

烟草疫霉拮抗菌枯草芽孢杆菌 21b 菌株的分离鉴定及其生物学特性研究

王进¹ 黄艳飞² 汪汉成^{3*} 王茂胜³ 陆宁³ 余知和^{1*}

(1. 长江大学 生命科技学院 湖北 荆州 434025)

(2. 长江大学 农学院 湖北 荆州 434025)

(3. 贵州省烟草科学研究院 贵州 贵阳 550081)

摘 要:【目的】为了控制烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)引起的烟草黑胫病对烟草生产造成的危害。【方法】采用稀释平板法从贵州省毕节地区烟草根际土壤中分离筛选拮抗烟草疫霉的细菌菌株,然后经形态观察、Biolog 鉴定及 16S rRNA 基因序列分析,对分离菌株进行鉴定,同时测定抗菌谱,单因子变量分析、优化生长条件。【结果】共分离得到 44 株拮抗烟草疫霉的细菌菌株,其中菌株 21b 对烟草黑胫病菌菌丝生长的抑制率达 78.33%,鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。该菌株对烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)、烟草灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)和烟草炭疽病菌(*Colletotrichum destructivum*)均具有拮抗作用,抑菌圈大小分别为 19.5、18.2、14.6 和 13.4 mm,最佳的发酵条件为:温度 30 °C、pH 7.0–8.0、装液量 12%、盐浓度 0.5%。【结论】分离筛选到一株对烟草寄生疫霉有较强拮抗活性的细菌菌株,为进一步开发烟草黑胫病的生防菌剂提供了菌种资源。

关键词:烟草黑胫病,枯草芽孢杆菌 21b,拮抗活性,菌株鉴定,液体发酵

Isolation, identification and biological characteristics of a bacterial strain *Bacillus subtilis* 21b against *Phytophthora nicotianae*

WANG Jin¹ HUANG Yan-Fei² WANG Han-Cheng^{3*} WANG Mao-Sheng³
LU Ning³ YU Zhi-He^{1*}

(1. College of Life Sciences, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

(2. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

(3. Guizhou Academy of Tobacco Sciences, Guiyang, Guizhou 550081, China)

Abstract: [Objective] Control of the spread of tobacco black shank caused by *Phytophthora nicotianae* in tobacco production. [Methods] With *Phytophthora nicotianae* used as the assay fungus, bacterial strains antagonistic to *P. nicotianae* were isolated from tobacco rhizosphere soil

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 1360448); 贵州省科学技术基金项目(No. 黔科合 J 字[2011]2337 号); 贵州省烟草公司资助项目(No. 201305, 201336)

*通讯作者: 汪汉成: xiaobaiyang126@hotmail.com; 余知和: zhiheyu@hotmail.com

收稿日期: 2014-03-14; 接受日期: 2014-05-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-05-13

obtained from Bijie District, Guizhou Province using dilution-plate methods and identified based on morphology, Biolog identification and 16S rRNA gene sequence analysis. The antimicrobial spectrum of these strains was further tested against *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternate* and *Colletotrichum destructivum* *in vitro*. Optimization of growth conditions was also investigated through single factor variable analysis. **[Results]** Of 44 antagonistic strains obtained, strain 21b showed an inhibition rate of 78.33% to *P. nicotianae* and was identified as *Bacillus subtilis*. The size of inhibition zone of this strain against *Ralstonia solanacearum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternate*, and *Colletotrichum destructivum* were 19.5, 18.2, 14.6 and 13.4 mm, respectively. The optimal fermentation conditions for 21b was a temperature of 30 °C, pH 7.0–8.0, media/flask volume 12%, and 0.5% salt. **[Conclusion]** One bacterial strain with antagonistic activity against *P. nicotianae* isolated in this study could provide microbiological resources for the development of biocontrol of tobacco black shank in the future.

Keywords: Black shank of tobacco, *Bacillus subtilis* 21b, Antagonistic activity, Bacterial identification, Liquid fermentation

烟草黑胫病是世界范围内烟草种植区都有发生、具毁灭性的病害之一^[1-2],其病菌烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)在烟草全生育期内可侵染根、茎、叶等组织,导致根系坏死、叶片黄化、植株萎蔫甚至枯死等症状^[3]。在不采取防治措施情形下,损失可达 100%^[4]。近年来,该病害严重影响着我国烟草行业的发展^[5],除黑龙江省尚未发现该病外,其他各种种植烟草产区均有不同程度发生。

目前烟草生产上尚无有效的抗黑胫病品种,黑胫病的防治主要依赖甲霜灵等苯基酰胺类杀菌剂,品种单一^[6]。由于化学药剂的残留、对非靶标生物的毒害以及引起环境污染问题,利用环境友好型生防菌剂进行植物病害的生物防治被视为替代或减少农业化学药剂使用的补充,已成为国内外的研究热点^[7-9]。

笔者从贵州省毕节地区种植烟草的土壤中分离、筛选根际微生物,其中筛选出一株对烟草黑胫病菌有明显拮抗活性的细菌菌株 21b,采用传统菌落形态观察、Biolog 鉴定及分子生物学相结合的方法对该菌株进行了鉴定,并采用单因子变量法对其生长条件进行研究,旨在为研发烟草黑胫病的生防菌剂提供种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 供试的烟草青枯病菌(*Ralstonia*

solanacearum)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternate*)、烟草灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)和烟草炭疽病菌(*Colletotrichum destructivum*)由贵州省烟草科学研究院微生物实验室提供;烟草疫霉由本研究分离鉴定并保存;拮抗菌株 21b 由本研究从贵州省毕节地区的烟草根际土壤分离获得。

1.1.2 培养基及试剂:牛肉膏蛋白胨培养基(NA)^[10]用于拮抗细菌的分离、培养及生长条件优化。利马豆培养基(LBA)和 10% V8 培养基分别用于烟草疫霉的菌丝培养及孢子囊的诱导^[11]。拮抗菌株的 Biolog 鉴定使用 BUG+B 培养基,其中 BUG 琼脂由 Biolog 公司提供,冻干脱纤维羊血(B)购自北京友康基业生物科技有限公司。细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TaKaRa Code: D304)购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 细菌分离

从贵州省毕节地区烟草种植地采集烟草根际距离地表 15 cm 左右土壤样品,按 Oku 等^[12]方法分离细菌,28 °C 黑暗培养,待细菌长出后挑取单菌落纯化,保存于 30%甘油的液体 NA 中,-20 °C 保存、备用。

1.3 菌株对烟草疫霉的抑制

采用“对峙培养法”测定细菌菌株的拮抗作用。将融化好的 LBA 与 NA 培养基按 1:1 比例混合均匀倒平板,用打孔器取烟草疫霉菌落边缘菌饼(直

径 5 mm)接种于平板中央, 28 °C 黑暗培养。2 d 后用无菌牙签在距菌饼 2 cm 左右处“十字线”上接种待测细菌, 对称地分布于菌饼的 4 个方向, 重复 3 次, 置 28 °C 培养, 4 d 后观察抑菌圈的大小。

采用同样方法对初筛细菌进行烟草疫霉的复筛测定。复筛时一条“十字线”上接种同一待测细菌, 另一条线上接种无菌水为对照。4 d 后观测结果, 计算抑制率^[13]。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 拮抗菌株的菌落观察及 Biolog 鉴定: (1) 将待测菌液均匀涂布于 NA 平板中, 参照 Kauffmann 等^[14]方法观察菌落形态特征。(2) 采用 Biolog GEN III 96 孔微孔板, 按操作指南对待测菌株进行 Biolog 鉴定^[15]。

1.4.2 拮抗菌株的分子鉴定: (1) 按试剂盒指南抽提菌株基因组 DNA, 用于 PCR 扩增。(2) 以基因组 DNA 为模板, 采用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')^[16](由上海生物工程技术有限公司合成)进行 PCR 扩增。反应体系为 50 μ L, 扩增条件为: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 105 s, 30 个循环; 72 °C 5 min。采用 1.0% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 送上海英骏测序公司测序。测序结果在 GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库中 BLAST 比对分析^[17]。

1.5 抗菌谱测定

拮抗菌株对病原真菌的拮抗测定同 1.3, 对病原细菌的拮抗测定采用“喷雾法”^[18], 即将拮抗菌株接种于 NA 平板中央, 28 °C 黑暗培养 2 d, 然后喷雾法接种烟草青枯菌悬液(1×10^7 个/mL), 以接种同体积无菌水作为对照, 重复 3 次, 48 h 后采用“十字交叉”法测抑菌圈大小。

1.6 拮抗菌株的活体验证

1.6.1 烟草疫霉孢子悬浮液的制备: 将烟草疫霉置 LBA 平板培养 4 d, 取菌落 1/3 处直径为 5 mm 的菌丝块 10 块放入盛有 20 mL 10% V8 培养液的培

养皿中, 光照培养 4 d 后, 置于 4 °C 低温处理 30 min, 然后再置于室温 2 h, 收集游动孢子悬浮液, 浓度调整为 1×10^4 个/mL, 待用。

1.6.2 拮抗菌对烟草黑胥病的防治效果: 采用拮抗菌菌液灌根处理烟苗测定其防效。用 50 mL 28 °C 黑暗下摇瓶培养 48 h 的拮抗细菌菌液(1×10^8 个/mL)灌根处理 6 叶期的烟苗(品种: 红花大金元), 以同体积无菌水灌根为对照, 2 d 后接浓度为 1×10^4 个/mL 的烟草疫霉游动孢子悬浮液 10 mL, 每处理 4 株烟苗重复。接菌后将烟苗置于 20–30 °C、RH>80% 的自然光照条件下培养, 21 d 后调查烟苗的发病情况, 计算烟株的发病率、病情指数及拮抗菌的防治效果^[19]。

1.7 拮抗菌株的生长条件优化

采用“单因子变量法”^[20]对菌株 21b 生长的最适温度、最适 pH、最适装液量及最适盐浓度等生长条件进行优化, 每处理 3 次重复。

1.7.1 种子液的制备: 接种拮抗菌株到装有 5 mL 培养基的试管中, 30 °C、170 r/min 培养 12 h, 制得种子液。

1.7.2 活菌量测定: 取 10 mL 种子液加入到盛有 250 mL 无菌液体 NA 的三角瓶, 混合均匀。分别取 5 mL 细菌混合培养液置入无菌试管, 于 30 °C、200 r/min 振荡培养, 测定不同培养时间(0、6、12、18、24、30、33、36、39、42、45、48、51 和 54 h)细菌培养液的 OD_{600} 值, 重复 3 次。同时, 从不同培养时间段的试管中取出 1 mL 培养液, 稀释平板法测定活菌落数。以培养时间为横坐标, OD_{600} 值和菌落数为纵坐标, 绘制 OD_{600} 值与活菌量的相关性曲线。

1.7.3 生长温度的优化: 将种子液以 1% 接种量转接到装有 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中, 分别在 20、30、37、45、50 和 55 °C, 170 r/min 培养 24 h, 分光光度计测定菌液 OD_{600} 值。

1.7.4 生长 pH 的优化: 将种子液以 1% 接种量分别转接到装有不同 pH (4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0) 的 50 mL 培养基的 250 mL 三角瓶中, 30 °C、

170 r/min 培养 24 h, 分光光度计测定菌液 OD_{600} 值。

1.7.5 装液量的优化: 将种子液以 1%接种量转接到不同装液量培养基的 250 mL 三角瓶中, 设 5 个装液量梯度: 30、50、100、150 和 180 mL, 30 °C、170 r/min 培养 24 h, 分光光度计测定菌液 OD_{600} 值。

1.7.6 盐浓度的优化: 将种子液以 1%接种量转接到装有 50 mL 培养基不同 NaCl 浓度的 250 mL 三角瓶中, 设 5 个浓度梯度: 0.5%、2.0%、5.0%、7.0%和 10.0%, 接种后, 30 °C、170 r/min 培养 24 h, 分光光度计测定菌液 OD_{600} 值。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的分离及拮抗活性测定

自贵州省毕节地区种植烟草的根际土壤共分离得到 104 个细菌菌株, 以烟草疫霉为指示菌, 筛选出 44 株具有拮抗作用, 其中, 菌株 21b 的抑制效果最好。菌株 21b 对烟草疫霉 3 次重复的抑菌圈大小平均为 17.6 mm, 抑菌率达 78.33% (图 1)。

2.2 拮抗菌株的鉴定

菌株 21b 在 NA 培养基中菌落呈白色, 圆形, 边缘不规则, 不透明, 菌落中间褶皱突起, 具典型的枯草芽孢杆菌属特征(图 2), 细胞呈杆状, 大小为 $(0.7-0.8) \mu\text{m} \times (2.0-3.0) \mu\text{m}$ 。

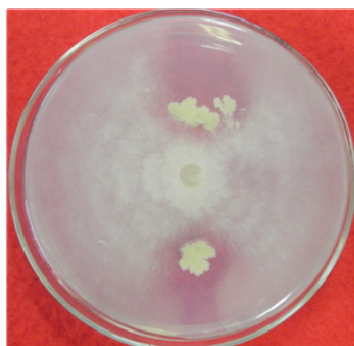


图 1 LBA 和 NA 混合培养基上拮抗菌株 21b 对烟草寄生疫霉的抑制作用

Figure 1 Inhibition effect of antagonistic bacterial strain 21b against *Phytophthora nicotianae* on mixture media of LBA and NA *in vitro*

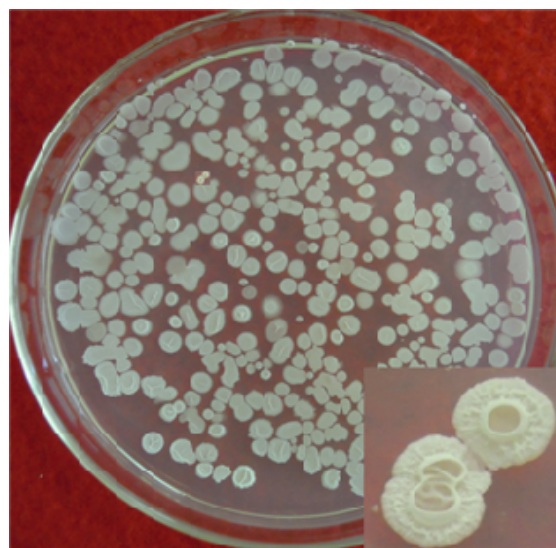


图 2 NA 培养基上菌株 21b 的菌落形态

Figure 2 Colony morphology of bacterium 21b on NA plate

菌株 21b 培养 24 h 后, 经 Biolog GEN III 自动测定对 71 种碳源的利用和 23 种化学敏感性物质的代谢反应, 结果表明, 相似性值(Similarity) 0.596, 距离(Distance) 5.861, 可能性(Probability) 0.596, 革兰氏反应阳性, 初步鉴定为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

此外, 菌株 21b 的 16S rRNA 基因序列长为 934 bp (GenBank 收录号为 KF179609), BLAST 分析表明, 菌株 21b 与枯草芽孢杆菌 G2 (GenBank 收录号 EU257699) 的相似性最高, 相似性达 99% (922/931)。

综合上述形态观察、Biolog 鉴定及 16S rRNA 基因序列数据, 将菌株 21b 鉴定为枯草芽孢杆菌。

2.3 抗菌谱的测定

抑菌结果表明, 菌株 21b 对烟草灰霉病菌、烟草赤星病菌和烟草炭疽病菌均有抑制作用(图 3), 抑菌圈大小 3 次重复的平均值分别为 18.2、14.6、13.4 mm (表 1), 菌丝生长抑制率分别为 74.8%、59.1%和 70.8%; 其中, 对烟草灰霉病菌的抑菌活性最高。该细菌对烟草青枯病菌也具有较高的抑菌活性, 抑菌圈大小为 19.5 mm。

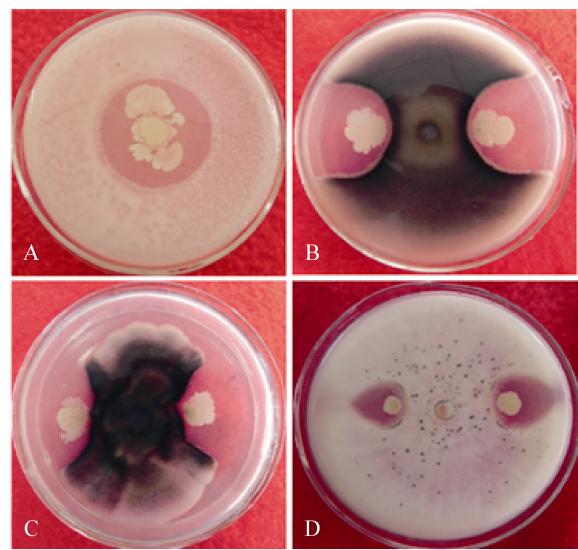


图 3 在 LBA 和 NA 混合培养基中拮抗菌株 21b 对 4 种烟草病原菌的抑制作用

Figure 3 Inhibition effect of antagonistic bacterial strain 21b against four tobacco pathogens on mixture media of LBA and NA in vitro

注：A：烟草青枯病菌；B：烟草灰霉病菌；C：烟草赤星病菌；D：烟草炭疽病菌。

Note: A: *Ralstonia solanacearum*; B: *Botrytis cinerea*; C: *Alternaria alternate*; D: *Colletotrichum destructivum*.

表 1 菌株 21b 对 4 种烟草病菌的拮抗作用	
Table 1 Inhibition of bacterial strain 21b against four tobacco pathogens	
烟草病原菌 Tobacco pathogens	抑菌圈大小 The size of inhibition zone (mm)
<i>Ralstonia solanacearum</i>	19.5 aA
<i>Botrytis cinerea</i>	18.2 bB
<i>Alternaria alternate</i>	14.6 bB
<i>Colletotrichum destructivum</i>	13.4 cC

注：小写字母和大写字母分别表示在 5%和 1%水平上的差异显著。

Note: The lowercases and capital letters represent the significance levels of difference at 5% and 1%, respectively.

2.4 拮抗菌对烟草黑胫病的防治效果

盆栽试验结果表明,对照在接种烟草寄生疫霉第 7 天茎基部开始出现黑胫病症状,第 14 天发病烟株茎部出现黑斑,上部叶片萎蔫,第 21 天烟株开始死亡,病情指数达到 100%。菌株 21b 菌液

(1×10^8 个/mL)灌根处理的烟苗至接菌 21 d 后仍未发病,防效达 100%。

2.5 拮抗菌生长条件的优化

活菌量测定表明, OD_{600} 值与细菌平板培养数量成正相关关系(图 4), OD_{600} 值能够反应枯草芽孢杆菌 21b 的活菌量。

4 种单因素生长条件测定结果表明,菌株 21b 在温度 20–55 °C 范围内均可生长,最佳温度范围为 30–37 °C;在 pH 4.0–9.0 范围内均可较好地生长,能适应较广的 pH 范围,最适 pH 为 7.0–8.0;在 250 mL 三角瓶中,随着装液量的逐渐增加,菌株 21b 的生长量呈下降趋势,装液量为 12%时 (30 mL)生长最好;该细菌在低盐浓度的培养基中生长很好,而在高盐浓度的培养基中几乎不生长,最适生长盐浓度为 0.5% (表 2)。

3 讨论

自然界存在着很多在植物病害防治上具有潜力的生防微生物^[21]。本研究从贵州省毕节地区种植烟草的根际土样中,分离筛选到一株细菌 21b,对烟草黑胫病有较强的拮抗活性,菌丝生长抑制率达 78.33%。通过形态学特征、Biolog 鉴定及 16S rRNA 基因序列的分析,将该细菌鉴定为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。采用“单因子变量法”对菌株生长条件进行优化,获得其最优生长条件为温度 30 °C、pH 7.0–8.0、装液量 12%、盐浓度 0.5%。

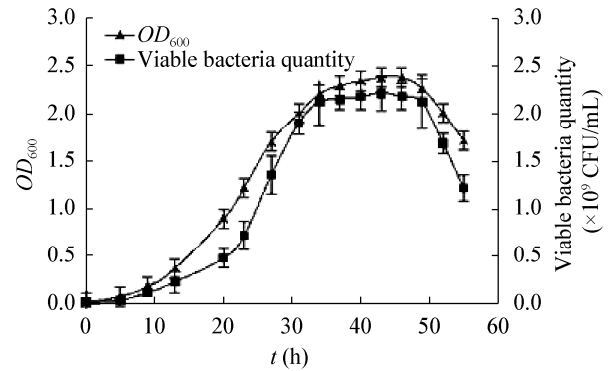


图 4 活菌量与 OD_{600} 值相关性
Figure 4 The correlation between OD_{600} and viable bacteria quantity

表 2 生长条件的优化结果					
Table 2 Results of optimization of growth conditions for the strain 21b					
处理号	温度	pH	装液量比例	盐浓度	OD ₆₀₀
Number	Temperature (°C)		Volume of the solution rate* (%)	Salt concentration (%)	
1	20	7.0	12	0.5	1.18cC
2	30	7.0	12	0.5	1.80aA
3	37	7.0	12	0.5	1.48bB
4	45	7.0	12	0.5	0.75dD
5	50	7.0	12	0.5	0.25eE
6	55	7.0	12	0.5	0.12fE
7	30	4.0	12	0.5	0.85eE
8	30	5.0	12	0.5	1.23cC
9	30	6.0	12	0.5	1.65bB
10	30	7.0	12	0.5	2.03aA
11	30	8.0	12	0.5	1.98aA
12	30	9.0	12	0.5	1.12dD
13	30	7.0	12	0.5	1.98aA
14	30	7.0	20	0.5	1.15bB
15	30	7.0	40	0.5	1.03cC
16	30	7.0	60	0.5	0.96dD
17	30	7.0	72	0.5	0.89eE
18	30	7.0	12	0.5	1.75aA
19	30	7.0	12	2.0	0.08bB
20	30	7.0	12	5.0	0.05cBC
21	30	7.0	12	7.0	0.03cC

注：小写字母和大写字母分别表示在 5%和 1%水平上的差异显著. *：测定容器的容量为 250 mL.

Note: The lowercases and capital letters represent the significance levels of difference at 5% and 1%, respectively. *: The volume of test container is 250 mL.

近年来 ,利用拮抗微生物防治烟草黑胥病的研究越来越受到人们的重视。已报道的烟草黑胥病的生防细菌有芽孢杆菌属、假单胞杆菌属等^[22-23]。枯草芽孢杆菌在生长过程中产生的枯草菌素、多粘素、制霉菌素、短杆菌肽等活性物质对致病菌有明显的抑制作用^[24]，由于生长快、营养简单以及耐热、抗逆等特征而成为一种潜在的生防菌剂^[25]。本研究筛选的枯草芽孢杆菌 21b 对烟草黑胥病菌菌丝生长抑制率达 78.33%，盆栽试验表明，该菌株能预防病害，提高烟叶产量，为进一步开发高效安全的生防菌剂提供了菌种资源。

据报道 ,烟草疫霉主要靠孢子囊及游动孢子的形式在田间迅速传播，若此环节能得到控制，将可

切断烟草黑胥病病原菌再侵染源 ,有效控制此病害的扩散蔓延^[26]。因此，生防菌对烟草疫霉孢子囊形成和游动孢子的释放与孢子萌发的抑制效果也是衡量生防菌抑菌作用的重要方面。另外，生防菌防病效果的发挥是一个受多种因素影响的过程 ,该过程与生防菌在自然条件下的生存能力、定殖能力、抗菌物质的产生能力和在植物体内的传导能力和方式等密切相关^[27]。

本研究表明 ,尽管枯草芽孢杆菌 21b 对烟草疫霉在内的多种植物病原真菌具有拮抗作用，然而，关于该菌株对烟草疫霉的拮抗机理包括是否抑制孢子囊及游动孢子的形成、抑或产生抗菌物质及其在烟草根际的定殖能力等均有待进一步研究。

致谢: 感谢加拿大 Guelph 大学 Tom Hsiang 教授帮助润色英文摘要。

参 考 文 献

- [1] Jacobi WR, Main CE, Powell NT. Influence of temperature and rainfall on the development of tobacco black shank[J]. *Phytopathology*, 1983, 73(2): 139-143.
- [2] Csinos AS, Fortnum BA, Powell NT, et al. Resistance of tobacco cultivars and candidate cultivars to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. *Tobacco Science*, 1984, 28: 153-155.
- [3] Csinos AS, Minton NA. Control of tobacco black shank with combinations of systemic fungicides and nematicides or fumigants[J]. *Plant Disease*, 1983, 67(2): 204-207.
- [4] Shew HD, Lucas GB. *Compendium of Tobacco Diseases*[M]. Saint Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press, 1991: 17-20.
- [5] Zhang XG, Sun WX, Guo L, et al. Genetic and pathogenic variation among tobacco black shank strains of *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* from the main tobacco growing in China[J]. *Journal of Phytopathology*, 2003, 151(5): 259-266.
- [6] 李梅云, 祝明亮. 烟草黑胫病菌对甲霜灵的抗性测定[J]. *中国农学通报*, 2006, 22(9): 377-379.
- [7] Haas D, Keel C. Regulation of antibiotic production in root colonizing *Pseudomonas* spp. and relevance for biological control of plant disease[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2003, 41(1): 117-153.
- [8] Welbaum G, Sturz AV, Dong Z, et al. Managing soil microorganisms to improve productivity of agro-ecosystems[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2004, 23(2): 175-193.
- [9] Gerhardson B. Biological substitutes for pesticides[J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, 20(8): 338-343.
- [10] Wang HC, Li WH, Chen QY, et al. A rapid microbioassay for discovery of antagonistic bacteria for *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. *Phytopathology*, 2012, 102(3): 267-271.
- [11] Wang HC, Yang SJ, Wang MS, et al. Sensitivity of *Phytophthora parasitica* to mandipromid: *in vitro* determination of baseline sensitivity and *in vivo* fungitoxicity[J]. *Crop Protection*, 2013, 43: 251-255.
- [12] Oku S, Nishiyama M, Takao Y. Selective isolation of bacteria from soil with hydrophobic materials[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2011, 27(8): 1941-1945.
- [13] 朱宏建, 欧阳小燕, 周倩, 等. 一株辣椒尖孢炭疽病菌拮抗菌株的分离鉴定与发酵条件优化[J]. *植物病理学报*, 2012, 4(42): 418-424.
- [14] Kauffmann IM, Schmitt J, Schmid RD. DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(5): 665-670.
- [15] George D, Giovanni D, Lidia S, et al. Fingerprinting of mixed bacterial strains and Biolog gram-negative (GN) substrate communities by enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-PCR (ERIC-PCR)[J]. *Current Microbiology*, 1999, 38(4): 217-223.
- [16] Osborne C, Galic M, Sangwan P, et al. PCR-generated artefact from 16S rRNA gene-specific primers[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 248(2): 183-187.
- [17] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [18] Berg G. Rhizobacteria of oilseed rape antagonistic to *Verticillium dahliae* var. *longisporum* STARK[J]. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 1996, 103(1): 20-30.
- [19] Lô-Pelzer E, Aubertot JN, Bousset L, et al. Phoma stem canker (*Leptosphaeria maculans*/L. *biglobosa*) of oilseed rape (*Brassica napus*): is the G₂ Disease Index a good indicator of the distribution of observed canker severities?[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 125(4): 515-522.
- [20] 王媛, 韩舜愈, 祝霞, 等. 果胶酶高产菌的筛选及发酵条件的优化[J]. *甘肃农业大学学报*, 2010, 45(3): 117-121.
- [21] Kloepper JW, Beauchamp CJ. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 1992, 38(12): 1219-1232.
- [22] Ren XL, Zhang N, Cao MH, et al. Biological control of tobacco black shank and colonization of tobacco roots by a *Paenibacillus polymyxa* strain C5[J]. *Biology and Fertilizer of Soils*, 2012, 48(6): 613-620.
- [23] Jin FL, Ding YQ, Ding W, et al. Genetic diversity and phylogeny of antagonistic bacteria against *Phytophthora nicotianae* isolated from tobacco rhizosphere[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011, 12(5): 3055-3071.
- [24] Bie XM, Lu ZX, Lu FX. Screening the main factors affecting extraction of the antimicrobial peptide from *Bacillus* sp. fmbJ using Plackett-Burman method[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2005, 21(6/7): 925-928.
- [25] Sabaté DC, Carrillo L, Carina Audisio M. Inhibition of *Paenibacillus larvae* and *Ascosphaera apis* by *Bacillus subtilis* isolated from honeybee gut and honey samples[J]. *Research in Microbiology*, 2009, 160(3): 193-199.
- [26] Shen SS, Choi OH, Park SH, et al. Toot colonizing and biocontrol competency of *Serratia plymuthica* A21-4 against phytophthora blight of pepper[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2005, 21(1): 64-67.
- [27] Weller DM. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1988, 26(1): 397-407.