

研究报告

附子白绢病拮抗细菌 CZ1 的分离鉴定、发酵条件优化及防效测定

施春兰¹, 朱国渊¹, 秦得强¹, 叶坤浩¹, 杨丽¹, 魏朝霞¹, 曾华兰², 叶鹏盛², 吴国星^{*1}

1 云南农业大学植物保护学院, 云南 昆明 650201

2 四川省农业科学院经济作物育种栽培研究所, 四川 成都 610066

施春兰, 朱国渊, 秦得强, 叶坤浩, 杨丽, 魏朝霞, 曾华兰, 叶鹏盛, 吴国星. 附子白绢病拮抗细菌 CZ1 的分离鉴定、发酵条件优化及防效测定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4485-4498.

SHI Chunlan, ZHU Guoyuan, QIN Deqiang, YE Kunhao, YANG Li, WEI Zhaoxia, ZENG Hualan, YE Pengsheng, WU Guoxing. An antagonistic bacterial strain CZ1 against southern blight on *Aconitum carmichaelii*: isolation, identification, optimization of fermentation conditions, and evaluation of control effect[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4485-4498.

摘要:【背景】附子白绢病是齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii*)引起的土传病害, 给附子生产带来了巨大损失。【目的】明确对齐整小核菌具有较好拮抗作用的菌株 CZ1 的分类地位、优化发酵条件及对附子白绢病的防治效果。【方法】采用稀释涂布的方法从叉角厉蝽马氏管内分离细菌, 平板对峙法筛选对齐整小核菌有较强拮抗力的菌株, 且测定该菌株对其他植物病原真菌的抑制作用; 通过形态特征、生理生化特征以及 16S rRNA 基因序列等方法明确该菌株的分类地位; 以细菌发酵液在波长 600 nm 时的 OD 值为指标, 并以单因素试验和正交试验的方法进行培养基组分及发酵条件优化; 通过室内盆栽试验明确防治效果。【结果】分离获得 6 株细菌, 其中菌株 CZ1 对齐整小核菌的平板对峙抑制率最高, 菌株 CZ1 对烟草疫霉(*Phytophthora nicotiana*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)等均有抑制效果。菌株 CZ1 被初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。其最佳培养基配方为: 蔗糖 15.00 g/L, 蛋白胨 25.00 g/L, 酵母浸粉 7.50 g/L; 最佳培养条件: 接种量 2%, 装液量 90 mL, 转速为 210 r/min, 温度 36 °C, 初始 pH 8.0、培养时间 120 h。室内盆栽试验结果表明, 菌株 CZ1 对附子白绢病的平均防效可以达到 59.26%。【结论】菌株 CZ1 在附子白绢病的防治上具有较好生防潜力。

关键词: 叉角厉蝽; 内生菌; 附子白绢病; 发酵条件; 防效

资助项目: 四川省区域创新合作项目(2021YFQ0022); 云南省科技计划项目(202105AC160037)

This work was supported by the Sichuan Provincial Regional Innovation Cooperation Project (2021YFQ0022) and the Science and Technology Planning Project of Yunnan Province (202105AC160037).

*Corresponding author. E-mail: wugx1@163.com

Received: 2023-02-24; Accepted: 2023-04-21; Published online: 2023-05-23

An antagonistic bacterial strain CZ1 against southern blight on *Aconitum carmichaelii*: isolation, identification, optimization of fermentation conditions, and evaluation of control effect

SHI Chunlan¹, ZHU Guoyuan¹, QIN Deqiang¹, YE Kunhao¹, YANG Li¹, WEI Zhaoxia¹, ZENG Hualan², YE Pengsheng², WU Guoxing^{*1}

1 College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China

2 Industrial Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, Sichuan, China

Abstract: [Background] Southern blight is a soil-borne disease caused by *Sclerotium rolfsii*, causing severe loss to *Aconitum carmichaelii* production. [Objective] To clarify the taxonomic status of an antagonistic strain CZ1 against *S. rolfsii*, and optimize the fermentation conditions to maximize the control effect on southern blight of *A. carmichaelii*. [Methods] The dilution-plate coating method was employed to isolate bacteria from the Malpighian tubules of *Cantheconidae furcellata*. The plate confrontation assay was employed to screen out the strain with strong resistance to *S. rolfsii*, and the inhibitory effects of this strain on other plant pathogenic fungi were determined. The taxonomic status of the strain was determined based on morphological characteristics, physiological and biochemical properties, and 16S rRNA gene sequence. With OD_{600} value of the fermentation broth as the indicator, single factor and orthogonal experiments were carried out to optimize the medium components and fermentation conditions. Furthermore, indoor pot experiment was carried out to evaluate the control effect of the strain. [Results] Six strains of bacteria were isolated, among which CZ1 had the highest inhibition rate on *S. rolfsii*. CZ1 had inhibitory effects on other plant pathogenic fungi such as *Phytophthora nicotiana* and *Fusarium oxysporum* and was preliminary identified as *Bacillus subtilis*. The optimal culture medium was composed of 15.00 g/L sucrose, 25.00 g/L peptone, and 7.50 g/L yeast extract. The strain showed the highest biomass when cultured at the inoculation amount of 2%, liquid loading volume of 90 mL, 210 r/min, 36 °C, and initial pH 8.0 for 120 h. The results of indoor pot experiment showed that the average control efficiency of CZ1 against the southern blight on *A. carmichaelii* reached 59.26%. [Conclusion] CZ1 strain has good potential in the biocontrol of southern blight on *A. carmichaelii*.

Keywords: *Cantheconidae furcellata* Wolff; endophytes; southern blight on *Aconitum carmichaelii*; fermentation conditions; control effect

附子俗称乌药，又名乌头、川乌，属毛茛科乌头属多年生草本植物，是一种常用中药，具有抗炎、镇痛、抗衰老、降糖和降血脂等药理活性^[1]。中医药事业的发展使附子需求增加，

但由于栽培条件、气候条件和连作等原因，植株病虫害发生严重。其中由齐整小核菌 (*Sclerotium rolfsii*)引起的附子白绢病是土传性真菌病害，高温多湿季节发病较严重，发病时

危害植株的根茎部分,进而危害植株地上部分,影响附子植株的营养积累与生长,从而对附子的产量和质量产生很大影响,严重时可造成50%以上的减产^[2-4]。因此亟须找到适宜药剂来防治该种病害。

附子白绢病的防治多通过轮作、土壤消毒及使用多菌灵、敌克松、氟酰胺和异菌脲等化学药剂来降低其发病率,目前仍以化学防治和农业防治为主。但长期不规范用药易对环境造成污染,还造成农药残留、诱导病原菌的抗性增强等一系列问题。因此,利用绿色高效生防菌进行生物防治对附子的生产具有重要意义。生物防治具有无残留、无污染等优势,芽孢杆菌、木霉、青霉、链霉菌等相继被发现用于病害的防治并制成生物菌剂,实现了商品化^[4-6]。目前用于生物防治研究和应用的芽孢杆菌有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilis*)、多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)和蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)等^[7]。Chen 等^[8]通过对花生种子进行内生菌分离,发现6株对齐整小核菌有较强拮抗活性的菌株。潘梦诗等^[9]也发现贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) BS-1对花生白绢病病原菌的抑制率可以达到81.93%。此外,木霉菌(*Trichoderma* spp.)作为生防真菌也被广泛研究并应用,具有抑制其他病原菌的生长、寄生作用^[10]。Hua 等^[11]发现一株可以产生胶质毒素的菌株 *Trichoderma virens* T23 对齐整小核菌具有较高拮抗活力。Li 等^[12]发现灰黄青霉(*Penicillium griseofulvum*) CF3 不仅可以降低乌头白绢病的发生,还可以促进乌头的生长。目前齐整小核菌的拮抗菌获取对象大多仍局限于土壤或者植株,来源于昆虫的研究鲜有报道^[13]。

马氏管是昆虫用于清除代谢产物、存储或转移有毒化合物的排泄器官^[14]。相关文献表明

马氏管中存在共生菌参与机体的抗病、免疫及协同进化^[15]。叉角厉蝽(*Eocanthecona furcellata*, Wolff)是半翅目(*Hemipter*)蝽科(*Pentatomida*)益蝽亚科(*Asopinae*)厉蝽属(*Eocanthecona*)的重要捕食性天敌昆虫,分布于热带和亚热带^[16],有关叉角厉蝽马氏管内生菌的研究鲜见报道。本文拟采用稀释涂布的方法从叉角厉蝽马氏管分离并尝试筛选对附子白绢病有较好拮抗效果的细菌,然后对该拮抗活性高的菌株进行初步鉴定,并优化该菌株的最佳发酵条件并测定其室内防治效果,以期为该菌株防治附子白绢病提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

生防菌:菌株分离自叉角厉蝽马氏管,编号为 CZ1,保存于本实验室。

病原菌:齐整小核菌(*S. rolfsii*)、烟草疫霉(*Phytophthora nicotiana*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、链格孢菌[*Alternaria alternate* (Fries) Keisslar]、多主棒孢菌(*Corynespora cassiicola*)、胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)。由本实验室自主分离鉴定并保存。

1.1.2 培养基

营养琼脂培养基(NA)、牛肉膏酵母葡萄糖培养基(NYBD)、蛋白胨酵母蔗糖培养基(YSP)、完全培养基(CM)、细菌基础培养基(LB)和马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)均参考文献^[17]配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨和酵母浸粉,北京奥博星生物有限公司;牛肉膏,广东环凯生物有限公司;葡萄糖、蔗糖和氯化钠,天津市大茂化学试剂厂。

超净工作台,苏州安泰空气技术有限公司;智能型人工气候箱,宁波东南仪器有限公司;

立式蒸汽灭菌锅,江苏登冠医疗器械有限公司;电热鼓风干燥箱,上海一恒科学有限公司;恒温摇床,易晨仪器制造有限公司;分光光度计,岛津仪器(苏州)有限公司。

1.2 拮抗细菌的分离

参照高平等^[18]的方法并略作改动。先将8头叉角厉蝽成虫置于-20℃冰箱3-5 min直至失去活力,后用酒精进行浸泡消毒处理15-30 s,用无菌水清洗3次,用解剖针在解剖镜下对叉角厉蝽进行解剖并得到马氏管。在超净环境下,对马氏管进行研磨并梯度稀释(10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7}),分别取已稀释研磨液100 μL于NA平板涂布,于28℃培养箱中培养2-4 d。每个处理3次重复,下同。分别挑取单菌落并于NA培养基上划线培养,纯化好菌株并保存于4℃冰箱备用。

1.3 拮抗细菌抑菌作用测定

1.3.1 平板对峙法

参照何明川等^[19]的方法并略作改动。将培养4 d的齐整小核菌打成6 mm菌饼,接于PDA平板中间,细菌用无菌牙签十字对称接种在距菌饼2 cm左右处,于28℃培养箱培养,4 d后观察并记录抑菌圈大小。同样的方法测定拮抗细菌对尖孢镰刀菌、烟草疫霉、多主棒孢菌、胶孢炭疽菌和链格孢菌的拮抗作用。

1.3.2 拮抗菌挥发气体对附子白绢病菌菌落生长及产菌核数的影响

参照徐玲娜等^[20]的方法加以改动,取100 μL拮抗菌于LB培养基上涂布,与接好齐整小核菌菌饼的PDA培养基进行对扣培养,以不涂布拮抗菌作为对照。于28℃恒温培养箱中培养4 d后观察并记录菌落直径,于20 d后观察并记录菌核的产生情况。

1.4 拮抗细菌的鉴定

1.4.1 形态及生理生化特征

将菌株CZ1接种在LB培养基上,28℃培养

3 d,观察单菌落并对其进行革兰氏染色。菌株生理生化特性依据《微生物学实验》^[17]进行测定。

1.4.2 系统发育树构建

采用细菌16S rRNA基因通用引物27F(5'-A GAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和1492R(5'-GGT TACCTTGTTACGACTT-3')对菌株的16S rRNA基因进行PCR扩增^[17],引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。将测序结果提交至NCBI基因库并进行BLAST比对,选择并下载相似性较高的序列使用ClustalX 1.83和MEGA 7软件构建系统发育树^[17]。

1.5 拮抗细菌发酵条件筛选

1.5.1 种子液制备

挑取菌株CZ1单菌落接种于100 mL LB液体培养基中,28℃、180 r/min条件下培养24 h,备用。

1.5.2 培养基优化

将50 μL种子液分别接入100 mL YSP、NYBD、NA、LB和CM培养基中,28℃、180 r/min振荡培养24 h后测定细菌 OD_{600} 值,筛选最佳培养基^[19]。每个处理3次重复,下同。

1.5.3 碳源类型对菌株生长量的影响

以上述筛选所得最佳培养基为基础培养基,以等量麦芽糖、淀粉、葡萄糖、蔗糖和乳糖进行碳源筛选,其余不变,接入种子液后培养及测定过程参照1.5.2,筛选最佳碳源。

1.5.4 氮源类型对菌株生长量的影响

以筛选所得最佳培养基为基础培养基,以等量蛋白胨、甘氨酸、酵母粉、氯化铵和硝酸铵分别作为氮源,其余不变,接入菌种后培养及测定过程参照1.5.2,筛选最佳氮源。

1.5.5 培养基组分正交试验

据上述碳氮源筛选结果,优化蔗糖、酵母浸粉和蛋白胨最佳用量以确定最佳培养基组分配方,设置如表1所示三因素三水平正交试验。

表 1 正交试验因素

Table 1 Orthogonal test factors

处理 Treatment	蔗糖 Sucrose (%)	酵母浸粉 Yeast powder (%)	蛋白胨 Peptone (%)
1	1.50	0.50	1.00
2	2.00	1.00	1.50
3	2.50	1.50	2.00

1.5.6 不同初始接菌量对菌株生长量的影响

以上述筛选结果为基础, 分别接入体积比为 0.05%、0.10%、0.50%、1.00% 和 2.00% 的种子液于 YSP 培养基中, 培养及测定过程参照 1.5.2, 筛选最佳初始接菌量。

1.5.7 不同装液量体积对菌株生长量的影响

以上述筛选结果为基础, 30、60、90、120 和 150 mL 作为装液量分别装于 250 mL 三角瓶中, 接入菌种后培养及测定过程参照 1.5.2, 筛选最佳装液量。

1.5.8 转速高低对菌株生长量的影响

以上述筛选结果为基础, 转速分别设置为 120、150、180、210 和 240 r/min, 接入菌种后培养时间及测定方法以 1.5.2 为参考, 筛选最佳转速。

1.5.9 温度高低对菌株生长量的影响

以上述筛选结果为基础, 恒温摇床温度设置为 20、24、28、32、36、40、42 和 44 °C, 接入菌种后培养时间及测定方法以 1.5.2 为参考, 筛选最佳温度。

1.5.10 初始 pH 对菌株生长量的影响

以上述筛选结果为基础, 用 0.10% 盐酸和 0.10% 的氢氧化钠将 pH 值分别调节为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 和 10.0, 接入菌种后培养时间及测定方法以 1.5.2 为参考, 筛选最佳初始 pH。

1.5.11 发酵时间对菌株生长量的影响

以上述筛选结果为基础接入菌种。在 0–24 h 内每 2 h 测量 OD_{600} 值, 后每 12 h 测量 OD_{600} 值, 绘制细菌生长曲线, 筛选最佳培养时间。

1.6 附子白绢病室内盆栽防效测定

根据彭启超等^[21]的方法加以改动。试验共设 6 个处理, 每个处理 9 盆附子, 每盆 1 株, 试验盆栽随机摆放。保护试验: 先分别用拮抗菌发酵液(1×10^8 CFU/mL)、噻呋酰胺、无菌水对植株进行灌根处理, 2 d 接种病原菌即直接把病原菌菌饼接种到土壤中。治疗试验: 先接种病原菌即直接把病原菌菌饼接种到土壤中, 2 d 后用拮抗菌发酵液(1×10^8 CFU/mL)、噻呋酰胺、无菌水进行灌根处理。接种病原菌 20 d 对发病情况进行调查。参考李玉龙^[2]的文献, 病情分级按茎叶枯萎程度将茎叶病情分为 4 级: 0 级: 无病叶; 1 级: 病叶数量小于总叶片数的 50%; 2 级: 病叶数量为 50%–100%, 但茎秆未枯萎; 3 级: 病叶数量为 100%, 茎秆枯萎。分别统计各个处理各病级的株数, 计算病情指数和防效。

1.7 数据处理

试验数据采用 SPSS 20.0、GraphPad Prism 8.0 和 Microsoft Excel 2016 进行分析; 测序结果在 NCBI 用 BLAST 比对, 使用 ClustalX 1.83 和 MEGA 7 软件对已下载的相似性较高的序列进行系统发育树的构建^[22]。

菌落直径(mm)=(横径+纵径)/2;

抑菌率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100;

菌核萌发抑制率(%)=(对照菌核数量-处理菌核数量)/对照菌核数量×100;

病情指数=[\sum (各级病株×各级代表值)/调查总株数×3]×100;

防治效果(%)=[(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数]×100。

2 结果与分析

2.1 菌株分离与抑菌活性测定

从叉角厉蝽马氏管中共分离得到 6 株细菌。

平板对峙结果表明 6 株细菌中 HC1、C1 和 H1 对齐整小核菌无抑制作用, 而 CZ1、Z1 和 TC1 对齐整小核菌均有抑制作用。其中菌株 CZ1 对齐整小核菌的抑制率最高, 为 72.10% (图 1, 表 2)。此外, 菌株 CZ1 对尖孢镰刀菌、烟草疫霉、多主棒孢菌、胶孢炭疽菌和链格孢菌也有抑制作用, 且抑制率均在 60% 以上 (表 2)。

由表 3 可知, 拮抗菌 CZ1 挥发气体对附子白绢病菌菌落生长具有抑制作用, 抑制率为

62.10%; 同时拮抗菌 CZ1 挥发气体对可抑制附子白绢病菌产生的菌核数量抑制率为 63.50%。

2.2 拮抗菌鉴定结果

2.2.1 拮抗菌形态及生理生化现象

LB 培养基上培养 2-3 d 的菌株 CZ1 呈乳白稍黄菌落, 菌落边缘不规则。菌体呈杆状, 能生芽孢, 为革兰氏阳性菌, 革兰氏染色如图 2 所示。可使牛奶、明胶发生液化, V.P、甲基红试验呈阴性, 生理生化特征如表 4 所示。

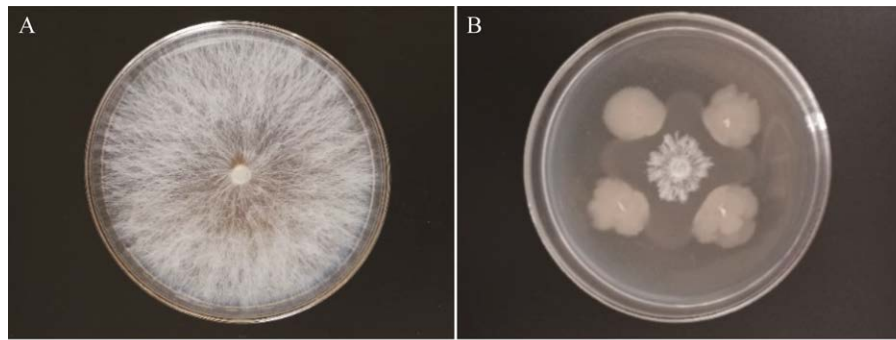


图 1 CZ1 对齐整小核菌的平板对峙结果 A: 对照组. B: 处理组

Figure 1 The results of CZ1 plate confrontation against *Sclerotium rolfsii*. A: Control group. B: Treatment group.

表 2 CZ1 菌株对不同植物病原真菌的平板抑制效果

Table 2 Plate inhibition effects of CZ1 strain on different plant pathogenic fungi

病害名称 Name of disease	病原菌 Pathogen	菌落直径 Colony diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
附子白绢病 Southern blight on <i>Aconitum carmichaeli</i>	齐整小核菌 <i>Sclerotium rolfsii</i>	25.10±3.57b	72.10±3.97a
烟草黑胫病 Tobacco black shank	烟草疫霉 <i>Phytophthora nicotiana</i>	27.72±0.52b	69.20±0.46a
烟草赤星病 Tobacco brown spot	链格孢菌 <i>Alternaria alternata</i> (Fries) Keisslar	25.97±0.22b	71.15±0.62a
烟草根腐病 Tobacco root rot	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	29.35±0.27ab	67.39±0.35ab
黄瓜靶斑病 Cucumber target spot disease	多主棒孢菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	27.17±0.25b	69.81±0.48a
咖啡炭疽病 Anthracnose of coffee	胶孢炭疽菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	33.12±0.07a	63.20±0.26c

同列数据后不同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 0.05 水平间差异显著。下同

Different lowercase letters after data in the same column indicate significant difference between 0.05 level by Duncan's new complex range test. The same below.

表 3 CZ1 挥发性气体对齐整小核菌菌落和菌核的抑制效果

Table 3 Inhibitory effect of volatile gas of strain CZ1 on colony and sclerotia of *Sclerotium rolfsii*

Item	挥发性气体	对照
	Volatile gas	CK
菌落直径	34.08±0.62b	90.00±0.00a
Colony diameter (mm)		
菌落抑制率	62.10	-
Colony inhibition rate (%)		
菌核数量	16.67±16.67b	136.67±14.81a
Sclerotium amount (dish)		
菌核抑制率	63.50	-
Sclerotium inhibition rate (%)		

-: 无数据. 下同

-: No data. The same below.

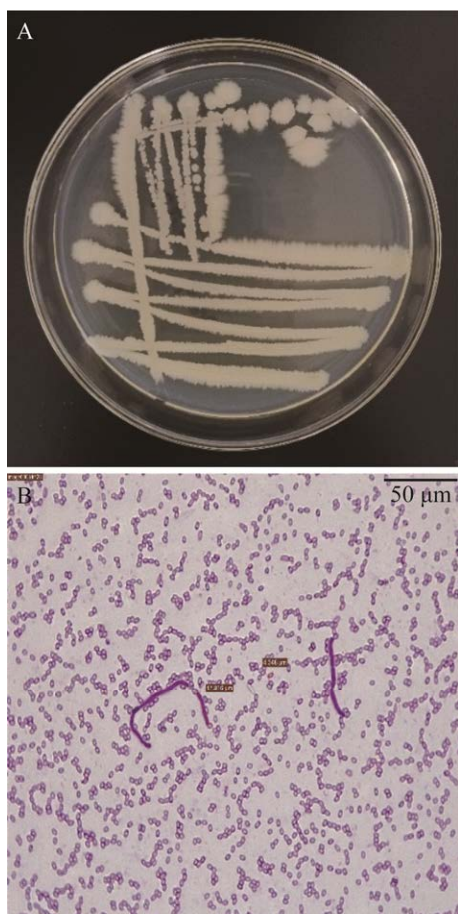


图 2 菌株 CZ1 菌落形态(A)及革兰氏染色结果(B)
Figure 2 Colony morphology (A) of strain CZ1 and the result of Gram staining (B).

表 4 菌株 CZ1 生理生化特征

Table 4 Physiological and biochemical characteristics of strain CZ1

Items	Results
Starch hydrolysis	+
Grease decomposition	-
Litmus milk	+
Gelatin liquefaction	+
Urea decomposition	-
Glucose fermentation	+
Lactose fermentation	-
Indole test	-
H ₂ S hydrolysis	+
Methyl red test	-
V-P test	-
Citric acid decomposition	-

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

2.2.2 拮抗菌分子鉴定结果

将菌株 CZ1 校对后的序列提交至 GenBank 数据库中进行比对, 分析结果表明菌株 CZ1 与枯草芽孢杆菌的相似性较高, 下载相似性高的序列, 使用 ClustalX 1.83 和 MEGA 7 软件构建系统发育树(图 3), 结合 2.2.1 结果将菌株 CZ1 初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

2.3 最佳培养发酵条件优化

2.3.1 培养基与菌株生长量的关系

如图 4A 可知, 菌株 CZ1 在 5 种培养基上均可生长, 且菌株菌体量具有显著差异性($F=31.43$, $P<0.01$), OD_{600} 分别为 1.62、1.55、1.52、1.54 和 0.48。YSP 是该菌株的最适培养基。

2.3.2 碳源与菌株生长量的关系

由图 4B 可知, 不同碳源培养菌株的生长情况存在显著差异($F=79.26$, $P<0.01$)。碳源为麦芽糖、葡萄糖和乳糖时, 菌株的 OD_{600} 为 1.59、1.56 和 1.38。当碳源为蔗糖时, 菌株生长较好, OD_{600} 为 1.71, 蔗糖为该菌株的最佳碳源。

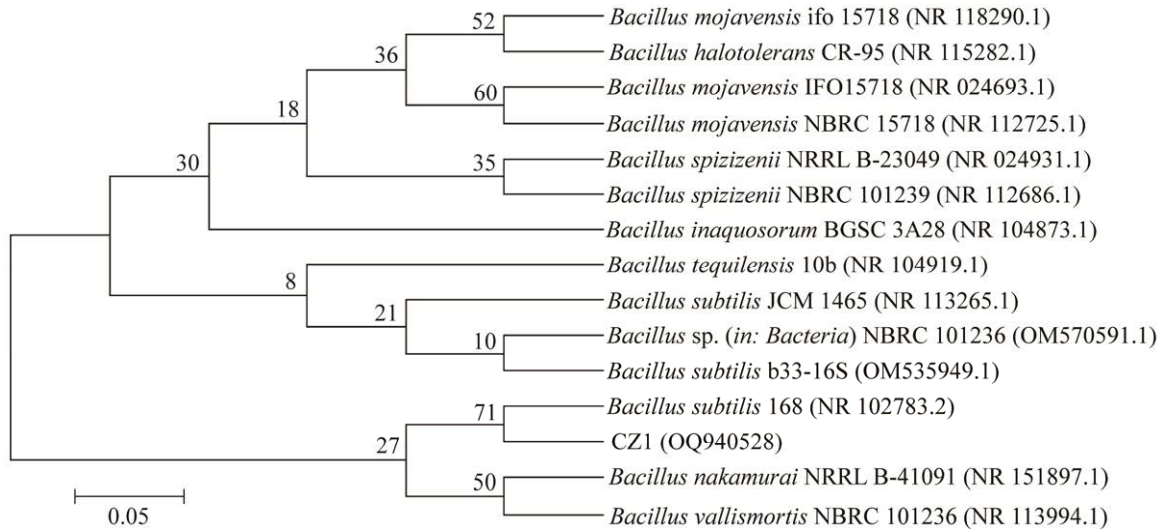


图3 菌株 CZ1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内为基因 GenBank 登录号; Bootstrap 次数设置为 1 000, 分支点上的数据代表 bootstrap 的支持率; 标尺 0.05 表示序列进化差异

Figure 3 Phylogenetic tree of strain CZ1 based on 16S rRNA gene sequence. The GenBank accession number of the gene is in brackets; Bootstrap times are set to 1 000, the numbers on the branch points indicate the support rate for bootstrap; Ruler represents 0.05 of sequence evolutionary differences.

2.3.3 氮源与菌株生长量的关系

由图 4C 可知,不同氮源培养菌株的生长情况存在显著差异($F=117.31$, $P<0.01$)。氮源为酵母粉时,该菌株的 OD_{600} 最高,为 1.65,说明其为最佳氮源。其次为蛋白胨、氯化铵和甘氨酸,菌株的 OD_{600} 在硝酸铵为氮源时最低,仅为 0.74。

2.3.4 培养基组分正交试验结果

正交试验结果如表 5 所示。蛋白胨、蔗糖和酵母浸粉对细菌生长的影响顺序可据表中 R 值大小排序得到:酵母浸粉>蔗糖>蛋白胨;结合 K 值大小所得优化培养基配方为:酵母浸粉 0.75 g,蔗糖 1.50 g,蛋白胨 2.50 g,蒸馏水 100 mL。

2.3.5 初始接菌量与菌株生长量的关系

由图 4D 可知,选用不同体积比的接菌量时($F=1.02$, $P<0.50$),菌株的 OD_{600} 在体积比为 2%时最大,为 1.87,说明 2%是其最适接菌量。

2.3.6 装液量与菌株生长量的关系

由图 4E 可知,不同装液量菌株的生长情况存在显著差异($F=54.75$, $P<0.01$)。装液量为 30 mL 时,菌株的生长量最低, OD_{600} 为 1.32。装液量为 60、90、120 和 150 mL 时, OD_{600} 分别为 1.83、1.85、1.83、1.79,说明 90.00 mL 是其最佳装液量。

2.3.7 转速与菌株生长量的关系

由图 4F 可知,菌株的生长情况在不同转速下存在显著差异($F=6.75$, $P<0.01$)。转速为 210 r/min 时,菌株生长量最大, OD_{600} 为 1.91。在转速为 120、150、180 和 240 r/min 时,菌株的 OD_{600} 分别为 1.74、1.79、1.86 和 1.84。因此最佳转速为 210 r/min。

2.3.8 温度与细菌生长速度的关系

由图 4G 可知,CZ1 菌株在不同温度条件下其 OD_{600} 存在显著差异($F=32.21$, $P<0.01$)。36 °C 最适合该菌株的生长,此时 OD_{600} 为 2.11。

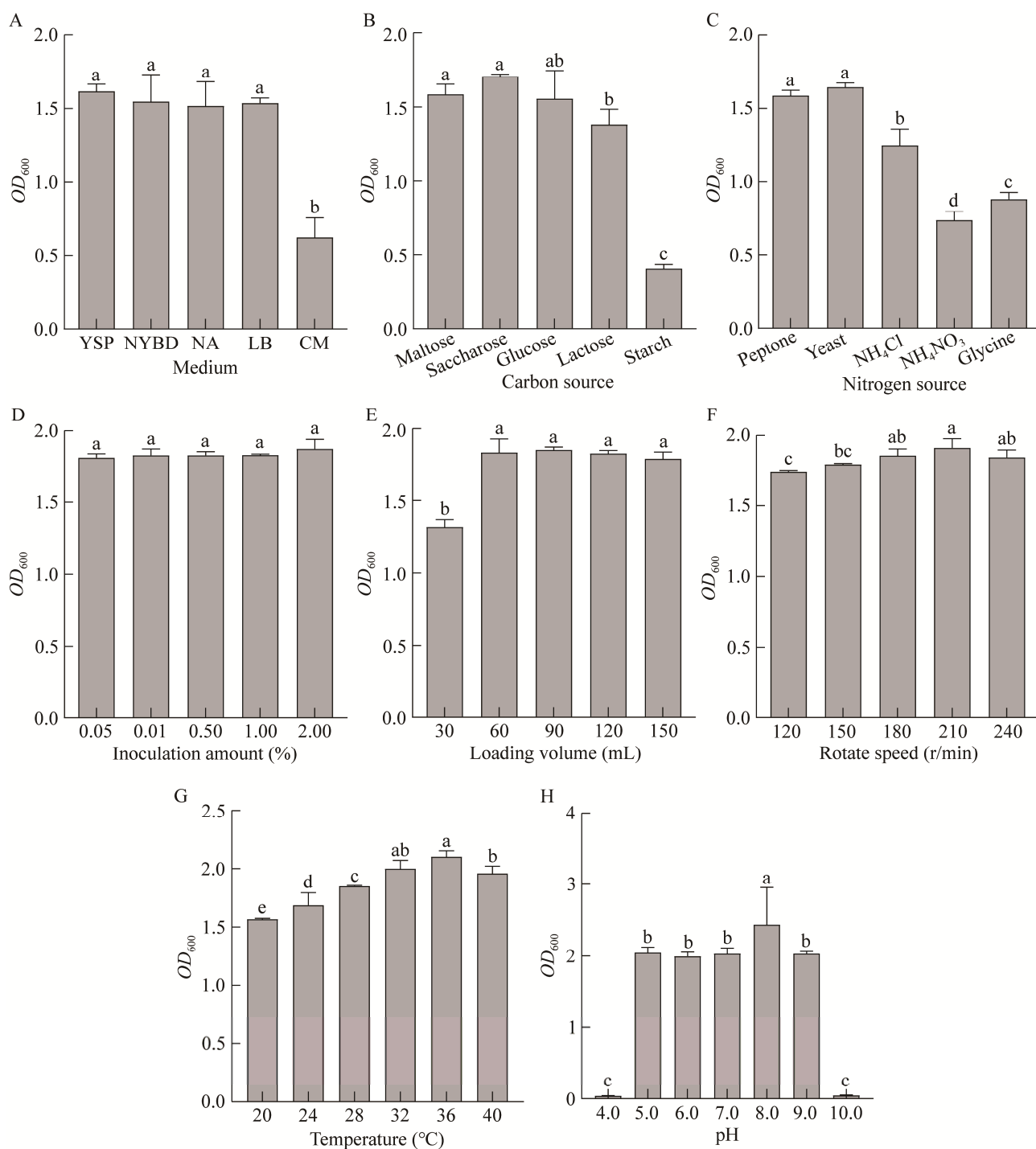


图 4 不同培养条件对 CZ1 菌株生长速度的影响 A: 培养基. B: 碳源. C: 氮源. D: 接菌量. E: 装液量. F: 转速. G: 温度. H: pH

Figure 4 Effects of different cultural conditions on the growth rate of CZ1 strain. A: Medium. B: Carbon sources. C: Nitrogen sources. D: Inoculation amount. E: Loading volume. F: Rotate speed. G: Temperature. H: pH value.

表 5 正交试验结果

Table 5 Orthogonal test result

处理 Treatment	因素 Factors		
	蔗糖 Sucrose (%)	酵母浸粉 Yeast powder (%)	蛋白胨 Peptone (%)
1	0.50	0.25	1.50
2	0.50	0.50	2.00
3	0.50	0.75	2.50
4	1.00	0.25	2.00
5	1.00	0.50	2.50
6	1.00	0.75	1.50
7	1.50	0.25	2.50
8	1.50	0.50	1.50
9	1.50	0.75	2.00
K_1	3.87	3.42	4.14
K_2	4.35	4.74	4.53
K_3	5.25	5.31	4.80
k_1	1.29	1.14	1.38
k_2	1.45	1.58	1.51
k_3	1.75	1.77	1.60
R	0.46	0.63	0.22

K_i : 任意列上水平号为 i 时所对应的试验指标之和; k_i :

K_i 的平均值; R : 极差

K_i : Sum of the test indicators corresponding to the level number i on any column; k_i : Average value of K_i ; R : The extreme difference.

2.3.9 初始 pH 对细菌生长速度的影响

由图 4H 可知, 菌株在不同 pH 条件下的生长情况存在显著差异($F=76.74, P<0.01$)。在 pH 5.0–9.0 均可正常生长, 而在 pH 值为 4.0 和 10.0 时, OD_{600} 值仅为 0.04、0.05。pH 值为 8.0 时 OD_{600} 为 2.34, 因此 pH 8.0 为最适生长 pH。

2.3.10 发酵时间对细菌生长速度的影响

由图 5 可知, 在 0–168 h 内, 不同时间的菌株生长存在差异($F=319.93, P<0.01$)。表示菌株 CZ1 生长量的 OD_{600} 在 0–120 h 内随着发酵时间的增加而增加, 120 h 之后 OD_{600} 开始逐渐降低, 菌株处于生长衰亡期。在 120 h 时 OD_{600} 达到最高, 为 2.55, 说明 120 h 是其最适生长时间。

2.4 室内盆栽防效

温室盆栽试验结果如表 6 所示, 在保护试验中, 使用噻呋酰胺的平均防效可以达到 66.67%, 用拮抗菌菌株发酵液处理的防效也可以达到 53.09%; 治疗试验中, 用拮抗菌 CZ1 菌株处理的平均防效可以达到 59.26%, 使用噻呋酰胺处理的平均防效为 58.03%。

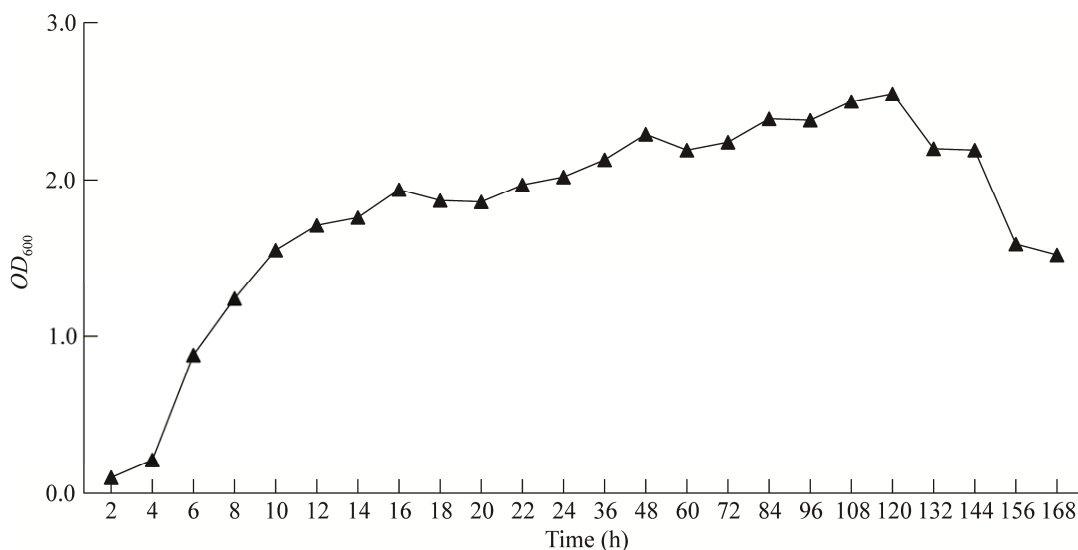


图 5 菌株 CZ1 生长曲线

Figure 5 Growth curve of strain CZ1.

表 6 菌株 CZ1 对附子白绢病的室内防效

Table 6 Results of indoor control effect of strain CZ1 on southern blight

处理 Treatment	保护试验 Protection experiment		治疗试验 Experimental treatment	
	病情指数 Disease index	平均防效 Average control efficacy (%)	病情指数 Disease index	平均防效 Average control efficacy (%)
	CZ1 菌株发酵液 CZ1 strain fermentation broth	46.91±1.24b	53.09±1.24b	40.74±2.14b
噻呋酰胺 Thifluzamide	33.33±2.14c	66.67±2.14a	41.97±1.23b	58.03±1.23b
对照 CK	100.00±0.00a	-	100.00±0.00a	-

-: 无数据

-: No data.

3 讨论与结论

枯草芽孢杆菌是被广泛应用、生长速度快、营养要求简单且自身抗逆性强的模式菌株^[23]。本文从叉角厉蝽马氏管内分离到一株对齐整小核菌有较好抑制效果的菌株 CZ1, 通过对该菌的形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列等进行分析和比对, 将该菌株初步鉴定为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*), 这不仅丰富了昆虫内生防菌资源, 而且为虫源生防菌进行生物防治提供了参考。

生防细菌在营养物质和外界条件适宜时可产生丰富的抑菌物质, 所以对其进行发酵条件的优化显得尤其重要^[24]。何明川^[22]对烟草黑胥病拮抗菌进行发酵条件优化时, 在培养基、碳源、氮源、pH、生长温度、生长转速以及初始接种量等为最适条件时拮抗菌株达到最大生长量, 此时对病原菌的抑制率最大。此外, 徐志周^[25]对香蕉枯萎病拮抗菌 HQB-1 进行发酵条件优化时, 菌株 HQB-1 在碳源、氮源、无机盐、温度、pH 和转速等为最适生长条件时菌体生长量最大, 其抑菌率也最大, 由此推测菌株菌体生长量与病原菌抑制率存在联系。参考前人相关研究方法对 CZ1 菌株采用单因素研究方法完成条件优化筛选, 为其创造适宜培养条件有利

于其在田间进行定殖^[17,19,26]。优化培养基终配方为: 酵母粉 7.5 g/L、蛋白胨 15.0 g/L、蔗糖 20.0 g/L; 试验结果表明: 接种量 2%、装液量 90 mL、转速为 210 r/min、温度 36 °C、初始 pH 值 7.0、培养时间 120 h 为其最佳发酵条件。将枯草芽孢杆菌菌株 CZ1 与其他来源枯草芽孢杆菌 BV10^[27]、B8^[28]、MC4-2^[19]的发酵条件进行比较, 可以发现菌株 BV10 和菌株 B8 在 30 °C 达到最大生长量, 菌株 MC4-2 在 32 °C 达到最大生长量, 而菌株 CZ1 在 36 °C 才达到最大生长量; 不同酸碱度条件下生长情况不同, 菌株 BV10、B8 和 CZ1 三者的最佳 pH 值分别为 8.0、8.0 和 7.0, 差异不大, 而菌株 MC4-2 的最适 pH 值为 6.0; 菌株 CZ1 的最适接种量为 2.0%, BV19 为 3.0%, 两者差异不大, 但菌株 MC4-2 的最适接种量与前两者差异较大, 为 8.0%; 转速方面存在差异, 菌株 BV10 最佳转速为 170 r/min, 而菌株 CZ1 和 MC4-2 最佳转速为 210 r/min; 四者在最佳培养时间也存在差异, 菌株 BV10 与 CZ1 的最佳培养时间均是 120 h, 菌株 B8 最佳培养时间是 48 h, 菌株 MC4-2 的最佳培养时间为 60 h。菌株 BV10、B8、MC4-2 和 CZ1 这 4 株菌均为枯草芽孢杆菌, 但四者生物学特性上仍然存在细微差异, 推测是由于菌株来源不同导致。

本研究用菌体、无菌发酵液及挥发性气体对齐整小核菌的菌丝生长和菌核萌发都开展了相关研究。结果表明,菌株 CZ1 的菌体、挥发性气体可以有效抑制菌丝生长和菌核萌发。菌体对菌丝的抑制率最好,可以达到 72.10%。推测 CZ1 菌株发挥作用的主要物质是其次生代谢产物。相关文献表明产生抑菌活性物质是芽孢杆菌抑制病原菌生长的方法之一,常见其代谢产物有细菌素、纤维素酶、伊枯草菌素、表面活性素、 β -甘露聚糖酶、几丁质酶和碱性蛋白酶等^[29]。

本研究对附子白绢病进行室内盆栽试验的防效测定,发现 CZ1 菌株发酵液在保护试验中有 53.09%的防效,在治疗试验中可以达到 59.26%的防治效果。杨倩倩^[30]用枯草芽孢杆菌 Y14 对花生白绢病进行防效测定,接种病原菌后每隔 7 d 进行数据的调查统计,结果表明 Y14 对花生白绢病在接种病原菌 60 d 后的相对防效可以达到 47.02%,而本研究在接种病原菌 20 d 后的相对防效为 59.26%。杨义等^[31]用 BV22 与化学药剂戊唑醇混配,发现二者混配后对茉莉花白绢病的平均防效比二者单独施用更好,说明二者混配时戊唑醇可以提高 BV22 对茉莉花白绢病的生防效果。

上述研究结果表明 CZ1 菌株对附子白绢病抑制效果较好,是一株具有较大生防潜力的生防菌株。同时,本研究一方面丰富了昆虫内生菌以及附子白绢病的生防菌资源,另一方面也为枯草芽孢杆菌在生物防治方向的发展提供了更多参考和依据。未来应加强 CZ1 菌株代谢产物及生防机制的研究,进一步了解该菌株与病原菌及植株之间的联系。

REFERENCES

- [1] 陈芳. 附子病虫害的发生发展规律及防治研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2007.
- [2] 李玉龙. 生防菌对两种作物病害的防治作用及机理[D]. 杨凌: 西北农林科技大学博士学位论文, 2019.
- [3] 王洪苏, 何韦静, 杜仕静, 方清茂, 罗冰. 药用植物乌头常见病害的病原、发病规律及综合防治[J]. 南方农业, 2022, 16(7): 128-132, 139.
- [4] 黄永生, 张丽, 邵娜. 附子病虫害综合防治技术[J]. 特种经济动植物, 2021, 24(12): 54-55.
- [5] 纪彦鸿, 杨志宏, 王春龙. 附子高产栽培技术[J]. 西北园艺(综合), 2021(5): 42-43.
- [6] 邱浩, 陈佳阳, 赖佑圳, 张国彦, 崔浪军, 魏希颖. 附子内生菌及根际土壤性质与附子生物碱积累的关系研究[J]. 植物科学学报, 2021, 39(6): 643-653.
- [7] 程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 732-737.
- [8] 程亮, 游春平, 肖爱萍. 拮抗细菌的研究进展[J]. 江西农业大学学报, 2003, 25(5): 732-737.
- [9] 潘梦诗, 郭文阳, 张宗源, 岳丹丹, 亓兰达, 王雪妍, 张英涛. 贝莱斯芽孢杆菌对花生白绢病的防治效果[J].
- CHEN F. Study about the disease occurrence principal and prevention of plant disease and pest in *Aconitum carmichaeli* farmland[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2007 (in Chinese).
- LI YL. Biocontrol effect and the mechanism of isolates on plant diseases of two crops[D]. Yangling: Doctoral Dissertation of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese).
- WANG HS, HE WJ, DU SJ, FANG QM, LUO B. The pathogenesis and the law of outbreak of the common diseases of medical plant aconite and how to prevent them comprehensively[J]. South China Agriculture, 2022, 16(7): 128-132, 139 (in Chinese).
- HUANG YS, ZHANG L, SHAO N. Integrated pest control techniques of aconite[J]. Special Economic Animal and Plant, 2021, 24(12): 54-55 (in Chinese).
- JI YH, YANG ZH, WANG CL. High-yield cultivation techniques of aconite[J]. Northwest Horticulture, 2021(5): 42-43 (in Chinese).
- QIU H, CHEN JY, LAI YZ, ZHANG GY, CUI LJ, WEI XY. Relationships between endophytic structure, rhizosphere soil properties and aconite alkaloids accumulations in *Aconitum carmichaelii* Debx[J]. Plant Science Journal, 2021, 39(6): 643-653 (in Chinese).
- CHENG L, YOU CP, XIAO AP. Advance in the study on antagonistic bacteria[J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2003, 25(5): 732-737 (in Chinese).
- CHEN L, WU YD, CHONG XY, XIN QH, WANG DX, BIAN K. Seed-borne endophytic *Bacillus velezensis* LHSB1 mediate the biocontrol of peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(3): 803-813.

- 生物学杂志, 2022, 39(1): 37-41.
- PAN MS, GUO WY, ZHANG ZY, YUE DD, QI LD, WANG XY, ZHANG YT. Biocontrol effects of *Bacillus velezensis* on peanut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*[J]. Journal of Biology, 2022, 39(1): 37-41 (in Chinese).
- [10] 吴加志. 植物土传、根际和内生细菌用于植物病害生物防治潜力的研究[J]. 中国微生态学杂志, 1996, 8(3): 4-13.
- WU JZ. Biological control of plant by soil-borne rhizospheric and endophytic bacteria[J]. Chinese Journal of Microecology, 1996, 8(3): 4-13 (in Chinese).
- [11] HUA LX, ZENG HL, HE L, JIANG QP, YE PS, LIU Y, SUN XF, ZHANG M. Gliotoxin is an important secondary metabolite involved in suppression of *Sclerotium rolfsii* of *Trichoderma virens* T23[J]. Phytopathology, 2021, 111(10): 1720-1725.
- [12] LI Y, GUO Q, WEI X, XUE Q, LAI H. Biocontrol effects of *Penicillium griseofulvum* against monkshood (*Aconitum carmichaelii* Debx.) root diseases caused by *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium* spp.[J]. Journal of Applied Microbiology, 2019, 127(5): 1532-1545.
- [13] 李敏, 何磊鸣, 赵特, 杜鹏强, 高飞, 汪梅子, 张静静, 崔凯娣, 游秀峰, 孙淑君, 周琳. 齐整小核菌研究进展[C]//河南省植物保护学会, 河南省昆虫学会, 河南省植物病理学会. 河南省植物保护学会第十二次、河南省昆虫学会第十一次、河南省植物病理学会第六次会员代表大会暨学术讨论会论文集, 2022: 12.
- LI M, HE LM, ZHAO T, DU PQ, GAO F, WANG MZ, ZHANG JJ, CUI KD, YOU XF, SUN SJ, ZHOU L. Advances in studies of *Sclerotium rolfsii* Saccardo[C]// Henan Society for Plant Protection, Henan Society for Entomological, Henan Society for Plant Pathology. Proceedings of the 12th Member Congress and Symposium of Henan Society for Plant Protection, the 11th Henan Society for Entomological, and the 6th Member Congress and Symposium of Henan Society for Plant Pathology, 2022: 12 (in Chinese).
- [14] 张力丹, 龚旭平, 彭薪霏, 石福明, 常岩林. 庭疾灶螽中肠及马氏管结构[J]. 昆虫学报, 2022, 65(6): 695-707.
- ZHANG LD, GONG XP, PENG XF, SHI FM, CHANG YL. Structures of the midgut and Malpighian tubules in the cave cricket, *Tachycines asymamorus* (Orthoptera: Rhaphidophoridae)[J]. Acta Entomologica Sinica, 2022, 65(6): 695-707 (in Chinese).
- [15] 张瑛. 蝉科昆虫内共生菌的分布规律研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2015.
- ZHANG Y. Distribution of endosymbionts in cicadas (*Hemiptera: Cicadidae*)[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2015 (in Chinese).
- [16] 汤永玉, 赵航, 张曼, 梁晨, 邢孔政, 吴国星, 高熹. 叉角厉蝽低温贮藏最适虫态和条件[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(5): 1345-1353.
- TANG YY, ZHAO H, ZHANG M, LIANG C, XING KZ, WU GX, GAO X. Suitable stage and conditions for low temperature storage of *Eocanthecona furcellata*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(5): 1345-1353 (in Chinese).
- [17] 何明川, 施春兰, 魏聪聪, 曾舒泉, 兰明先, 唐萍, 王志江, 伍显录, 陆光钰, 谢永辉. 烟草黑胥病拮抗细菌的分离、鉴定及发酵条件优化[J]. 南方农业学报, 2022, 53(6): 1604-1615.
- HE MC, SHI CL, WEI CC, ZENG SQ, LAN MX, TANG P, WANG ZJ, WU XL, LU GY, XIE YH. Isolation, identification and optimization of fermentation conditions of antagonistic bacteria against tobacco black shank[J]. Journal of Southern Agriculture, 2022, 53(6): 1604-1615 (in Chinese).
- [18] 高平, 廖贤斌, 李丽芳, 兰明先, 赵航, 陈斌, 吴国星, 高熹. 叉角厉蝽唾液腺转录组及差异分析[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2021, 36(1): 29-38.
- GAO P, LIAO XB, LI LF, LAN MX, ZHAO H, CHEN B, WU GX, GAO X. Transcriptome and difference analysis of *Eocanthecona furcellata* (Wolff)[J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2021, 36(1): 29-38 (in Chinese).
- [19] 何明川, 曾舒泉, 王志江, 詹筱国, 柯昌磊, 李微杰, 张忠, 吴国星, 谢永辉. 一株烟草疫霉拮抗菌 MC4-2 的鉴定、发酵条件优化及防效测定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4636-4648.
- HE MC, ZENG SQ, WANG ZJ, ZHAN YG, KE CL, LI WJ, ZHANG Z, WU GX, XIE YH. Identification, fermentation condition optimization and control effect of an antagonistic strain MC4-2 against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4636-4648 (in Chinese).
- [20] 徐玲娜, 徐新月, 董铮. 死谷芽孢杆菌产生的挥发性物质对桃褐腐病的抑菌作用[J]. 农业工程技术, 2022, 42(8): 20-20, 22.
- XU LN, XU XY, DONG Z. Inhibitory effect of volatile substances produced by *Bacillus vallismortis* on peach brown rot[J]. Agricultural Engineering Technology, 2022, 42(8): 20-20, 22 (in Chinese).
- [21] 彭启超, 黄德龙, 张志鹏, 魏浩, 吴书凤, 吴妍, 李俊, 邓祖科, 王宗抗. 贝莱斯芽孢杆菌 DPT-03 对花

- 生白绢病菌的防控效果[J]. 河南农业科学, 2022, 51(2): 97-103.
- PENG QC, HUANG DL, ZHANG ZP, WEI H, WU SF, WU Y, LI J, DENG ZK, WANG ZK. The biocontrol effect of *Bacillus velezensis* DPT-03 on *Sclerotium rolfsii* in peanut[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2022, 51(2): 97-103 (in Chinese).
- [22] 何明川, 王志江, 谢永辉, 詹筱国, 柯昌磊, 李微杰, 张忠, 吴国星. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2): 428-439.
- HE MC, WANG ZJ, XIE YH, ZHAN YG, KE CL, LI WJ, ZHANG Z, WU GX. Screening, identification and fermentation conditions optimization of antagonistic bacterium against tobacco black shank[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(2): 428-439 (in Chinese).
- [23] 陈羽娇, 余朝阁. 芽孢杆菌在植物病害防治中的应用及研究进展[J]. 农机使用与维修, 2020(11): 39-40.
- CHEN YJ, YU ZG. Application and research progress of *Bacillus* in plant disease control[J]. Farm Machinery Using & Maintenance, 2020(11): 39-40 (in Chinese).
- [24] 叶云峰, 黎起秦, 袁高庆, 付岗, 缪剑华, 林纬. 枯草芽孢杆菌 B47 菌株高产抗菌物质的培养基及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2011, 38(9): 1339-1346.
- YE YF, LI QQ, YUAN GQ, FU G, MIAO JH, LIN W. Optimization of culture medium and fermentation conditions for high production of antimicrobial substance by *Bacillus subtilis* strain B47[J]. Microbiology China, 2011, 38(9): 1339-1346 (in Chinese).
- [25] 徐志周, 王明元, 杜锦鹏, 刘建福, 欧树文, 秦紫艺, 杨可然. 一株香蕉枯萎病拮抗菌 HQB-1 的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(7): 1611-1618.
- XU ZZ, WANG MY, DU JP, LIU JF, OU SW, QIN ZY, YANG KR. Isolation, identification and fermentation optimization of an antagonistic bacterial strain HQB-1 against banana wilt disease[J]. Microbiology China, 2019, 46(7): 1611-1618 (in Chinese).
- [26] 兰明先, 白云梅, 王志江, 谢永辉, 朱法亮, 詹筱国, 曾舒泉, 吴国星. 对紫茎泽兰具有除草活性的特基拉芽孢杆菌 ZLSY5 的鉴定及发酵条件筛选[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(3): 508-517.
- LAN MX, BAI YM, WANG ZJ, XIE YH, ZHU FL, ZHAN YG, ZENG SQ, WU GX. Identification of *Bacillus tequilensis* ZLSY5 strain with herbicidal activity against *Eupatorium adenophorum* and optimization of fermentation conditions[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2021, 37(3): 508-517 (in Chinese).
- [27] 王雅. 枯草芽孢杆菌菌株 Bv10 胞外抗菌物质的纯化及其特性测定[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2013.
- WANG Y. Purification and characterization of antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain Bv10[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2013 (in Chinese).
- [28] 文毅. 利用芽孢杆菌防治鱼腥草白绢病的研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2010.
- WEN Y. Study on biocontrol of southern blight on *Houttuynia cordata* thumb by *Bacillus* spp.[D]. Yaan: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2010 (in Chinese).
- [29] 张德锋, 高艳侠, 王亚军, 刘春, 石存斌. 贝莱斯芽孢杆菌的分类、拮抗功能及其应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(11): 3634-3649.
- ZHANG DF, GAO YX, WANG YJ, LIU C, SHI CB. Advances in taxonomy, antagonistic function and application of *Bacillus velezensis*[J]. Microbiology China, 2020, 47(11): 3634-3649 (in Chinese).
- [30] 杨倩倩. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)Y₁₄ 对花生的促生防病效果及其机理研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2016.
- YANG QQ. Effects and mechanisms of *Bacillus subtilis* Y14 on peanut growth promotion and disease control[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [31] 杨义, 黄永禄, 张献强, 黎起秦, 甘启范, 罗一东, 林纬. 芽孢杆菌 Bv22 菌株对茉莉花白绢病的防治效果试验[J]. 广西农业科学, 2010(6): 554-557.
- YANG Y, HUANG YL, ZHANG XQ, LI QQ, GAN QF, LUO YD, LIN W. Control effects of *Bacillus subtilis* strain Bv22 on jasmine sclerotium blight[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2010(6): 554-557 (in Chinese).