

人参锈腐病菌拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化

邓进超, 关一鸣, 吴连举, 张亚玉*

(中国农业科学院特产研究所, 长春 130112)

摘要:从健康人参根际土壤中分离获得一株生防菌株 ATB4。根据 16S rDNA、*gyrA* 基因序列分析, 结合形态学、生理与生化特性鉴定, 将生防菌株 ATB4 鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。通过单因素试验和正交试验设计, 对其发酵培养基成分培养条件进行优化, 探究生防菌对引起人参锈腐病的 *Cylindrocarpon destructans* 防治效果, 最终得到该菌最适培养基成分为 3% 葡萄糖、4% 酵母浸粉、0.05% $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 0.1% K_2HPO_4 , 最佳发酵条件为 4% 接菌量, 初始 pH 8.0、培养温度 28℃、培养 24 h、250 mL 三角瓶装液量 40 mL。

关键词:人参锈腐病; 生防菌; 发酵条件优化

中图分类号: S435.675

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2017)03-0031-08

Screening, Identification and Optimization of Fermentation Condition of an Antagonistic Bacteria Against Ginseng Rusted Root Caused by *Cylindrocarpon destructans*

DENG Jinchao, GUAN Yiming, WU Lianju, ZHANG Yayu*

(Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130112, China)

Abstract: One antagonistic bacterial strain ATB4 was isolated from the rhizosphere soil samples of healthy ginseng. Based on phylogenetic analyses of 16S rDNA and *gyrA* gene sequences, and morphological, physiological, biochemical characterizations, the strain ATB4 was identified as *Bacillus methylotrophicus*. The single factor experiment and orthogonal experiment were adopted to optimize the liquid fermentation medium and conditions that enhance its biocontrol efficacy against *Cylindrocarpon destructans* caused ginseng rusted root. The best compositions of cultural medium were as follow: 3% glucose, 4% yeast extract powder, 0.05% $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and 0.1% K_2HPO_4 . The optimal fermentation conditions were as follow: inoculation rate 4%, initial pH 8.0, temperature 28℃, fermentation time 24 h, and medium capacity 40 mL/250 mL.

Key words: Ginseng rusted root; Biocontrol bacteria; Optimization fermentation condition

人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为五加科多年生草本植物, 是应用历史最为久远的名贵中药, 其药用价值早已为世界所公认, 人参病害约有 20~40 余种, 主要侵染性病害为人参锈腐病、人参根腐病、人参疫病、人参立枯病、人参菌核病和人参灰霉病^[1]。由毁灭柱孢菌(*Cylindrocarpon destructans*)引起的人参锈腐病是危害人参根部的

主要因素之一, 可危害各龄参根, 发病率约为 20%~30%, 地势低凹、水分过多、发病严重地块可达 70% 以上^[2]。生产上对人参病害的防治主要以化学防治为主, 多使用多菌灵和托布津等化学农药^[3], 实际生产中存在盲目和频繁的用药现象, 从而导致病原菌抗药性上升, 防治效果降低, 并且造成人参农药残留问题。随着绿色农业的兴起, 国家鼓励和倡导植物病害防治向绿色环保方向发展, 对人参锈腐病进行生物防治具有重大的意义。

植物根际土壤中细菌数量最多, 种类组成最为丰富, 因此细菌在土传病害防治方面研究报道较多^[4], 已分离筛选获得的生防细菌包括 *Agrobacterium* 属细菌、*Pseudomonas* 属细菌、*Bacillus* 属细

收稿日期: 2016-12-23

基金项目: 吉林省科技厅重点科技攻关项目(20140204056YY)

作者简介: 邓进超(1990-), 女, 在读硕士, 主要从事药用植物病理研究。

通讯作者: 张亚玉, 女, 博士, 研究员, E-mail: zyy1966999@sina.com

菌及 *Pasteurella* 属细菌等^[5]。芽孢杆菌作为生物菌株防治植物病害已被多次报道,除了其生防潜力,芽孢杆菌也能通过调节激素水平,促进植物生长,提高土壤中磷的有效性,促进植物营养成分吸收^[6],并且芽孢杆菌具有耐热耐干燥的特点,是商业价值很高的生防菌株。因此,本研究致力于筛选产芽孢的拮抗细菌。

试验以人参锈腐病菌为靶标菌,经过初筛、复筛得到一株拮抗活性较强的产芽孢菌株 ATB4,结合形态学、生理与生化特性和 16S rDNA、*gyrA* 基因序列分析对其鉴定,并且对菌株 ATB4 的发酵条件进行优化。研究结果对人参病害的生物防治具有一定的实践意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试病原菌

人参锈腐病菌(*Cylindrocarpon destructans*)、人参立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、人参根腐病菌(*Fusarium solani*)、人参灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、人参菌核病菌(*Sclerotinia schinseng*)、人参疫病菌(*Phytophthora cactorum*)、均为中国农业科学院特产研究所植物病理实验室鉴定并保藏。

1.1.2 培养基

PDA 培养基、NA 培养基、种子培养基(LB 培养基)和基础培养基(YSP 培养基)配方参照赵斌等人的方法^[7-8];发酵培养基根据试验在基础培养基中替换或添加 C 源、N 源或无机盐配制^[7-8]。

1.2 人参根际土壤生防菌种的分离、纯化

从人参主产区采集人参根际土壤样品 53 份,取 1 g 土壤样品加入 10 mL 无菌水中,28℃ 震荡培养 30 min 后取出,在无菌条件下将土壤悬浮液用无菌水逐级稀释为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 3 个浓度梯度。一次取 100 μ L 涂布于 NA 培养基表面,置于 28℃ 恒温培养箱培养。待菌落长出后,挑取单菌落分离纯化。

1.3 人参主要病害拮抗菌的筛选

采用平板对峙培养法对分离菌株进行初筛。用直径为 8 mm 的打孔器取活化好的人参锈腐病菌置于 PDA 平板的中央,将拮抗细菌在距离平板中心 2.0 cm 处划线,每个处理设 3 个重复,以单独培养的人参锈腐病菌平板为对照。20℃ 培养 7 d 后观察是否产生拮抗带或者抑菌圈。

采用平板对峙法对初筛结果进行复筛,将初筛得到的拮抗细菌接种于装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃、170 r/min 摇床液体培养

12 h,在人参锈腐病菌的 PDA 平板上选择距平板中心 1.5 cm 放上 8 mm 滤纸片,每皿放 3 个滤纸片,每片滤纸片上滴加发酵液 20 μ L,静置 30 min 后于 20℃ 培养箱倒置培养 7 d,测量并记录抑菌圈直径。

1.4 人参主要病害拮抗细菌鉴定

1.4.1 形态鉴定与生理生化鉴定

按常规方法^[9-10]进行形态观察、革兰氏染色以及生理生化反应检测,根据以上特征进行初步分类。

1.4.2 分子鉴定

(1) 16S rDNA 序列扩增

以提取的 ATB4 菌株 DNA 为模板,利用 16S rDNA 引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增采用一对细菌通用引物^[11],正向引物 27F: 5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCA-3' 和反向引物 1492R: 5'-GGT-TACCTTGTTACGACTT-3' 均由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 扩增条件为:首先 94℃ 预变性 5 min,随后 30 个循环:94℃ 变性 40 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s,最后 72℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司纯化并测序。

(2) *gyrA* 基因序列扩增

以提取的 ATB4 菌株 DNA 为模板,引物为 *GyrA*-F(5'-CAGTCAGGA AAT GCG TAC GTC CTT-3') 和 *GyrA*-R (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3'),由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 扩增条件为:首先 95℃ 预热 5 min,随后 30 个循环:94℃ 变性 1 min,62℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,最后 72℃ 延伸 10 min^[12]。将 PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

将所测得的两种 PCR 产物序列在 GenBank 数据库中进行同源性分析,下载相关序列并使用 MEGA 5.0 按照邻接法构建系统发育树。

1.4.3 抑菌图谱的测定

采用平板对峙法对供试病原菌进行抑菌图谱测定。将拮抗细菌 ATB4 接种于装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃、170 r/min 摇床液体培养 12 h,在 PDA 平板上分别接种人参立枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、人参根腐病菌(*Fusarium solani*)、人参灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、人参菌核病菌(*Sclerotinia schinseng*) 和人参疫病菌(*Phytophthora cactorum*) 菌饼(直径 8 mm),选择合适的间距放上 8 mm 滤纸片,每皿放 3 个滤纸片,每片滤纸片滴入发酵液 20 μ L,静置 30 min 后于 25℃ 培养箱倒置培养 7 d,测量并记录抑菌圈直径。

1.5 生防菌株 ATB4 发酵条件优化

1.5.1 种子液与发酵液制备

将菌株 ATB4 活化后接入装有 50 mL LB 培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃、170 r/min 摇床液体培养 24 h,即获得种子液。

1.5.2 发酵培养基单因素试验

(1)最适碳源筛选:以 YSP 为基础培养基,分别用葡萄糖、蔗糖、可溶性淀粉、乳糖、麦芽糖代替基础培养基中碳源,以 2% 接种量接入种子液,28℃、170 r/min 摇床液体培养 18 h,测定不同碳源下,生防菌株 ATB4 对人参锈腐病菌的抑菌圈大小。

(2)最适氮源筛选:以 YSP 为基础培养基,分

别用酵母浸粉、蛋白胨、牛肉膏、氯化铵、硝酸钾代替基础培养基中氮源,试验方法同碳源筛选。

(3)最适无机盐筛选:以 YSP 为基础培养基,分别用 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 K_2HPO_4 、 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $FeSO_4$,试验方法同碳源筛选。

1.5.3 培养基成分正交试验

对筛选得到的最佳碳源、最佳氮源、最佳无机盐 I、最佳无机盐 II 进行 4 因素 3 水平正交试验,每个处理重复 3 次。发酵条件为以 2% 接种量接入种子液,28℃、170 r/min 摇床液体培养 18 h。测定不同试验条件下,生防菌株 ATB4 对人参锈腐病菌抑菌活性,正交试验各因素及水平见表 1。

表 1 培养基成分正交试验

水平	A 葡萄糖 (%)	B 酵母浸粉 (%)	C $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ (%)	D K_2HPO_4 (%)
1	2	2	0.15	0.05
2	2	3	0.05	0.1
3	2	4	0.1	0.15
4	3	2	0.1	0.15
5	3	3	0.15	0.05
6	3	4	0.05	0.1
7	4	2	0.15	0.1
8	4	3	0.1	0.15
9	4	4	0.05	0.05

1.5.4 发酵条件正交试验

对接菌量、培养基起始 pH、培养温度、培养时间和摇瓶初始装液量进行 5 因素 4 水平正交试

验,每个处理重复 3 次。测定不同试验条件下,生防菌株 ATB4 对人参锈腐病菌抑菌活性,正交试验各因素及水平见表 2。

表 2 发酵条件正交试验

水平	A 接种量 (%)	B pH 值	C 温度 (℃)	D 时间 (h)	E 初始装液量 (%)
1	2	7	28	12	20
2	2	7.5	31	24	40
3	2	8	34	36	60
4	2	8.5	37	48	80
5	3	7	31	36	80
6	3	7.5	28	48	60
7	3	8	37	12	40
8	3	8.5	34	24	20
9	4	7	34	48	40
10	4	7.5	37	36	20
11	4	8	28	24	80
12	4	8.5	31	12	60
13	5	7	37	24	60
14	5	7.5	34	12	80
15	5	8	31	48	20
16	5	8.5	28	36	40

2 结果与分析

2.1 人参根际土壤生防菌种的分离与筛选

从人参根际土壤中得到11株对人参锈腐病菌具有拮抗效果的细菌。对抑菌圈较大的6株菌株进行抑菌复筛试验。结果表明(表3),ATB4的抑菌效果最好,抑菌圈直径达到了20.65 mm,因此,将ATB4用于后续试验。

表3 复筛的6株菌株抑菌圈直径 mm			
菌株	抑菌圈直径	菌株	抑菌圈直径
JHB18	18.19 d	HCB25	11.25 c
FSB16	10.24 b	JHB6	10.08 b
ATB4	20.65 e	FSB23	8.08 a

注:不同小写字母表示差异显著性($P<0.05$),下同

2.2 生防菌株ATB4的鉴定

2.2.1 形态鉴定与生理生化鉴定

菌体呈短杆状,革兰氏染色阳性,孔雀绿染色阳性;菌落为不透明乳白色的圆形,边缘不整齐,表面有皱褶。对生防菌株ATB4进行生理生化测定结果(表4)表明,示阳性反应的测试项目有接触酶、需要性测定、柠檬酸盐、丙二酸盐,能使淀粉水解、明胶液化、产生吡啶,能发酵葡萄糖、木

糖、甘露醇等。

表4 菌株ATB4生理生化性状

试验项目	试验结果	试验项目	试验结果
接触酶	+	V-P 试验	-
需要性测定	+	柠檬酸盐试验	+
淀粉水解	+	丙二酸盐试验	+
明胶液化	+	吡啶反应试验	+
甲基红	-	葡萄糖发酵	+
鼠李糖发酵	-	木糖发酵	+
甘露醇发酵	+	肌醇发酵	-

注:“+”:阳性;“-”:阴性

2.2.2 菌株ATB4的16S rDNA序列分析

测得的菌株ATB4的16S rDNA序列为1450 bp,通过BLAST,将其16S rDNA序列与GenBank中的相关序列进行比对,并将数据库中与ATB4菌株相似性较高的标准菌株构建系统发育树,结果见图1。通过BLAST同源分析,菌株ATB4与*B. methylotrophicus* (JN661699) 同源性达到了99%。从构建的系统发育树中可以看出菌株ATB4与解淀粉芽孢杆菌*Bacillus amyloliquefaciens* (JN661699)、*B. methylotrophicus* (KM659227) 聚于同一族中。

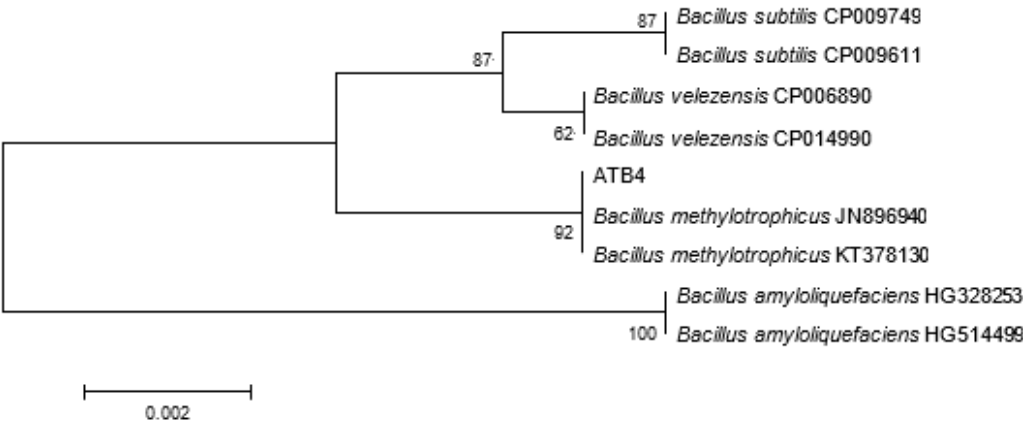


图1 基于16S rDNA序列构建的系统发育树

2.2.3 菌株ATB4的gyrA基因序列分析

利用引物GyrA-F和GyrA-R进行gyrA基因序列的PCR扩增,获得菌株ATB4的片段大小为1031 bp,将其与GenBank中已注册的相应序列进行比对,并将数据库中与ATB4菌株相似性较高的标准菌株构建系统发育树,结果见图2。BLAST分析结果表明,ATB4菌株与甲基营养型芽孢杆菌*B. methylotrophicus* (KT378130) 同源性达100%,从

构建的系统发育树中可以看出,菌株ATB4与*B. methylotrophicus* (JN896940和KT378130) 在同一分枝上,并能与相近种贝莱斯芽孢杆菌*Bacillus velezensis* (CP014990和CP006890),解淀粉芽孢杆菌*B. amyloliquefaciens* (HG328253和HG514499),枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis* (CP009749和CP009611) 区分出来。

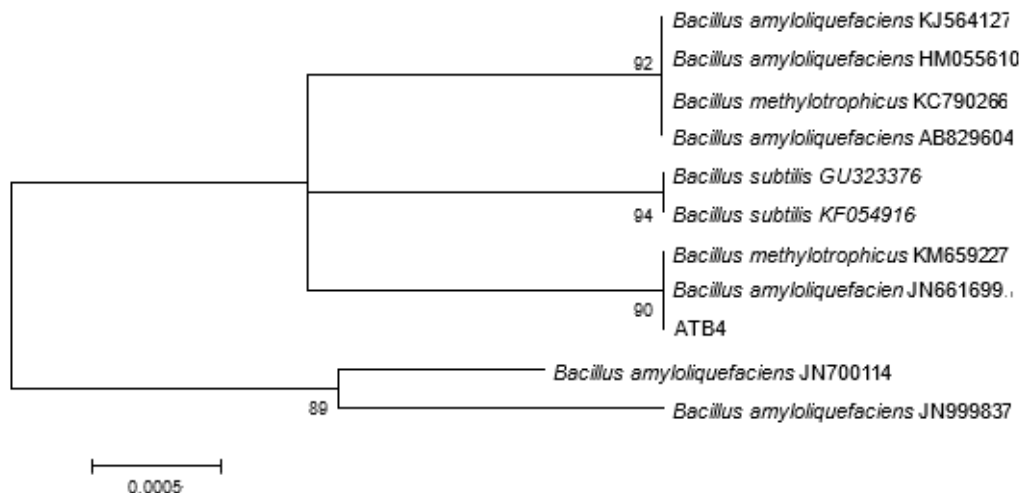


图2 基于 gyrA 基因构建的系统发育树

2.3 菌株 ATB4 抗菌图谱的测定

通过平板对峙法,拮抗细菌 ATB4 除了对人参锈腐病菌有抑制作用外,还对人参菌核病菌、人参立枯病菌、人参灰霉病菌、人参根腐病菌和人

参疫病菌均有抑制作用(图3),可见菌株 ATB4 是1株具有较广抗菌谱活性的拮抗菌,在人参病害生物防治方面有很大的应用潜力(表5)。

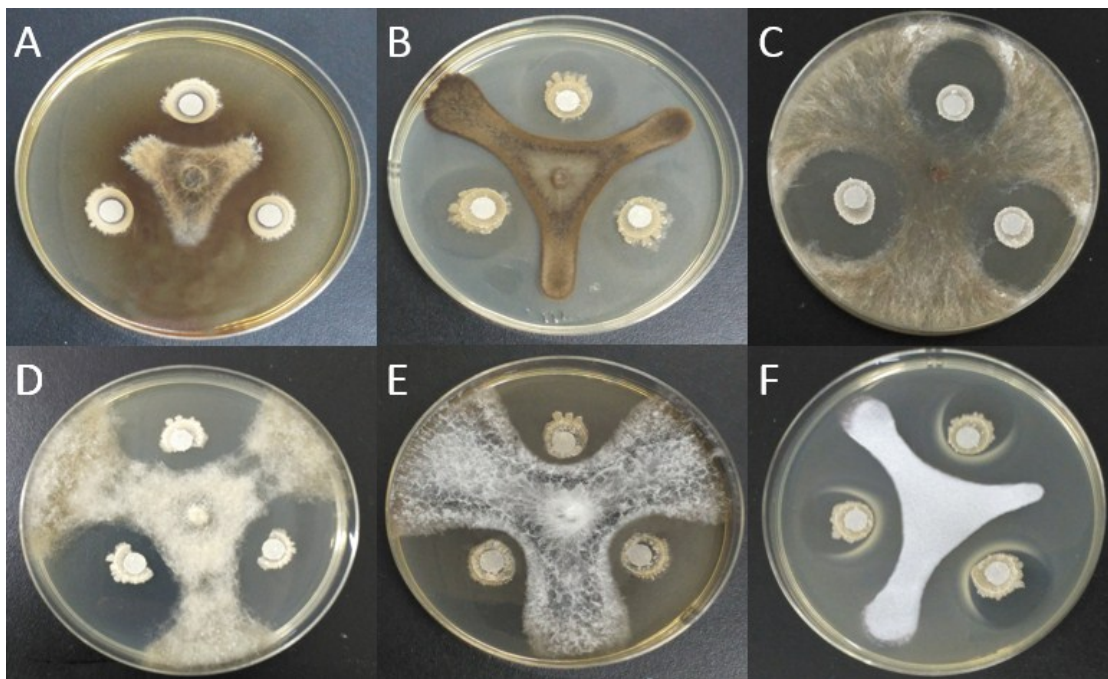


图3 ATB4 对人参病原菌的拮抗作用

注:A:人参锈腐病菌(*Cylindrocarpon destructans*);B:人参菌核病菌(*Sclerotinia schinseng*);C:人参立枯病菌(*Rhizoctonia solani*);D:人参灰霉病菌(*Botrytis cinerea*);E:人参根腐病菌(*Fusarium solani*);F:人参疫病菌(*Phytophthora cactorum*)

2.4 生防菌株 ATB4 发酵条件优化

2.4.1 发酵培养基单因素试验

2.4.1.1 最适碳源

不同碳源对 ATB4 菌株抑菌活性的影响如表6所示,在所有碳源中,碳源为葡萄糖时抑菌圈最大,抑菌圈直径为 21.48 mm,因此应选用葡萄糖作为碳源。

2.4.1.2 最适氮源

不同氮源对 ATB4 菌株抑菌活性的影响如表6所示,在所有氮源中,氮源为酵母浸粉时抑菌圈最大,抑菌圈直径为 22.29 mm,因此应选用酵母浸粉作为氮源。

2.4.1.3 最适无机盐

不同无机盐对 ATB4 菌株抑菌活性的影响如

表6所示,在所有无机盐中,发酵液的无机盐为 K_2HPO_4 和 $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 时,抑菌圈最大,效果最好。

表5 拮抗菌株ATB4的抑菌谱

病原菌	抑菌直径(mm)
人参根腐病菌 <i>Fusarium solani</i>	23.96 c
人参立枯病菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	20.68 a
人参灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	22.73 b
人参菌核病菌 <i>Sclerotinia schinseng</i>	25.12 c
人参疫病菌 <i>Phytophthora cactorum</i>	21.33 a

2.4.2 培养基成分正交试验

按照 $\text{L}_9(3^4)$ 的正交表进行发酵液抑菌试验,并将抑菌结果进行统计分析。结果表明(表7),不同培养基成分对菌株ATB4抑菌活性的影响程度:B

$>\text{A}>\text{C}>\text{D}$,即氮源对菌株抑菌活性的影响最大,其次是氮源,无机盐的影响不明显。最佳发酵培养基组合为 $\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_1\text{D}_2$,即最佳发酵培养基成分为3%葡萄糖、4%酵母浸粉、0.05% $\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和0.1% K_2HPO_4 。

2.4.3 发酵条件正交试验

按照 $\text{L}_{16}(4^5)$ 的正交表进行发酵液抑菌试验,并将抑菌结果进行统计分析。结果表明(表8),不同发酵条件对菌株ATB4抑菌活性的影响程度: $\text{B}>\text{D}>\text{C}>\text{E}>\text{A}$,即pH对菌株的抑菌活性影响最大,而接菌量对菌株抑菌活性影响最小。最佳发酵条件为 $\text{A}_3\text{B}_3\text{C}_1\text{D}_2\text{E}_4$,即以4%接菌量接入种子液,初始pH 8.0,培养温度 28°C ,培养24 h,250 mL三角瓶初始装液量40 mL。

表6 不同碳源、氮源、无机盐对菌株ATB4抑制效果的影响

碳源	抑菌圈直径(mm)	氮源	抑菌圈直径(mm)	无机盐	抑菌圈直径(mm)
葡萄糖	21.48 e	酵母浸粉	22.29 e	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18.35 c
蔗糖	19.15 d	蛋白胨	19.38 d	$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9.69 b
可溶性淀粉	14.63 a	牛肉膏	18.23 c	K_2HPO_4	22.88 d
乳糖	18.28 c	氯化铵	5.78 b	$\text{MnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.92 d
麦芽糖	15.52 b	硝酸钾	0 a	FeSO_4	2.55 a

注:同列不同小写字母表示差异显著性($P<0.05$),下同

表7 培养基成分正交试验结果

处理	A	B	C	D	抑菌圈直径(mm)
1	1	1	3	1	12.31 a
2	1	2	1	2	14.23 b
3	1	3	2	3	16.87 c
4	2	1	2	3	14.67 b
5	2	2	3	1	18.95 e
6	2	3	1	2	23.32 g
7	3	1	3	2	18.33 de
8	3	2	2	3	17.89 d
9	3	3	1	1	21.21 f
K1	14.47	15.10	19.59	17.49	
K2	18.98	17.01	16.48	18.63	$\text{B}>\text{A}>\text{C}>\text{D}$
K3	19.14	20.47	16.53	16.48	$\text{A}_2\text{B}_3\text{C}_1\text{D}_2$
R	4.67	5.37	3.11	2.15	

表8 发酵条件正交试验结果

处理	A	B	C	D	E	抑菌圈直径(mm)
1	1	1	1	1	1	15.77 cd
2	1	2	2	2	2	18.34 e
3	1	3	3	3	3	20.54 g
4	1	4	4	4	4	14.33 b
5	2	1	2	3	4	16.67 d
6	2	2	1	4	3	14.98 bc
7	2	3	4	1	2	18.99 e
8	2	4	3	2	1	19.34 ef
9	3	1	3	4	2	12.76 a
10	3	2	4	3	1	12.28 a
11	3	3	1	2	4	22.34 h
12	3	4	2	1	3	18.45 e
13	4	1	4	2	3	14.34 b
14	4	2	3	1	4	20.37 fg
15	4	3	2	4	1	16.88 d
16	4	4	1	3	2	18.97 e
K1	17.25	14.89	18.02	18.40	16.07	B>D>C>E>A A ₃ B ₃ C ₁ D ₂ E ₄
K2	17.50	16.49	17.59	18.59	17.27	
K3	16.46	19.69	18.25	17.12	17.08	
K4	17.64	17.77	14.99	14.74	18.43	
R	1.18	4.80	3.27	3.85	2.36	

3 讨 论

目前,人参病害的防治是以化学防治为主,农业防治为辅的综合防治体系,化学药剂毒性大,不但污染土壤生态环境,而且影响人参产品的安全性,不利于人参产业安全稳定发展,不符合国家推行的无公害政策,产品质量无法达到质检标准。农业防治虽有一定效果,但多为预防性措施,不能从根本上控制病害的发生。生物防治持久、环保等特点将成为人参病害防治的发展趋势。本试验筛选得到的ATB4菌株经鉴定为甲基营养型芽孢杆菌(*B. methylotrophicus*),对人参锈腐病菌(*C. destructans*)有较强的抑制效果,并且其具有广谱抗菌性,对人参立枯病菌(*R. solani*)、人参根腐病菌(*F. solani*)、人参灰霉病菌(*B. cinerea*)、人参菌核病菌(*S. schinseng*)和人参疫病菌(*P. cactorum*)都有较好的抑制效果。

菌株通过发酵,产生大量的代谢产物,代谢产物影响着菌株的生防效果,因此,发酵条件的优化对拮抗细菌抑菌作用及抑菌机理的深入研究具有十分重要的作用,也是菌株工业化生产的必要步骤。本试验采用单因素试验设计与正交试验,

得到了菌株ATB4最适培养基成分为3%葡萄糖、4%酵母浸粉、0.05% $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 和0.1% K_2HPO_4 ,最佳发酵条件为4%接菌量、初始pH 8.0、培养温度28℃、培养24 h、250 mL三角瓶初始装液量40 mL,为后续ATB4菌株的工业化开发及田间应用奠定了基础。

参考文献:

[1] 王铁生,中国人参[M]. 沈阳:辽宁科学技术出版社,2001: 12-14.

[2] 严雪瑞,傅俊范. 柱孢属(*Cylindrocarpon*)真菌和参类锈腐病的研究历史与现状[J]. 沈阳农业大学学报,2002,33(1): 71-75.

[3] 韩润亭,张金花,任金平,等. 氯化苦液剂防治人参锈腐病田间药效试验[J]. 吉林农业科学,2008,33(4):32-33,42.

[4] Song M, Yun H Y, Kim Y H. Antagonistic *Bacillus* species as a biological control of ginseng root rot caused by *Fusarium* cf. *incarnatum*[J]. *Journal of Ginseng Research*, 2014, 8(2): 136-145.

[5] 杨秀荣,刘水芳,孙淑琴,等. 生防细菌防治土传病害的研究进展[J]. 天津农业科学,2008,14(4):38-42.

[6] Idriss E E, Makarewicz O, Farouk A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect[J]. *Microbiology*, 2002, 148(7): 2097-2109.

- [7] 赵 斌,何绍江. 微生物实验[M]. 北京:科学出版社,2002: 251-267.
- [8] 陈金春,陈国强. 微生物实验指导[M]. 北京:清华大学出版社,2005:31-35.
- [9] R E Buchanan, N E Gibbons. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,1984:729-795.
- [10] 东秀珠,蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001:349-388.
- [11] Kim S B, Yoon J H, Kim H, et al. Phylogenetic analysis of the genus *Saccharomonospora* conducted with 16S rRNA gene sequences[J]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1995, 45(2): 351-356.
- [12] Chun J, Bae K S. Phylogenetic analysis of *Bacillus subtilis* and related taxa based on partial *gyrA* gene sequence[J]. *Antonie van leeuwenhoek*, 2000, 78: 123-127.
- (责任编辑:王 昱)