培养基中培养 12~20 h 即可获得较好的拮抗效果,相对于一般细菌、真菌大大缩短了培养时间,降低了生产成本<sup>[6]</sup>。

目前,对油茶主要病害和细菌性软腐病普遍通过种植抗性品种和化学防治来控制,过多地使用化学杀菌剂有危害人类身体健康、药物残留破坏生态环境、引发病原物产生抗药性、影响产品质量和食用安全等诸多缺点,不利于绿色可持续发展<sup>[4]</sup>。寻求安全、高效和经济的生物源农药已成为当前防治细菌性软腐病和油茶病害的热点和当务之急,其中拮抗微生物在植物病害生物防治中起到十分重要的作用。本研究首次报道了单一微生物菌剂同时防治多种油茶病原真菌和欧文氏菌的 3 个亚种,在油茶真菌病害及蔬菜细菌性软腐病的无公害防治上有一定的应用潜力。

### 参考文献:

- [1] 庄瑞林. 中国油茶[M]. 北京:中国林业出版社,1988.
- [2] 束庆龙,张良富. 中国油茶栽培与病虫害防治[M]. 北京:中国

- 林业出版社,2009:147-148.
- [3]周 盈,陈 琳,柴鑫莉,等. 魔芋内生拮抗细菌的分离及其抗菌物质特性研究[J]. 微生物学报,2007,47(6):1076-1079.
- [4]刘君昂,宋光桃,周国英,等. 一种拮抗油茶病害的菌株及其应用:201110027957.1[P]. 2011-08-17.
- [5]陈琼珍,吴兴泉. 枯草芽孢杆菌对有害真菌的生防作用及最佳发酵条件研究[J]. 河南工业大学学报(自然科学版),2011,32(5):66-70.
- [6]范秀容,沈 萍,李广武. 微生物学实验[M]. 北京:人民教育出版社,1980:67-72.
- [7]郑 琪,徐秉良,薛应钰,等. 杏采后病害病原拮抗菌的分离筛选及鉴定[J]. 植物保护,2013,39(4):34-39,71.
- [8]Földes T, Bánhegyi I, Herpai Z, et al. Isolation of *Bacillus* strains from the rhizosphere of cereals and *in vitro* screening for antagonism against phytopathogenic, food-borne pathogenic and spoilage micro-organisms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2000, 89(5):840-846.
- [9]牛慧芹,刘春辉,沈检龙,等. 玉米大斑病生防细菌的筛选、鉴定及其抑制作用[J]. 中国农学通报,2014,30(28):275-279.
- [10]东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:370-390.
- [11]武志江,李业燕,王亚军,等. 百合枯萎病拮抗细菌的筛选、鉴定及其抑菌物质研究[J]. 微生物学通报,2015,42(7):1307-1320.
- [12]陈双臣,刘爱荣,王晓清,等. 放线菌株 F 培养条件优化和抗菌物质的稳定性研究[J]. 生物技术,2009,19(2):76-79.
- [13]唐 蕊,张雪辉,石晓云,等. 白菜软腐病拮抗菌 M-14 拮抗机理和拮抗物质的初步研究[J]. 北方园艺,2011(20):38-39.
- [14]王英国,王军华,权春善,等. 解淀粉芽孢杆菌抗菌活性物质的分离纯化及抑菌活性研究[J]. 中国生物工程杂志,2007,27(12):41-45.
- [15]勾长龙,王雨琼,孙 朋,等. 人参根腐病拮抗菌的筛选、鉴定及其抑菌活性[J]. 食品科学,2015,36(19):143-147.
- [16]吕 捷,陈 云,朱从一,等. 拮抗菌 Bs43 的鉴定、抑菌机理及其对采后柑橘绿霉病的生防效果[J]. 果树学报,2014(5):885-892.
- [17]张 娟,杨彩梅,曹广添,等. 解淀粉芽孢杆菌极其做为益生菌的应用[J]. 动物营养学报,2014,26(4):863-867.
- [18]Arrebola E, Jacobs R, Korsten L. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens [J]. Journal of Applied Microbiology, 2010, 108(2):386-395.
- [19]Sun L J, Lu Z X, Bie X M, et al. Isolation and characterization of a co-producer of fengycins and surfactins, endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2, from *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2006, 22(12):1259-1266.
- [20]屈俊廷,金海强,沈国娟,等. 人参锈腐病生防用解淀粉芽孢杆菌 Y-S-Y12 菌株发酵条件的优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):158-161.
- [21]裴纪莹,陈相艳,吴发萍,等. 解淀粉芽孢杆菌 NCPSJ7 菌株高产抗菌物质的发酵条件优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):311-315.
- [22]郭照辉,黄 军,魏小武,等. 1 株广谱拮抗菌的分离鉴定及其抗菌活性成分分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2014,40(5):513-518.
- [23]杨 帆,李新民,刘春来,等. 解淀粉芽孢杆菌抑菌活性初步研究[J]. 黑龙江农业科学,2015(9):55-59.

(上接第 99 页)

更好地开展病害防治工作及整合诸多分散防治措施于一体,是学术界亟须解决的问题之一。同时,针对目前关于油用牡丹生物防治措施少、效果差等问题,及时开展生物菌剂开发和利用,是学术界今后开展研究工作的方向之一。此外,针对一些新型病害的发生,尽快明确其病原、病害发生规律以及防治措施等,是未来研究的重点。

#### 参考文献:

- [1]朱恒星,戴前莉,李辉乾,等. 基于 SWOT 分析的重庆市油用牡丹产业发展研究[J]. 山西农业大学学报(自然科学版),2016,36(3):166-169.
- [2]张鼎新,杨 希. 关于华亭县发展油用牡丹芍药产业的几点思考[J]. 农业与技术,2016,36(2):144.
- [3]冯 健,尤文忠,丁 彪. 辽宁省发展油用牡丹前景分析[J]. 辽宁林业科技,2016(1):46-49.
- [4]张雪莲,解志军,朱长红,等. 油用牡丹产业发展前景及策略分析[J]. 农村经济与科技,2015,26(12):67-68.
- [5]张正周,张驰松,郑 旗,等. 油用牡丹籽油水酶法提取工艺的研究[J]. 农业与技术,2016,36(3):30-32,46.
- [6]姚欢欢. 油用牡丹种子油提取及剩余物综合利用[D]. 哈尔滨:东北林业大学,2013.
- [7]张海燕. 油用牡丹的发展优势及其丰产栽培管理技术[J]. 现代园艺,2016(5):60-61.
- [8]张晓东. 油用牡丹种植管理技术[J]. 中国园艺文摘,2015,31(7):225-226.
- [9]杨 勇. 桃树与油用牡丹复合经营技术[J]. 现代园艺,2016(1):35-36.
- [10]杨振晶,褚鹏飞,张秀省,等. 我国油用牡丹繁殖技术研究进展[J]. 北方园艺,2015(21):201-204.
- [11]臧承荣,窦 霄,卢 洁,等. 油用牡丹结实状况调查[J]. 河北林业科技,2016(1):53-54.
- [12]韩本贵,徐德平,汪丽莎,等. 油用牡丹病虫害综合防治技术[J]. 现代农业科技,2014(13):161.
- [13]杨 娜. 油用牡丹栽培技术及主要病虫害防治措施[J]. 中国园艺文摘,2014,30(10):225-226.
- [14]孙文姬,简桂良,刘秀兰,等. 山东菏泽地区牡丹根腐病病原真菌的分离鉴定[J]. 植物病理学报,1999,29(2):177-180.
- [15]杨瑞先,刘 萍,方站民,等. 牡丹病害研究现状及展望[J]. 河南农业科学,2010,39(11):138-143.
- [16]赵 丹. 牡丹根部茎部真菌病害及病原鉴定[D]. 洛阳:河南科技大学,2012.
- [17]李育材. 中国油用牡丹工程的战略思考[J]. 中国工程科学,2014,16(10):58-63.
- [18]王占营,王晓晖,刘振国,等. 不同油用牡丹品种园艺性状及油分含量的比较[J]. 安徽农业科学,2016,44(1):70-72.
- [19]陆继亮. 油用牡丹发展后劲十足云南牡丹产业悄然兴起[J]. 花木盆景:花卉园艺,2015(4):54.
- [20]李志东. 紫斑牡丹主要病虫害及其综合防治技术[J]. 甘肃林业科技,2002,27(3):56-57.