

毛仪楠,邓百万.白芨病菌拮抗菌株的筛选及鉴定[J].江苏农业科学,2019,47(3):103-106.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.03.025

白芨病菌拮抗菌株的筛选及鉴定

毛仪楠¹,邓百万^{1,2}

(1.陕西理工大学生物科学与工程学院,陕西汉中 723000; 2.陕西省资源生物重点实验室,陕西汉中 723000)

摘要:从白芨根际土壤中筛选出对白芨根腐病有拮抗性的菌株,初步研究其抑菌作用,为白芨病害的生物防治提供参考依据。采用平板稀释法从白芨根际土壤中分离获得菌株,以白芨根腐病菌、白芨灰霉菌、白芨黑斑菌为靶标菌采用平板对峙法筛选出拮抗菌株;分别采用 16S rDNA 和 28S rDNA 序列分析方法鉴定拮抗细菌和真菌菌株的分类学地位。结果:共计从白芨栽培土壤中分离到 35 株细菌和 10 株真菌菌株,其中 8 株细菌和 6 株真菌对 4 种白芨致病病菌表现较好的抑菌活性;经鉴定,细菌菌株大多数为芽孢杆菌,真菌为木霉属,BJ-135 为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*),BJ-175 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),BJ-2 为木霉(*Trichoderma asperellum*)。筛选出的菌株中有 5 株拮抗菌对 4 种白芨致病病菌均有较好的抑菌活性,菌株 BJ-135、BJ-175、BJ-2 可用于生防菌剂开发,用于白芨病害防治。

关键词:白芨;根际微生物;致病菌;拮抗菌;抑菌活性

中图分类号: S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)03-0103-04

白芨 [*Bletilla striata* (Thunb.) Reichb. f.] 别称冰球子、地螺丝、利知子、连及草等,为兰科白芨属多年生草本植物^[1],主要分布在我国秦岭以南地域,多生长在潮湿的环境之中,作为我国一种传统的中药材^[2],具有清热利湿、收敛止血、消肿生肌等功效,此外,白芨还是很好的黏合剂和食品增稠剂,白芨应用广泛^[2-3],因此,在市场呈现出供不应求的状态,大量的人工采挖使得野生资源匮乏,于是出现了人工栽培,但在栽培过程中病害不断发生,严重地影响了白芨产业的健康发展。据统计,最常见且危害最严重的真菌性病病毒害包括白芨根腐

病菌、白芨灰霉菌、白芨黑斑病菌。白芨根腐病主要侵染白芨的根部和叶片,造成根部软化腐烂、叶片褪绿变黄,萎蔫死亡。白芨根腐病致使白芨大面积减产、质量大幅度下降,造成了巨大的经济损失。

目前控制白芨根腐病的主要方法仍以化学杀菌剂为主,但由于化学杀菌剂容易出现抗药性和药物残留,不仅污染环境,还严重地威胁人体健康。随着人们对无公害食品需求的日益增加以及对环境保护的日益关注,生物防治成为了人们控制植物病害的理想途径^[4-5]。因此,筛选出生物活性高、抗菌谱广的菌株具有重要的意义。目前国内外对番茄^[6]、黄瓜^[4,6]等植物生物防治的研究已经取得了较大的进展^[4],但对白芨病害的生物防治还罕有报道。本研究从白芨根际土壤中进行拮抗细菌和真菌的分离筛选,以 4 种常见的白芨致病病菌为供试菌株,对所得菌株进行生理生化及分子生物学鉴定,探讨白芨根际土壤细菌和真菌对不同病原菌的拮抗作用,为解决白芨在栽培过程中的病害问题提供了初步的试验依据。

收稿日期:2018-09-06

基金项目:陕西省科技创新工程项目(编号:2016HBGC-07)。

作者简介:毛仪楠(1994—),女,陕西商洛人,硕士研究生,主要从事微生物资源保育研究。E-mail:178794736@qq.com。

通信作者:邓百万,硕士,教授,主要从事微生物资源保护与开发利用研究。E-mail:2210309868@qq.com。

[5] 冉隆贵,谢震宇,肖斌,等. 诱虫黄板对陕西茶区小贯小绿叶蝉及天敌蜘蛛的影响[J]. 西南农业学报,2016,29(11):2594-2597.

[6] 张余杰,陈文龙,杨琳,等. 小贯小绿叶蝉的化防农药及其抗性发展状况[J]. 农药,2017,56(4):239-245.

[7] Mu D, Cui L, Ge J, et al. Behavioral responses for evaluating the attractiveness of specific tea shoot volatiles to the tea green leafhopper, *Empoasca vitis* [J]. Science, 2012, 19(2):229-238.

[8] Yang H M, Xie S X, Wang L, et al. Identification of up-regulated genes in tea leaves under mild infestation of green leafhopper [J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130(2):476-481.

[9] Reineke A, Hauck M. Larval development of *Empoasca vitis* and *Edwardsiana rosae* (Homoptera: Cicadellidae) at different temperatures on grapevine leaves [J]. Journal of Applied Entomology, 2012, 136(9):656-664.

[10] 黄明星. 茶假眼小绿叶蝉卵发育起点及有效积温法研究[J]. 茶叶, 1989(2):34-35.

[11] 张武扬,林明雄,张汉鹤. 茶小绿叶蝉生长发育与温度的关系[J]. 安徽农业大学学报,1997,24(4):12-15.

[12] 张汉鹤,谭济才. 中国茶树害虫及其无公害治理[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,2004:244-250.

[13] 李慧玲,林乃銓. 茶梢不同节位假眼小绿叶蝉的着卵量差异[J]. 茶叶科学技术,2009(3):18-19.

[14] 李典谟,王莽莽. 快速估计发育起点及有效积温法的研究[J]. 昆虫知识,1986,23(4):184-186.

[15] 冯康. 数值计算方法[M]. 北京:国防工业出版社,1978.

[16] 张孝羲. 昆虫生态及预测预报[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2001:77-83.

[17] 黄寿波,金志凤. 茶树优质高产栽培与气象[M]. 北京:气象出版社,2010:80-81.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试土样 供试土样采自多年轮作无病害的白芨根际土壤。

1.1.2 培养基 细菌培养采用肉汤 (LB) 培养基:牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g、纯净水定容至 1 000 mL。固体培养基中加琼脂 18.0 g, pH 值为 7.2。真菌培养采用马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 15 ~ 20 g、自来水 1000 mL。

1.1.3 供试菌株 白芨叶褐斑病菌、叶斑霉病菌、白芨块茎腐烂病菌、白芨根腐菌均由陕西理工大学微生物实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离纯化 从陕西省汉中市白芨种植区挑选生长状态好的白芨植株,采集其根际土壤,将土壤自然风干后过 20 目筛,分别称取 5 g 置于三角瓶中,加入 45 mL 无菌水及玻璃珠振荡 20 min 得到土壤样品悬液,依次用无菌水配制成 5 个浓度梯度的土壤悬液,每个梯度取 100 μ L 均匀涂布在 LB 培养基表面,每组设置 3 个重复,于 28 $^{\circ}$ C 下培养 3 ~ 5 d,挑取性状差异明显的单菌落进行编号,划线法纯化培养,4 $^{\circ}$ C 保藏备用。拮抗细菌分离采用 LB 培养基^[7-8],35 $^{\circ}$ C 培养 3 ~ 5 d。拮抗木霉菌分离采用 PDA 培养基^[9],25 $^{\circ}$ C 培养 5 ~ 7 d,分离得到的拮抗菌株纯化后,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 抑菌活性的筛选 本试验以 4 种白芨致病菌为靶标,采用菌饼法^[7,10]筛选拮抗菌株。将预先培养好的白芨致病菌菌饼置于 PDA 培养基中心,四周距平板边缘 1 cm 处对称接种拮抗菌株,每种处理 3 ~ 5 次重复,28 $^{\circ}$ C 培养 5 ~ 7 d^[4,11]。拮抗细菌的筛选采用 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 培养 2 ~ 3 d,看是否有抑菌圈的出现,并记录对照及处理组白芨致病菌菌落直径^[2,12],按公式计算抑制率:

菌丝生长抑制率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径) \times 100%。

1.2.3 抗菌株的鉴定 对初步分离出来的白芨土壤根际细菌采用水煮法进行 DNA 的提取,16S rRNA 分子生物学鉴定^[13],本研究用引物由康为世纪生物科技有限公司合成,引物序列 E-27F: (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3')、1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3')^[14],应用这 2 种引物进行 PCR 扩增,扩增长度大约为 1 500 bp^[15-16]。扩增体系 50 μ L,包括:dNTP (4 种核苷酸混合物) 5 μ L、E-27F 和 1492R 2 种引物各 2 μ L,模板 DNA (菌悬液) 1 μ L, DNA 聚合酶 0.25 μ L, ddH₂O 补齐。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 40 次循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 2 min; 4 $^{\circ}$ C 保存,扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测^[17]。采用 CTAB 法用于真菌 DNA 的提取^[18-19],PCR 扩增体系:94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 40 个循环 (94 $^{\circ}$ C 30 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min); 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 4 $^{\circ}$ C 保存^[20-21],PCR 反应体系为 10 \times Buffer (反应缓冲液) 5 μ L、脱氧核苷三磷酸底物 (dNTP) 5 μ L, 上下游引物 ITS1、ITS4 各 2 μ L, DNA 模板 1 μ L、5 U/ μ L *Taq* 0.25 μ L、ddH₂O 34.75 μ L, ITS 序列长度都在 500 ~ 750 bp 之间^[22]。该片段包括 ITS1、5.8S rDNA 和 ITS2 的全部序列以及 18S rDNA 和 28S rDNA 的部分序列,

将完成 PCR 扩增的样品再次进行 1% 琼脂糖凝胶电泳^[23],筛选出条带明亮且清晰的样品,将 PCR 送上海生工生物工程技术服务有限公司测序,测得序列与 GenBank 数据库进 Blast 分析,MEGA 6.0 软件分析序列同源性,以 Neighbor - Joining 方法构建系统发育树^[24],Bootstrap (1 000 次重复) 进行检验。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株分离、纯化结果

从白芨根际土壤中分离得到 35 株细菌和 10 株真菌,拮抗菌株筛选研究发现,对白芨致病菌有抑菌活性的菌株共计 14 株 (表 1、表 2)。其中,对白芨根腐菌有抑菌作用的菌株有 14 株,占拮抗菌总株数的 100%;对白芨叶斑霉病菌、白芨叶褐斑病菌、块茎腐烂病菌有抑菌作用的菌株 9 株,占拮抗菌总株数的 64.29%。在上述 14 株具有抑菌效果的微生物菌株中,BJ-169、BJ-017、BJ-135、BJ-002、BJ1-07、BJ2-04 对 4 种供试致病菌均有较好的抑菌活性。

表 1 8 株白芨根际土壤细菌对 4 种供试菌株的抑菌作用

菌株编号	对白芨致病菌抑制情况			
	白芨叶褐斑病菌	叶斑霉病菌	块茎腐烂病菌	白芨根腐菌
BJ-169	+++	++	++	++
BJ-017	+	++	++	++
BJ-175	++	++	-	++
BJ-135	++	++	+	++
BJ-179	-	+	-	+++
BJ-007	-	-	-	+++
BJ-070	-	-	-	+
BJ-002	+++	+	++	++

注:“+++”表示抑菌作用明显 (抑菌率 > 60%);“++”表示抑菌作用较明显 (抑菌率为 40% ~ 60%);“+”表示抑菌作用有效果但不明显 (抑菌率 < 40%);“-”表示无抑菌效果。下表同。

表 2 6 株白芨根际土壤真菌对 4 种供试菌株的抑菌作用

菌株编号	对白芨致病菌抑制情况			
	白芨叶褐斑病菌	叶斑霉病菌	块茎腐烂病菌	白芨根腐菌
BJ2-03	-	-	++	++
BJ1-02	++	+	-	+
BJ1-07	+	++	+	+
BJ1-10	+	-	-	++
BJ2-04	+	+	+	+
BJ2-06	-	-	+	+

2.2 拮抗菌株鉴定

8 株拮抗细菌同源性分析结果 (图 1) 表明,菌株 BJ-169 芽孢杆菌 *Bacillus* sp. (KX360745) 的序列同源性高达 100%,它们位于系统发育树同一分支上;综合同源性比对结果,BJ-135 属甲基营养型芽孢杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*);BJ-175 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*);菌株 BJ-179 与梭形芽孢杆菌 *Lsiniabacillus* sp. (MF784470) 的序列同源性达 100%;BJ-7 属于嗜气杆菌属 *Sporosarcina* sp. (KY465523);BJ-70 燕麦属 *Acidovorax* sp. (KF999729);菌株 BJ-2 与假单胞菌属 *Pseudomonas* sp. (KJ642347);6 株拮抗真菌同源性比对结果 (图 2),BJ2-4、BJ2-6 与 *Aspergillus udagawae*

(LC317462)的同源性 100%,它们位于系统发育树的同一分支上,综合同源性比对结果和 BJ2-4、BJ2-6 与曲霉在发育系统中的位置,该菌株应属于曲霉;BJ2-9 与 *Trichoderma asperellum* (MF808619)的序列同源性达到 100%,它们位于系统发育树的同一分支上,综合同源性比对结果和在发育系统中的位置,该菌株应属于刺孢木霉;菌株 BJ2-3 与 *Aspergillus tubingensis* (MG647866)序列同源性达 100%,综合同源性比对

结果和 BJ2-3 在发育系统中的位置,该菌应属于 *Aspergillus tubingensis*;菌株 BJ1-7 与 *Penicillium oxalicum* (MG543697)序列同源性达 100%,综合同源性比对结果和 BJ1-7 在发育系统中的位置,该菌应属于 *Penicillium oxalicum*;菌株 BJ1-2 与 *Trichoderma effusum* (MF040213、MF136544)序列同源性达 100%,综合同源性比对结果和 BJ1-2 在发育系统中的位置,该菌株属木霉属。

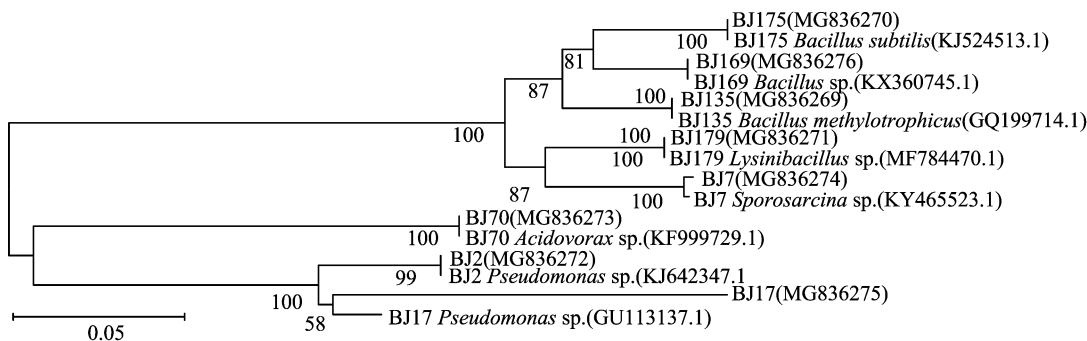


图1 细菌菌株的系统发育

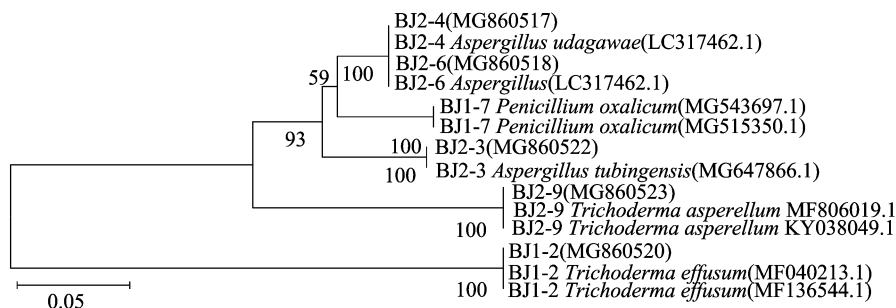


图2 真菌菌株的系统发育树

3 讨论

从白芨根际土壤中分离得到 35 株细菌和 10 株真菌,其中对白芨致病菌有抑菌活性的菌株共计 14 株,这些菌株对白芨根腐病菌、白芨灰霉菌、白芨黑斑病菌以及白芨块茎腐烂病菌都有不同程度的抑制作用,其中 6 种菌株对供试菌株都有拮抗作用,且抗菌活性较强。分别采用细菌 16S rRNA 和真菌 18S 基因序列对分离出的细菌和真菌进行分子生物学鉴定^[11],发现这些细菌主要分布在芽孢杆菌属中、真菌主要分布在木霉属中,甲基营养型芽孢杆菌是 2011 年才被鉴定的新种,刘利强等利用该菌种防治黄瓜灰霉病^[8]。枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌作为芽孢杆菌属的重要成员^[25],在防治传统农业产品病害的同时,也逐渐用于人参病害生物防治。据已有的报道显示,枯草芽孢杆菌广泛应用于植物根部^[26]、枝干^[27]、叶^[28]、花部以及果蔬采摘后病害的防治方面,甚至用于人和动物疾病的治疗和预防。因此,本研究首次从白芨根际土壤中分离得到的这 2 种芽孢杆菌可能与枯草芽孢杆菌^[29]在一些生理活性上具有密切关联性,比如它们的抑菌活性。除此之外,本研究中分离得到的芽孢杆菌属中存在大量抑制白芨根腐病菌、叶斑霉病病菌、白芨叶褐斑病菌以及白芨块茎腐烂病菌的活性菌。目前,普遍的观点认为芽孢杆菌主要通过营养和空间位点竞争、抗菌物质产生、溶菌作用、诱导植物抗病性等方面来发挥其防病促生作用^[30-31]。正是通

过这些相关机制,芽孢杆菌杀菌剂对多种植物病原菌产生较强的拮抗作用,并同时具备环境兼容性好、抗逆性强、对人畜安全、不易产生抗药性等优点^[29]。因此,利用所获得的具有抗菌活性的芽孢杆菌进行深入研究、开发相关微生物菌剂是后续要进行的重要工作之一。自发现木霉菌对植物病原真菌有拮抗作用以来,科学家们从诸多方面开展了木霉菌的生防研究。由于木霉菌的拮抗作用具有广谱性,目前已被认为是用于植物病害生物防治最有潜力的生防菌之一。据已有研究报道,木霉对人参锈腐菌等引发的人参根部病害有较好的防治效果。丁万隆等研究发现,木霉菌剂可显著降低西洋参立枯病的发病率^[13]。本试验结果表明,白芨根际病原菌受到木霉菌抑制后有明显的生长停滞甚至萎缩现象,据已知木霉菌生防机制,推测可能是木霉菌生长速度快,对病原菌形成营养和空间的双重竞争,使病原菌因缺乏营养和空间而萎缩;另外也可能是木霉对病菌菌丝的重寄生作用,导致病菌菌丝生长受到抑制。本试验筛选出的 14 株拮抗菌对 4 种白芨致病菌均有较强的抑菌活性,证明其在白芨病害生物防治领域有较大的应用潜力。后续将深入探索上述菌株对白芨致病菌的抑菌作用机制,结合田间病害防效测定,为白芨病害生物防治提供科学依据。

参考文献:

[1]王跃华,陈燕,刘曼,等. 培育优质白芨及苗条件筛选研究[J].

- 江苏农业科学,2018,46(20):165-167.
- [2] 王大群,赵仁全,刘海,等. 白及的成分、药理作用和临床应用研究进展[J]. 中国药业,2017,26(2):93-96.
- [3] He X R, Wang X X, Fang J C, et al. *Bletilla striata*: medicinal uses, phytochemistry and pharmacological activities [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2017, 195(2): 20-38.
- [4] 陈颖潇,何胥,施洁君,等. 黄瓜霜霉病生防菌株的筛选及防病促生研究[J]. 安徽农业科学,2015,43(23):121-124.
- [5] 李天来,杨丽娟. 作物连作障碍的克服——难解的问题[J]. 中国农业科学,2016,49(5):916-918.
- [6] 范志航,李波,于侦云,等. 微生物肥“宁盾”对番茄青枯病的生防效果[J]. 安徽农业科学,2015,43(24):87-88,121
- [7] 李勇,赵东岳,丁万隆,等. 人参内生细菌的分离及生防菌株的筛选[J]. 中国中药杂志,2012,37(11):1532-1535.
- [8] 刘利强,杨士玲,陈强,等. 30亿个/g甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂防治黄瓜灰霉病田间药效试验[J]. 现代农业科技,2014(9):130-133.
- [9] 刘兆迪,解修超,陈文强,等. 药用植物三尖杉内生真菌的分离鉴定及抗菌活性[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(9):128-132.
- [10] 王瑞飞,康春晓,许圆圆,等. 怀地黄内生细菌的分离鉴定及抗菌活性[J]. 江苏农业科学,2017,45(13):82-86.
- [11] 梁勤,乔登嫣,马小明,等. 甘肃道地中药大黄、黄芩对多重耐药菌的抑菌活性[J]. 西部中医药,2014,27(5):5-7.
- [12] 邹庆甲,王树桐,梁魁景,等. 河北省苹果园根际土壤中疑似致病镰孢菌种类[J]. 菌物学报,2014,33(5):976-983.
- [13] 丁万隆,程惠珍,陈君. 应用木霉制剂防治几种药用植物病害的研究[J]. 中国中药杂志,2003,28(1):28-31.
- [14] 王超,郭坚华,席运官,等. 拮抗细菌在植物病害生物防治中应用的研究进展[J]. 江苏农业科学,2017,45(18):1-6.
- [15] National Institute of Allergy and Infectious Diseases (US). NIAID global health research plan for HIV/AIDS, malaria, and tuberculosis [M]. National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, US Department of Health and Human Services, 2001.
- [16] Jiang C M, Shi J L, Liu Y L, et al. Inhibition of *Aspergillus carbonarius* and fungal contamination in table grapes using *Bacillus subtilis* [J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 41-48.
- [17] Chen D, Liu X, Li C, et al. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt [J]. *Journal of Environmental Management*, 2014, 137(4): 120-127.
- [18] 贾斌,赵贞丽,沈国娟,等. 人参黑斑病生防用内生拮抗菌分离鉴定及发酵浓缩液性质[J]. 中国森林病虫,2014,33(3):5-10.
- [19] 张德珍,李鹏昌,陈晓霞,等. 山东省小麦根腐病病原菌的分离鉴定[J]. 植物保护学报,2016,43(2):233-240.
- [20] 陈天祥,孙权,顾欣,等. 设施蔬菜连作障碍及调控措施研究进展[J]. 北方园艺,2016,40(10):193-197.
- [21] Xiang Z Y, Zhang L, Zhang Q F. Soil nutrients and microbial functional diversity of different stand types in Qinghai Province [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, 50(4): 22-31.
- [22] 魏崃,王伟威,李馨园,等. 大豆抗腐霉根腐病的生理差异研究[J]. 大豆科学,2017,36(3):425-429.
- [23] Mann J. Natural products as immunosuppressive agents [J]. *Natural Product Reports*, 2001, 18(4): 417-430.
- [24] 翁远超,刘静雯,崔璨,等. 秦皮中化学成分的分离鉴定及其体外抑菌活性[J]. 中国药物化学杂志,2014(1):40-47.
- [25] 彭震,王春娟,陈庆河,等. 生物肥料“宁盾”对大豆疫霉病的防效及对毛豆的促生作用[J]. 上海农业学报,2014,30(6):95-98.
- [26] 刘琴,刘翼,何月秋,等. 我国植物病害生物防治综述[J]. 安徽农学通报,2012,18(7):67-69.
- [27] 王琴,高青,缪卫国,等. 3种生防细菌2种药剂剂型对芒果炭疽病菌的拮抗作用初探[J]. 广东农业科学,2014,41(11):82-88.
- [28] 郎多勇,张文晋,解植彩,等. 宁夏产甘草内生细菌分离纯化、拮抗植物病原菌菌株的筛选及鉴定[J]. 时珍国医国药,2017(9):184-186.
- [29] 陈志谊. 芽孢杆菌类生物杀菌剂的研发与应用[J]. 中国生物防治学报,2015,31(5):723-732.
- [30] 吴林坤,林向民,林文雄. 根系分泌物介导下植物-土壤-微生物互作关系研究进展与展望[J]. 植物生态学报,2014,38(3):298-310.
- [31] 周文杰,吕德国,秦嗣军. 植物与根际微生物相互作用关系研究进展[J]. 吉林农业大学学报,2016,38(3):253-260.

(上接第99页)

- [4] 胡丹丹,黄山,李斌,等. 藏荆芥与荆芥的挥发性成分比较[J]. 中成药,2016,38(5):1078-1082.
- [5] 臧林泉,胡枫,韦敏,等. 荆芥挥发油抗肿瘤作用的研究[J]. 广西中医药,2006,29(4):60-62.
- [6] 兰海梅,陈宝田,杨柳. 荆芥连翘汤浸泡治疗小腿慢性溃疡临床观察[J]. 四川中医,2006,24(9):80-82.
- [7] 赵蓉,陈大蓉. 中西医结合治疗成人水痘临床观察[J]. 实用中医药杂志,2008,24(1):36.
- [8] 何婷,陈恬,曾南,等. 荆芥挥发油体外抗甲型流感病毒作用及机制的研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(3):51-55.
- [9] 汤奇,杨发龙,曾南,等. 荆芥挥发油及其主要成分抗流感病毒作用研究[J]. 中药药理与临床,2012,28(2):29-32.
- [10] Kumar R, Mishra A K, Dube N K, et al. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, 115(2): 159-164.
- [11] Jardim C M, Jham G N, Dhingra O D, et al. Composition and antifungal activity of the essential oil of the Brazilian *Chenopodium ambrosioides* L. [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2008, 34(9): 1213-1218.
- [12] 聂小妮,梁宗锁,段琦梅,等. 土荆芥挥发油的化学成分及抗菌活性研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2010,38(11):151-155.
- [13] 李元,廖颖,严伟,等. 四川土荆芥精油对植物病原真菌的抗菌活性[J]. 生态环境学报,2010,19(5):1176-1181.
- [14] 杨汝德. 现代工业微生物学实验技术[M]. 北京:科学出版社,2009:250-259.
- [15] 陈国妮,孙飞龙,闫亚茹,等. 马齿苋萜类化合物抑菌机理研究[J]. 化学与生物工程,2015,32(10):34-37.
- [16] 杨海清. 桃褐腐病菌致病性及拮抗细菌生防机制的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2007.
- [17] 马迪根 M T, 马丁克 J M. 微生物生物学[M]. 李明春,杨文博,译. 11版. 北京:科学出版社,2009.