

研究报告

关防风根腐病拮抗细菌筛选与鉴定

陈逢玲, 孙卓*, 林红梅*, 杨利民

吉林农业大学中药材学院 省部共建生态恢复与生态系统管理国家重点实验室, 吉林 长春 130118

陈逢玲, 孙卓, 林红梅, 杨利民. 关防风根腐病拮抗细菌筛选与鉴定[J]. 微生物学通报, 2022, 49(8): 3192-3204

Chen Fengling, Sun Zhuo, Lin Hongmei, Yang Limin. Screening and identification of the antagonistic bacteria against root rot of *Saposhnikovia divaricata*[J]. Microbiology China, 2022, 49(8): 3192-3204

摘 要:【背景】由木贼镰刀菌 [*Fusarium equiseti* (Corda) Sacc.] 引起的关防风根腐病, 是近年来导致关防风产量及质量下降的主要土传病害之一。生物防治因其对环境安全及人畜无害等优势, 成为目前植物病害防治的一种有效手段。【目的】挖掘关防风根际土壤中对木贼镰刀菌具有良好拮抗作用的生防菌株。【方法】采用稀释平板法分离根际土壤细菌; 用滤纸片法和牛津杯法对拮抗细菌进行筛选和抑菌谱检测; 用抗生素标记法标记拮抗细菌并测定其定殖能力; 通过盆栽实验研究其对关防风根腐病的防效; 通过形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列确定分类学地位。【结果】从健康关防风根际土壤中分离纯化了 157 株细菌, 筛选获得对关防风根腐病菌具有显著抑菌作用的拮抗细菌 SC-119, 无菌滤液的抑菌率可达 68.53%, 而且兼具广谱抑菌能力和良好的定殖能力; 盆栽实验表明, 菌株 SC-119 对关防风根腐病的防治效果达到 67.39%, 其相对防效较接种哈茨木霉菌剂、枯草芽胞杆菌菌剂和代森锰锌分别提高了 29.03%、32.26% 和 16.13%; 对菌株 SC-119 进行分类学鉴定, 确定其为萎缩芽胞杆菌 (*Bacillus atrophaeus*)。【结论】萎缩芽胞杆菌 SC-119 对关防风根腐病菌具有良好的拮抗作用, 防效优良, 具有良好的生防潜力, 这为关防风根腐病的防治提供了优良的生防菌源, 也为菌株 SC-119 的开发利用奠定了基础。

关键词: 关防风; 拮抗细菌; 鉴定; 定殖; 防病

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFC1710700); 国家现代农业产业技术体系资助(CARS-21)

Supported by: National Key Research and Development Program of China (2019YFC1710700); China Agriculture Research System (CARS-21)

*Corresponding authors: E-mail: SUN Zhuo: 329575068@163.com; LIN Hongmei: baolinhm@126.com

Received: 2021-12-08; Accepted: 2022-02-09; Published online: 2022-03-09

Screening and identification of the antagonistic bacteria against root rot of *Saposhnikovia divaricata*

CHEN Fengling, SUN Zhuo*, LIN Hongmei*, YANG Limin

Breeding Base of State Key Laboratory of JLP-MOST for Ecological Restoration and Ecosystem Management, College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China

Abstract: [Background] *Fusarium equiseti* (Corda) Sacc. caused root rot is one of the principal soil-borne diseases that have resulted in a decline in the production and quality of *Saposhnikovia divaricata* in recent years. Because of environmental safety and no harm to humans and animals, biocontrol becomes an efficient approach for the prevention and control of plant diseases. [Objective] In order to mine the biocontrol strains with good antagonistic activity against *F. equiseti* in the rhizosphere soil of *S. divaricata*. [Methods] The dilution plate method was used to isolate bacteria from the rhizosphere soil. The antagonistic bacteria were identified via the filter paper method and the Oxford cup method. Antibiotic labeling was employed to mark antagonistic bacteria and assess their colonization capacity. Pot experiments were carried out to investigate their ability of mitigating root rot. The morphological, physiological and biochemical parameters, as well as the 16S rRNA gene sequence, were used to assess the taxonomic position. [Results] A total of 157 strains of bacteria were isolated from the healthy rhizosphere soil of *S. divaricata*, among which the antagonistic bacterial strain SC-119 with strong activity against *F. equiseti* was screened out. This strain showed an inhibition rate of 68.53% and exhibited strong colonization capacity and a broad antagonistic spectrum. In the pot experiments, SC-119 showed the control effect of 67.39%, which was 29.03%, 32.26%, and 16.13% higher than that of *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, and mancozeb, respectively. Finally, strain SC-119 was identified as *Bacillus atrophaeus*. [Conclusion] *B. atrophaeus* SC-119 has good antagonistic effect and biocontrol potential against *F. equiseti*, serving as an effective source for the biocontrol of root rot in *S. divaricata*. The findings of this study facilitate the development and utilization of strain SC-119.

Keywords: *Saposhnikovia divaricata*; antagonistic bacteria; identification; colonization; control effect

防风 [*Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk] 为伞形科多年生草本药用植物, 以干燥根入药^[1], 有解表发汗、祛风除湿、止痛的功效, 是我国常用的大宗中药材之一^[2]。东北产的防风为道地药材, 素有“关防风”之称, 主产于黑龙江安达、泰康和吉林洮安及辽宁昭盟、铁岭等地区^[3]。供给市场的关防风主要以人工栽培为主^[4], 但近年来由于关防风人工栽培技术体系不够完善, 导致关防风根腐病、立枯病和灰霉病等 10 余种病害时有发生, 其中由木

贼镰刀菌 [*Fusarium equiseti* (Corda) Sacc.] 引起的关防风根腐病危害较为严重, 一般减产 20%–30%, 严重时可达 50%–60%^[5]。目前对于关防风根腐病的防控仍依赖于化学途径^[6], 但长期大量施用化学农药引发的病原菌抗药性不断增强^[7]、农药残留和环境污染等问题, 严重影响关防风的品质和商业价值, 极大地限制了关防风产业的可持续发展, 因此亟需开辟关防风根腐病绿色防控新途径。

生物防控作为一种绿色、安全、有效的病

害管理途径^[8],目前在生态农业中已广泛应用^[9-11],是药用植物病害防控领域的研究热点之一。研究表明,以木霉属真菌(*Trichoderma* sp.)和芽胞杆菌(*Bacillus* sp.)所研制的生物菌剂,对根腐病、灰霉病和立枯病等多种植物病害具有良好的防控效果,但是市场上已推广的菌剂对植物特定病害的防控存在着针对性不强的问题。市面上生产的哈茨木霉菌剂和枯草芽胞杆菌菌剂对向日葵黄萎病的防效仅为 33.75%和 17.65%^[12]。因此,从自然生境中筛选高效的拮抗菌株对开展植物病害生物防控工作至关重要。

研究表明植物根际土壤中的拮抗细菌具有良好的生防潜力^[13-16]。目前关于关防风拮抗菌的研究鲜有报道,并且都只是针对关防风内生菌的研究^[17-18],而关于关防风根际土壤细菌的研究还未见报道,因此,本研究以关防风根际土壤为研究对象,从中分离筛选出对木贼镰刀菌具有显著抑制作用且具有广谱抑菌活性和良好定殖能力的拮抗细菌,通过形态学、生理生化特征及 16S rRNA 基因序列确定其分类学地位,并考察其室外盆栽防病效果,以期为关防风根腐病等真菌性病害的生物防控研究提供针对性强的优质菌源,同时为我国药用植物病害防控相关研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

关防风根腐病病原真菌木贼镰刀菌(*F. equiseti*)用于拮抗细菌的筛选。

九种常见作物病原真菌:关防风灰霉病病原真菌灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.)、关防风立枯病病原真菌立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)、关防风疫病病原真菌恶疫霉菌(*Phytophthora cactorum* (Leb et Cohn)

Schort.]、关防风枯萎病病原真菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* Schlecht.)、五味子黑斑病病原真菌鹅掌楸链格孢菌(*Alternaria liriodendra* T. Y. Zhang et J. Z. Zhang)、五味子茎基腐病病原真菌腐皮镰孢菌(*Fusarium solani* (mart.) App. et Wollenw.]、细辛叶枯病病原真菌槭菌刺孢菌(*Mycocentrospora acerina* (Hartig) Deighton.)、刺五加黑斑病病原真菌细极链格孢菌(*Alternaria tenuissima* (Fr) Wiltshire]和细辛菌核病病原真菌核盘菌(*Sclerotinia asari* Wu et C. R. Wang.),用于拮抗细菌抗菌谱测定。以上病原真菌均由吉林农业大学植物病理实验室提供。

采用五点取样法,于吉林农业大学药园(E125°24'59", N43°48'24", 海拔 251 m)、吉林省白城市黑水镇(E122°52'10.43", N45°11'39.01", 海拔 152 m)、吉林省洮南市永茂林场(E122°12'38.32", N45°31'58.59", 海拔 224 m)的健康关防风种植地进行土壤样品采集。根际土壤收集采用抖落法:拔出根系,去除根围土,将离主根和须根根轴表面 0-5 mm 之内附着的土壤抖到自封袋中,4℃保存、备用。

1.1.2 培养基

牛肉膏蛋白胨(NA)培养基参照文献[19]配制;马铃薯葡萄糖(PDA)培养基参照文献[20]配制;西蒙氏柠檬酸盐培养基、硝酸盐肉汤培养基、明胶水解培养基、淀粉水解培养基和 V-P 培养基等鉴定培养基参照文献[21]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

99%利福平(rifampicin, Rif),北京索莱宝科技有限公司;70%代森锰锌 800 倍液,四川润尔科技有限公司;哈茨木霉菌剂,潍坊奥奇生物科技有限公司;枯草芽胞杆菌菌剂,山东鲁抗生物农药有限责任公司;细菌基因组试剂盒, TaKaRa 公司;DNA Marker 和细菌引物,生工生物工程(上海)股份有限公司。细菌生理生

化鉴定管, 青岛海博生物科技有限公司; 人工气候箱, 哈尔滨东联电子科技有限公司; PCR 仪, Rockwell Allen-Bradley 公司; 水平电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像系统, 上海天能科技有限公司。

1.2 土壤细菌的分离

采用稀释平板法分离土壤细菌^[22]。称取已过 20 目筛的土样 10 g, 置于 250 mL 三角瓶中, 加入 90 mL 无菌水和少许玻璃珠, 30 °C、180 r/min 充分振荡 20 min, 混匀后静置 5 min, 制得土壤悬液。按 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 梯度制成稀释液, 分别吸取 200 μ L 各稀释液在 NA 平板均匀涂布, 每个处理 3 次重复, 平板倒置于恒温培养箱内 32 °C 暗培养 24–48 h。根据菌落形态、颜色、边缘和可溶性色素等特征挑取不同的细菌菌落, 进行 NA 平板划线纯化, 编号, 4 °C 保存备用。

1.3 拮抗细菌筛选

1.3.1 滤纸片法初筛^[23]

细菌发酵液的制备: 将供试细菌接种于 NA 液体培养基中, 32 °C、180 r/min 振荡培养 36 h 制得细菌发酵液, 加入灭菌水调整含菌量为 10^8 CFU/mL, 置于室温备用。

将木贼镰刀菌制成直径 8 mm 的菌饼, 接种至 PDA 平板正中央, 同时将 4 片灭菌滤纸圆片(直径 8 mm)对称置于距平板中心约 25 mm 处, 每片点接 20 μ L 细菌培养液, 对照组点接 20 μ L 的 NA 液体培养基, 每处理 3 次重复, 置于 30 °C 培养箱暗培养, 待对照组菌落长满平板, 计算抑菌率。筛选出有明显拮抗作用的细菌菌株进行复筛。

1.3.2 牛津杯法复筛^[24]

无菌滤液的制备: 将供试细菌发酵液于 4 °C、7 000 r/min 离心 20 min, 收集上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤掉菌体后, 制得无菌滤

液, 4 °C 保存备用。

将木贼镰刀菌制成直径 8 mm 的菌饼, 接种至 PDA 平板正中央, 无菌条件下将 4 个已灭菌牛津杯(内径 6 mm, 外径 8 mm, 高 10 mm)对称放于距平板中心约 25 mm 处, 每杯接入 200 μ L 无菌滤液, 对照组接入 200 μ L 的 NA 液体培养基, 每处理 3 次重复, 置于 30 °C 培养箱暗培养, 待对照组菌落长满平板, 测量、记录处理组真菌菌落生长直径(十字交叉法), 计算供试细菌滤液的抑菌率。

$$\text{抑菌率} = [(A-B)/(A-8)] \times 100\%$$

式中, A : 对照组病原真菌的生长直径; B : 处理组病原真菌的生长直径, 数字为病原菌菌饼直径。

1.4 抗利福平(Rif)突变菌株的筛选

采用抗生素标记法^[25], 取拮抗细菌发酵液 10 mL 接种在含 10 μ g/mL Rif 的 50 mL NA 培养液中。32 °C、180 r/min 振荡培养, 逐步筛选出能在 300 μ g/mL Rif 的 NA 培养液中稳定生长且拮抗活性、菌落形态变化不大的突变菌株进行下一步实验。

1.4.1 突变菌株遗传稳定性检测

将突变菌株在 NA 液体培养基(不含 Rif)中继代培养 10 代后, 涂布于含 300 μ g/mL Rif 的 NA 培养基平板, 观察是否能正常生长。

1.4.2 突变菌株拮抗稳定性检测

采用滤纸片法, 以原始菌株为对照, 观察抑菌率是否存在差异。

1.5 抗利福平突变菌株在土壤中的定殖

采用拌土接种法^[26], 将 300 g 土壤放入育苗盆中, 并向盆中注入 30 mL 突变菌株发酵液(初始菌量 10^8 CFU/g)均匀拌土, 3 次重复处理, 室温下放置, 每隔 7 d 定期取样, 采用土壤稀释法将土壤稀释液涂布在含 300 μ g/mL Rif 的 NA 培养基平板上, 计算含菌量。

1.6 拮抗细菌抗菌谱测定

采用滤纸片法,以供试 9 种常见作物真菌性病害致病菌为靶标菌,对定殖能力较好的拮抗细菌进行抗菌谱的测定,每处理 3 次重复,置于 30 °C 培养箱暗培养,待对照组菌落长满平板,计算抑制率。

1.7 拮抗细菌盆栽防效研究

木贼镰刀菌孢子悬液的制备:将已活化好的木贼镰刀菌用打孔器打成直径 8 mm 的菌饼,挑取 5–6 块菌饼放入装有 PDA 液体培养基的锥形瓶中,25 °C、180 r/min 振荡培养 7 d,用 4 层灭菌纱布过滤,在显微镜下用血球计数板调整孢子浓度为 10^8 CFU/mL。

拮抗细菌发酵液的制备:将定殖效果良好的拮抗细菌接种于 NA 液体培养基中,32 °C、180 r/min 振荡培养 4 d,制得拮抗细菌发酵液,用灭菌水调整含菌量为 10^8 CFU/mL,置于室温下备用。

盆栽试验设置 6 个处理:处理 1:单接木贼镰刀菌孢子悬液 15 mL;处理 2:哈茨木霉菌剂(孢子浓度为 10^8 CFU/mL)与木贼镰刀菌孢子悬液各 15 mL 混合接种;处理 3:枯草芽胞菌剂(含菌量为 10^8 CFU/mL)与木贼镰刀菌孢子悬液各 15 mL 混合接种;处理 4:70%代森锰锌 800 倍液与木贼镰刀菌孢子悬液各 15 mL 混合接种;处理 5:拮抗细菌 SC-16 发酵液与木贼镰刀菌孢子悬液各 15 mL 混合接种;处理 6:拮抗细菌 SC-119 发酵液与木贼镰刀菌孢子悬液各 15 mL 混合接种,每处理 8 个重复。

接种方式:选取长势一致且健康的一年生关防风植株,采用伤根灌注法^[27],用刀片在距关防风茎基 1–2 cm 处划伤,从伤口处灌入上述处理组菌液。常规管理,接种后 35 d 进行病害调查,参照胡容平^[28]的方法计算病情指数和防治效果。

病情指数= $\sum(\text{各级病株数} \times \text{相应级数})/(\text{病级最高级} \times \text{调查总植株数}) \times 100$;

防治效果(%)=(对照组病情指数–处理组病情指数)/对照组病情指数 $\times 100$ 。

1.8 拮抗细菌的鉴定

将具有较强定殖能力和防效能力的拮抗细菌进行鉴定。

1.8.1 形态学鉴定

将拮抗细菌划线接种于 NA 固体培养基上,30 °C 暗培养,观察菌落形态,主要包括菌落颜色、透明度、边缘特征等,并进行革兰氏染色及芽胞染色。

1.8.2 生理生化鉴定

参照《常见细菌系统鉴定手册》^[29]和《伯杰细菌鉴定手册》^[30],采用细菌生理生化鉴定管对拮抗细菌糖醇利用、甲基红试验、V-P 试验、明胶液化、淀粉水解和吲哚试验等生理生化指标进行测定。

1.8.3 分子鉴定

采用细菌基因组试剂盒提取拮抗细菌基因组 DNA。采用细菌 16S rRNA 基因通用引物 16S1F 和 16S1R 进行 PCR 扩增 16S rRNA 基因序列^[31]。PCR 产物纯化后送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序,根据测序结果在 NCBI 进行相似性比较分析,确定亲缘关系。用 MEGA 5.0 软件采用邻接法构建基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树,自展次数设定为 1 000,确定拮抗菌株的系统发育学地位。

2 结果与分析

2.1 土壤细菌的分离和拮抗细菌筛选结果

采用稀释平板法,从关防风根际土壤中共分离出 157 株细菌,编号为 SC-1–SC-157。初筛获得 40 株对木贼镰刀菌具有明显拮抗效果的细菌菌株,占总菌数的 25.48%。复筛结果显

示, 拮抗细菌的无菌滤液对木贼镰刀菌具有拮抗抑制作用的有 20 株, 抑菌率最高可达到 70.24%, 表明拮抗细菌分泌的胞外物质同样对木贼镰刀菌具有拮抗作用。选取抑菌率高于 65% 的 5 株拮抗细菌进行下一步定殖研究。

2.2 抗利福平突变菌株的筛选结果

菌株 SC-16 和 SC-119 均能在含 300 $\mu\text{g/mL}$ Rif 的 NA 固体培养基上稳定生长, 并且在不含 Rif 的 NA 固体培养基上连续培养 10 代后, 均能在含 300 $\mu\text{g/mL}$ Rif 的 NA 固体培养基上正常生长, 其发酵液对木贼镰刀菌仍具有抑制作用, 抑制效果与原始菌株基本相同, 具有遗传稳定性和拮抗稳定性。

2.3 抗利福平突变菌株在土壤中的定殖结果

菌株 SC-16 和 SC-119 在土壤中的定殖动态(图 1)呈现“先减后增再趋于平稳”的趋势。菌株 SC-16 接种 7 d 后, 土壤中突变菌株数量明显下降, 但 7 d 后土壤的含菌量逐渐增加, 于第 14 天达到峰值, 为 5.13×10^7 CFU/g, 为 7 d 时的 1.52 倍; 菌株 SC-119 接种 14 d 后, 土壤中突变

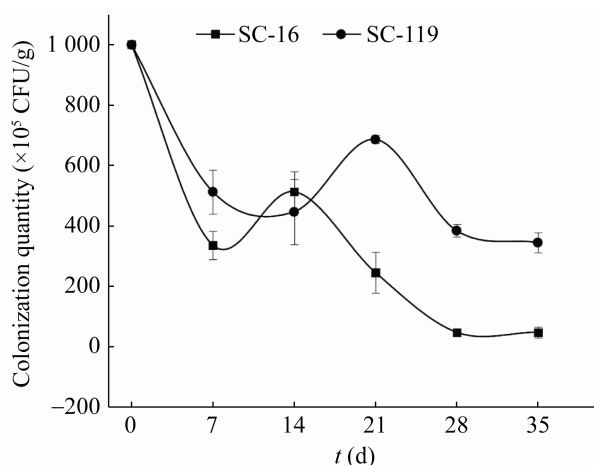


图 1 菌株 SC-16 和 SC-119 在土壤中的定殖动态
Figure 1 The colonization dynamic of SC-16 and SC-119 in soil.

菌株数量明显下降, 但 14 d 后土壤的含菌量逐渐增加, 于第 21 天达到峰值, 为 6.87×10^7 CFU/g, 为 14 d 时的 1.54 倍; 2 株突变细菌含菌量达到峰值后开始逐渐减少, 并于 28 d 后土壤含菌量趋于稳定; 35 d 时, 菌株 SC-16 和 SC-119 在土壤中的含菌量仍能达到 4.83×10^6 CFU/g-土和 3.45×10^7 CFU/g-土, 说明菌株 SC-16 和 SC-119 能在土壤中较长时间定殖。

2.4 拮抗细菌抗菌谱测定结果

菌株 SC-16 和 SC-119 对 9 种供试病原真菌均表现出明显的抑菌能力(表 1), 其中对赭菌刺孢菌抑制效果最好, 抑菌率达到了 96.27% 和 96.26%, 显著高于其他供试病原真菌($P < 0.05$)。菌株 SC-16 和 SC-119 对其他 8 种供试病原真菌抑菌率可达到 80.52%–86.40% 和 72.48%–84.85%, 表明菌株 SC-16 和 SC-119 具有较强的广谱抑菌效果, 而且菌株 SC-16 较 SC-119 广谱抑菌能力强。

表 1 拮抗细菌的抑菌谱测定结果

Phytopathogenic fungus	SC-16 Inhibition rate (%)	SC-119 Inhibition rate (%)
<i>Rhizoctonia solani</i>	81.66±1.30cde	72.48±2.52e
<i>Botrytis cinerea</i>	84.37±2.12bcd	73.28±1.50e
<i>Fusarium oxysporum</i>	81.32±1.88de	82.46±2.69bc
<i>Phytophthora cactorum</i>	86.40±0.66b	74.74±0.85e
<i>Alternaria liriodendra</i>	82.22±2.12cde	79.25±3.56cd
<i>Fusarium solani</i>	84.64±0.46bc	84.85±1.81b
<i>Alternaria tenuissima</i>	83.45±0.65bcde	79.63±0.17cd
<i>Mycocentrospora acerina</i>	96.27±1.31a	96.26±0.78a
<i>Sclerotinia asari</i>	80.52±0.17e	76.04±0.57de

注: 表中数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P < 0.05$)

Note: Data in the table are mean±SD. Different letters in the same row indicate significant difference at $P < 0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5 拮抗细菌盆栽防效研究结果

菌株 SC-16 和 SC-119 对关防风根腐病的盆栽防效如表 2 所示, 单接木贼镰刀菌的病情指数为 56.79, 其他处理组病情指数均较单接木贼镰刀菌显著降低($P<0.05$)。其中, 木贼镰刀菌与 SC-16 混合接种后, 其相对防效较接种哈茨木霉菌剂和枯草芽胞杆菌菌剂分别提高了 8.31% 和 12.50%, 但与代森锰锌处理相比防效降低了 7.80%; 木贼镰刀菌与 SC-119 混合接种后, 其相对防效较接种哈茨木霉菌剂、枯草芽胞杆菌菌剂和代森锰锌分别提高了 29.03%、32.26% 和 16.13%; 各处理组之间相对防效差异不显著, 进一步表明了拮抗细菌 SC-16 和 SC-119 对关防风根腐病均具有较好的防治效果, 但 SC-119 较 SC-16 的防治效果好。

2.6 拮抗细菌的鉴定结果

2.6.1 形态学鉴定结果

菌株 SC-119 在 NA 固体培养基培养 48 h

表 2 拮抗细菌对关防风根腐病的防治效果

Table 2 Control effect of antagonistic bacteria on *F. equiseti*

Treatment	Disease index	Control effect (%)
1	56.79±7.41a	
2	29.63±4.28b	47.83±6.79a
3	30.86±7.41b	45.65±11.76a
4	24.69±7.71b	56.52±12.25a
5	27.16±4.28b	52.17±6.79a
6	18.52±7.41b	67.39±11.76a

注: 1: 木贼镰刀菌; 2: 木贼镰刀菌和哈茨木霉菌剂; 3: 木贼镰刀菌和枯草芽胞杆菌菌剂; 4: 木贼镰刀菌和代森锰锌; 5: 木贼镰刀菌和 SC-16; 6: 木贼镰刀菌和 SC-119。数据为平均数±标准差。不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)

Note: 1: *F. equiseti*; 2: *F. equiseti* and *Trichoderma harzianum*; 3: *F. equiseti* and *Bacillus subtilis*; 4: *F. equiseti* and mancozeb; 5: *F. equiseti* and SC-16; 6: *F. equiseti* and SC-119. Data in the table are mean±SD. Different letters in the same row indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

后, 菌落呈乳白色, 有黏性, 质软, 中心隆起, 表面湿润, 不透明, 边缘不整齐, 培养 96 h 后菌落及培养基颜色逐渐变为深褐色, 有色素产生, 菌体杆状, 革兰氏阳性, 有芽胞。

2.6.2 生理生化鉴定结果

菌株 SC-119 的生理生化特性结果表明(表 3), 菌株 SC-119 能够水解淀粉和明胶, 硝酸盐还原反应生成红色化合物, 接触酶、丙酸盐、乙酰甲基甲醇试验(V-P)、酪蛋白和氧化酶均为阳性, 能够利用柠檬酸盐和多种糖原, 甲基红反应、吲哚、苯丙氨酸脱氨酶均为阴性, 代

表 3 菌株 SC-119 的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of SC-119

Characteristics	SC-119	1	2
V-P test	+	+	+
Methyl red test	—	—	—
Nitrate reduction	+	+	+
Citrate utilization	+	+	+
Catalase test	+	+	+
Gelatin liquefaction	+	+	+
Amylolysis	+	+	+
L-arabinose	+	+	+
D-xylose	+	+	+
D-mannitol utilization	+	+	+
Hydrogen sulfide production	—	—	—
Mannose	+	+	—
Mannitol	—	—	+
7% NaCl growth	+	+	+
10% NaCl growth	+	+	+
Propionate	+	+	+
Indole test	—	—	—
Hydrolyzed casein	+	+	+
Oxidase	+	+	+
Phenylalanine ammonia lyase	—	—	—

注: 1: 萎蔫芽胞杆菌模式菌株; 2: 枯草芽胞杆菌模式菌株。+: 阳性; -: 阴性

Note: 1: *Bacillus atrophaeus*^T; 2: *Bacillus subtilis*^T. +: Positive; -: Negative.

谢过程不产生硫化氢(H_2S)气体, 能在含 10% NaCl 的 NA 培养基上生长。菌株 SC-119 与萎缩芽胞杆菌模式菌株均能利用甘露糖、不能利用甘露醇, 而枯草芽胞杆菌模式菌株则反之, 可据此有效区分萎缩芽胞杆菌及其近缘种^[29,32]。

2.6.3 分子鉴定结果

采用 PCR 扩增菌株 SC-119 的 16S rRNA 基因序列, 得到 1 454 bp 的 PCR 产物, 提交 GenBank 注册(登录号为 OK605033)并进行 NCBI BLAST 比对, 结果显示菌株 SC-119 与萎缩芽胞杆菌(*Bacillus atrophaeus*)相似性最高, 达到 99.86%, 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树显示(图 2), 菌株 SC-119 与萎缩芽胞杆菌(*Bacillus atrophaeus*)聚为一支。

结合形态学特征、生理生化特性、16S

rRNA 基因序列分析, 将菌株 SC-119 鉴定为萎缩芽胞杆菌(*Bacillus atrophaeus*)。

3 讨论与结论

植物根际是植物与外界环境进行物质交换的重要场所, 植物根际土壤聚集了种类繁多且数量庞大的微生物群落^[33], 尤以根际细菌为主^[34-35]。根际细菌可通过与病原菌争夺有利的生态位点, 从而达到抑制病原菌在植物根际中生长繁殖的目的, 具有良好的防病潜能^[36-37]。本研究通过平板对峙法从健康关防风根际土壤中分离筛选出一株对木贼镰刀菌具有良好拮抗效果的拮抗细菌 SC-119, 无菌滤液抑菌率可达 68.53%, 具有良好的生防潜力。

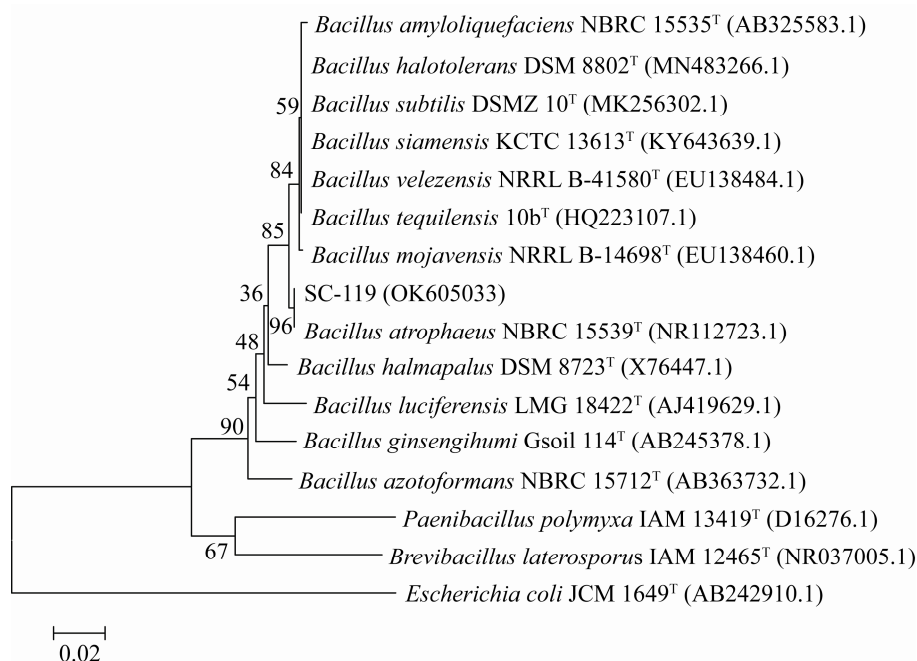


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 SC-119 系统发育树 标尺代表遗传变异系数; 分支上的数字表示置信度; 括号中的序号表示该菌在 GenBank 数据库中的登录号

Figure 2 phylogenetic tree of SC-119 strain based on 16S rRNA gene sequence. The scale represents the coefficient of genetic variation; The number at the branch represents the confidence interval; The serial number in parentheses indicates GenBank accession number.

研究表明,植物根际细菌具有广谱抑菌活性,可同时对多种病原真菌具有拮抗作用。孙卓等^[38]从人参根际土壤中分离出的拮抗细菌SZ-35,可抑制辣椒疫霉病菌、番茄灰霉病菌等14种植物病原真菌的生长;李新宇等^[39]从黄瓜根际土中分离出拮抗细菌ZF57,对番茄根腐病菌、白菜茎基腐病菌和番茄早疫病菌等7种植物病原菌也具有较好拮抗效果。本研究证实菌株SC-119对细辛叶枯病菌、刺五加黑斑病菌、细辛菌核病菌等9种作物病原真菌均表现出不同程度的抑菌能力,其中对槭菌刺孢菌抑制效果最好,抑菌率达到了96.26%,表明菌株SC-119不但对根部病害病原菌具有拮抗作用,而且对其他茎、叶部病害病原菌同样具有拮抗效果,表现出其广谱抑菌活性。

研究表明,筛选出的拮抗菌株在室内与病原菌互作时虽表现出较强的抑制效果,但在实际应用中,由于外界环境条件的影响,生防菌在与土壤土著微生物的竞争中不易长期定殖生存并占据优势,因而极大地影响了它们的实际防病效果^[40-41]。因此,筛选出能在植物根际中长期稳定定殖的拮抗细菌是关防风根腐病生物防治的重要环节^[42]。本研究发现,经利福平标记的突变菌株SC-119在土壤中的定殖动态呈现“先减后增再趋于稳定”的趋势,其中,菌株SC-119在土壤中定殖21 d内,含菌量急速下降而后上升达到最大值,这可能是突变菌株施入前期受到土壤土著微生物的竞争或其他环境因子的影响^[43],致使菌株SC-119生长受到抑制,之后其在土壤中占据有利竞争位点取代原有微生物并已适应新环境,因此含菌量上升;但21 d后土壤含菌量再次下降,分析原因可能是由于后期土壤中营养物质逐渐减少,突变菌株缺乏生长所需营养条件所致。同时,由于育苗盆中未栽入关防风植株,致使突变菌株无法依

附于植物根系,这可能也是菌株SC-119含菌量下降的原因之一。即便如此,本研究筛选出的突变菌株SC-119在上述环境中定殖35 d后其含菌量仍能达到 3.45×10^7 CFU/g-土,表明其具有较强的定殖能力。

盆栽防病试验表明,各处理组施入相同浓度菌液时,菌株SC-119能显著降低关防风根腐病的病情指数,其防效高于菌剂和农药处理组。充分表明菌株SC-119对关防风根腐病具有良好的防治效果,与市面上推广的生物菌剂相比更能针对性地防治关防风根腐病,同时,从关防风根际土壤分离筛选出的拮抗细菌保证了关防风拮抗菌源的安全性和可靠性。

本研究经形态学、生理生化特性和16S rRNA基因序列分析,鉴定菌株SC-119为萎缩芽胞杆菌(*Bacillus atrophaeus*)。萎缩芽胞杆菌是一类可产生芽胞的非致病菌,对人与动物无致病性,能够产生多种次级代谢产物,具有防病促生^[44]、抗病毒^[45]、降解重金属^[46]等生态作用,被广泛应用于植物病害的生物防治研究。本研究首次发现萎缩芽胞杆菌对于关防风根腐病具有良好的生防效果,为关防风根腐病的防治提供了优良菌源,但有关菌株SC-119的大田试验、发酵条件及抑菌机制仍需要进一步研究。

REFERENCES

- [1] 国家药典委员会. 中国药典[S]. 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 158
National Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia[S]. Volume One. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 158 (in Chinese)
- [2] 刘双利, 姜程曦, 赵岩, 许永华, 王壮, 张连学. 防风化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(10): 2146-2152
Liu SL, Jiang CX, Zhao Y, Xu YH, Wang Z, Zhang LX. Advance in study on chemical constituents of *Saposhnikovia divaricata* and their pharmacological

- effects[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(10): 2146-2152 (in Chinese)
- [3] 孙国东, 王思淼, 任晓蕾, 霍金海, 王伟明. 多指标综合评价关防风适宜干燥加工方法的研究[J]. 中国中医药科技, 2021, 28(2): 208-213
Sun GD, Wang SM, Ren XL, Huo JH, Wang WM. Comprehensive evaluation of suitable drying methods of Guanfangfeng (*Saposhnikovia Radix*) by multiple indicators[J]. Chinese Journal of Traditional Medical Science and Technology, 2021, 28(2): 208-213 (in Chinese)
- [4] 王梦奇, 刘丽玲, 李海洋, 魏春艳, 白庆荣. 防风枯萎病的病原学及药剂敏感性[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(1): 34-42
Wang MQ, Liu LL, Li HY, Wei CY, Bai QR. Pathogen and fungicide susceptibility of *Saposhnikovia divaricata* blight caused by *Diaporthe angelicae*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2018, 40(1): 34-42 (in Chinese)
- [5] 林英杰, 夏春婷, 彭巧慧, 郭晓慧. 中药材防风根腐病药剂防治效果试验[J]. 现代农村科技, 2017(11): 71
Lin YJ, Xia CT, Peng QH, Guo XH. Experimental study on the control effect of Chinese medicinal materials for *Saposhnikovia divaricata* root rot disease[J]. Xiandai Nongcun Keji, 2017(11): 71 (in Chinese)
- [6] 杜广平. 黑龙江关防风白粉病和根腐病的防治[J]. 植物医生, 2013, 26(4): 26-27
Du GP. The prevention and control against powdery mildew and root rot of *Saposhnikovia divaricata* in Heilongjiang[J]. Plant Doctor, 2013, 26(4): 26-27 (in Chinese)
- [7] 吴威, 刘世禹, 王诗语, 秦路平, 朱波. 白术内生细菌 AM14 的分离鉴定及其对宿主根腐病的防效研究[J]. 中草药, 2021, 52(10): 3075-3080
Wu W, Liu SY, Wang SY, Qin LP, Zhu B. Isolation and identification of *Atractylodes macrocephala* endophytic bacteria AM14 and its biological control for host plant root-rot disease[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(10): 3075-3080 (in Chinese)
- [8] 李兴龙, 李彦忠. 土传病害生物防治研究进展[J]. 草业学报, 2015, 24(3): 204-212
Li XL, Li YZ. Research advances in biological control of soil-borne disease[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(3): 204-212 (in Chinese)
- [9] Botelho GR, Mendonça-Hagler LC. Fluorescent *Pseudomonads* associated with the rhizosphere of crops: an overview[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2006, 37(4): 401-416
- [10] Charudattan R. Biological control of weeds by means of plant pathogens: significance for integrated weed management in modern agro-ecology[J]. BioControl, 2001, 46(2): 229-260
- [11] 杨利民. 中药材生态种植理论与技术前沿[J]. 吉林农业大学学报, 2020, 42(4): 355-363
Yang LM. Theory and technology frontiers of ecological planting of Chinese medicinal materials[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2020, 42(4): 355-363 (in Chinese)
- [12] 刘继霞, 山军建, 王平. 两种生防菌剂防治向日葵黄萎病的效果[J]. 中国植保导刊, 2020, 40(12): 80-81, 75
Liu JX, Shan JJ, Wang P. Effects of two biocontrol agents on verticillium wilt of sunflower[J]. China Plant Protection, 2020, 40(12): 80-81, 75 (in Chinese)
- [13] 孙卓, 杨利民. 人参锈腐病拮抗细菌的筛选鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(2): 73-81
Sun Z, Yang LM. Screening and identification of bacterial antagonistic strains against *Cylindrocarpus destructans*[J]. Journal of China Agricultural University, 2016, 21(2): 73-81 (in Chinese)
- [14] 高菲, 卜春亚, 靳永胜, 师光禄. 草莓根腐病拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J]. 广东农业科学, 2012, 39(3): 4-8
Gao F, Bu CY, Jin YS, Shi GL. Screening and identification of antagonistic bacteria against *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(3): 4-8 (in Chinese)
- [15] 游成真, 李平兰, 张志刚, 何佳庆, 刘静媛, 韩玉竹. 黄瓜立枯病高效拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 中国农业大学学报, 2015, 20(1): 90-95
You CZ, Li PL, Zhang ZG, He JQ, Liu JY, Han YZ. Screening and identifying antagonistic bacteria against *Rhizoctonia solani* on damping-off disease of cucumber[J]. Journal of China Agricultural University, 2015, 20(1): 90-95 (in Chinese)
- [16] Cao Y, Wang JD, Wu HS, Yan SH, Guo DJ, Wang GF, Ma Y. Soil chemical and microbial responses to biogas slurry amendment and its effect on *Fusarium* wilt suppression[J]. Applied Soil Ecology, 2016, 107: 116-123
- [17] 张影珍, 马养民, 王鹏飞, 田从丽. 秦岭药用植物防风内生真菌的分离鉴定及抑菌活性研究[J]. 青岛科

- 技大学学报(自然科学版), 2015, 36(2): 155-159
- Zhang YZ, Ma YM, Wang PF, Tian CL. Isolation, identification and antimicrobial activities of endophytic fungi from *Saposhnikovia divaricata*[J]. Journal of Qingdao University of Science and Technology: Natural Science Edition, 2015, 36(2): 155-159 (in Chinese)
- [18] 马静, 田义新, 王志清, 刘桂英, 王子晴, 张敏. 防风内生拮抗细菌的分离与鉴定[J]. 吉林农业大学学报, 2021, 43(4): 1-6
- Ma J, Tian YX, Wang ZQ, Liu GY, Qang ZQ, Zhang M. Isolation and identification of endophytic antagonistic bacteria from *Saposhnikovia divaricata*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2021, 43(4): 1-6 (in Chinese)
- [19] 冯印印, 李斌, 杨洋, 何佶弦, 安航, 闫芳芳, 安德荣. 烟草青枯病菌拮抗细菌的筛选、鉴定和抑菌机制研究[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(2): 331-339
- Feng YY, Li B, Yang Y, He JX, An H, Yan FF, An DR. Screening, identification and inhibition activity of the antagonistic bacteria of *Ralstonia solanacearum*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(2): 331-339 (in Chinese)
- [20] 周春元, 宋娟, 闫梅霞, 郑培和. 人参灰霉病菌拮抗细菌菌株筛选及鉴定[J]. 分子植物育种, 2021, 19(19): 6482-6487
- Zhou CY, Song J, Yan MX, Zheng PH. Screening and identification of antagonistic bacterial strains against *Botrytis cinerea* on ginseng[J]. Molecular Plant Breeding, 2021, 19(19): 6482-6487 (in Chinese)
- [21] 陆志翔. 香蕉枯萎病菌的鉴定及其拮抗细菌的筛选[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2015
- Lu ZX. Identification to the pathogen of banana *Fusarium* wilt and screening of antagonistic bacteria against it[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2015 (in Chinese)
- [22] 于水清, 杨毅清, 张岱, 庞民好, 杨志辉, 朱杰华. 马铃薯早疫病拮抗细菌的筛选、鉴定及抑菌物质研究[J]. 西南农业学报, 2021, 34(6): 1234-1241
- Yu SQ, Yang YQ, Zhang D, Pang MH, Yang ZH, Zhu JH. Screening, identification and its antifungal substances of antagonistic bacterium against potato early blight[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(6): 1234-1241 (in Chinese)
- [23] 高芬, 赵晓霞, 闫欢, 雷振宏, 王梦亮, 秦雪梅. 黄芪根腐病拮抗芽孢杆菌的筛选鉴定及其对根围细菌群落的影响[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(18): 3942-3947
- Gao F, Zhao XX, Yan H, Lei ZH, Wang ML, Qin XM. Screening and identification of antagonistic *Bacillus* against *Astragalus membranaceus* root rot and its effect on microorganism community in root zone soil[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(18): 3942-3947 (in Chinese)
- [24] 王磊, 王兴兰, 郭瑞, 郜博, 徐莉. 1株抗烟草青枯病菌拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(23): 89-90
- Wang L, Wang XL, Guo R, Gao B, Xu L. Screening and identification of an antagonistic bacteria against tobacco bacterial wilt[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(23): 89-90 (in Chinese)
- [25] 钱佳琳. 柑橘溃疡病生防细菌的筛选及其在脐橙叶片上的定殖研究[D]. 南昌: 江西理工大学硕士学位论文, 2020
- Qian JL. Isolation of biocontrol bacteria for citrus canker and its colonization on Navel Orange leaves[D]. Nanchang: Master's Thesis of Jiangxi University of Science and Technology, 2020 (in Chinese)
- [26] 肖春萍. 人参根际土壤微生物多样性及其生防真菌资源开发研究[D]. 长春: 吉林农业大学博士学位论文, 2015
- Xiao CP. Study on microbial diversity in rhizosphere soil of *Panax ginseng* and exploitation of the biocontrol fungi for ginseng pathogenic fungal diseases[D]. Changchun: Doctoral Dissertation of Jilin Agricultural University, 2015 (in Chinese)
- [27] 李信申, 饶建辉, 肖运萍, 魏林根, 汪瑞清, 黄瑞荣, 黄蓉, 胡建坤, 华菊玲. 芝麻种质资源抗青枯病鉴定[J]. 江西农业学报, 2018, 30(1): 54-58
- Li XS, Rao JH, Xiao YP, Wei LG, Wang RQ, Huang RR, Huang R, Hu JK, Hua JL. Identification of resistance of sesame (*Sesamum indicum*) germplasm resources to bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*)[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2018, 30(1): 54-58 (in Chinese)
- [28] 胡容平. 四川几种重要药用植物病害调查与川芎根腐病(*Fusarium solani*)防治初探[D]. 成都: 四川农业大学硕士学位论文, 2008
- Hu RP. Investigation on disease of the important medicinal plant and study on biological and chemical control of root rot of *Ligusticum Chuanxiong*[D]. Chengdu: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2008 (in Chinese)

- [29] 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
Dong XZ, Cai MY. Handbook of Systematic Identification of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [30] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984
Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984 (in Chinese)
- [31] 孙卓, 杨利民. 人参锈腐病生防细菌的筛选及鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(4): 536-542
Sun Z, Yang LM. Screening and identification of antagonistic bacteria on *Cylindrocarpon destructans* (Zinss.) Scholtan[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(4): 536-542 (in Chinese)
- [32] 马顶虹, 龚海燕, 李萌萌, 李备军, 汤琳, 张明. 萎缩芽孢杆菌生理生化特征与检测鉴定[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(7): 33-35
Ma DH, Gong HY, Li MM, Li BJ, Tang L, Zhang M. Physiological and biochemical identification of *Bacillus atrophaeus*[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2014, 20(7): 33-35 (in Chinese)
- [33] Mendes R, Garbeva P, Raaijmakers JM. The rhizosphere microbiome: significance of plant beneficial, plant pathogenic, and human pathogenic microorganisms[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(5): 634-663
- [34] 詹伟. 金钗石斛根际土壤细菌和放线菌分离及抑菌活性研究[D]. 贵阳: 贵州师范大学硕士学位论文, 2016
Zhan W. Isolation and antibacterial activity of the rhizosphere soil bacteria and actinomycetes from *Dendrobium nobile* Lindl.[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou Normal University, 2016 (in Chinese)
- [35] 余著成. 伯乐树根际土壤肥力状况和微生物群落特征及其影响因素研究[D]. 杭州: 浙江农林大学硕士学位论文, 2021
Yu ZC. Rhizosphere soil fertility and microbial community characteristics of *Bretschneidera sinensis* and its influencing factors[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang A&F University, 2021 (in Chinese)
- [36] 乔帅. 轮作制水稻根际土壤微生物多样性的研究[D]. 汉中: 陕西理工大学硕士学位论文, 2017
Qiao S. Study of microbial diversity from rhizosphere soil of rice rotation system[D]. Hanzhong: Master's Thesis of Shaanxi University of Technology, 2017 (in Chinese)
- [37] 闫伟. 油松、虎榛子根际土壤微生物分离条件及其区系的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2007
Yan S. Study on microorganism isolated factors and microflora of rhizosphere soil of *Pinus tabulaeformis* and *Ostryopsis davidiana*[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2007 (in Chinese)
- [38] 孙卓, 杨利民. 人参灰霉病拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. 植物保护学报, 2016, 43(6): 935-942
Sun Z, Yang LM. Isolation and characterization of antagonistic bacteria against ginseng grey mould[J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(6): 935-942 (in Chinese)
- [39] 李新宇, 李磊, 石延霞, 柴阿丽, 谢学文, 李宝聚. 黄瓜棒孢叶斑病拮抗细菌的筛选、鉴定及防治效果[J]. 植物保护学报, 2020, 47(3): 620-627
Li XY, Li L, Shi YX, Chai AL, Xie XW, Li BJ. Screening, identification and control effects of antagonistic bacteria against cucumber *Corynespora* leaf spot[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(3): 620-627 (in Chinese)
- [40] 高苇, 杨利娟, 刘春艳, 张春祥, 王勇. 西瓜枯萎病拮抗菌株的筛选与鉴定[J]. 中国瓜菜, 2021, 34(1): 19-23
Gao W, Yang LJ, Liu CY, Zhang CX, Wang Y. Screening and identification biocontrol strain to watermelon *Fusarium* wilt[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2021, 34(1): 19-23 (in Chinese)
- [41] 杨洪凤, 薛雅蓉, 余向阳, 刘常宏. 内生解淀粉芽孢杆菌 CC09 菌株在小麦叶部的定殖能力及其防治白粉病效果研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(4): 481-488
Yang HF, Xue YR, Yu XY, Liu CH. Colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* CC09 in wheat leaf and its biocontrol effect on powdery mildew disease[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(4): 481-488 (in Chinese)
- [42] 张冬冬, 刘涛, 高同国, 姜军坡, 雷白时, 王世英, 朱宝成. 棉花黄萎病拮抗细菌 Z-5 菌株的定殖能力检测[J]. 棉花学报, 2013, 25(6): 510-516
Zhang DD, Liu T, Gao TG, Jiang JP, Lei BS, Wang SY,

- Zhu BC. Detection of the colonization ability of antagonistic bacteria strain Z-5 against cotton *Verticillium* wilt[J]. Cotton Science, 2013, 25(6): 510-516 (in Chinese)
- [43] 韩长志, 周银. 钩状木霉与枯草芽孢杆菌在核桃根际土壤中的定殖研究[J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(9): 19-24
- Han CZ, Zhou Y. Colonization of *Trichoderma hamatum* and *Bacillus subtilis* in rhizosphere soil of walnut[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2021, 43(9): 19-24 (in Chinese)
- [44] 刘思靖. 萎缩芽孢杆菌次级代谢产物的研究进展[J]. 现代化工, 2019, 39(12): 48-51
- Liu SJ. Advances in secondary metabolites from *Bacillus atrophaeus*[J]. Modern Chemical Industry, 2019, 39(12): 48-51 (in Chinese)
- [45] 白豆, 龙玲, 朱乃硕. 一株产 1-脱氧野尻霉素(DNJ) 枯草芽孢杆菌黑色变种的诱变育种研究[J]. 复旦学报(自然科学版), 2016, 55(1): 104-111
- Bai D, Long L, Zhu NS. Mutation breeding of a isolated *Bacillus subtilis* var. *niger* for producing the 1-deoxynojirimycin[J]. Journal of Fudan University: Natural Science, 2016, 55(1): 104-111 (in Chinese)
- [46] 王超. 萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*)与铀、铬相互作用机理研究[D]. 绵阳: 西南科技大学硕士学位论文, 2015
- Wang C. Study on interaction mechanism between *Bacillus atrophaeus* and uranium, chromium[D]. Mianyang: Master's Thesis of Southwest University of Science and Technology, 2015 (in Chinese)