

# 知母拮抗内生细菌的筛选及发酵条件优化

孟千琪<sup>1</sup>, 王志清<sup>1</sup>, 刘桂英<sup>2</sup>, 马 静<sup>1</sup>, 吕 静<sup>1</sup>, 田义新<sup>1\*</sup>

(1. 吉林农业大学中药材学院, 长春 130118; 2. 白山市江源区农业农村局, 吉林 白山 134700)

**摘要:**从分离出的知母内生细菌中筛选对人参6种常见病原菌和细辛3种常见病原菌有拮抗作用的菌株, 为生物防治中药材病害提供基础。采用组织切片法和组织研磨法及菌丝生长速率法分离、筛选拮抗内生细菌。根据16S rDNA序列和系统发育树分析, 对抑菌活性达到显著水平( $P < 0.05$ )的菌株进行菌种鉴定, 并利用菌丝生长速率法检测活性菌株发酵液的抑菌率。通过正交试验优化该菌株的发酵条件。知母中分离出359株内生细菌, 筛选出3株内生细菌BR10、BR11、BR26对这9种病原菌均有拮抗作用且抑菌活性较强, 最高抑菌率达92.41%。16S rDNA序列系统发育分析结果显示BR11与多株水拉恩氏菌的亲缘关系最近, 且处于系统发育树的同一分支, 故将BR11菌株鉴定为水拉恩氏菌 *Rahnella aquatilis*。确定了BR11菌株最佳培养基配方与培养条件: 牛肉膏1.5%、葡萄糖1.5%、酵母膏0.5%、 $MgSO_4$  0.15%, 初始pH值7.5, 温度29℃, 发酵时间72 h。知母内生细菌BR11是防治人参、细辛病害的优良候选菌株。

**关键词:** 知母; 内生细菌; 病原菌; 拮抗菌; 发酵条件优化

中图分类号: S567.23+9

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)01-0045-05

## Screening of Antagonistic Endophytic Bacteria from *Anemarrhena asphodeloides* and Optimization of Fermentation Conditions

MENG Qianqi<sup>1</sup>, WANG Zhiqing<sup>1</sup>, LIU Guiying<sup>2</sup>, MA Jing<sup>1</sup>, LYU Jing<sup>1</sup>, TIAN Yixin<sup>1\*</sup>

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. Agricultural and Rural Bureau of Jiangyuan District, Baishan 134700, China)

**Abstract:** To screen antagonistic endophytic bacteria isolated from the plant of *Anemarrhena asphodeloides*, of which could inhibit six common diseases of *Panax ginseng* and three ones of *Asarum sclerotium*, to provide a base for biological control of some Chinese medicinal materials. The antagonistic endophytic bacteria were isolated and screened by tissue slicing, tissue grinding and hyphal growth rate. The strains with significant bacteriostatic activity ( $P < 0.05$ ) were identified according to 16S rDNA sequence and phylogenetic tree analysis, and the bacteriostatic rate of fermentation broth of active strains was detected by hyphal growth rate method. The fermentation conditions of the strain were optimized by orthogonal test. From the 359 endophytic bacteria isolated from the plant of *A. asphodeloides* three endophytic bacteria were screened, they are strains of BR10, BR11 and BR26, and all of them have had antagonistic effect and strong bacteriostatic activities to the nine pathogens, there was a highest bacteriostatic rate 92.41% of them. The results of phylogenetic analysis of 16S rDNA sequence showed that the BR11 had the closest relationship with many strains of *Rahnella aquatilis*, and was in the same branch of the phylogenetic tree, so the BR11 strain was identified as *R. aquatilis*. The optimum medium formula and culture conditions of BR11 strains were determined: beef paste 1.5%, glucose 1.5%, yeast extract 0.5%,  $MgSO_4$  0.15%, initial pH value 7.5, temperature 29℃, fermentation time 72 h. The endophytic bacteria BR11 from *A. asphodeloides* is an excellent candidate for the control of *ginseng* and *Asarum* diseases.

**Key words:** *Anemarrhena asphodeloides* Bunge; Endophytic bacteria; Pathogenic bacteria; Antagonistic bacteria; Optimization of fermentation conditions

收稿日期: 2020-02-29

基金项目: 吉林省科技厅技术攻关项目(20190304017YY); 吉林省科技厅医药健康专项(20191102038YY)

作者简介: 孟千琪(1994-), 女, 在读硕士, 从事药用植物规范化栽培及育种研究。

通讯作者: 田义新, 男, 博士, 教授, E-mail: y.x.tian2003@163.com

知母(*Anemarrhenaas phodloides* Bunge)为百合科知母属植物,以干燥根茎入药。常用于治疗外感热病、高热烦渴、肺热燥咳等症。知母的有效成分主要为芒果苷、知母皂苷B II等皂苷类成分<sup>[1]</sup>,具有抗肿瘤、抗凝血等多种药理活性<sup>[2]</sup>。知母主要分布于我国北方地区,生于山地、干燥丘陵或草原地带;栽培范围较广,主产于河北、河南、山东、山西等省,是常见的大宗药材<sup>[3]</sup>。

目前中药材种植中,化学农药防治仍是普遍采用的防治手段。为降低药材农残,提高药材质量安全、实现药材绿色生产,利用拮抗微生物对药用植物病害进行防治是最有效的手段之一<sup>[4]</sup>。由于生物防治具有靶标性强、环保且无毒无残留等优点,越来越受到重视,也逐渐成为化学农药重要的替代品<sup>[5]</sup>。知母适种范围广,已经发现其提取物对马铃薯疫病有拮抗作用<sup>[6]</sup>。目前,对于知母内生菌的研究尚未见报道。因此,筛选具有拮抗作用的知母内生菌优势菌株并优化其培养条件,用于防治东北道地药材常见病害,对发展绿色中药种植具有重要意义和广阔的应用前景<sup>[7]</sup>。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料及培养基

知母样品的来源见表1。

表1 植物样品来源

采集日期	地点	经度	纬度
2018年6月	吉林长春	东经:125°17'18.42"	北纬:43°49'59.77"
2018年6月	吉林昌邑	东经:126°34'27.70"	北纬:43°52'54.73"
2019年6月	辽宁抚顺	东经:123°56'25.90"	北纬:41°53'20.29"
2019年6月	甘肃兰州	东经:103°43'7.61"	北纬:36°06'14.26"
2019年6月	安徽合肥	东经:115°46'44.90"	北纬:33°52'35.08"
2019年6月	河北保定	东经:115°27'31.50"	北纬:38°52'39.25"

人参6种常见病害致病菌:根腐病(*Fusarium solani*)、灰霉病(*Botrytis cinerea*)、锈腐病(*Cylindrocarpon destructans*)、黑斑病(*Alternaria panax*)、疫病(*Phytophthora cactorum*)、立枯病(*Rhizoctonia solani*),3种细辛常见病害致病菌:菌核病(*Sclerotinia asari*)、锈病(*puccinia asarina*)、叶枯病(*Mycocentrospora acerina*),分别由吉林农业大学植物保护学院和中药材学院提供。

使用NA(牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉)、NB(牛肉膏、蛋白胨)培养基。

### 1.2 内生菌的分离纯化

供试样品的根、根茎和叶片用蒸馏水冲洗干

净表面泥沙,用无菌滤纸吸干表面附水。切成2 cm见方的小块(段、片),先用75%乙醇进行表面消毒30 s,根用0.2% HgCl<sub>2</sub>消毒9 min;根茎用0.2% HgCl<sub>2</sub>消毒7 min;叶用2% NaClO消毒3 min。消毒后用无菌水冲洗3~5次后接入牛肉膏蛋白胨培养基,并将最后一次冲洗的无菌水涂布在平板上作为对照,15 d后无菌体生长即为消毒成功。内生菌分离方法采用组织切片法和组织研磨法<sup>[8]</sup>,将处理好的组织碎块接入NA培养基培养,在(28±1) °C下培养,每隔2 d观察一次。获得的内生菌采用划线法纯化后4 °C保存备用。

### 1.3 拮抗菌株的筛选

采用菌丝生长速率法<sup>[9]</sup>,以未加发酵菌液的平板为对照组,每组3次重复,测量菌落直径、计算抑菌率。SPSS 18.0软件分析。抑菌率计算公式如下。

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{测试组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\%$$

### 1.4 拮抗菌分子鉴定

根据分离出的内生菌形态学进行初步鉴定。后将样品内生细菌接入到PDB培养基中(26±1) °C 160 r/min震荡培养。使用北京百泰克生物技术有限公司生产的Bio Tekecat#DP2001细菌基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)提取样品DNA。以提取的细菌DNA样品为模板,用表2中列出的通用引物进行16S PCR扩增<sup>[10]</sup>。

表2 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
27f	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492r	GGTTACCTTGTTACGACTT

PCR反应总体积50 μL,其中含2×PCR MIX 25 μL, ddH<sub>2</sub>O 15 μL,引物各2.5 μL,基因组DNA 5 μL。PCR反应条件为94 °C,预变性5 min,以35个循环94 °C变性40 s,53 °C退火60 s,72 °C延伸90 s,最后以72 °C延伸10 min。扩增产物在1%琼脂糖凝胶上分离,80 W恒定功率下电泳<sup>[11]</sup>。

### 1.5 序列测定与比较

将有明显条带的PCR产物进行测序(生工生物工程(上海)股份有限公司完成),序列测定结果比较分析采用BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)进行,MEGA7.0(分子进化遗传分析软件)建立系统发育树。

### 1.6 拮抗菌株培养条件优化

#### 1.6.1 正交试验

正交试验设计参照宋芳旭等方法<sup>[12]</sup>,分析牛

肉膏(A)、葡萄糖(B)、酵母膏(C)、 $MgSO_4$ (D) 4因素3水平的影响作用,结果见表3。

表3  $L_9(3^4)$ 正交试验因素水平

水平	因素			
	A	B	C	D
1	0.5	0.5	0.5	0.05
2	1.0	1.0	1.0	0.15
3	1.5	1.5	1.5	0.10

### 1.6.2 培养条件优化

以优化后的发酵培养基为基础,检测目标拮抗菌株在不同培养条件下发酵液的抑菌效果。设置起始pH 5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0共8个处理,其他条件一致,接种后于28℃、180 r/min培养4 d,检测抑菌效果,确定最适起始pH值。设置温度20、23、26、29、32、35℃共6个处理,培养4 d,检测抑菌效果,确定最适培养温度。设置发酵时间12、24、36、48、72、96、120 h共7个处理,培养后检测抑菌效果,确定最适发酵时间。

## 2 结果与分析

### 2.1 知母内生菌分离结果

从6个产地知母样品叶中得到31株内生菌,其中28株细菌、3株真菌;根茎中得到131株内生菌,其中97株细菌、33株真菌、1株放线菌;根中得到309株内生菌,其中219株细菌、88株真菌、2株放线菌。合计507株内生菌,其中359株细菌、145株真菌、3株放线菌;在这些内生菌中,长春产地样品分离得到99株细菌、21株真菌、1株放线

菌;吉林昌邑产地分离得到62株细菌、37株真菌;辽宁抚顺产地分离得到47株细菌、15株真菌、1株放线菌;甘肃兰州产地分离得到72株细菌、11株真菌;安徽合肥产地分离得到40株细菌、8株真菌、1株放线菌;河北保定产地分离得到39株细菌、53株真菌。

### 2.2 拮抗菌株的筛选

以6种人参常见病害和3种细辛常见病害作为指示菌,筛选获得9株均具有抑菌活性的内生拮抗细菌,其中3株内生菌抑菌活性较强,分别为BR10、BR11、BR26(图1A)。

#### 2.2.1 对人参6种病原菌拮抗能力的影响

3种拮抗内生细菌对6种人参病原菌的抑菌率情况见表4。

表4 BR10、BR11、BR26对6种人参病原菌的抑菌率

病原菌名称	BR10抑菌	BR11抑菌	BR26抑菌
	率(%) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )	率(%) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )	率(%) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )
<i>Fusarium solani</i>	22.17±0.02	32.19±0.01	16.98±0.01
<i>Botrytis cinerea</i>	21.56±0.02	43.26±0.02	33.08±0.03
<i>Cylindrocarpon destructans</i>	14.25±0.03	65.13±0.04	54.23±0.05
<i>Alternaria panax</i>	26.26±0.04	43.38±0.04	23.87±0.04
<i>Phytophthora cactorum</i>	35.86±0.02	57.44±0.13	33.76±0.07
<i>Rhizoctonia solani</i>	12.43±0.04	70.48±0.05a	45.91±0.11

知母内生菌对6种人参常见致病菌有较好效果(图1B)。菌株BR11表现最好,对*Rhizoctonia solani*的抑菌率可达70.48%,显示显著拮抗作用( $P<0.05$ ),对*Cylindrocarpon destructans*的抑菌率

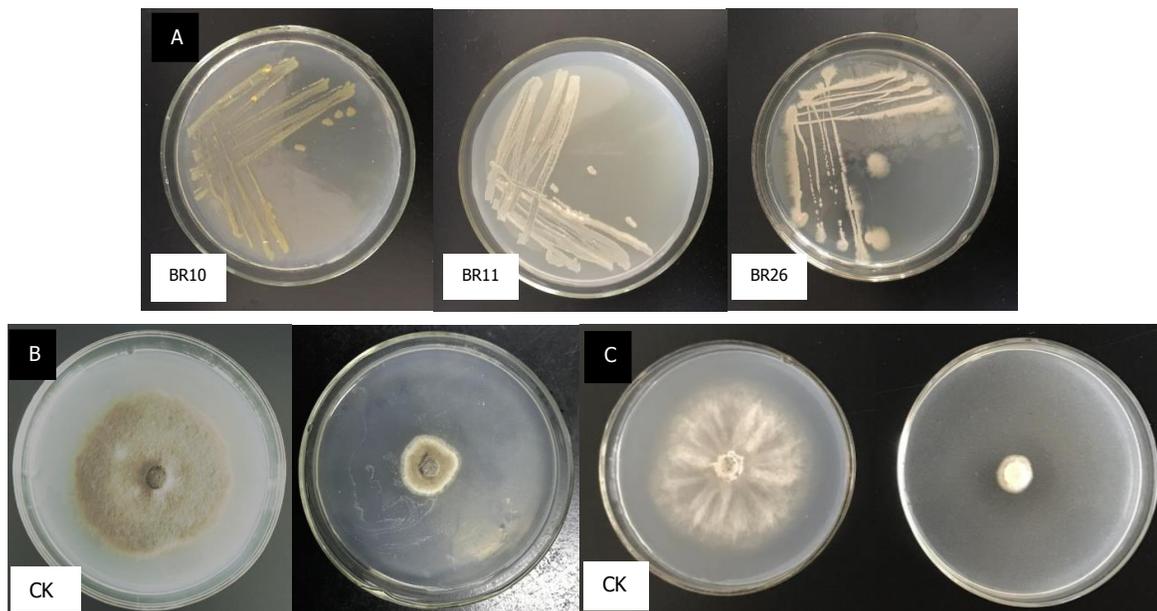


图1 拮抗能力较强的内生菌株(A)及菌株BR11的拮抗效果(B、C)

65.13%, 对 *Phytophthora cactorum* 的抑菌率 57.44%, 对 *Alternaria panax* 的抑菌率 43.38%, 对 *Botrytis cinerea* 的抑菌率 43.26%, 对 *Fusarium solani* 的抑菌率 32.19% (表 4)。

### 2.2.2 对细辛 3 种病原菌拮抗能力的影响

3 种拮抗内生细菌对 3 种细辛病原菌的抑菌率情况见表 5。

表 5 BR10、BR11、BR26 对 3 种细辛病原菌的抑菌率

病原菌名称	BR10 抑菌率 (%) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )	BR11 抑菌率 (%) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )	BR26 抑菌率 (%) ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )
<i>Sclerotinia asari</i>	34.24 $\pm$ 0.03	92.41 $\pm$ 0.02a	39.46 $\pm$ 0.04
<i>Puccinia asarina</i>	24.54 $\pm$ 0.01	22.07 $\pm$ 0.05	28.74 $\pm$ 0.03
<i>Mycocentrospora acerina</i>	37.47 $\pm$ 0.02	34.98 $\pm$ 0.01	36.47 $\pm$ 0.01

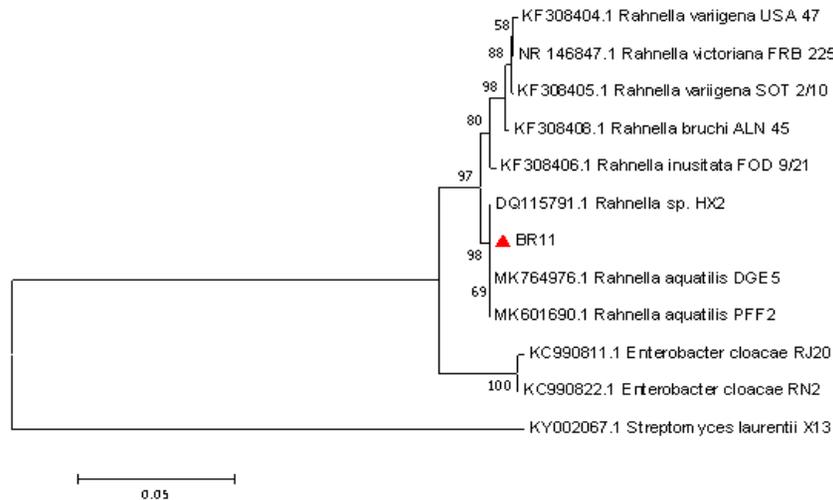
菌株 BR11 同样表现最好, 对 *Mycocentrospora acerina* 的抑菌率为 34.98%, 对 *Puccinia asarina* 的抑菌率为 22.07%, 对菌核病菌 *Sclerotinia asari* 的

抑菌率高达 92.41%, 且有显著拮抗作用 ( $P < 0.05$ ) (图 1C)。

因此, 本研究对内生拮抗细菌 BR11 视为有进一步研究价值的生防菌株并进行分子鉴定和培养条件优化。

### 2.3 拮抗菌株分子鉴定结果及系统发育树分析

BR11 菌株 16S rDNA 序列测定及系统发育分析, 是将 BR11 菌株 16S rDNA 扩增产物送生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 得到长度为 1450 bp 的片段, 提交该序列相关信息至 GenBank, 获得登录号 CP032296, 将该序列与 GenBank 中序列进行在线比对, 结果显示其与多株水拉恩氏菌 *Rahnella aquatilis* 菌株 16S rDNA 序列的同源性高达 99%。基于 16S rDNA 系统发育分析结果显示, BR11 菌株与登录号为 DQ115791、MK764976 及 MK601690 等水拉恩氏菌的亲缘关系最近, 处于系统发育树的同一分支 (图 2)。因此, 确定 BR11 为水拉恩氏菌。



注: 每条之后数字为 GenBank 序列号; 节点处数字为 Bootstrap 值

图 2 BR11 菌株系统发育树

## 2.4 培养条件及优化结果

### 2.4.1 培养基的优化

菌株 BR11 培养基优化的正交试验结果见表 6。

按正交试验并通过测定菌株对细辛菌核病菌的抑菌率来确定最优培养基方案。极差分析表明 4 个因素对细辛菌核病菌的抑菌率的影响为  $A > B > D > C$ , 从表 6 可知最佳培养基配比为  $A_3B_3C_1D_2$ , 即牛肉膏 1.5%、葡萄糖 1.5%、酵母膏 0.5%、 $MgSO_4$  0.15%。

### 2.4.2 培养条件的优化

采用最优培养基, 对菌株 BR11 的发酵条件进行优化, 结果表明, 不同培养条件对该菌株发酵液的抑菌活性影响较大, 如图 3 所示。初始 pH 值为 7.5 时抑菌活性最强 (图 3A); 培养温度在 29 °C

时, 抑菌活性最强, 抑菌率可达 97.31% (图 3B); 发酵时间与发酵液抑菌活性呈正相关, 培养 72 h 时拮抗菌株 BR11 的抑菌活性最强, 可达 98.09%, 随后随着培养时间增长, 抑菌活性逐渐下降 (图 3C)。综上可知, 拮抗菌株 BR11 发酵培养条件 pH 为 7.5 是最适初始值, 29 °C 是最适培养温度, 72 h 是最适培养时间。使用优化后的培养基配方和发酵条件培养 BR11 菌株进行验证。结果表明, 优化后 BR11 菌株等量发酵液的抑菌率为 98.79%, 显著 ( $P < 0.05$ ) 大于 PDB 培养基发酵液的抑菌率 92.41%, 同时, 对其余 6 种人参常见病害和 2 种细辛常见病害的抑菌率均有一定提高。表明优化后的发酵培养基组成与发酵条件有利于抑菌活性物质的生成。

表6 菌株BR11L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)培养基正交设计及试验结果

编号	A	B	C	D	细辛菌核病菌 抑菌率(%)
1	1	1	1	1	22.23
2	1	2	2	2	31.89
3	1	3	3	3	64.97
4	2	1	2	3	32.29
5	2	2	3	1	40.98
6	2	3	1	2	97.24
7	3	1	3	2	87.07
8	3	2	1	3	88.45
9	3	3	2	1	91.36
X <sub>1</sub>	119.09	141.59	207.92	154.57	
X <sub>2</sub>	170.51	161.23	155.54	216.20	
X <sub>3</sub>	266.88	253.57	193.02	185.71	
K <sub>1</sub>	39.70	47.19	69.31	51.52	
K <sub>2</sub>	56.84	53.74	51.85	72.07	
K <sub>3</sub>	88.96	84.52	64.34	61.91	
R	49.26	37.33	17.46	20.55	

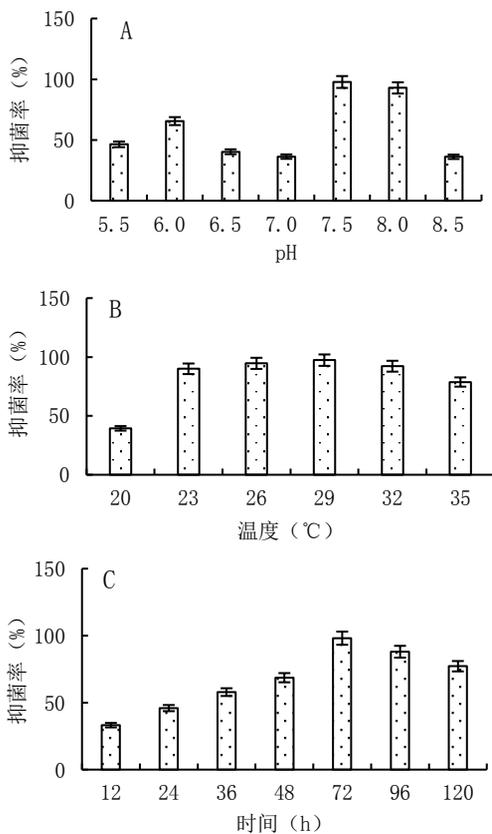


图3 不同培养条件对菌株BR11发酵液抑菌率的影响

### 3 讨论

本研究从知母根、根茎、叶中经分离、纯化、筛选获得拮抗内生细菌水拉恩氏菌BR11,菌株优化

后发酵液对细辛菌核病抑制率高达98.79%。同时,对人参6种常见病害和细辛另外2种常见病害均有较好的拮抗效果,并从6个产地分离得到该菌株。水拉恩氏菌BR11是1株容易获得且值得进一步研究及开发的优势生防菌株。研究表明,水拉恩氏菌在生物防治上有出色的表现。水拉恩氏菌对防治葡萄根癌病和杨树溃疡病均有显著效果。水拉恩氏菌能产生嗜铁素、纤维素酶和磷酸酯酶等物质<sup>[10-12]</sup>。多数细菌和真菌都能产生嗜铁素、磷酸酯酶等物质。这些物质对破坏病原菌细胞膜透性、可溶性糖含量和MDA含量有很大影响<sup>[12-13]</sup>。还可以在植物生长过程中通过争夺铁营养影响宿主植物的病原微生物的正常生长繁殖。嗜铁素能由拮抗细菌产生,并能螯合铁元素供给植物铁营养,促进植物健康生长<sup>[14]</sup>。同时,磷酸化蛋白质、磷酸单酯类等物质可以由磷酸酯酶水解,这些物质可以参与磷代谢,在宿主植物生长发育和代谢调节中起到主要作用<sup>[15-17]</sup>。由此看来,水拉恩氏菌作为内生细菌与宿主植物共生的同时所产生的次生代谢产物,不仅干扰病原菌的正常生长、起到营养竞争作用,还可以参与代谢提高植物长势,最终起到拮抗作用。因此,可以推测菌株BR11也可能具有这样的拮抗机制,有待进一步探究。

综上,菌株BR11是知母内生细菌中作为生防拮抗菌株易分离获得且有显著优势的菌株。知母种植范围广,适应性强,无常见病害<sup>[17]</sup>。取材便利,其内生菌BR11有广谱拮抗效果,可进一步深入探究该菌株抑制作用机理,并评估其田间防治效果,为生产成型的抑菌剂奠定坚实基础。

### 参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2015年版(1部)[S]. 北京:中国医药科技出版社,2015.
- [2] 刘艳平. 知母皂苷成分的药理活性及作用机制研究进展[J]. 药学实践杂志,2018,36(1):24-29.
- [3] 吉星,冯毅凡. 知母中皂苷类成分研究进展[J]. 中草药,2010,41(4):680-683.
- [4] 孔阳,马养民,王佳运,等. 一株烟曲霉抗植物病原菌活性次生代谢产物的研究[J]. 东北农业科学,2019,44(2):34-38.
- [5] 傅巧真,路俊仙,王萌,等. 中药材农药残留原因及防治措施的研究进展[J]. 时珍国医国药,2014,25(4):925-927.
- [6] 宋风平. 知母提取物对马铃薯晚疫病防治作用机制及其抑菌活性成分研究[D]. 保定:河北农业大学,2009.
- [7] 康传志,郭兰萍,周涛,等. 中药材农残研究现状的探讨[J]. 中国中药杂志,2016,41(2):155-159. (下转第66页)

差,应与分子标记等方法结合进行遗传多样性研究。其中对莢型、光泽、质地、莢面切面等这些质量性状的遗传规律分析,将对菜豆种质资源进一步创新利用中选配亲本、预测杂交后代分离等具有战略意义,这与华劲松等<sup>[21]</sup>的研究一致。

生物学特性调查是种质资源研究的最基础研究<sup>[22]</sup>。菜豆特别是油豆角以嫩莢作为菜用,含多种营养成分,受到人们的喜爱<sup>[23]</sup>。鉴于以上基础,下一步将开展菜豆营养成分及生物和非生物胁迫方面的研究,为建立和完善东北菜豆种质资源提供依据。

### 参考文献:

- [ 1 ] 郑卓杰. 中国食用豆类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 222-249.
- [ 2 ] 郑卓杰. 中国食用豆类品种资源目录(第一集)[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 1983: 277-359.
- [ 3 ] 龙静宜, 林黎奋, 侯修身, 等. 食用豆类作物[M]. 北京: 科学出版社, 1989: 209-222.
- [ 4 ] 辛大昊, 顾新良. 东北油豆角主要病害无公害防治技术[J]. 现代农业科技, 2008(22): 121.
- [ 5 ] 王 坤. 普通菜豆抗炭疽病基因的分子标记与定位研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
- [ 6 ] 胡家篷, 程须珍, 王佩芝. 中国食用豆类品种资源目录(第三集)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 142-209, 398-437.
- [ 7 ] 栾非时, 崔成煥, 王金陵. 菜豆种质资源形态标记的研究[J]. 东北农业大学学报, 2001, 32(2): 134-138.
- [ 8 ] 刘庞源, 何伟明. 菜豆种质资源特征评价及信息分析[J]. 现代农业科技, 2007(19): 13-14.
- [ 9 ] 张赤红, 王述民. 利用SSR标记评价普通菜豆种质遗传多样性[J]. 作物学报, 2005, 31(5): 619-627.
- [ 10 ] 张赤红. 普通菜豆种质资源遗传多样与分类研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2004.
- [ 11 ] Mensack M M, Fitzgerald V K, Ryan E P, et al. Evaluation of diversity among common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) from two centers of domestication using 'omics' technologies[J]. BMC Genomics, 2010, 2:686.
- [ 12 ] Marsolais F, Pajak A, Yin F, et al. Proteomic analysis of common bean seed with storage protein deficiency reveals up-regulation of sulfur-rich proteins and starch and raffinose metabolic enzymes, and down-regulation of the secretory pathway[J]. Journal of Proteomics, 2010, 73: 1587-1600.
- [ 13 ] 许玉香, 王 焱, 邸文静. 菜豆新品种园丰908选育[J]. 北方园艺, 2006(3): 81.
- [ 14 ] 尹凤龙, 袁立新, 李树会. 优质高产菜豆新品种翠龙选育及应用[J]. 辽宁农业科学, 2007(3): 95.
- [ 15 ] 葛善欣, 计秀杰, 蔡艳华, 等. 菜豆新品种“长农菜豆2号”选育报告[J]. 北京农业, 2015(35): 32-33.
- [ 16 ] Doria E, Campion B, Sparvoli F, et al. Anti-nutrient components and metabolites with health implications in seeds of 10 common bean landraces cultivated in southern Italy[J]. Journal Food Composition and Analysis, 2012, 26: 72-80.
- [ 17 ] Reyes-Bastidas M, Reyes-Fernández E Z, López-Cervantes J, et al. Physicochemical, Nutritional and Antioxidant Properties of Tempeh Flour from Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) [J]. Food Science and Technology International, 2010, 16: 427-434.
- [ 18 ] 郭建华, 刘学东, 李 梅. 菜豆新品种连农97-5的选育[J]. 中国蔬菜, 2005(10/11): 97-98.
- [ 19 ] 冯国军, 刘大军, 叶永亮, 等. 菜豆新品种哈菜豆8号的选育[J]. 中国蔬菜, 2007(8): 28-29.
- [ 20 ] 余 莉, 葛平珍, 王昭礼, 等. 籽粒型芸豆品种主要农艺性状的主成分分析和聚类分析[J]. 农业科技通讯, 2019(6): 143-149.
- [ 21 ] 华劲松, 罗中魏, 阿力里呷, 等. 西南高原生态区28个芸豆品种主要农艺性状的相关性及聚类分析[J]. 现代农业科技, 2018(24): 83-84.
- [ 22 ] 肖 靖, 李 斌, 石晓华, 等. 普通菜豆蛋白质组学研究进展[J]. 东北农业科学, 2016, 41(4): 90-93.
- [ 23 ] 凤 桐, 石晓华, 王清发, 等. 吉林省中部地区油豆角地膜覆盖栽培技术[J]. 东北农业科学, 2017, 42(1): 38-39.
- (责任编辑: 刘洪霞)
- ~~~~~
- (上接第49页)
- [ 8 ] 刘学周, 赵智灵, 李绍宾, 等. 西洋参内生菌群落结构与多样性[J]. 微生物学报, 2015, 55(3): 330-340.
- [ 9 ] 刘 霞, 党峰峰, 贺晓龙, 等. 陕北野生甘草内生菌的分离及抑菌活性筛选[J]. 西北植物学报, 2010, 30(10): 2110-2115.
- [ 10 ] 赵智灵, 刘学周, 魏晓雨, 等. 人参可利用内生菌株的筛选和鉴定[J]. 中草药, 2015, 46(14): 2143-2148.
- [ 11 ] 陈 凡. 水拉恩氏菌HX2菌株防治葡萄根癌病的初步研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2007.
- [ 12 ] 宋芳旭, 吴小芹, 赵 群. 水拉恩氏菌JZ-GX1对杨树溃疡病菌的拮抗作用[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2017, 41(4): 42-48.
- [ 13 ] Entry J A, Cromack K J, Kelsey R G, et al. Response of Douglas-fir to infection by *Armillaria ostoyae* after thinning or thinning plus fertilization[J]. Phytopathology, 1991, 81(6): 682-689.
- [ 14 ] Zhou C, Zhu L, Ma ZY, et al. Improved iron acquisition of *As-tragalus sinicus* under low iron-availability conditions by soil-borne bacteria *Burkholderia cepacia*[J]. Journal of Plant Interactions, 2018, 13(1): 9-20.
- [ 15 ] 余贤美, 郑服丛, 林 超, 等. 土壤产嗜铁素拮抗细菌CAS15的分离鉴定[J]. 植物保护学报, 2009, 36(2): 129-135.
- [ 16 ] 费美娟, 陈建省, 王晓云. 小麦叶片磷酸酯酶生化特性的研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(1): 110-113.
- [ 17 ] 姜 云, 陈长卿, 尹 望. 药用植物内生菌及其产生活性物质的应用研究[J]. 吉林农业科学, 2013, 38(4): 94-96.
- (责任编辑: 王 昱)