

大白菜软腐病拮抗菌的筛选、鉴定及其防效研究

王彪¹, 崔文艳¹, 武君洁¹, 何朋杰¹, 吴毅歆^{1,2},
何鹏飞^{1,2}, 王再强¹, 李兴玉^{1,2}, 何月秋^{1,2*}

(1. 云南农业大学, 昆明 650201; 2. 微生物菌种筛选与应用国家地方联合工程研究中心, 昆明 650217)

摘要 为筛选对大白菜软腐病具有较好拮抗效果的生防菌株, 采用对峙平板法分别从作物根际土、发酵池以及本实验室菌种库得到 6 株拮抗性较强的菌株 ASR-12、ASR-23、ASR-31、ASR-54、ASR-55、ASR-150。在离体叶柄软腐防效试验中, 采用注射接种法获得了拮抗性较强的 3 株拮抗菌 ASR-12、ASR-23 和 ASR-150, 48 h 的防效分别达到了 87.64%、80.90% 和 70.79%。温室防效试验的结果表明: 菌株 ASR-12、ASR-23 和 ASR-150 防治效果分别为 59.22%、59.21% 和 55.00%, 显著高于 72% 农用链霉素可湿性粉剂的防效 (39.15%), 具有很好应用前景。依据形态、生理生化 and 分子鉴定, 菌株 ASR-12 被鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。

关键词 拮抗菌; 筛选; 防效; 鉴定; 解淀粉芽胞杆菌

中图分类号: S 436.341.13 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018416

Screening, identification and control effect of the antibacteria against soft rot of Chinese cabbage

WANG Biao¹, CUI Wenyan¹, WU Junjie¹, HE Pengjie¹, WU Yixin^{1,2},
HE Pengfei^{1,2}, WANG Zaiqiang¹, LI Xingyu^{1,2}, HE Yueqiu^{1,2}

(1. Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. National and Local Joint Engineering Research Center for Screening and Application of Microbial Strains, Kunming 650217, China)

Abstract In order to screen the antagonistic strains with good effects on soft rot of Chinese cabbage, a total of 6 strong antagonistic strains, ASR-12, ASR-23, ASR-31, ASR-54, ASR-55 and ASR-150, were isolated from the rhizosphere soil of the crops in the greenhouse, fermentation pool and bacterial bank through confrontation plate culture. Three antagonistic strains, ASR-12, ASR-23 and ASR-150, were selected for soft rot resistance test by petiole injection method of Chinese cabbage *in vitro*, and their control effects were 87.64%, 80.90% and 70.79%, respectively, in 48 h. The three strains were tested against soft rot in the greenhouse by spraying method, and the results showed that the control effects of the strains ASR-12, ASR-23 and ASR-150 were 59.22%, 59.21% and 55.00%, respectively, significantly better than 72% agricultural streptomycin wettable powders whose effect was 39.15%, indicating they have good application prospect. Based on morphological, physiological and biochemical and molecular identification, the strain ASR-12 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*.

Key words antagonistic bacteria; screening; control effect; identification; *Bacillus amyloliquefaciens*

软腐病是一种世界范围内的土传细菌性病害, 主要由果胶杆菌属 *Pectobacterium* 细菌引起。我国主要包括胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜软腐亚种 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*、胡萝卜软腐果胶杆菌黑胫亚种 *P. carotovorum* subsp. *atroseptica* 和菊苣基氏菌 *Dickeya chrysanthemi* 等^[1-2]。除了危害大白菜以外, 这些菌还可以侵

染魔芋、胡萝卜、辣椒、番茄、马铃薯及马蹄莲等重要经济作物^[1,3-4], 它们在侵染寄主的过程中, 能够产生大量果胶酶, 分解寄主植物组织细胞壁, 产生臭味, 致使寄主组织出现溃烂、浸渍等症状, 严重时可导致整株死亡。

目前, 人们主要采取选育抗病品种与化学农药相结合的方式防治软腐病^[5]。其中, 化学农药见

收稿日期: 2018-09-26 修订日期: 2018-11-01

基金项目: 科技部国际合作计划项目 (2009DFA32360)

* 通信作者 E-mail: ynfh2007@163.com

效快、防效好,但是长期使用不仅会污染环境,还会使病原菌产生耐药性,使药效下降。生物防治相较于化学农药具有选择性强、环境兼容性好、不易产生耐药性、生产原料广泛等优点^[6]。随着现代农业生产的发展,利用环保安全的微生物防治植物病害变得越来越重要。为筛选得到对大白菜软腐病有较好防治效果的拮抗菌,本试验以作物根际土、污水池和菌种库为材料进行筛选,经室内离体叶柄防效试验和温室软腐病防效试验进一步验证,对防效最好的拮抗菌株进行形态、生理生化、16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列分析鉴定,以期为深入开展该菌的生防机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

指示菌为软腐病菌 SR-5,保存于本实验室;部分待筛菌株取自本实验室菌种库。作物根际土和污水分别采集自微生物菌种筛选与应用国家地方联合工程研究中心温室大棚和发酵池(昆明安宁市青龙镇)。大白菜‘83-1’(‘鲁春白1号’)购自云南众乐农业科技有限公司。72%农用链霉素可湿性粉剂购自山东百士威农药有限公司。培养基为 LB 固体和 LB 液体培养基。

1.2 方法

1.2.1 生防菌的初筛

参考熊汉琴的双培养法^[7]并略作修改:1)取不同作物根际土烘干,称取 5 g 加入到 45 mL 无菌水中,37℃,160 r/min 摇床上振荡培养 30 min,用移液枪吸取部分做 10 倍梯度稀释;2)直接取发酵池污水适当稀释。从-20℃冰箱取出软腐病菌 SR-5 于 LB 固体平板上活化,次日挑取单菌落于 LB 液体培养基中过夜培养。调整浓度约为 10^7 cfu/mL,分别与带菌土壤稀释液和污水稀释液按 1:1 等体积混合,用移液枪吸取 200 μ L 混合液均匀涂布在 LB 固体平板上,置于 37℃ 恒温培养箱内培养,24 h 后观察有无抑菌圈产生。挑取有抑菌作用的菌落并连续纯化 3 代以上保存。

同时采用点接法从菌种库内现有的 1 000 株菌株中筛选潜在软腐病生防菌。从-80℃内取出保存在甘油中的菌划线活化,将 200 μ L SR-5 菌悬液(10^7 cfu/mL)均匀涂布到 LB 固体培养基上,用牙签挑取活化的待测菌株点接在平板上,置于 37℃ 恒温培养箱内。

24 h 后观察有无抑菌圈出现,记录并保存有良好抑菌作用的菌株。

1.2.2 复筛

用点接法将初筛保存的所有菌株点接到涂布有 200 μ L SR-5 菌株(10^7 cfu/mL)的 LB 固体平板上,每个菌株 3 次重复,培养 24 h 后采用十字交叉法测量抑菌圈直径与菌落直径,计算相对抑制比值。

相对抑制比值=抑菌圈直径/菌落直径。

1.2.3 离体叶柄软腐防效试验

菌悬液制备:分别挑取拮抗性较强菌株和指示菌 SR-5 接种于 LB 液体培养基内,置于 37℃ 恒温摇床上培养 48 h,采用稀释涂布法调整菌液浓度,拮抗菌约 10^8 cfu/mL,指示菌约 10^6 cfu/mL。

取健康的白菜叶片,将叶柄剪成大小约 3 cm×5 cm 的片段,表面用 75%乙醇消毒。处理方法参考 Zhao 等^[8]并适当修改,取规格 90 mm 灭菌培养皿,内铺两层灭菌滤纸片,并加适量无菌水保湿,每皿放置 1 个叶柄片段。设置处理如下:以接种 LB 液体培养基的处理为空白对照;以只接种软腐病菌 SR-5 的处理为阴性对照;接种 100 μ g/mL 氯霉素的处理为化学对照;接种待选拮抗菌(10^8 cfu/mL)为处理组。先接种拮抗菌,4 h 后再接种软腐病菌。其中,指示菌 SR-5(约 10^6 cfu/mL)与待筛选生防菌(约 10^8 cfu/mL)均采用注射接种法,即使用移液枪将菌液注入叶柄片段内,每个片段均匀注射 3 个孔,每孔病原菌与生防菌的接种量均为 10 μ L。以 3 个叶柄片段为 1 个重复,每个处理设置 5 个重复。培养皿用保鲜膜封口,置于 35℃ 恒温培养箱内保湿培养。48 h 后调查各处理叶片腐烂情况。分级标准如下:0 级:伤口处无软腐病斑;1 级:伤口处出现黄褐色水渍状病斑;3 级:叶片腐烂面积在 10% 以下;5 级:叶片腐烂面积在 10%~30%;7 级:叶片腐烂面积达 31%~50%;9 级:软腐面积在 50% 以上。

1.2.4 温室大棚软腐防效试验

试验于 2018 年 3 月-4 月在安宁微生物筛选与应用国家与地方联合工程研究中心温室大棚进行。菌悬液制备方法同 1.2.3。

试验设计拮抗菌处理、化学药剂处理(1 000 倍 72%农用链霉素可湿性粉剂),以只接种软腐病菌 SR-5 的处理做阴性对照(CK),每处理 3 个重复,每个重复 30 株大白菜。在白菜包心初期开始第 1 次

处理,喷施方法及用量参考王超等^[9],在白菜茎基部喷施拮抗菌的菌液(10^8 cfu/mL),以叶表湿润且菌液不下流为宜。2 d 后开始喷施软腐病菌(10^6 cfu/mL),之后每隔 7 d 喷施 1 次拮抗菌,共喷施 3 次,于最后 1 次处理后 7 d 调查病情,并计算防效,分级标准参考谢德龄等^[10]。

1.2.5 鉴定

1.2.5.1 形态、生理生化鉴定

对菌株 ASR-12 进行鉴定,以确定其分类地位。

测试性状及方法参考文献^[1]。

1.2.5.2 分子鉴定

参考 Cheng 等^[11]的方法提取细菌基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板,使用细菌 16S rDNA 和 *gyrB* 通用引物扩增相应基因片段。其中,反应体系参考熊国如等^[12],扩增程序如下:94℃ 4 min 30 s;94℃ 30 s,54℃ 40 s,72℃ 1 min 30 s,30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物送昆明硕擎科技生物有限公司测序。

表 1 引物名称和序列
Table 1 List of primers and sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
16S-P0	GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG
16S-P6	CTACGGCTACCTTGTTCAGA
<i>gyrB</i> -F	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTTYGA
<i>gyrB</i> -R	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCACRTTCNGCRTCNGTCAT

1.3 统计分析

本试验中所有数据均利用 SPSS 20 软件处理,采用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 筛选结果

分别从作物根际土和污水发酵池中获得 5 株和 3 株对软腐病菌有抑制作用的拮抗菌,从菌种库中筛得 142 株拮抗菌,分别对其进行编号 ASR-1 至 ASR-142(来自菌种库)、ASR-143 至 ASR-147(来自作物根际土)、ASR-148 至 ASR-150(来自发酵池)。

复筛得到 6 株对软腐病菌有较强抑制作用的拮抗菌,编号分别为 ASR-12、ASR-23、ASR-31、ASR-54 和 ASR-55、ASR-150。其中 ASR-12、ASR-23 和 ASR-150 的抑菌圈直径分别为 11.5、10.33 和 6.83 mm,

它们的抑菌圈直径与菌落直径的比值分别达到了 2.57、2.22 和 2.16,其余 3 株拮抗菌的抑菌圈直径与菌落直径比值也都在 1.6 以上,具体数据见表 2,图 1 为拮抗菌对软腐病菌抑制作用效果图。

表 2 拮抗菌对软腐病菌的抑制作用¹⁾
Table 2 Inhibitory effects of the antagonistic bacteria against soft rot pathogen

菌株 Strain	抑菌圈直径/mm Inhibition diameter	菌落直径/mm Colony diameter	比值 Ratio value
ASR-12	(11.50±0.29)a	(4.50±0.29)a	(2.57±0.10)a
ASR-23	(10.33±0.67)a	(4.67±0.33)a	(2.22±0.02)b
ASR-150	(6.83±0.44)b	(3.17±0.17)c	(2.16±0.10)b
ASR-54	(7.67±0.16)b	(4.17±0.17)ab	(1.84±0.05)c
ASR-31	(6.67±0.67)b	(3.67±0.33)bc	(1.83±0.17)c
ASR-55	(8.17±0.47)b	(4.83±0.17)a	(1.69±0.05)c

1) 同列数据后不同字母表示在 $\alpha=0.05$ 水平下差异显著。下同。
The different letters in the same column indicate significant difference at $\alpha=0.05$ level. The same below.

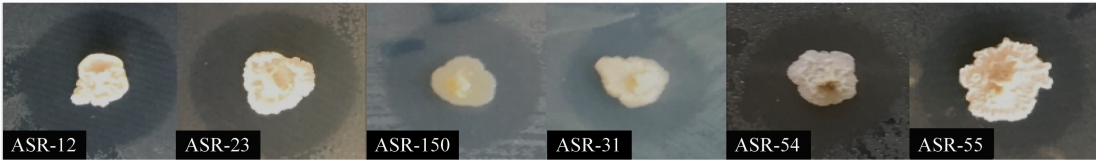


图 1 拮抗菌对软腐病菌的抑制作用

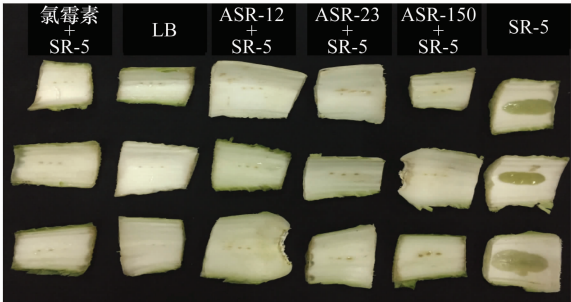
Fig. 1 Inhibitory effects of the antagonistic bacteria against soft rot pathogen

2.2 离体叶片软腐防效

处理 48 h 后调查发病情况,从图 2 和表 3 来看,只接种病原菌的对照伤口附近出现明显的水渍状软

腐病斑,腐烂情况较严重,病情指数高达 65.93;空白对照未出现腐烂情况;化学对照伤口附近几乎没有出现软腐病斑,防效高达 96.63%;拮抗菌 ASR-12、

ASR-23 和 ASR-150 处理的大白菜伤口附近部分出现腐烂情况,它们的防效分别达到了 87.64%、80.90% 和 70.79%,其中拮抗菌处理 ASR-12 和 ASR-23 与化学对照之间差异不显著。



每个处理下的3个组织片段代表同一重复下的3个小重复
The three tissue fragments under each treatment represent three technical repeats for the same repetition

图 2 拮抗菌在大白菜离体叶柄上防治软腐病效果
Fig. 2 Control effects of the antagonistic bacteria against soft rot of Chinese cabbage petiole in vitro

表 3 生防菌株对大白菜离体叶柄软腐病的防效
Table 3 Control effects of the biocontrol agents against soft rot of Chinese cabbage petiole in vitro

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防效/% Control effect
LB	0	—
SR-5	(65.93±1.82)a	—
氯霉素+SR-5 paraxin+SR-5	(2.22±0.91)d	(96.63±1.38)a
ASR-12+SR-5	(8.15±0.30)cd	(87.64±4.49)a
ASR-23+SR-5	(12.59±0.45)bc	(80.90±6.79)ab
ASR-150+SR-5	(19.26±0.41)b	(70.79±6.26)b

2.3 温室大棚软腐防效

试验于 2018 年 4 月初开始调查,只接病原菌的对照处理发病已比较严重,病情指数高达 74.07; 农用链霉素对照病情指数为 45.07,防效仅为 39.15%; 拮抗菌 ASR-12、ASR-23 和 ASR-150 处理发病较轻,防治效果均显著优于 72%农用链霉素可湿性粉剂对照,分别达 59.22%、59.21%和 55.00%(表 4)。

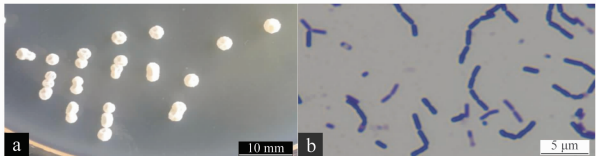
表 4 生防菌温室软腐防效试验

Table 4 Control effects of the biocontrol agents against soft rot of Chinese cabbage in the greenhouse

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防效/% Control effect
CK	(74.07±1.96)a	—
72%农用链霉素 WP streptomycin 72% WP	(45.07±2.95)b	(39.15±3.98)b
ASR-12	(30.21±1.11)c	(59.22±1.50)a
ASR-23	(30.21±2.72)c	(59.21±3.67)a
ASR-150	(33.33±2.22)c	(55.00±3.00)a

2.4 拮抗菌形态鉴定结果

对菌株 ASR-12 形态鉴定的结果表明,菌株 ASR-12 在 LB 固体培养基上于 37℃恒温培养箱中培养,培养初期菌落乳白色、脓状、圆形、边缘整齐,培养后期菌落表面凹陷,表面干燥有褶皱。革兰氏染色呈阳性,菌体杆状,产芽胞。



a: 在LB上菌落形态; b: 革兰氏染色
a: Colony on LB plate; b: Gram staining

图 3 ASR-12 形态特征
Fig. 3 Morphology of ASR-12

2.5 生理生化鉴定结果

ASR-12 的生理生化反应表现为:在 2%、5%、7% 和 10% 的盐浓度下能正常生长,在 30、40 和 55℃下能正常生长,5℃下不能正常生长,过氧化氢、明胶液化、淀粉水解、甲基红、V. P、产吡啶乙酸、柠檬酸盐利用等试验均为阳性,兼性厌氧,不分解尿素。这些特性与解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* 相似。

2.6 分子鉴定结果

将菌株 ASR-12 测序结果利用 DNAMAN 软件进行拼接,结果显示 16S rDNA 和 *gyrB* 基因序列全长分别为 1 441 bp 和 1 201 bp。将拼接结果分别输入 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLAST 比对,与解淀粉芽胞杆菌的同源性均达到了 99%。根据比对结果选取同源性较高菌株序列,利用 MEGA 7.0 软件采用邻接法构建系统发育树,结果见图 4 和图 5。聚类分析将菌株 ASR-12 鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*。

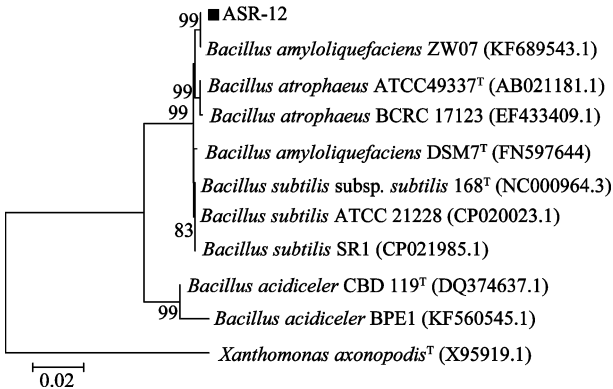


图 4 菌株 ASR-12 基于 16S rDNA 序列的系统发育分析
Fig. 4 Phylogenetic analysis of strain ASR-12 based on 16S rDNA sequences

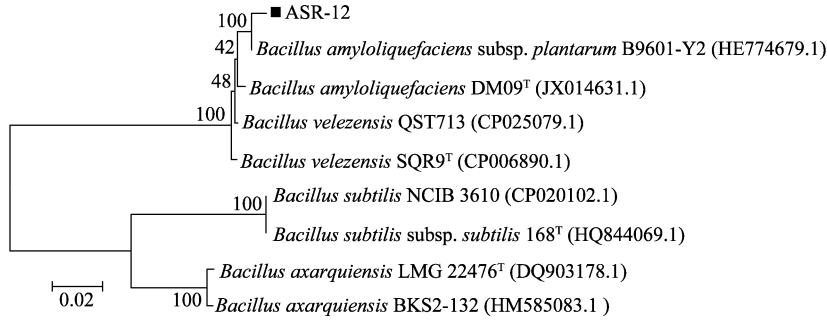


图 5 菌株 ASR-12 基于 *gyrB* 基因的系统发育分析

Fig. 5 Phylogenetic analysis of strain ASR-12 based on *gyrB* gene sequences

3 讨论

近年来,软腐病已成为制约大白菜等作物高产丰收的主要病害之一。由于化学防治对环境危害很大^[13],不符合绿色农业需求,因此筛选、发掘环境友好型的微生物菌株并开发成相应的产品应用到农业上防治植物病害已成为当前的研究热点^[14-19]。本研究从安宁温室大棚作物根际土壤、发酵池以及实验室菌种库内 1 000 株菌株中筛选得到 6 株对软腐病菌 SR-5 拮抗性较强的菌株,其中 ASR-12, ASR-23 及 ASR-150 的抑菌圈直径与菌落直径比值均超过 2.1,对软腐病菌抑制效果优异。室内离体大白菜叶柄组织防效试验显示,ASR-12、ASR-23 及 ASR-150 均能有效地抑制叶柄组织中浸渍面积的扩大,且菌株 ASR-12 的防治效果显著优于 ASR-23 与 ASR-150,与 100 $\mu\text{g/mL}$ 氯霉素处理防效相仿。田间试验显示,拮抗菌 ASR-12 处理后软腐病病情指数下降了 43.86 百分点,防治效果(59.22%)显著优于 72%链霉素可湿性粉剂对照(39.15%)。田间试验中化学药剂与生防菌剂对大白菜软腐病的防控效果低于室内试验,可能与田间病原菌的浓度与分布、微生物区系及温湿度、土壤 pH、含水量等环境条件因素有关。ASR-12 菌株经形态观察、生理生化及分子手段被鉴定为解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*。芽胞杆菌是最主要的几种植株根际促生菌(PGPR)之一,具有抗逆性强、对人畜无危害及易于开发为稳定生物制剂等优点,近几十年来被广泛开发应用于生物防治领域,能够较好地防控土传病害的芽胞杆菌屡见报道^[20-22]。

此外,大白菜软腐病发病迅速,一旦植株出现可见的软腐病斑,可在短时间内使大白菜品质产量

下降甚至整株倒伏死亡。本研究采用先接种生防菌再接种病原菌的方法测定拮抗菌对大白菜软腐病的预防效果,结果显示,拮抗菌 ASR-12 在温室软腐防效试验中的防效为 59.22%,明显优于王超等^[9]的 48.29%,故在农业生产上对于大白菜软腐病的防治应该采用“预防为主,治疗为辅”的手段,即在软腐病高发的季节提前喷施生物制剂,以达到预防的目的。对其他生防方式和土传病害的防控亦有借鉴意义。此外,Hoda 等^[23]的研究结果表明,将 3 株拮抗菌 Pf2、Bs3 和 Ra39 组合后使用,其防治效果明显优于三者单独使用。本试验筛选得到的 3 株拮抗菌 ASR-12、ASR-23 和 ASR-150 在离体和温室试验中均有较好的防治效果,将其组合后使用的防效是否优于单独使用还有待进一步研究。

参考文献

[1] 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: 349-370.

[2] 冯洁. 植物病原细菌分类最新进展[J]. 中国农业科学, 2017, 50(12): 2305-2314.

[3] PEROMBELON M C, MANDKELMAN A. Ecology of the soft rot *Erwinia* [J]. Annual Review of Phytopathology, 1980, 18: 361-387.

[4] 王国馨,罗灿辉,刘克颐. 魔芋软腐病研究[J]. 湖南农学院学报, 1989, 15(2): 50-57.

[5] 鲁燕汶. 大白菜软腐病病原细菌的分离、筛选及鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2006: 5-6.

[6] 贺小香. 大白菜软腐病菌的拮抗内生细菌的筛选及其拮抗作用的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006: 2-3.

[7] 熊汉琴. 番茄青枯病拮抗菌的筛选及其相关生防机制的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016: 10-11.

[8] ZHAO Yancun, LI Pengxia, HUANG Kaihong. Control of post-harvest soft rot caused by *Erwinia carotovora* of vegetables by

- a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its potential modes of action [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2013, 29: 411–420.
- [9] 王超,李宏伟,王翠,等. 防治大白菜软腐病细菌菌株的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(12):114–117.
- [10] 谢德龄,倪楚芳,朱昌熊,等. 中生菌素(农抗751)防治白菜软腐病的效果试验初报[J]. 生物防治通报,1990,6(2):74–77.
- [11] CHENG Hairong, JIANG Ning. Extremely rapid extraction of DNA from bacteria and yeasts [J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(1): 55–59.
- [12] 熊国如,赵更峰,范成明,等. 生防菌株 XF-1 的鉴定和抑菌谱的测定[J]. 云南农业大学学报,2009,24(2):190–194.
- [13] YOSHIDA S, HIRADATE S, TSUKAMOTO T, et al. Antimicrobial activity of culture filtrate of *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2 isolated from mulberry leaves [J]. Biological Control, 2001, 91: 181–182.
- [14] 潘映华,李振高,李良谟. 杂交梗稻的氮素利用率及根际微生物[J]. 土壤,1995,27(3):144–146.
- [15] TSUDA K, TSUJI G, HIGASHIYAMA M, et al. Biological control of bacterial soft rot in Chinese cabbage by *Lactobacillus plantarum* strain BY under field conditions [J]. Biological Control, 2016, 100: 63–69.
- [16] JEONG A L, DONG HWAN L, SUNGGI H. Isolation and genomic characterization of the T4-Like bacteriophage PM2 infecting *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* [J]. The Plant Pathology Journal, 2015, 31(1): 83–89.
- [17] SAMANEH K Z, SAREH B R, PEJMAN K, et al. Screening bactericidal effect of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains against causal agent of potato soft rot [J]. Journal of Basic Microbiology, 2016, 56: 196–205.
- [18] 李娟,李红丽,王岩. 大白菜软腐病拮抗菌筛选及其发酵条件研究[J]. 湖北农业科学,2011,50(2):281–284.
- [19] 周丽洪,李森,姬广海,等. 防治软腐病的魔芋内生拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 云南农业大学学报,2015,30(4):547–553.
- [20] 杨冬静,孙厚俊,张成玲,等. 解淀粉芽孢杆菌菌株 XZ-1 对甘薯黑斑病的生物防治效果研究[J]. 西南农业学报,2018,31(4):736–741.
- [21] 郑雪芳,刘波,朱育菁,等. 番茄青枯病生防芽孢杆菌的筛选与鉴定[J]. 中国生物防治学报,2016,32(5):657–665.
- [22] 陈哲,黄静,赵佳,等. 防治草莓炭疽病的芽孢杆菌组合的筛选[J]. 中国生物防治学报,2018,34(4):582–588.
- [23] HODA H, KAMAL A. Combination of different antagonistic bacteria to control of potato blackleg disease caused by *Pectobacterium atrosepticum* under greenhouse and field conditions [J]. International Journal of Phytopathology, 2016, 5(1): 35–43.
- (责任编辑:田 喆)
-
- (上接 141 页)
- [13] ROBSON S K A, CROZIER R H. An evaluation of two biochemical methods of age determination in insects (pteridines and lipofuscins) using the ant *Polyrhachis sexpinosa* Latrielle (Hymenoptera: Formicidae)[J]. Australian Journal of Entomology, 2009, 48(2): 102–106.
- [14] 范青松. 口虾蛄年龄鉴定和种群动态研究[D]. 大连:大连海洋大学,2015.
- [15] SOHAL R S, DONATO H. Effect of experimental prolongation of life span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly, *Musca domestica*[J]. Journal of Gerontology, 1979, 34(4): 489–496.
- [16] SHEEHY M R. Role of environmental temperature in aging and longevity: insights from neurolipofuscin[J]. Archives of Gerontology & Geriatrics, 2002, 34(3): 287–310.
- [17] BELCHIER M, EDSMAN L, SHEEHY M R J, et al. Estimating age and growth in long-lived temperate freshwater crayfish using lipofuscin [J]. Freshwater Biology, 2010, 39(3): 439–446.
- [18] LEHANE M J, HARGROVE J. Field experiments on a new method for determining age in tsetse flies (Diptera: Glossinidae) [J]. Ecological Entomology, 2010, 13(3): 319–322.
- [19] MOON R D, KRAFSUR E. Pterin quantity and gonotrophic stage as indicators of age in *Musca autumnalis* (Diptera: Muscidae) [J]. Journal of Medical Entomology, 1995, 32(5): 673–684.
- [20] WALL R, LANGLEY P A, MORGAN K L. Ovarian development and pteridine accumulation for age determination in the blowfly *Lucilia sericata* [J]. Journal of Insect Physiology, 1991, 37(12): 863–868.
- [21] MCINTYRE G S, GOODING R H. Pteridine accumulation in *Musca domestica* [J]. Journal of Insect Physiology, 1995, 41(4): 357–368.
- [22] EDALAT H, AKHOUNDI M, BASSERI H. Age-dependance of pteridines in the malaria vector, *Anopheles stephensi* [J]. Pteridines, 2017, 28(3/4):157–161.
- [23] 徐博. 斜纹夜蛾前胸腺与性腺的形态结构和发育研究[D]. 广州:中山大学,2012.
- [24] 宋俊元,胡阳,傅强,等. 二化螟雄虫内生殖系统结构的解剖[J]. 浙江农业科学,2012(5):686–688.
- [25] 张家侠,孙钦玉,赵强,等. 茶尺蠖雄成虫生殖系统形态学与组织学观察[J]. 茶叶科学,2015,35(6):527–533.
- (责任编辑:田 喆)