

菜心炭疽病菌拮抗细菌的筛选及鉴定

况福元^{1,2} 吴小丽^{1,2} 吕凤青^{1,2} 曾大兴^{2*} 涂国全¹

(1. 江西农业大学生物科学与工程学院 江西 南昌 330045)

(2. 深圳职业技术学院化生学院 广东 深圳 518055)

摘要: 从土壤中分离筛选获得 2 株对菜心炭疽病菌——希金斯炭疽菌(*Colletotrichum higginsianum*)具有强烈抑制作用的芽孢杆菌菌株 19E2、13A1。通过形态特征观察、生理生化特性测定,结合 16S rDNA 序列同源性分析以及部分基因特异性序列分析,将 2 株菌鉴定为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。抑菌试验的结果表明:当 19E2 和 13A1 的培养液在 PDA 培养基中的浓度为 10%时,抑菌率分别达到 75.62%和 85.35%,当培养液浓度升高到 20%时,可完全抑制菜心炭疽病菌生长。抗菌谱测定结果显示:2 株菌对辣椒炭疽菌(*C. capsici*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)、灰霉(*Botrytis cinerea*)、芭叶芋柱帚霉(*Cylindrocladium spathiphylli*)和尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)等重要病原菌具有明显的作用效果。

关键词: 生物防治, 菜心炭疽病, 解淀粉芽孢杆菌

Screening and Identification of Antagonistic *Bacillus* spp. Against *Colletotrichum higginsianum*

KUANG Fu-Yuan^{1,2} WU Xiao-Li^{1,2} LV Feng-Qing^{1,2}
ZENG Da-Xing^{2*} TU Guo-Quan¹

(1. College of Bioscience and Bioengineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

(2. School of Applied Chemistry and Biological Technology, Shenzhen Polytechnic, Shenzhen, Guangdong 518055, China)

Abstract: Two antagonistic strains of *Bacillus*, 19E2 and 13A1, were isolated from soil and were shown to have strong inhibitory effects on the growth of *Colletotrichum higginsianum*. Through morphological observation, physiological and biochemical characteristics, analysis of 16S rRNA gene sequence, and partial analysis of specific chromosomal genes, the two isolates were both identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. Growth of *C. higginsianum* on potato dextrose agar was inhibited by strains 19E2 and 13A1 by 75.62% and 85.35% respectively at 10% concentration of the *Bacillus* culture. Growth of *C. higginsianum* was completely inhibited (100%) at 20% *Bacillus* culture concentration. Results also demonstrated similar inhibitory effects by the two *Bacillus* strains on growing cultures of *C. capsici*, *C. gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Cylindrocladium spathiphylli* and *Fusarium oxysporum*.

Keywords: Biocontrol, *Brassica parachinensis* anthracnose, *Bacillus amyloliquefaciens*

菜心(*Brassica parachinensis* Bailey)是十字花科芸苔属中以花苔为产品的一类蔬菜,起源于我国南部,是广东乃至华南地区的主要蔬菜之一,在广东可周年生产,既适合市销又可出口创汇,国内外市场广阔^[1]。菜心炭疽病由希金斯炭疽菌引起,是菜心上最常见和发生最严重的病害之一,广东地区高温高湿的气候条件特别适宜该病的发生,既影响菜心的外观及品质,又造成减产,严重时损失可达30%~40%^[2]。菜心炭疽病的防治以选用抗病品种等农业措施和化学防治为主。近年来,由于规模化栽培、抗病品种退化和化学防治易产生产品污染等原因,使该病处于较难防治的困境。因此,探索新的有效防治途径具有重要意义。

采用土壤中的拮抗微生物来控制植物病害发生的生物防治措施已在多种重要植物病害的防治中得到应用,取得了较好的防治效果^[3-5]。植物炭疽病的生物防治研究国内外也有一些报道^[6-8],但相对较少,对菜心炭疽病生物防治的研究和应用国内外未见报道。为此,本文开展了菜心炭疽病生防细菌的筛选、鉴定研究,并对其生防性状进行了初步的探讨。

1 材料与方 法

1.1 菌株

拮抗芽孢杆菌 19E2 和 13A1,从土壤分离筛选获得。供试病原菌菌株:希金斯炭疽菌(*Colletotrichum higginsianum*)、辣椒炭疽菌(*C. capsici*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)Mg1, Sxt4、香蕉炭疽菌(*C. musae*)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)F2, Foc4、灰霉(*Botrytis cinerea*)、苞叶芋柱帚霉(*Cylindrocladium spathiphylli*)和烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)。希金斯炭疽菌分离自广州采集的菜心病害标本,尖镰孢和灰霉菌株由华南农业大学植病系真菌研究室姜子德教授赠送。

1.2 培养基

营养琼脂(上海生工):用于细菌分离培养。牛肉膏蛋白胨培养基:牛肉膏 3 g/L,蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L,琼脂 20 g/L, pH 7.4~7.6。PDA 培养基:马铃薯 200 g/L,葡萄糖 20 g/L,琼脂 20 g/L。LB 培养基:胰蛋白胨 10 g/L,酵母膏 5 g/L,氯化钠 5 g/L, pH 7.2。

1.3 拮抗细菌的分离及筛选

以营养琼脂为分离培养基,用常规稀释平板分

离法分离细菌菌株。菌株的初筛采用对峙培养法,方法为:希金斯炭疽菌接种在 PDA 平板上,25°C 培养 7 d~10 d,用打孔器从菌落边缘取直径为 6.5 mm 的小菌块,接种于 PAD 平板中央,在小菌块周围呈三角形接种分离平板上的细菌单菌落,25°C 培养。观察细菌对炭疽菌的抑制情况。挑取抑菌效果好的细菌移至牛肉膏蛋白胨培养基试管斜面保存。

菌株的复筛仍采用对峙培养法,仅将待筛选细菌(初筛菌株)从三点接种改为两点接种,即在病原菌小菌块的两边各 2.5 cm 处对称接入初筛菌株进行复筛。同时,设不接待测细菌的希金斯炭疽菌培养平板为对照,25°C 恒温培养 7 d,测定其抑菌带的宽度(平均对照菌落半径-受抑制作用的菌落半径)。以抑菌带的宽度表示细菌的拮抗效果。

1.4 菌株的鉴定

1.4.1 细菌的形态特征观察:将菌株 19E2 和 13A1 分别在牛肉膏蛋白胨培养基上划线培养,37°C 培养 2 d后,观察形成的单菌落特征;同时取样涂布载片,观察菌体和芽孢形态,测量其大小,并进行革兰氏染色。

1.4.2 生理生化特性测定:参照《常见细菌鉴定手册》的方法及芽孢杆菌属的特征对菌株 19E2 和 13A1 进行生理生化特性测定和鉴定分析^[9]。

1.4.3 16S rDNA 序列分析:采用细菌基因组提取试剂盒(上海生工)抽提基因组 DNA。用通用引物 8F (5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGYTACCTTGTACGACTT-3')进行 16S rDNA 的 PCR 扩增。PCR 扩增条件:95°C 5 min; 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min, 40 个循环; 72°C 10 min。扩增产物由上海生工进行测序,测序结果用 Blast 软件与 GenBank 核酸数据库中收集的相关种属的 16S rDNA 序列进行同源性比较。

采用 Mega 3.1 软件包中的 Phylogeny 进行系统发育树构建,采用重抽样法(Bootstrap test)对分支点的置信度进行评价,重复抽取数为 1000 次,以 Neighbor-joining 法,进行遗传距离计算。

1.4.4 菌株 19E2 和 13A1 的部分特异性基因序列分析:按文献[10]的方法,采用两对特异引物(YyaO-F/TetB-R 和 YyaR-F/TetB-R)对菌株 19E2 和 13A1 的部分特异性基因序列进行分析。引物序列分别为:YyaO-F, 5'-GGAACCAGTCCACAGGGTTGTGG-3';

YyaR-F, 5'-CGATTGAGTGGGCRAAGGAGAATCATTTWTGYGGT-3'; TetB-R, 5'-CCATATAGAGCTGTTCCAATGGAGAAG-3'。PCR 反应条件为: 94°C 1 min; 94°C 1 min, 52°C 1 min, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 7 min。

1.5 拮抗细菌培养液的抑菌作用

将菌株 19E2 和 13A1 分别接种在 LB 培养基中, 30°C、180 r/min 振荡培养 48 h, 4°C、10000 r/min 离心 20 min, 取上清液用细菌滤器过滤, 获得无菌培养液。将此滤液与 PDA 培养基混合, 制成含量分别为 1%、5%、10%和 20%的平板, 用 LB 液体培养基代替培养液制备对照平板。然后将直径为 6.5 mm 的希金斯炭疽菌菌块移植到平板中央, 28°C 恒温培养 7 d 后, 测量菌落直径, 计算拮抗细菌培养液的抑制能力。抑菌率=(对照平板菌落直径-含等量培养液平板菌落直径)/对照平板菌落直径。每处理 3 次重复。

1.6 抗菌谱的测定

用对峙培养测定拮抗菌株的抗菌谱。方法为: 供试病原菌在 PDA 平板上, 25°C 培养 5 d~7 d, 从菌落边缘取直径为 6.5 mm 的圆形小菌块接到 PDA 平板中央, 在其两边等距(2.5 cm)对称地接入拮抗细菌。25°C 恒温培养 7 d, 测定其抑菌带宽度。抑菌带宽度=对照平板平均菌落半径-受抑制菌落的平均半径。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离筛选

以希金斯炭疽菌为拮抗对象, 从采自江西南昌、云南昆明、浙江杭州等地的 44 份不同类型的土样中筛选拮抗细菌。用三点式对峙培养法对分离平板上的 1324 个单菌落进行了初筛, 共获得 248 个对菜心炭疽病菌菌丝生长有抑制作用的菌株, 有效菌株占 18.69%。由此可见, 不同类型的土壤中存在有大量对希金斯炭疽菌有抑制作用的细菌菌株。初筛菌株经过 2~3 轮复筛, 获得 10 个对希金斯炭疽菌有较强拮抗作用的菌株, 其中分别从昆明山林土样和杭州玉米地土样分离获得的两个菌株 19E2 和 13A1 作用效果最好, 其抑菌带宽度分别达到 12.63 mm 和 12.46 mm。

2.2 菌株的鉴定

在培养平板上, 菌株 19E2 和 13A1 的菌落形态相似, 菌落乳白色, 圆形, 中部隆起, 边缘整齐。菌

体杆状, 19E2 大小为 0.93 μm ×2.35 μm , 13A1 大小为 1.19 μm ×2.68 μm 。芽孢椭圆形, 中生或近端生, 孢囊不膨大。两菌株的生理生化特征一致, 接触酶、V-P 反应阳性; 水解明胶、淀粉, 但不水解酪氨酸; 能利用柠檬酸盐、D-葡萄糖和 D-木糖; 生长温度范围 5°C~50°C (表 1)。

表 1 菌株 19E2 和 13A1 的主要生理学特性
Table 1 Physiological characteristics of strains 19E2 and 13A1

生理生化特征 Physiological characteristics	菌株 Strains	
	19E2	13A1
Contact enzyme	+	+
V-P reaction	+	+
Tyrosine hydrolysis	-	-
Gelatin hydrolysis	+	+
Starch hydrolysis	+	+
8% NaCl	+	+
15% NaCl	-	-
Citrate utilization	+	+
D-glucose	+	+
D-xylose	+	+
Oxidation of glycerol	+	+
Mannitol	+	+
Anaerobic growth	-	-
Growth temperature	5°C~50°C	5°C~50°C

测得 19E2 的 16S rDNA 序列长度为 1455 bp, GenBank 序列登录号为: FJ705346。通过 Blast 与 GenBank 内的数据进行搜索比对。结果显示: 与 19E2 序列相似性达到 99% 以上的前 50 个菌株包含多个芽孢杆菌种, 多数菌株为枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌, 且序列相似性较高。19E2 与这两种菌的最高序列相似性分别达到 100%(gb|EF472261.1) 和 99.93%(gb|DQ422953.1)。13A1 的序列比对结果与 19E2 相似。基于 16S rDNA 序列的系统发育分析表明: 菌株 19E2 和 13A1 也与枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌亲缘关系最近, 但分别与解淀粉芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌聚在一起(见图 1)。从以上序列分析的结果可以看出, 16S rDNA 序列分析不能很好地区分枯草芽孢杆菌及其近缘种。

菌株 19E2 和 13A1 基因组 DNA 的特异引物扩增结果见图 2, 结果显示: 两菌株的 YyaO-F/TetB-R 扩增结果呈阴性, 而 YyaR-F/TetB-R 扩增结果呈阳

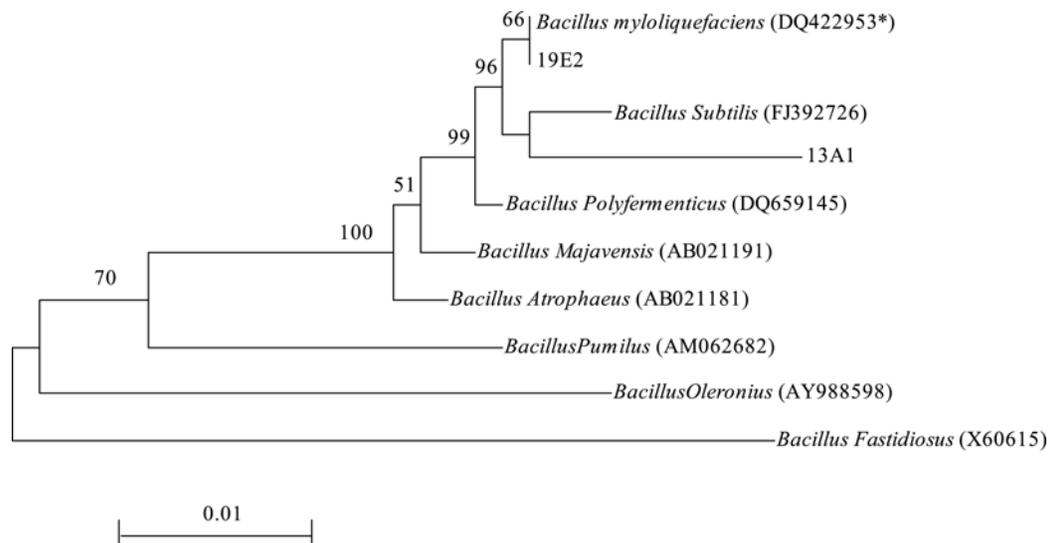


图 1 基于 16S rDNA 序列构建的 19E2 和 13A1 的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the strain 19E2 and 13A1 based on 16S rDNA sequence

Note: *: The accession number in GenBank. The numbers on the nodes are support values in a bootstrap test of 1000 runs. Bar, 1% sequence divergence.

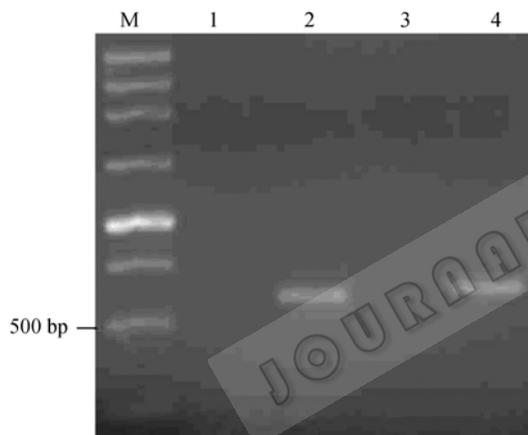


图 2 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 The electrophoretogram of the PCR product of two strains using the primers YyaO-F/TetB-R and YyaR-F/TetB-R

Note: M: Marker 250 bp ladder; 1 and 2: 19E2; 3 and 4: 13A1. 1,3: Amplification performed with the primer pair of YyaO-F/TetB-R; 2,4: Amplification performed with the primer pair of YyaR-F/TetB-R.

性。YyaO-F/TetB-R 和 YyaR-F/TetB-R 是根据枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌在编码转运蛋白基因 (*tetB-tetL*) 上的序列结构差异而设计的两对特异鉴别引物^[10]。YyaO-F/TetB-R 扩增阳性, YyaR-F/TetB-R 扩增阴性为枯草芽孢杆菌, 反之为解淀粉芽孢杆菌。现已成功地利用这两对引物对多个可能为枯草芽孢杆菌或解淀粉芽孢杆菌的菌种进行了鉴定^[10,11]。本文用引物 YyaR-F/TetB-R 对 19E2 和 13A1 扩增获得的阳性片段大小与文献报道的结果基本一致, 实验

结果支持将 19E2 和 13A1 鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

根据形态特征、生理生化特性、16S rDNA 序列分析及部分特异性基因序列分析, 参考文献[9-11]将菌株 19E2 和 13A1 鉴定为解淀粉芽孢杆菌。

2.3 拮抗细菌对菜心炭疽病菌生长和菌丝形态的影响

从对峙培养平板可以看出, 拮抗细菌对病原菌菌丝生长有较强的抑制作用, 在二者之间形成一条明显的抑菌带(见图 3); 从平板背面观察, 可以看到病原菌菌落边缘的菌丝变黑, 说明菌丝生长受到抑制的同时迅速老化。从对峙培养平板中靠近抑菌带的菌落边缘切取 $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$ 的菌块, 在光学显微镜下观察菌丝形态。可见拮抗细菌对病原菌的菌丝形态结构有明显的影响和破坏作用, 初期表现为菌丝变黑, 细胞膨大呈泡囊状, 之后菌丝呈串珠状



图 3 菌株 19E2(左)和 13A1(右)对希金斯炭疽菌的抑制
Fig. 3 The effect of strain 19E2(left) and 13A1(right) against *C. higginsianum*

膨大断裂成段, 细胞质外渗。

分别测定了菌株 19E2 和 13A1 的无菌培养液对希金斯炭疽菌的抑制作用, 结果见表 2。结果表明: 当 PDA 培养基中含有少量的细菌培养液(1%)时, 即对希金斯炭疽菌的生长产生明显的抑制作用, 抑菌率分别达到 21.47%和 23.06%; 随着 PDA 培养基中细菌培养液浓度的增加, 抑菌率快速升高, 当两菌的培养液浓度升高到 10%时, 抑菌率分别达到 75.62%和 85.35%, 抑菌效果显著。培养液浓度继续升高到 20%时, 可完全抑制希金斯炭疽菌的生长。这些结果说明菌株 19E2 和 13A1 的培养液具有突出的抑菌效果。

2.4 抗菌谱的测定

用对峙培养法测定了菌株 19E2 和 13A1 对不同病原菌生长的抑制作用, 结果见表 3。结果显示: 两菌株对多种炭疽菌和镰刀菌、灰霉等重要病原菌有明显的抑制作用, 仅对烟草疫霉没有作用。由此可

表 2 生防细菌培养液对希金斯炭疽菌生长的影响
Table 2 The effect of 19E2 and 13A1 culture solution on *C. higginsianum* growth

菌株 Strains	培养液浓度 Concentration of culture solu- tion (%)	菌落直径 Colony diammeter (mm)	对照菌落 直径 CK (mm)	抑制率 The in- hibitory effect (%)
19E2	1	52.38±0.81	66.7±1.13	21.47
	5	46.45±0.98		30.36
	10	16.26±0.76		75.62
	20	0		100
13A1	1	51.32±1.11		23.06
	5	39.16±1.2		41.29
	10	9.77±0.90		85.35
	20	0		100

表 3 菌株 19E2 和 13A1 的抗菌谱测定
Table 3 Antimicrobial spectrum of strains 19E2 and 13A1

病原真菌 Pathogenic fungi	抑菌带宽度 Inhibitory width(mm)	
	19E2	13A1
<i>C. gloeosporioides</i> Mg1	9.35±1.18	9.74±1.13
<i>C. gloeosporioides</i> Sxt4	7.05±0.84	9.26±0.98
<i>C. capsici</i>	11.58±1.02	8.17±0.87
<i>C. musae</i>	6.11±0.75	7.03±0.86
<i>F. oxysorum</i> F2	5.49±0.54	5.95±0.65
<i>F. oxysorum</i> Foc4	6.11±0.43	6.75±0.32
<i>Cylindrocladium</i> <i>spathiphylli</i>	7.22±0.65	8.85±1.45
<i>Botrytis cinerea</i>	8.12±0.72	8.76±0.84
<i>Phytophthora</i> <i>nicotianae</i>	0	0

见, 菌株 19E2 和 13A1 的抗菌谱较宽, 对多种病害的生物防治具有应用潜力。

3 讨论

芽孢杆菌具有生长快、营养简单, 能产生耐热、抗逆性强的芽孢等突出特点, 有利于生防菌剂的生产、剂型加工及在环境中的存活、定殖与繁殖, 加之批量生产工艺简单, 成本较低, 施用方便, 储存期长, 是一种理想的生防微生物^[12]。因此, 应用芽孢杆菌进行植物真菌病害的生物防治研究已深入开展, 国内外已开发出多种芽孢杆菌生防制剂应用于多种病害的生物防治, 取得了良好的效果^[3-5,12]。

本文从采自南昌、昆明、杭州等地的土壤中, 分离筛选对希金斯炭疽菌有拮抗作用的菌株应用于该病的生物防治, 通过多轮筛选, 从大量分离菌株中筛选获得 2 个芽孢杆菌菌株 19E2 和 13A1, 应用形态特征、生理生化特性和分子特征将两菌株鉴定为解淀粉芽孢杆菌。经抑菌试验和抗菌谱测定, 两菌株对希金斯炭疽菌抑菌效果突出, 对多种病原菌也有较好的拮抗效果, 是两株具有生防应用潜力的菌株。

解淀粉芽孢杆菌是枯草芽孢杆菌的近缘种, 很多研究表明: 不同的解淀粉芽孢杆菌菌株可分别抑制 *Alternaria radicina*、*Botrytis cinerea*、*Fusarium oxysorum*、*Rhizoctonia solani* 和 *Sclerotinia sclerotiorum* 等重要病原真菌的生长而应用于这些病原菌所引起的植物病害的生物防治^[13]。一些解淀粉芽孢杆菌菌株对黑线炭疽菌(*C. dematium*)^[14]、瓜类炭疽菌(*C. lagenarium*)^[7]和香蕉炭疽菌(*C. musae*)^[8]也有很好的拮抗效果。本研究筛选获得两株对希金斯炭疽菌(*C. higginsianum*)拮抗效果突出的解淀粉芽孢杆菌菌株, 丰富了芽孢杆菌生防研究及应用的内容, 为开发菌剂应用于菜心炭疽病的生物防治奠定了较好的基础。

解淀粉芽孢杆菌对病原真菌的拮抗机理主要是通过产生伊枯草菌素 A2(iturinA2)^[14]、 β -1,3-葡聚糖酶(β -1,3-glucanase)^[7]等抗菌肽或裂解酶而抑制真菌的生长。我们对菌株 19E2 的抗菌物质进行了初步的定性分析, 19E2 的培养液经硫酸铵分级沉淀获得的蛋白质粗提液仍具有强烈的抑菌效果, 表明 19E2 产生的抗菌物质主要是蛋白质。有关抗菌蛋白质的分离纯化、鉴定和生防作用试验正在进一步研究。

16S rDNA 序列同源性分析已广泛应用于细菌

的快速鉴定, 根据序列分析结果可将菌株直接鉴定到属, 甚至种^[15]。19E2 和 13A1 的 16S rDNA 序列比对结果显示, 两菌株与数据库中的枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌等多个种的序列同源性都达到 99% 以上, 按 99%~100% 的 16S rDNA 序列相似性可判定为一个种的标准^[15], 仅从序列同源性上很难准确确定它们的分类地位。为解决 16S rDNA 序列分析在枯草芽胞杆菌及其近缘种鉴定上的局限, Oleg 等根据枯草芽胞杆菌和解淀粉芽胞杆菌在编码转运蛋白基因(*tetB-tetL*)上的序列结构差异设计了 2 对特异鉴别引物(YyaO-F/TetB-R 和 YyaR-F/TetB-R)^[10], 并成功地利用这两对引物对多个可能为枯草芽胞杆菌或解淀粉芽胞杆菌的菌种进行了鉴定^[10,11]。本文应用这一方法对 19E2 和 13A1 的基因组 DNA 进行扩增, 其结果对将两菌株鉴定为解淀粉芽胞杆菌提供了有力的支持。

参 考 文 献

- [1] 蒋先明. 中国农业百科全书·蔬菜卷分册—各种蔬菜. 北京: 农业出版社, 1989, pp.38–41.
- [2] 张 华, 周而勋, 刘自珠. 菜心炭疽病苗期抗病性鉴定技术. 华南农业大学学报, 1998, **19**(3): 45–50.
- [3] 黄海婵, 裘娟萍. 枯草芽胞杆菌防治植物病害的研究进展. 浙江农业科学, 2005, **3**: 213–219.
- [4] Idris H, Ahmed Labuschagne N, Korsten L. Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological Control*, 2007, **40**: 97–106.
- [5] Szczech M, Shoda M. The effect of mode of application of *Bacillus subtilis* RB14-C on its efficacy as a biocontrol agent against *Rhizoctonia solani*. *Journal of Phytopathology*, 2006, **154**: 370–377.
- [6] 何 红, 蔡学清, 关 雄, 等. 辣椒内生枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*)BS-2 和 BS-1 防治辣椒炭疽病研究. 植物病理学报, 2003, **33**(2): 170–173.
- [7] Kim PI, Chung KC. Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens*. *FEMS Microbiol Lett*, 2004, **234**: 177–183.
- [8] Alvindia DG, Natsuaki KT. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. *Crop Protection*, 2009, **28**(3): 236–242.
- [9] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, pp.43–65.
- [10] Oleg NR, Christina D, Johan M, et al. Taxonomic characterization and plant colonizing abilities of some bacteria related to *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, **48**: 249–259.
- [11] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽胞杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究. 微生物学报, 2006, **46**(1): 7–12.
- [12] Monica LE, Elizabeth ADJ, William EBJ, et al. Viability and stability of biological control agents on cotton and snap bean seeds. *Pest Management Science*, 2001, **57**(8): 695–706.
- [13] Wu WS, Wu HC, Li YL. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for control of *Alternaria cosmosa* and *A. patula* of *Cosmos sulfurous* (Yellow Cosmos) and *Tagetes patula* (French Marigold). *Journal of Phytopathology*, 2007, **155**: 670–675.
- [14] Yoshida S, Hiradate S, Tsukamoto T. et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC22 isolated from mulberry leaves. *Phytopathology*, 2001, **91**: 181–187.
- [15] Drancourt M, Bollet C, Carlioz R, et al. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *Clin Microbiol*, 2000, **38**: 3623–3630.