

黄瓜立枯病高效拮抗菌的筛选与鉴定

游成真¹ 李平兰¹ 张志刚² 何佳庆¹ 刘静媛¹ 韩玉竹^{1,3*}

(1. 中国农业大学 食品科学与营养工程学院,北京 100083;

2. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所,北京 100081;

3. 西南大学 荣昌校区动物科学系,重庆 402460)

摘要 为获得对黄瓜立枯病具有显著防效的优良菌株,以从果蔬体内、根际土壤等多生境中分离的100株细菌为出发菌株,采用平板对峙法和拌土法对100株供试菌株进行初筛和复筛。初筛得到8株能显著抑制立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的菌株(抑菌带直径 $D>0.60$ cm);复筛进一步分析表明,其中3株菌能够显著促进黄瓜幼苗的生长和高效防治苗期立枯病害,与对照相比,黄瓜幼苗壮苗指数分别增加16.22%(60)、13.48%(K13)和43.04%(Z84),相对防效分别达67.53%(60)、59.42%(K13)和77.27%(Z84);通过形态观察、生理生化试验及16S rDNA同源性序列对比分析,将60、K13和Z84菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),可为蔬菜苗期高效微生物制剂的开发提供微生物资源。

关键词 拮抗细菌;黄瓜;立枯丝核菌;芽孢杆菌

中图分类号 S 482.292

文章编号 1007-4333(2015)01-0090-06

文献标志码 A

Screening and identifying antagonistic bacteria against *Rhizoctonia solani* on damping-off disease of cucumber

YOU Cheng-zhen¹, LI Ping-lan¹, ZHANG Zhi-gang², HE Jia-qing¹, LIU Jing-yuan¹, HAN Yu-zhu^{1,3*}

(1. College of Food Science and Nutrition Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China;

2. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

3. Department of Animal Science, Rongchang Campus, Southwest University, Chongqing 402460, China)

Abstract In the study, 100 bacterial strains from some vegetables or rhizosphere soil were used to screen antagonistic bacteria against *Rhizoctonia solani* by the dual culture method. Eight strains of bacterial antagonists were isolated and their inhabiting zone against *R. solani* was more than 0.60 cm. Through application of cucumber seedlings, three of the eight antagonists could increasingly promote the growth of cucumber seedlings. Seedling indices were 16.22% (60), 13.48% (K13) and 43.04% (Z84) respectively compared to the control seedlings. Meanwhile, three strains (60, K13 and Z84) of the six strains could increasingly prevent the cucumber damping-off disease with the control efficiency of 67.53%, 59.42% and 77.27% respectively. According to the characteristics of morphology, the physiology and biochemistry test and the comparison of 16S rDNA sequence, three strains (60, K13 and Z84) were identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. The three strains of antagonistic bacteria can be used as a biological control agency to control the cucumber damping-off disease.

Key words antagonistic bacteria; cucumber; *Rhizoctonia solani*; *Bacillus*

立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)是一种全球性以危害茄科、葫芦科和禾本科等作物的土传病原真

菌^[1],该病害经常造成大面积缺苗和毁灭性的损失^[2]。目前主要采用化学药剂防治立枯病,它们自

收稿日期:2014-04-04

基金项目:公益性行业(农业)科研专项经费项目(201103014);国家自然科学基金资助项目(31172001);西南大学博士基金(2013Bsr06)

第一作者:游成真,硕士研究生,E-mail:youchengzhen@cau.edu.cn

通讯作者:韩玉竹,讲师,主要从事应用微生物的研究,E-mail:hyz_gs@163.com

身具有抵抗病原菌的活性或转化的衍生物具有杀死病原菌的活性^[3]。但是长期过量使用化学药剂不仅对环境造成污染,而且农药残留对人类健康也存在潜在的危害。生物防治以其具有高效、环保等优点^[4],备受学者们的关注。

国内外有关木霉属 *Trichoderma* spp. 菌株防治立枯病的研究报道较多^[5-7],张广志等^[8]从玉米根际土壤中分离出的绿色木霉 *T. viride* 可通过竞争和寄生作用对立枯病达到较好的防治效果。另外,王刚等^[9]从黄瓜根际土壤中分离的荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 对立枯丝核菌有显著的抑制作用。目前,很多研究仅关注于从单一环境中分离的微生物来防治植物立枯病,郑爱萍等^[10]仅从水稻环境中分离对水稻纹枯病(*R. solani*)的拮抗菌,高增贵等^[11]仅从玉米体内筛选对玉米纹枯病菌(*R. solani* Kühn AG1-1A)的生防菌。

为寻找生防菌资源,开发高效、低毒生物农药,探索控制农作物土传真菌病害的生物防治途径,本研究从实验室已有的多种果蔬体内、根际土壤等生长环境中分离得到 100 株具有生防潜力的细菌,研究其对黄瓜幼苗生长的影响及对黄瓜立枯病的防治效果,筛选得到优良拮抗细菌并确定其系统发育学地位,旨在为黄瓜苗期根际微生物制剂的研制,降低黄瓜苗期病害发生奠定基础并提供微生物资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病原真菌:立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*),由中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)提供,编号为 36124。

黄瓜种子:中农 203 号,由中国农业科学院提供。

LB 液体培养基^[2]:蛋白胨 10 g/L,NaCl 10 g/L,酵母膏 5 g/L,pH 7.0~7.2,固体培养基则加入琼脂 20 g/L。

PDA 固体培养基^[12]:去皮马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,固体培养基则加入琼脂 20 g/L。制作方法是去皮马铃薯切成小块煮沸 30 min,8 层纱布过滤,自来水补足 1 L 并加入葡萄糖及琼脂,煮沸,pH 自然。

主要试剂:酵母膏、蛋白胨和琼脂等购于北京奥博星生物技术有限责任公司;氯化钠、葡萄糖等试剂均为分析纯,购于北京蓝弋化工产品有限责任公司;

细菌微量生化反应管,购于杭州天和微生物试剂有限公司;DNA 提取及 PCR 所用试剂均购于北京博迈德科技发展有限公司。

1.2 供试细菌菌悬液的制备

取供试细菌斜面培养物接种于 LB 液体培养基,振荡培养(30 °C,200 r/min),24 h 后所得菌液在 10 000 r/min、4 °C 下离心 10 min,离心所得菌体用无菌水洗涤 3 次,以梯度稀释法计数,调整菌体至 10⁸ CFU/mL 备用。

1.3 供试细菌对立枯丝核菌平板抑制活性的检测

平板对峙法^[13]筛选:将 25 °C 培养 3 d 的立枯丝核菌菌饼(直径 5 mm)置于 PDA 培养基中央,取供试细菌菌悬液 2 uL 分别接种于距立枯丝核菌菌饼 2.5 cm 处,以无菌水为对照组。28 °C 培养 48 h,计算抑菌带直径,抑菌带直径=抑菌圈直径-拮抗细菌菌落直径。选取拮抗区明显的细菌菌株(抑菌带直径>0.6 cm)进行盆栽试验测定。

1.4 温室盆栽试验

1.4.1 初筛细菌对黄瓜苗期的促生作用

用次氯酸钠溶液对黄瓜种子表面消毒后,进行催芽处理。育苗基质为 V(草炭):V(蛭石):V(珍珠岩)=3:1:1 的混合基质^[14]。将初筛的 8 株拮抗细菌的菌悬液分别与灭菌的基质混匀,达到 10⁷ CFU/cm³,装入 90 mm×60 mm×80 mm 营养钵中。选取芽长一致(0.5 cm)的种子播于营养钵中,然后覆盖 1.0 cm 厚的蛭石。幼苗在日光室温室自然条件下生长,平均温度:昼(25±3)°C/夜(15±3)°C,平均相对湿度 80%~95%。对照为等量灭菌蒸馏水。每个处理 3 个重复,每个重复 5 钵。处理后 40 d,进行黄瓜幼苗株高、茎粗、茎叶及根系鲜重的测定。筛选出对黄瓜幼苗生长无抑制作用的拮抗细菌进行后续研究。

壮苗指数=茎粗(cm)/株高(cm)×全株干重(g)^[15]

1.4.2 拮抗细菌对黄瓜立枯病的防效

将 1.4.1 筛选得到的 6 株对黄瓜幼苗无抑制作用的拮抗细菌菌悬液分别与灭菌育苗基质混合均匀,使细菌悬液达到 10⁷ CFU/cm³ 基质,装入营养钵中。用次氯酸钠溶液对黄瓜种子进行催芽处理,选取芽长一致(0.5 cm)的种子播于营养钵中,播种同时在距种子 1 cm 处均匀放置在 PDA 培养基上培养 3 d 的病原菌菌饼 5 片(直径 5 mm),菌丝面向下,然后覆盖一层无菌蛭石^[14]。幼苗在日光室温室自然条件下生长,平均温度:昼(25±3)°C/夜(15±

3) °C, 平均相对湿度 80%~95%。同时设置只接病原菌的对照(CK)。每个处理 3 个重复, 每个重复 5 钵。统计出苗情况, 并根据方中达等^[16]的分级标准统计病害严重度, 以基质单接病原菌为对照计算病情指数及相对防效。

病害分级标准

0 级: 无病。

1 级: 茎基部有小病斑, 占茎围的 1/4 以下。

2 级: 茎基部的病斑较大, 约占茎围的 1/4~1/2。

3 级: 茎基部的病斑占茎围的 1/2 以上, 但尚未破坏整个茎围。

4 级: 茎基部的病斑占据全部茎围, 植株死亡。

病情指数/% = $\frac{\sum(\text{病情级别} \times \text{该级株数})}{\text{调查总株} \times \text{最高发病级别}} \times 100$;

相对防效/% = $\frac{(\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数})}{\text{对照组病情指数}} \times 100$ 。

1.5 优良拮抗细菌的鉴定

1.5.1 形态学与生理生化鉴定

将优良拮抗细菌菌株接种于 LB 固体培养基上, 30 °C 培养 24 h 后观察菌落形态并革兰氏染色后镜检。参照《伯杰细菌鉴定手册》^[17] 和《常见细菌系统鉴定手册》^[18], 采用细菌微量生化反应管对糖醇利用、硝酸盐还原、大分子利用、各种酶类的利用以及生长温度、耐盐性等十几项生理生化指标进行测定。

1.5.2 16S rDNA 序列分析

采用 CTAB 法^[19] 提取优良拮抗细菌基因组 DNA, 电泳检验基因组质量, 置 -20 °C 保存备用。选用细菌的通用引物(27F: 5'-AGAGTTTGATCC-TGGCTCAG-3', 1492R: 5'-GGTTACC TTGTTA-

CGACTT-3'), 以目标菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 最后在 72 °C 下延伸 10 min。PCR 反应产物纯化后, 连接 T 载体后测序(北京博迈德生物技术有限公司), 将结果与 GenBank 中收录的其他菌株序列进行相似性比对(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

1.6 数据统计与分析

采用 Excel 和 SAS 软件进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 供试细菌对立枯丝核菌的平板抑制活性

从果蔬体内、根际土壤等环境分离的 100 株细菌中, 通过平板对峙法, 初步筛选出 45 株对立枯丝核菌均有抑制效果的菌株, 其中 8 株(60、81、86、C621、H16、K13、Z13 和 Z84) 抑菌作用最强, 抑菌带直径在 0.61~0.78 cm (图 1、图 2), 用于后续盆栽试验。

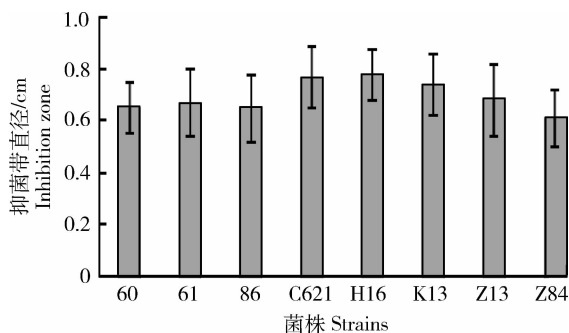


图 1 生防菌株对立枯丝核菌的拮抗活性

Fig. 1 Inhibition zone of tested bacteria against *R. solani*

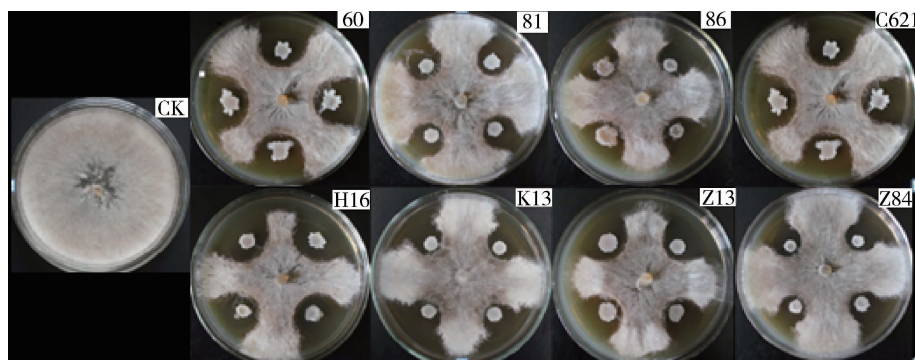


图 2 生防菌株对立枯丝核菌的拮抗现象

Fig. 2 Inhibitory activity of tested bacteria against growth of *R. solani*

2.2 温室盆栽试验结果

2.2.1 初筛细菌对黄瓜幼苗的促生效果

盆栽试验结果表明,除 81 和 C621 对黄瓜幼苗的生长产生抑制作用外,其余 60、86、H16、K13、Z13 和 Z84 等 6 菌株对黄瓜幼苗均有促生效果,其中 60、86、Z13 和 Z84 能显著性增加幼苗地上部鲜重,与对照相比分别增加了 13.5%、16.5%、12.6%和

30.0%;60、86 和 Z84 还可显著性增加幼苗的总生物量,与对照相比分别增加了 17.0%、18.1%和 23.4%。壮苗指数是一项复合指标,可较全面的反映幼苗的质量及发育状况。从壮苗指数来看,60、86、K13 和 Z84 均显著地优于对照,较对照提高了 13.5%~43.1%(表 1)。

表 1 初筛菌株对黄瓜幼苗生长的影响
Table 1 Effect of 8 strains on growth of cucumber seedlings

菌株 Strain	株高/cm Plant height	地上鲜重/g Shoot biomass	地下鲜重/g Root biomass	总生物量/g Total biomass	壮苗指数 Seedling index
CK	9.44±0.35 b	3.33±0.19 c	0.82±0.05 b	4.15±0.19 b	0.157 9 b
60	9.58±0.40 b	3.78±0.07 b	1.07±0.06 a	4.85±0.22 a	0.183 5 a
81	8.53±0.26 c	2.49±0.08 d	0.41±0.01 c	2.91±0.08 c	0.123 8 c
86	9.00±0.30 bc	3.88±0.06 b	1.01±0.03 ab	4.90±0.14 a	0.203 0 a
C621	8.17±0.11 c	2.50±0.09 d	0.51±0.01 c	3.01±0.09 c	0.111 9 c
H16	9.25±0.23 b	3.53±0.20 c	0.85±0.02 b	4.38±0.30 b	0.178 8 ab
K13	10.05±0.20 a	3.66±0.13 bc	1.01±0.04 ab	4.67±0.20 ab	0.179 2 a
Z13	10.07±0.17 a	3.75±0.12 b	0.77±0.01 bc	4.52±0.40 ab	0.167 9 b
Z84	9.23±0.35 b	4.33±0.09 a	0.81±0.03 b	5.14±0.21 c	0.225 9 a

注:每列数字后相同字母表示在 0.05 水平上无显著差异。下表同。

Note: Values followed by the same letters in each lumn are not significantly different at 0.05 level from each other according to Duncan Test. The same as follows.

2.2.2 拮抗细菌对黄瓜立枯病的防治效果

盆栽生防试验结果表明:筛选的 6 株拮抗细菌中对黄瓜立枯病均有一定的防效作用,其中分别来源于 60、K13 和 Z84 防治效果最为显著,相对防效分别达 67.53%、59.42%和 77.27%(表 2)。

表 2 拮抗细菌对黄瓜立枯病的盆栽防治效果
Table 2 Control effect of 6 strains on cucumber damping-off disease

菌株 Strain	病情指数 Disease index	相对防效/% Control effect
CK	3.08±0.16	—
60	1.00±0.05	67.53 a
86	1.75±0.04	43.18 b
H16	2.00±0.01	35.06 b
K13	1.25±0.04	59.42 a
Z13	1.85±0.06	39.94 b
Z84	0.70±0.02	77.27 a

注:“—”无防治效果。

Note:“—” No control effect.

2.3 优良拮抗细菌的鉴定

2.3.1 菌落及菌体特征

3 菌株(60、K13 和 Z84)在 LB 培养基上均呈白色不透明(图 2);60 菌落表面不光滑,有凸起,菌落边缘规则,质地干燥;K13 菌落表面粗糙,有凸起,边缘不规则;Z84 菌落表面光滑,边缘规则,质地粘稠,挑起时呈不易拉断的丝状;3 菌株菌体特征相似,表现为革兰氏染色阳性,呈杆状,染色均匀,兼性好氧,芽孢多为内生。

2.3.2 生理生化鉴定

根据 3 细菌的形态特征和生理生化试验结果(表 3),初步鉴定 60、K13 和 Z84 为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)或解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)。

2.3.3 分子生物学鉴定

60、K13 和 Z84 菌株经测序分析,16S rDNA 序列长度分别为 1 459、1 455 和 1 459 bp。在 GeneBank 数据库中进行 BLAST 同源性检索,以 16S rDNA 序列同源性为基础绘制系统发育树(图 3)。60、K13 和 Z84 菌株与 *B. amyloliquefaciens*

表3 优良拮抗细菌生物的生化反应

Table 3 Physiological characteristics of 3 strains

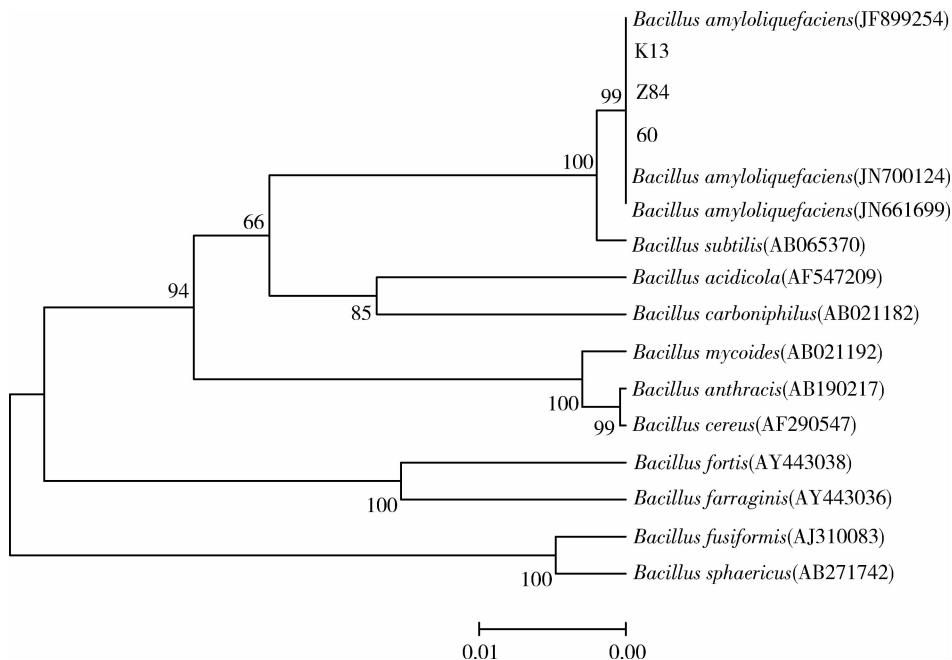
项目 Item	菌株 Strain			项目 Item	菌株 Strain		
	60	K13	Z84		60	K13	Z84
革兰氏反应	+	+	+	酪素水解	+	+	+
V-P 反应	-	-	-	酵母水解	+	+	+
甲基红反应	+	+	+	柠檬酸铵利用	+	+	+
接触酶	+	+	+	丙酸钙	-	-	-
葡萄糖	+	+	+	明胶水解	+	+	+
阿拉伯糖	+	+	+	海藻酸钠	+	+	+
木糖	+	+	+	NaCl 2%	+	+	+
甘露糖	+	+	+	NaCl 5%	+	+	+
甘露醇	+	+	+	NaCl 7%	+	+	+
淀粉水解	+	+	+	NaCl 10%	+	+	+

注: +为阳性反应; -为阴性反应。

Note: + represent positive reaction; - represent negative reaction.

位于同一分支上。此外,60 与 *B. amyloliquefaciens* NK3-15 (JN661699) 同源性高达 99%; K13 与 *B. amyloliquefaciens* Hk3-1 (JF899255) 同源性达

99%; Z84 与 *B. amyloliquefaciens* L11 (JN700124) 同源性达 99%。因此,经鉴定菌株 60、K13 和 Z84 为解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens*。



标尺表示每 100 个 16S rDNA 碱基序列中有 1 个碱基替换。

Rule represents a nucleotide replacement among 100 16S rDNA nucleotide sequence.

图3 以 16S rDNA 序列为基础的 60、K13 和 Z84 的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of three strains 60, K13 and Z84 on 16S rDNA sequence homology

3 讨论

植物生防细菌是生存在土壤或植物根际、茎叶的具有促进植物生长、防治植株病害、增加作物产量

的一种或多种功能的有益菌^[20]。国内外已发现包括假单胞菌 (*Pseudomonas*)、芽孢杆菌 (*Bacillus*)、土壤杆菌 (*Agrobacterium*) 和沙雷氏菌 (*Serratia*) 属等 20 多个种属的根际微生物具有防病促生的潜

能^[21]。芽孢杆菌分布广泛,存在于多种土壤和植物中,并且具有很强的拮抗作用和抗逆能力,是植物病害生防细菌的重要来源^[22]。李晶等^[23]采用枯草芽孢杆菌种剂对大豆根腐病的田间防效高达56.3%~89.1%。黄曦等^[24]发现芽孢杆菌产生的蛋白类和脂肽类物质对荔枝炭疽病有较好的防治效果。本研究盆栽试验表明,3株拮抗细菌不仅对黄瓜幼苗有明显的促生作用,而且对黄瓜立枯病具有一定的防治效果。

目前,已有学者采用芽孢杆菌对立枯丝核菌进行拮抗试验,从而到达防治植物病害的作用。杜志兵等^[25]从棉花根际分离得到的1株枯草芽孢杆菌对立枯丝核菌有显著的拮抗作用;Guo等^[26]利用*B. subtilis* strain NCD-2分泌的fency抗菌物防治立枯病。现阶段,学者们主要研究枯草芽孢杆菌对立枯丝核菌的拮抗作用,而利用解淀粉芽孢杆菌来防治黄瓜苗期立枯病的报道较少。

根据3株菌(60、K13和Z84)的形态特征和理化特性,将其初步均鉴定为枯草芽孢杆菌*B. subtilis*或解淀粉芽孢杆菌*B. amyloliquefaciens*。经16S rDNA序列分析,3株菌与解淀粉芽孢杆菌*B. amyloliquefaciens*同源性最高,最终将3株菌鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

筛选得到的3株高效拮抗菌对黄瓜幼苗的促生和立枯病的防治均有较好的效果,有待于研究其对其他蔬菜促生和病害的防治效果,进一步研究优良菌株对蔬菜幼苗根际环境养分增持、促生和病原拮抗等的复配效果,及开发系列新型高效蔬菜苗期促生菌产品。总之,本研究筛选得到具有较好应用潜力的3株拮抗菌,为蔬菜苗期生物资源的开发利用奠定了基础并提供菌种资源。

参 考 文 献

- [1] Yacine G, Omrane T, Amine K, et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off and promotion of tomato plant growth by endophytic actinomycetes isolated from native plants of Algerian Sahara[J]. Microbiol Res, 2014, 169: 59-165
- [2] 颜思齐, 吴帮承, 唐富富, 等. 禾谷类作物纹枯病研究 I: 水稻、玉米、小麦纹枯病和棉花立枯病四者之间的关系[J]. 植物病理学报, 1984, 14(1): 25-32
- [3] 夏伟, 张红, 颜艳伟, 等. 棘孢木霉 L4 对立枯丝核菌的拮抗机制[J]. 植物保护学报, 2010, 37(5): 477-478
- [4] 何迎春, 高必达. 立枯丝核菌的生物防治[J]. 中国生物防治, 2000, 16(1): 31-34
- [5] Lewis J A, Lumsden R D. Biocontrol of damping-off greenhouse-grown crops caused by *Rhizoctonia solani* with a formulation of *Trichoderma* spp[J]. Crop Prot, 2001 (20): 49-56
- [6] 朱廷恒, 邢小平, 孙顺娣. 木霉 T₉₇ 菌株对几种植物病原真菌的拮抗作用机制和温室防治试验[J]. 植物保护学报, 2004, 31(2): 139-144
- [7] Raquel da S A, Andrei S S, Marcelo H S R, et al. Biochemical characterization induced by a 27 kD 1, 3-β-D-glucanase from *Trichoderma asperellum* induced by cell wall of *Rhizoctonia solani* [J]. Carbohydr Polym, 2012, 87(2): 1219-1223
- [8] 张广志. 木霉对玉米纹枯病(*Rhizoctonia solani* Kühn)生物防治的初步研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2005
- [9] 王刚, 李志强, 彭娟, 等. 利用植物根际细菌生物防治黄瓜立枯病研究[J]. 北方园艺, 2009(3): 52-54
- [10] 郑爱萍, 李平, 孙惠青, 等. 水稻纹枯病拮抗菌的筛选及田间小区防治水稻纹枯病的效果[J]. 中国生物防治, 2001, 17(4): 188-189
- [11] 高增贵, 陈捷, 冯晶, 等. 玉米纹枯病拮抗内生细菌的筛选[J]. 植物保护学报, 2005, 32(4): 357-361
- [12] 孔维嘉. 抗黄瓜苗立枯病芽孢杆菌的筛选鉴定及生防机制初探[D]. 北京: 中国农业大学, 2012
- [13] 黄新琦, 雍晓宇, 沈其荣, 等. 土传黄瓜立枯丝核病高效拮抗菌的筛选鉴定及其生物效应[J]. 植物保护学报, 2012, 39(1): 45-50
- [14] 常冬梅, 张志刚, 尚庆茂. 根际接种芽孢杆菌对辣椒和黄瓜壮苗形成的作用[J]. 中国蔬菜, 2010(6): 53-57
- [15] 常冬梅. 芽孢杆菌(*Bacillus* spp)根际接种促进辣椒(*Capsicum annuum* L)生长的作用机理[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010
- [16] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 农业出版社, 1998: 8-11
- [17] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 8版. 北京: 科学出版社, 1989: 729-795
- [18] 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: 256-258
- [19] 李钧敏. 土壤可培养细菌 DNA 的提取及 RAPD 条件的优化[J]. 微生物学通报, 2003, 30(5): 5-9
- [20] 常慧萍. PGPR 菌株 N2106 在小麦根部的吸附机理和定殖动态[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2009
- [21] 胡江春, 薛德林, 马成新, 等. 植物根际促生菌(PGPR)的研究与应用前景[J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1963-1966
- [22] 陈忠义, 张杰, 黄大昉. 植物病害生防芽孢杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 97-103
- [23] Li jing, Zhang shu mei, Wang yu xia, et al. Field control efficiency of a microbial seeddressing agent of *Bacillus* strain on soybean fungal root rot[J]. Microbi, 2009, 36(6): 824-846
- [24] 黄曦, 张荣灿, 王何健, 等. 枯草芽孢杆菌 ON-6 菌株抑制荔枝炭疽病活性物质的初步探究[J]. 中国农学通报, 2011, 27(13): 188-193
- [25] 杜志兵, 杜秉海, 姚良同, 等. 两株棉花立枯病拮抗菌 MH1 和 MH25 的筛选与鉴定[J]. 微生物学报, 2008, 35(2): 204-208
- [26] Qinggang Guo, Weixin Dong, Shezeng Li, et al. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease[J]. Microbiol Res, 2013, 12(1): 1-8