

拮抗核盘菌 Bt 菌株的筛选及抑菌活性研究

王美玲^{1,2}, 耿丽丽², 段江燕^{1*}, 张 杰^{2*}

(1. 山西师范大学生命科学学院, 临汾 041004; 2. 中国农业科学院植物保护研究所/
植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

摘要 利用平板对峙试验从 170 株 Bt 菌株中筛选获得 12 株对核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 有抑菌活性的菌株, 对其中 4 株活性较强的菌株进行抗病相关基因分析, 发现菌株中都含有几丁质酶基因, 测定 4AP1 菌株发酵液的几丁质酶活力为 672.4 U/mL。通过对 4AP1 菌株 pH 和温度敏感性的研究发现, 4AP1 菌株最高可耐受 55℃ 高温及 pH 12 缓冲液的处理, 抑菌活性与对照无显著差异。且该菌株抑菌谱较广, 除核盘菌外, 对小麦赤霉菌 *Fusarium graminearum* 等其他 9 种病原真菌均有抑制作用。本研究获得的 4AP1 菌株对核盘菌具有较强抑制作用, 且耐热耐强碱环境, 为构建杀虫抗病 Bt 工程菌提供了菌株资源。

关键词 核盘菌; Bt 菌株; 抑菌活性; 几丁质酶

中图分类号: S 476 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.06.009

Screening of and studying on Bt strains with antagonistic activity against *Sclerotinia sclerotiorum*

Wang Meiling^{1,2}, Geng Lili², Duan Jiangyan¹, Zhang Jie²

(1. College of Life Sciences, Shanxi Normal University, Linfen 041004, China;

2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract A total of 12 Bt strains with antifungal activity against *Sclerotinia sclerotiorum* were obtained from 170 strains of Bt strains by the plate confrontation test. Disease resistance-related genes of 4 strains with higher activity were analyzed and all these strains contained *chit* gene. Chitinase activity of 4AP1 strain cell culture was 672.4 U/mL. The 4AP1 strain could withstand high temperature of 55℃ and pH 12, and its antifungal activity was not significantly different from the control. Moreover, the antimicrobial spectrum of 4AP1 strain was broad, except for *S. sclerotiorum*, which had antifungal activity against the other 9 fungal diseases such as *Fusarium graminearum*, etc. In this study, 4AP1 strains with strong antifungal activity against *S. sclerotiorum*, and heat and alkali resistance were obtained, and this provides strain resources for construction of engineering Bt with insecticidal activity and disease-resistance.

Key words *Sclerotinia sclerotiorum*; Bt strain; antagonistic activity; chitinase

油菜菌核病是由核盘菌引发的一种真菌病害, 在全世界近 100 多个国家造成不同程度的危害^[1]。核盘菌的寄主范围极其广泛, 可寄生的植物多达 75 个科 278 个属 408 个种以及 42 个变种或亚种^[2]。目前对核盘菌比较有效的防治方法是化学防治, 但每年我国化学农药的使用量高达 50 多万 t, 对环境已造成严重的破坏, 国际上部分国家已经限制使用化学杀菌剂^[3-4]。而生物防治因其对环境友好且不

易产生抗性等优点具有很好的开发前景。目前生物防治菌核病主要是应用木霉和芽胞杆菌等^[5-8], 芽胞杆菌因其易于分离以及产生的芽胞抗逆性强等优点, 在病害防治中占有重要的地位。

苏云金芽胞杆菌 *Bacillus thuringiensis*, 简称 Bt, 可产生多种杀虫晶体蛋白, 对昆虫有很强的毒性作用, 是一种应用最广泛的微生物杀虫剂^[9-13]。Takahashi 和 Hyakumachi 等研究发现, Bt *fukuokaensis*

收稿日期: 2017-02-08 修订日期: 2017-03-31

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201204)

* 通信作者 E-mail: duanjiangyan123@163.com; jzhang@ippcaas.cn

亚种 B88-82 菌株和 *sotto* 亚种 RG1-6 菌株可以诱导植物产生系统抗性,通过增强植物自身免疫力而提高抗病性^[14-15]。Bt 菌株可以分泌一些抗病抑菌活性物质,祁红兵等从 80 株 Bt 菌株中筛选到两株 Bt 菌株 QB51 和 HD7,这 2 株菌株均具有较高的几丁质酶活力^[16];卢伟等筛选到 19 株 Bt 菌株,其分泌产生的几丁质酶对小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum* Schwabe 有抑菌活性^[17]。许多细菌、病毒等都能够产生几丁质酶(chitinase, EC 3. 2. 1. 14)。微生物所产生的几丁质酶与其他来源的几丁质酶一样分为外切几丁质酶和内切几丁质酶,而绝大多数微生物产生的是内切几丁质酶,能特异性地将几丁质中的 β -1, 4-糖苷键水解成 *N*-乙酰-*D*-氨基葡萄糖(*N*-acetyl-*D*-glucosamine, NAG)^[18]。微生物几丁质酶活性的最适 pH 一般在 3~10 之间,而发挥抑菌活性的最适温度多在 50~60℃,高于 60℃酶容易失活^[19]。

目前报道,解淀粉芽胞杆菌、地衣芽胞杆菌以及枯草芽胞杆菌等可以用于防治油菜菌核病^[6, 20-21],而关于 Bt 的报道主要集中在其杀虫活性方面^[22]。本研究从 Bt 标准菌株库中分离获得对核盘菌有较高抑菌活性的 4AP1 菌株,并对其抑菌谱、抑菌活性的稳定性及其中几丁质酶的活性进行研究。旨在获得对核盘菌有较高防效的 Bt 菌株,以期为真菌病害的防治提供菌株资源。

1 材料与方法

1.1 材料

病原真菌:10 种供试病原真菌,核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、黄瓜炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare*、苹果轮纹病菌 *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola*、水稻稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea*、黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、黄瓜黑星病菌 *Cladosporium cucumerinum*、水稻纹枯病菌 *Thanatephorus cucumeris*、棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae*、苹果腐烂病菌 *Cytospora mandshurica* 由武汉科诺公司提供。

Bt 菌株:供试菌株共 170 株,其中 165 株来自中国农科院植物保护研究所的标准 Bt 菌株库;另外 5 株 Bt185、G03、HD73、HD73⁻ 和 HBF-18 由中国农科院植物保护研究所抗虫生物技术课题组

保存。

供试植物:甘蓝型油菜 *Brassica napus* (L.), 品种为‘新四月蔓’,栽培用土为营养土:蛭石=2:1;光照时间 14 h(7 000 lx),黑暗时间 10 h,种植时间约 30 d;种植地点为中国农业科学院植物保护研究所温室。

培养基:LB 液体培养基(胰蛋白胨 10.0 g/L,酵母提取物 5.0 g/L,NaCl 10.0 g/L,121℃灭菌 20 min),LB 固体培养基(LB 液体培养基加琼脂 15 g/L),5% 的胶体几丁质和 PDA 固体培养基,购自北京冰达生物科技有限公司。

引物由 Sangon Biotech 北京合成部合成,测序由中国农业科学院农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程开放实验室完成,生化及分子生物学试剂均为市售分析纯。

1.2 对核盘菌具有抑菌活性 Bt 菌株的筛选

将纯化后的 Bt 菌株分别接种在 LB 液体培养基中,30℃,220 r/min 活化 12 h。核盘菌在固体 PDA 平板上活化生长至满板时,利用打孔器取直径为 7 mm 的圆形菌饼倒置于 90 mm PDA 固体培养基平板的中央位置,然后在平板对称位置距离菌饼 20 mm 处放置 4 个直径为 6 mm 的圆形无菌滤纸片,每个滤纸片滴加 5 μ L 待测菌液,随后将平板置于 28℃恒温培养箱中培养,观察有无抑菌圈产生,每个处理 3 个重复。

1.3 菌株中抑菌基因的检测

提取菌株的基因组,方法参照《分子克隆指南》^[23]。利用 Raddadi 等^[24]报道的引物(表 1)扩增以下 5 个基因:降解真菌细胞壁几丁质的几丁质酶基因和几丁质外切酶基因、ZwA 抗生素基因簇的丙二酸单酰辅酶 A 转酰基酶基因和 ZwA 抗性基因、干扰细菌病原菌群体感应系统的酰基高丝氨酸内酯酶基因。PCR 扩增反应体系(20 μ L):2 $\times$ Taq Mix 10 μ L,上、下游引物各 0.4 μ L,浓度为 10 μ mol/L,模板 DNA 1 μ L,超纯水 8.2 μ L。PCR 扩增反应条件:94℃预变性 10 min;94℃变性 1 min,合适的温度退火 1 min,72℃延伸一定的时间(1 kb 的扩增产物延伸时间为 1 min),30 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶、140 V 电泳检测,产物送交测序。将测序获得的核酸序列,上传 NCBI 数据库进行 BlastN 比对分析。

表 1 PCR 引物的核酸序列和退火温度

Table 1 Nucleotide sequences and annealing temperatures of PCR primers

基因名称 Genes name	引物名称和序列(5' → 3') Primer name and sequence (5' → 3')	退火温度/℃ Annealing temperature
几丁质酶基因 <i>Chit</i>	ChitF:ATTACACTGCTATTACTATC ChitR:TGACGGCATTATAAAGTTTCGGC	50
胞外几丁质酶基因 <i>Chit36</i>	Chi36F:GATGTAAACAGGTTCAA Chi36R:TTATTTTGCAAGGAAAG	50
丙二酸单酰辅酶 A 转酰基酶基因 <i>MAT (orf2)</i>	F:ATTGTATTTATGTTTCTTGCGTA R:TTTGTCTCTCTCTTAATCTGTT	55
ZwA 抗性基因 <i>zmaR</i>	A0678:ATGTGCACTTGTATGGGCAG A0677:TAAAGCTCGTCCCTCTTCAG	55
酰基高丝氨酸内酯酶基因 <i>aiiA</i>	AIF:TAAATGTAAAGGTGGATACATAATGACAGT AIR:AGCTCATGACTTTTGGCACTATATATA	50

1.4 几丁质酶活力的测定

以 5% 的胶体几丁质为底物,取 1.5 mL 纯化后的细菌培养液于 10 mL 的离心管中,加入 0.5 mL 含 1% (质量分数) 胶体几丁质的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH=7.0), 37℃ 水浴 1 h 后,加入 2 mL 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 溶液,终止反应,100℃ 加热 10 min,以不含胶体几丁质作为对照,测定 OD₅₂₀^[25]。绘制 NAG 标准曲线,1 个酶活力单位 (U) 定义为 37℃ 条件下反应 1 h 生成 1 μg NAG。

1.5 不同 pH 缓冲液及温度对 4AP1 菌株抑菌能力的影响

将菌株接种在 5 mL LB 液体培养基中,30℃ 振荡培养 12 h,收集菌液,分别取 300 μL 菌液于 10 个 1.5 mL 离心管中,其中 4 管分别加入等量的 pH 分别为 10、11、12 和 13 的缓冲液,颠倒混匀,室温反应 30 min。5 管分别置于温度为 55、60、65、70 和 80℃ 的恒温水浴锅中温育 30 min,剩余 1 管不做任何处理。分别取 5 μL 反应液通过平板对峙试验检测其对核盘菌的抑菌能力,并测量其抑菌圈直径,每个处理设 3 个重复。

1.6 抑菌谱的检测

利用对核盘菌抑菌能力最强的菌株,通过平板对峙试验检测其对 10 种病原真菌的抑菌能力,每个处理设 3 个重复,并测量抑菌圈直径,培养温度均为 28℃。

2 结果与分析

2.1 抗核盘菌 Bt 菌株的筛选

通过平板对峙试验检测 170 株 Bt 菌株对核盘菌的抑菌能力,结果显示来自标准菌株库的 12 株 Bt 菌株 4AP1、4R1、4BR1、4BS1、4AA1、4J5、4K5、4L1、4D12、

4D16、4G7 和 4B3 对核盘菌有抑菌活性,比例为 7.1%。其中 4AP1、4BR1、4BS1、4AA1 菌株抑菌能力较强 (图 1), 而实验室常用菌株 Bt185、G03、HD73、HD73⁻ 和 HBF-18 均对核盘菌无抑菌活性。

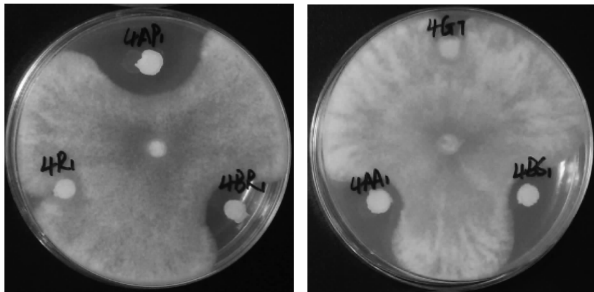


图 1 Bt 菌株抑菌能力检测

Fig. 1 Analysis of antifungal activity of Bt strains

2.2 Bt 菌株中抑菌相关基因检测及几丁质酶活力的测定

提取 4AP1、4BR1、4BS1、4AA1 菌株的基因组,对 4 个真菌病害抗性相关基因:几丁质酶基因、几丁质外切酶基因、丙二酸单酰辅酶 A 转酰基酶基因和 ZwA 抗性基因,以及 1 个细菌病害抗性相关基因:酰基高丝氨酸内酯酶基因进行 PCR 鉴定。鉴定结果显示,4 个菌株中均检测到几丁质酶基因和酰基高丝氨酸内酯酶基因 (表 2); 4AP1 菌株含有 4 个抗病相关基因,包括几丁质酶基因、丙二酸单酰辅酶 A 转酰基酶基因、ZwA 抗性基因和酰基高丝氨酸内酯酶基因 (图 2)。对 4AP1 菌株的几丁质酶基因进行 PCR 扩增并测序,NCBI BlastN 结果显示 4AP1 菌株中几丁质酶基因 (1 873 bp) 与 BtHD201 几丁质酶基因 (GenBank 登录号: AY452506. 1) 核酸序列相似性为 99%。随后对 4AP1 菌株发酵液的几丁质酶活力进行测定,结果显示其酶活力为 672.4 U/mL。

表 2 4AP1、4BR1、4BS1、4AA1 菌株抗病相关基因鉴定结果¹⁾

Table 2 Identification of disease resistance-related genes of

4AP1, 4BR1, 4BS1 and 4AA1 strains				
基因 Gene	4AP1	4BR1	4BS1	4AA1
几丁质酶基因 <i>Chit</i>	+	+	+	+
几丁质外切酶基因 <i>Chit36</i>	—	+	+	+
丙二酸单酰辅酶 A 转酰基酶基因 <i>MAT (orf2)</i>	+	—	—	—
ZwA 抗性基因 <i>zmaR</i>	+	—	—	—
酰基高丝氨酸内酯酶基因 <i>aiiA</i>	+	+	+	+

1) “+”表示鉴定到该基因;“—”表示未鉴定到该基因。
“+” represents identified gene; “—”represents unidentified gene.

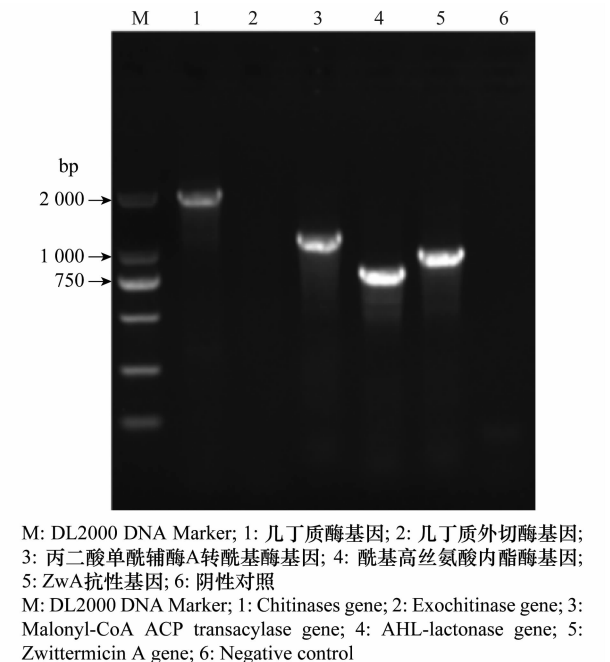


图 2 4AP1 菌株抗病相关基因鉴定结果

Fig. 2 Identification of disease resistance-related genes of 4AP1 strains

2.3 pH 及温度对 4AP1 菌株抑菌能力的影响

选择抑菌能力最强的 4AP1 菌株,分析 pH 及温度对 Bt 菌株抑菌能力的影响。室温条件下,经 pH 分别为 10、11、12 的缓冲液处理 30 min 后,4AP1 菌株抑菌活性与对照无显著差异,抑菌圈直径在 30.3~32.8 mm 之间,而经 pH 为 13 的缓冲液处理后,其抑菌活性显著降低,抑菌圈直径为(25.0±0.9) mm(图 3a),说明在 pH 10~12 缓冲液中 4AP1 菌株能保持稳定的抑菌活性。

不同温度处理对 4AP1 菌株活性影响测定结果表明:经 55℃处理 30 min 后 4AP1 菌株可保持稳定的抑菌活性,抑菌圈直径为(29.2±0.8)mm;随着处理温度升高其抑菌活性均显著降低,80℃高温处理

后其抑菌活性完全丧失(图 3b)。表明 4AP1 菌株仅耐 55℃高温处理。

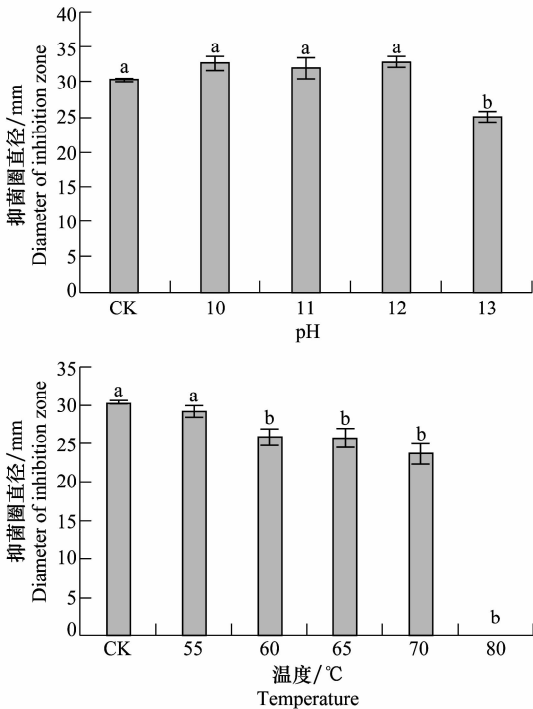


图 3 pH 及温度对 4AP1 菌株抑菌能力的影响

Fig. 3 Effects of pH and temperature on antagonistic ability of 4AP1 strains

2.4 4AP1 菌株抑菌谱的测定

利用平板对峙试验对 4AP1 菌株的抑菌谱进行测定,结果显示:4AP1 菌株对核盘菌 *S. sclerotiorum*、小麦赤霉病菌 *F. graminearum*、黄瓜炭疽病菌 *C. orbiculare*、苹果轮纹病菌 *B. berengeriana* f. sp. *piricola*、水稻稻瘟病菌 *M. grisea*、黄瓜枯萎病菌 *F. oxysporum* 和黄瓜黑星病菌 *C. cucumerinum* 的抑菌能力最强,抑菌圈直径均>30 mm;对水稻纹枯病菌 *T. cucumeris* 和棉花黄萎病菌 *V. dahliae* 的抑菌效果较强,抑菌圈直径介于 20~30 mm 之间;对苹果腐烂病菌 *C. mandshurica* 的抑菌效果较弱,抑菌圈直径<20 mm,具有较广的抑菌谱(表 3)。

3 讨论

长期以来,人们对于 Bt 的研究主要集中于对其杀虫活性的研究^[11, 22],也有研究报道 Bt 可以抑制病原真菌的生长。韩苗苗等研究发现 Bt519-1 对小麦赤霉病菌 *F. graminearum* 等 8 种病原真菌有不同的抑制作用^[26];周国旺等研究发现 BtLTS290 菌

株可抑制 6 种马铃薯致病镰孢菌的生长^[27]。本研究从 165 株标准 Bt 菌株和 5 株实验室常用菌株中筛选到 4 株对核盘菌抑菌活性较强的 Bt 菌株,发现其中的 4AP1 菌株对其他 9 种病原真菌均有不同程度的抑制作用,尤其对病害严重的水稻稻瘟病菌 *M. grisea* 以及小麦赤霉病菌 *F. graminearum* 等具有较强的抑制效果。此外,PCR 鉴定结果显示 4 株抑菌活性较强的 Bt 菌株中都含有几丁质酶基因,且 4AP1 菌株发酵液具有较高的几丁质酶活力,因此推测该菌株的抑菌活性可能与其含有的几丁质酶相关,或者与 Bt 菌株分泌的环脂肽类抗生素相关^[28],需要进一步的试验验证。

表 3 4AP1 菌株抑菌能力测试¹⁾

Table 3 Antagonistic ability assay of 4AP1 strains

病原真菌 Pathogen fungus	4AP1 菌株抑菌能力 Antagonistic ability of 4AP1
核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+++
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	+++
黄瓜炭疽病菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i>	+++
苹果轮纹病菌 <i>Botryosphaeria berengeriana</i> f. sp. <i>piricola</i>	+++
水稻稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i>	+++
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	+++
黄瓜黑星病菌 <i>Cladosporium cucumerinum</i>	+++
水稻纹枯病 <i>Thanatephorus cucumeris</i>	++
棉花黄萎病 <i>Verticillium dahliae</i>	++
苹果腐烂病 <i>Cytospora mandshurica</i>	+

1) “+”表示抑菌圈直径≤20 mm,“++”表示 20 mm<抑菌圈直径<30 mm,“+++”表示抑菌圈直径≥30 mm。
+ represents diameter of inhibition zone≤20 mm; ++ represents 20 mm< diameter of inhibition zones<30 mm; +++ represents diameter of inhibition zone≥30 mm.

已有的研究表明,微生物几丁质酶在 pH 3~10 之间、低于 60℃的条件下可以保持降解几丁质的活性^[19]。陶树兴等研究发现枯草芽胞杆菌 2-3-2 分泌几丁质酶的最适温度为 40℃,最适 pH 为 7.0,温度高于 50℃及碱性条件下酶活力都会下降^[29]。黄小红等研究发现 Bt-WB7 分泌的几丁质酶活性在 pH 4.5~6.5 区域稳定,而在 pH>8 时酶很快失活,且

55℃处理 30 min 后,酶的活性没有发生变化,高于该温度,酶就失去活性^[30]。本研究发现的 4AP1 菌株 55℃处理 30 min 后活性无显著变化,随着温度的升高,活性降低,80℃处理后活性完全丧失;经 pH 10~13 缓冲液处理 30 min 后仍有较高的抑菌活性,但其发酵液上清没有抑菌活性,该几丁质酶可能存在于菌体内,需要后续纯化分离,进一步确定其对碱性条件的耐受能力。

通过本研究发现 Bt 菌株中部分菌株对核盘菌等病原真菌有较强抑菌能力,其中 4AP1 菌株抑菌物质具有耐碱和耐热性,为真菌病害生防菌的筛选提供了新的思路,为构建杀虫抗病 Bt 工程菌奠定了基础,对于增加 Bt 制剂的市场份额具有重要的意义。

参考文献

[1] 李丽丽. 世界油菜病害研究概述[J]. 中国油料作物学报, 1994, 16(1): 79-81.

[2] Boland G J, Hall R. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 1994, 16(2): 93-108.

[3] 林玉锁, 龚瑞忠. 农药环境管理与污染控制[J]. 环境导报, 2000(3): 4-6.

[4] Kland M J. Chapter 8 teratogenicity of pesticides and other environmental pollutants [J]. Studies in Environmental Science, 1988, 31(1): 315-463.

[5] Hunter J E, Steadman J R, Cigna J A. Preservation of ascospores of *Sclerotinia sclerotiorum* on membrane filters [J]. Phytopathology, 1982, 72(6): 650-652.

[6] 薛鹏琦, 刘芳, 乔俊卿, 等. 油菜菌核病生防芽孢杆菌的分离鉴定及其脂肽化合物分析[J]. 植物保护学报, 2011, 38(2): 127-132.

[7] 侯毅平, 章四平, 王建新, 等. 枯草芽孢杆菌 NJ-18 对油菜菌核病的防治效果及其定殖动态[J]. 植物病理学报, 2013, 43(4): 411-417.

[8] Tozlu E, Mohammadi P, Senol Kotan M, et al. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, the causal agent of white mould disease in red cabbage, by some bacteria [J]. Plant Protection Science, 2016, 52(3): 188-198.

[9] Jiao Yaoyu, Yang Yan, Meissle M, et al. Comparison of susceptibility of *Chilo suppressalis* and *Bombyx mori* to five *Bacillus thuringiensis* proteins [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2016, 136: 95-99.

[10] Azizoglu U, Ayvaz A, Yilmaz S, et al. Expression of *cry1Ab* gene from a novel *Bacillus thuringiensis* strain SY49-1 active on pest insects [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2016, 47(3): 597-602.

[11] Azzouz H, Kebaili-ghribi J, BenFarhat-Touzri D, et al. Selection

- and characterisation of an HD1-like *Bacillus thuringiensis* isolate with a high insecticidal activity against *Spodoptera littoralis* (Lepidoptera: Noctuidae) [J]. *Pest Management Science*, 2014, 70(8): 1192–1201.
- [12] Bi Yang, Zhang Yanrui, Shu Changlong, et al. Genomic sequencing identifies novel *Bacillus thuringiensis* Vip1/Vip2 binary and Cry8 toxins that have high toxicity to *Scarabaeoidea* larvae [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(2): 753–760.
- [13] Yu Yajun, Yuan Yihui, Gao Meiyang. Construction of an environmental safe *Bacillus thuringiensis* engineered strain against Coleoptera [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(9): 4027–4034.
- [14] Takahashi H, Nakaho K, Ishihara T, et al. Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum* [J]. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(1): 99–110.
- [15] Hyakumachi M, Nishimura M, Arakawa T, et al. *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato [J]. *Microbes and Environments*, 2013, 28(1): 128–134.
- [16] 祁红兵, 刘铭, 李红敬. 产几丁质酶苏云金芽胞杆菌的筛选及其对甜菜夜蛾高毒菌株的增效活性[J]. *江苏农业科学*, 2003, 23(6): 61–63.
- [17] 卢伟, 赵秋敏, 陈艳玲, 等. 几丁质酶在苏云金芽胞杆菌中的分布及抑小麦赤霉菌菌株的筛选[J]. *南开大学学报(自然科学版)*, 2007, 40(3): 97–101.
- [18] 喻子牛. 苏云金杆菌[M]. 北京: 科学出版社, 1990.
- [19] 胡荣康, 肖正, 林满红, 等. 微生物热稳定几丁质酶的研究进展[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(22): 359–364.
- [20] 孙启利, 陈夕军, 童蕴慧, 等. 地衣芽孢杆菌 W10 抗菌蛋白对油菜菌核病菌的抑制作用及防病效果[J]. *扬州大学学报(农业与生命科学版)*, 2007, 28(3): 82–86.
- [21] 江木兰, 赵瑞, 王国平. 油菜内生枯草芽孢杆菌 BY-2 抗油菜菌核病菌有效成分的鉴定和分离提纯[J]. *中国油料作物学报*, 2006, 28(4): 453–456.
- [22] 束长龙, 张风娇, 黄颖, 等. Bt 杀虫基因研究现状与趋势[J]. *中国科学: 生命科学*, 2016, 46(5): 548–555.
- [23] 萨姆布鲁克, 鲁塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂, 译. 北京: 化学工业出版社, 2008.
- [24] Raddadi N, Belaouis A, Tamagnini I, et al. Characterization of polyvalent and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2009, 49(3): 293–303.
- [25] 李力, 黄胜元, 英雄. 产几丁质酶的苏云金杆菌菌株筛选及酶合成条件研究[J]. *中国病毒学*, 2000, 15(S1): 97–100.
- [26] 韩苗苗, 肖亮, 蔡峻, 等. 一株抑真菌、对甜菜夜蛾高效的苏云金芽胞杆菌菌株[J]. *微生物学通报*, 2008, 35(11): 1750–1754.
- [27] 周国旺, 李玉红, 张圆, 等. 苏云金芽胞杆菌 LTS290 菌株抑制镰孢菌的作用[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(8): 153–158.
- [28] Jouzani G S, Valijanian E, Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and findings [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101: 2691–2711.
- [29] 陶树兴, 张娟妮, 郭贤, 等. 枯草芽孢杆菌 2-3-2 的抗线虫作用和产酶条件与酶特性[J]. *陕西师范大学学报(自然科学版)*, 2013, 41(3): 45–49.
- [30] 黄小红, 陈清西, 王君, 等. 苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)几丁质酶的分离纯化及酶学性质[J]. *应用与环境生物学报*, 2004, 10(6): 771–773.
- (责任编辑: 田 喆)
-
- (上接 16 页)
- [14] Koike S T, Gordon T R, Daugovish O, et al. Recent developments on strawberry plant collapse problems in California caused by *Fusarium* and *Macrophomina* [J]. *International Journal of Fruit Science*, 2013, 13(1–2): 76–83.
- [15] 王素素, 杜国栋, 吕德国. 土壤高温处理对连作草莓根系呼吸代谢及植株发育的影响[J]. *果树学报*, 2011, 28(2): 234–239.
- [16] 郭修武, 李坤, 谢洪刚, 等. 连作土灭菌对葡萄生长及根系分泌特性的影响[J]. *果树学报*, 2010, 27(1): 29–33.
- [17] 肖宏, 毛志泉, 于明革, 等. 连作土与灭菌土对平邑甜茶幼苗生长发育的影响[J]. *果树学报*, 2004, 21(4): 370–372.
- [18] 侯永侠, 周宝利, 吴晓玲, 等. 土壤灭菌对辣椒抗连作障碍效果[J]. *生态学杂志*, 2006, 25(3): 340–342.
- [19] 方祖桢. 石灰抑制根纹枯菌的效应及应用研究[J]. *安徽农业科学*, 2004, 32(3): 454–455.
- [20] 孙桂芝, 王成云. 棚室蔬菜连作障碍的成因及防治对策[J]. *现代农业*, 2016(11): 25–26.
- [21] 刘炳君, 杨扬, 李强, 等. 调节茶园土壤 pH 对土壤养分、酶活性及微生物数量的影响[J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(32): 19822–19824.
- [22] 张丽荣, 康萍芝, 沈瑞清. 石灰氮对设施番茄根际土壤微生物数量及产量和枯萎病的影响[J]. *西北农业学报*, 2014, 23(3): 201–204.
- [23] Oleszczuk P, Joško I, Futa B, et al. Effect of pesticides on microorganisms, enzymatic activity and plant in biochar-amended soil [J]. *Geoderma*, 2014, 214–215(2): 10–18.
- [24] 班洁静, 侯明生, 蔡丽. 土壤 pH 对芸薹根肿菌感染及病害发生的影响[J]. *植物保护*, 2015, 41(6): 55–59.
- [25] 姚燕来, 黄飞龙, 薛智勇, 等. 土壤环境因子对土壤中黄瓜枯萎病致病菌增殖的影响[J]. *中国土壤与肥料*, 2015(1): 106–110.
- [26] 张超, 赵芊, 张哲, 等. 植物免疫应答过程中 Ca^{2+} 及 CaM /CML 的功能[J]. *生物学杂志*, 2014, 31(2): 69–72.
- (责任编辑: 田 喆)