



苏州农业职业技术学院
Suzhou Polytechnic Institute of Agriculture

毕业论文

课题名称	土壤中赤霉病拮抗菌的分离方法研究
课题类型	<input type="checkbox"/> 毕业设计 <input checked="" type="checkbox"/> 毕业论文
二级院系	环境工程学院
专业班级	环境工程技术 14-2
学 号	140405222
姓 名	张淑
指导老师	刘金根

2017 年 5 月 20 日

摘要

摘要：小麦赤霉病 (*Fusarium head blight*) 是由病原真菌引起的麦类常见病害，会导致小麦和大麦产量和质量严重受损，并且在麦类作物上残留致病毒素，因此主动控制赤霉病是保证经济产量和保护环境的有效方式。本论文主要探讨小麦赤霉病拮抗菌的筛选、分离方法，旨在控制实际生产中小麦赤霉病暴发。试验中一共分离出 191 株拮抗细菌，其中 HB10 是筛选得到的一株纺锤链霉菌 (*Streptomyces netropsis*)，目前尚无该菌属对镰刀菌拮抗效果的报道。HB10 在 LB 和 PDA 培养基上抑菌圈直径超过 28mm，较其他菌株拮抗效果更优。

关键词：小麦赤霉病 禾谷镰刀菌 拮抗菌 筛选

ABSTRACT

ABSTRACT: Wheat gibberellic (*Fusarium head blight*) is a common disease caused by pathogenic fungi of wheat and barley, which can lead to serious loss of yield and quality of wheat and barley and wheat crops as well as residual pathogenic toxin on crops. Therefore, taking the initiative to resist the disease is an effective way to ensure economic yield and protect the environment. In this paper it is discussed how to select and separate gibberellic antagonism with the purpose of controlling the breakout of wheat gibberellic. In the experiments, a total of 191 strains of antagonism bacteria were selected, among which HB10 is a spindle *Streptomyces* (*Streptomyces netropsis*). So far, no antagonistic effect of this species against *Fusarium* has been reported. HB10 formed inhibition zone over 28 mm in diameter in LB and PDA medium. Its effect is better than those of other strains of antagonism.

KEY WORDS: *Fusarium head blight*; *Fusarium graminearum*; Antagonistic bacteria; Select

目录

第一章 绪论	1
1.1 小麦赤霉病的介绍以及目前的防治手段	1
1.1.1 小麦赤霉病的危害	1
1.1.2 小麦赤霉病的病原真菌	1
1.1.3 小麦赤霉病传播途径	2
1.2 赤霉病拮抗菌的研究进展	2
1.2.1 抗性育种	2
1.2.2 农药防治	2
1.2.3 生物防治	3
1.2.4 用于防治小麦赤霉病的拮抗菌种类	3
1.3 本课题的研究意义	3
第二章 赤霉病菌拮抗菌的分离方法	5
2.1 材料与方法	5
2.1.1 材料	5
2.1.1.1 抗赤霉病菌拮抗菌的样品来源	5
2.1.1.2 病原真菌	5
2.1.1.3 主要培养基	6
2.1.1.4 主要仪器	6
2.1.2 实验方法	7
2.1.2.1 土壤样品中禾谷镰刀菌拮抗菌的分离纯化	7
2.1.2.2 拮抗菌的鉴定	7
2.1.2.3 拮抗菌抑菌效果的对比实验	9
2.1.2.4 优势拮抗菌在十一种农药平板上的适应性	9
2.1.2.5 抗赤霉病菌的病原真菌的拮抗谱	10
2.2 结果与分析	10
2.2.1 拮抗菌株的筛选结果	10
2.2.2 拮抗菌的鉴定	12
2.2.3 拮抗菌的抑制结果	14
2.2.4 优势拮抗菌在十一种农药平板上的适应性	15
2.2.5 拮抗菌的抗菌谱	16
2.3 讨论	20
第三章 小结	21
谢辞	22
参考文献	23

第一章 绪论

1.1 小麦赤霉病的介绍以及目前的防治手段

1.1.1 小麦赤霉病的危害

小麦赤霉病 (*Fusarium head blight*, FHB) 是由一种或多种病原真菌引起的麦类常见病害, 赤霉病病害严重的地区, 小麦粒重明显下降, 产量大幅度下降, 甚至造成绝收。我国的小麦赤霉病主要在淮河流域、长江流域的麦区流行^[1]。由于病原真菌适宜在潮湿、温暖的环境中生长, 因此小麦赤霉病在湿度较大的地区容易爆发^[2]。近年来全国气候相对复杂多变, 不仅仅局限于东部沿海地区, 在东北、中原甚至大西北麦区, 小麦赤霉病也时有发生, 并且有逐渐向北蔓延的势头, 给农业经济造成了巨大的损失。近年来, 我国小麦赤霉病的发病比例已经达到25%, 成为继美国之后全球受害面积最大的国家之一^[3]。

小麦赤霉病除了造成严重的农业经济损失之外, 还会对食品安全留下巨大隐患。病原真菌在侵染小麦时, 会产生多种有害的代谢产物, 典型的如脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (Deoxynivalenol, DON)、玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEN)、雪腐镰刀菌烯醇 (Nivalenol, NIV) 等真菌毒素, 其中DON毒素危害尤为严重。据研究报道, DON毒素能在小麦病粒上长期残留, 人体摄入后会出现呕吐、腹泻、恶心等症状, 若摄入过量, 则会引起大出血、免疫力下降。牲畜食用含毒饲料后主要表现为食欲不振、呕吐、体型瘦削等症状, 严重时会导致死亡^[2-3]。

1.1.2 小麦赤霉病的病原真菌

小麦赤霉病是一种由病原真菌引发的病害, 其病原真菌是一种或多种镰刀菌, 主要包括禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*)、黄色镰刀菌 (*Fusarium culmorum*) 和燕麦镰刀菌 (*Fusarium avenaceum*) 等。虽然有研究表明每一种镰刀菌均具有致病性, 但它们对农业的危害往往因年份、气候、地点的差异而不同^[4]。在我国东部地区, 禾谷镰刀菌是小麦赤霉病诱发的主要病原真菌。因此, 针对禾谷镰刀菌开展小麦赤霉病的防治工作, 具有十分重要的意义。

1.1.3 小麦赤霉病传播途径

小麦赤霉病的侵染过程主要发生在扬花期，此阶段通常天气回暖，雨水充沛，空气中湿度较大，非常适合病原真菌的生长。它们往往借助风或者雨水在田间传播，再从植株根部传播到穗部。若遭遇连续降雨的温湿环境，麦穗上很快就会蒙上一层白色的霉层，仔细观察就会发现麦穗上长满了菌丝。而当一年的麦子收割完毕后，病原真菌依旧大量残留在杂草、秸秆以及土壤中，进而在来年天气回暖、雨水充沛的时候继续进行传播^[5-6]。

1.2 赤霉病拮抗菌的研究进展

近年来，小麦赤霉病的防治研究逐渐得到广泛的重视，主要防治措施有：培育抗性小麦新种、化学农药喷施和生物防治等措施。但是，这些防治措施有利也有弊。例如，培育抗性小麦新种成本高，时期长，研究难度大；化学药物喷施虽然见效快、效果好，但是在长期大量使用，环境承载力将很快达到极限，目前，水体污染、土壤污染、空气污染已经严重破坏了生态平衡，引发了一系列负面影响，给人畜健康留下了巨大的隐患。然而，生物防治可以有效解决这一系列问题，避免化学药物防治带来的弊端。目前推广应用的生防手段从短期效果来看并不如化学药剂，但是从长远角度来看，生防菌的研究对于维持生态平衡、节约能源、降低成本等各个方面来讲均具有十分重大意义^[7-8]。

1.2.1 抗性育种

人工筛选、培育对赤霉病有显著抗性的小麦品种是当今解决赤霉病危害的有效方法^[9]。目前有许多品种对小麦赤霉病有一定的抵抗作用，例如：扬麦4号、扬麦5号、苏麦2号、苏麦3号、新皖麦27号、万年2号、西农88、西农881、宝丰（7228）、绵麦26号、湘麦1号、万雅2号、158号，辽春4号、兴麦17、宁8026、早麦5号等。因此，在选择抗病品种的时候，应该结合本地气候情况、扬花期时间、灌浆情况等，尽量选择花药残留时间短、灌浆速度快、扬花抽穗时间相对一致的品种，配合多菌灵等农药的使用，从而达到最好的防治效果^[10]。

1.2.2 农药防治

目前，针对小麦赤霉病的农药仍然以化学合成农药为主，多菌灵是常用的高效农

药之一，其抗菌谱广，能够针对各种病原真菌引发的多种病害，并且已经能够大规模工业合成，价格便宜^[11]。然而，近年来由于长期使用多菌灵，导致病原真菌对多菌灵的抗性逐步提升，多菌灵的防治效率也在下降，有些地区不得不通过提高喷施浓度抑制发病率。此外，在农业生产过程中，农药残留问题一直是不能忽视的重点，喷施过量的农药对环境、土壤、水体的污染是持久的。因此，寻找一种环境友好型的赤霉病防止手段，具有十分重大意义。

1.2.3 生物防治

相对于其他防治方法，拮抗菌在植物病害的防治中具有一定的优势。首先，由于拮抗菌的生防机制是比较复杂多样的，通常是两种以上的机制相互协同而起到防治效果，所以病原真菌不易产生抗药性。在实践中通常采用活菌体与其具有拮抗性的代谢产物共同使用，这不仅有利于多种机制共同作用，而且也可以充分发挥生防菌的生防潜力。其次，相对于其它微生物而言生防菌的防效更加持久。被开发利用的生防菌大部分都是从农田系统中分离获得的，与病原真菌具有相似的生态适应性，因而会相对容易定殖。还有，细菌繁殖迅速，使得使用活体细菌进行病害防治成为可能。特别是生防菌的代谢周期短、产拮抗物质旺盛，以及繁殖速度快，不但缩短了生产周期、节约了时间，同时也降低了生产成本。此外，利用生防菌进行病害预防和治疗维护了微生物的生态平衡。拮抗菌产生的拮抗活性物质特异性较强，往往只对相应的病原真菌起作用，不会对生态系统中的其它微生物产生严重影响，有效地维护了环境中微生物的多样性。

1.2.4 用于防治小麦赤霉病的拮抗菌种类

现有研究结果显示，通过筛选分离获得的生防菌种类繁多，包括了细菌、真菌、放线菌、病毒等多种微生物。其中，用于农业生防的常用微生物有细菌、霉菌、放线菌和酵母菌等。其中，研究最多、效果最好的是细菌^[12-13]。

1.3 本课题的研究意义

近年来，防治赤霉病的主要防治措施有：培育抗性小麦新种、化学农药喷施和生物防治等。培育抗性小麦新种成本高，时期长，研究难度也大。多菌灵等化学农药的喷施虽然短期内对小麦赤霉病有显著的抑制效果，但是其对环境的承载力带来的诸多

负面影响，也易使病原真菌产生抗性，因此生物防治有望成为新的小麦赤霉病的预防手段。当然，目前将生物防治的研发成果大量应用于实际生产仍然面临许多难题。其一，目前的生防效果远不及多菌灵等化学农药，对小麦赤霉病的抑制效果有限，且不同地区、不同气候条件、不同品种等因素的限制，目前还没有一种生防手段获得大规模推广使用。其二，生防成本不低。目前，化学农药已经可以通过化学合成的方法大规模生产，因而成本低廉。而对于生防来说，不论是发酵生产甚至是产物分离，成本均较高。因此人们想要寻找到一种经济效益、无环境污染的方式。本课题就是通过大量的土壤样品中筛选拮抗赤霉病的拮抗菌，期望发现拮抗效果良好的工程菌株，并且可以应用到大田农业生产之中。

第二章 赤霉病菌拮抗菌的分离方法

目前,赤霉病的防治主要是通过培育抗病新品种、利用化学农药抑杀病原真菌等。培育抗病新品种时间较长,成本高;频繁使用化学农药抑杀病原真菌容易造成病原真菌的抗药性及污染环境。因此,能够发现成本低且又不污染环境的生物防治技术有着很好的应用前景。

本实验室从江苏省各县市采集的土壤样品中分离出对禾谷镰刀菌具有拮抗作用的菌株,通过对比菌株产生抑菌圈的大小筛选出效果较好的拮抗菌,然后再对其中表现较好的菌株做进一步的鉴定与性能分析。

2.1 材料与方法

2.1.1 材料

2.1.1.1 抗赤霉病菌拮抗菌的样品的来源

将江苏省各县市采集到的 100 余份土壤样品装入无菌袋中保存,再放入冰箱备用。

2.1.1.2 病原真菌

亚洲镰刀菌 (*Fusarium asiaticum*)

禾谷镰刀菌 GZ3639 (*Fusarium graminearum*)

轮枝镰刀菌 (*Fusarium verticillioides*)

胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)

雪腐镰刀菌 (*Microdochium nivale*/*Fusarium nivale*)

厚垣镰刀菌 (*Fusarium chlamydosporum*)

小麦纹枯菌 (*Rhizoctonia cereali*)

番茄晚疫菌 (*Phytophthora infestans*)

黑附球菌 (*Epicoccum nigrum*)

棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae*)

灰霉菌 (*Botrytis cinerea*)

以上所用病原真菌均由江苏省农科院食检所实验室保存。

2.1.1.3 主要培养基

LB 培养基：蛋白胨 10 g，酵母粉 5 g，NaCl 10 g，调节 pH 至 7.0-7.2，琼脂 15-20 g，将溶液用蒸馏水定容至 1 L。121 °C，20 min 灭菌。

PDA 培养基：土豆 200 g，葡萄糖 10 g，自然 pH 条件，琼脂 15-20 g，用蒸馏水定容至 1 L。将土豆洗净去皮，切成 1 cm 见方小块，沸水煮 30 min，通过四层纱布将其过滤，再向滤液里加入葡萄糖及琼脂，溶解均匀后补充蒸馏水至 1 L，pH 自然条件。115 °C，25 min 灭菌。

AW 培养基：小麦麦粒 15 g，琼脂 15-20 g，将小麦研磨，沸水煮 5-10 min 至产生大量浮沫，pH 自然条件，四层纱布过滤 3 次后再定容至 1 L。121 °C，20 min 灭菌。

绿豆培养基：绿豆 30 g，绿豆洗净后放入沸水中煮至开花，用纱布过滤，自然 pH 条件，将滤液用补充蒸馏水至 1 L。121 °C，20 min 灭菌。

2.1.1.4 主要仪器

本研究主要仪器设备见表 2-1。

表 2-1 主要仪器与设备

仪器设备名称	型号	生产厂家
超净工作台	AIRTECH	苏净安泰
生化培养箱	SPX-250BIII	天津泰斯特仪器有限公司
恒温振荡培养箱	HZL-F160	太仓市强乐实验设备厂
高压灭菌锅	SINTH-3560	VERTICALSTERILIZERTSAOH
电子天平	BS124S	北系赛多利斯仪器系统有限公司
离心机	5415-D	Eppendorf in German
光照培养箱	GXZ	宁波江南仪器厂
电磁炉	LBC-S19A	东莞市东邦电子有限公司
涡旋仪	QL-901	其林贝尔仪器制造公司
冰箱	BCD-254	博西华家用电器有限公司
超低温冰箱	ULT1386-3-V38	Asheville NC USA

2.1.2 实验方法

2.1.2.1 土壤样品中禾谷镰刀菌拮抗菌的分离纯化

(1) 禾谷镰刀菌孢子液的制备

活化禾谷镰刀菌后转到多个 PDA 平板上, 25 °C 培养箱中培养 3-5 天, 待平板中禾谷镰刀菌菌丝长满平板, 挑菌碟加入绿豆培养基中培养, 每 100 mL 培养基接种 4-5 个菌碟, 25 °C 光照摇床中 180 rpm 培养 4-5 天, 双层灭菌纱布过滤, 4 °C 冰箱保存。

(2) 土壤样品中拮抗菌的分离

分别称取土壤样品 30 g, 放入已灭菌的锥形瓶中, 加入适量的无菌水放入摇床 0.5h, 取上清; 采用梯度稀释法(取 500 μ L 的上清液加入含 4.5 mL 无菌水的试管中, 混匀, 获得 10^{-1} 浓度的稀释液, 依次稀释得到不同稀释倍数的菌悬液), 取 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 菌悬液 100 μ L, 分别在 LB、PDA、AW 培养基上涂布, 每个培养基做三个平行, 放入 30 °C 培养箱中培养 2 天。

(3) 土壤样品中拮抗菌的初筛

待平板上长出若干形态不同的单菌落后, 再向菌落表面喷禾谷镰刀菌孢子液, 28 °C 条件下培养培养 48 h。观察结果, 挑选可产生抑菌圈的单菌落, 进行复筛。

(4) 拮抗菌的验证复筛

由于初筛中平板上有许多菌落紧挨在一起, 通过拮抗圈也无法辨认哪个菌落有拮抗性, 于是将挑选出的单菌落按照每四个菌一组分别点在 LB、PDA、AW 平板上, 放入培养箱 30 °C 培养 48 h。再将禾谷镰刀菌的孢子液均匀的喷施在平板上, 30 °C 培养箱中培养 48 h, 观察有无拮抗圈。

(5) 拮抗菌的纯化与保存

将复筛确定有拮抗性的菌株多次划线纯化, 纯化至菌落形态、大小、颜色一致并在显微镜下镜检无杂菌后, 再将其保存于 40 % 的甘油中, 放在 -80 °C 冰箱中保存。

2.1.2.2 拮抗菌的鉴定

本实验采用 16S rDNA 基因序列的测序, 对筛选到的拮抗菌进行鉴定。将拮抗菌放在 LB 平板上活化, 30 °C 过夜培养, 用灭菌牙签取适量单菌落浸入 100 μ L 无菌水中, 沸水煮 10 min 左右, 吸取 1 μ L 菌悬液作为 PCR 反应的模板。按照表 2-2 的反

应体系分别用引物扩增 16S rDNA 基因。16S rDNA 扩增反应条件：94 °C 5 min；94 °C 30 s，55°C 30 s，72°C 90 s，30 个循环；72°C，10 min。

(1) 扩增 16S rDNA 的引物序列：

27F: 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'

1492R: 5' GGTTACCTTGTTACGACTT3'

(2) PCR 反应体系见表 2-2:

表 2-2 PCR 扩增序列反应体系

体系 (25 μ l)	添加量 (μ L)
ddH ₂ O	16
10 \times Buffer (Mg ²⁺ free)	2.5
Mg ²⁺ (25 mM)	1.5
dNTP mixer (2.5 mM)	2
正向引物 1 (10 μ M)	1
反向引物 2 (10 μ M)	1
模板 DNA (约 25 ng \cdot μ L ⁻¹)	1
rTaq 酶 (5U/ μ L)	0.125

(3) 琼脂糖凝胶电泳检测

① 配制电泳缓冲液 (1 \times TBE)：称取 54 g Tris、25.9 g 硼酸、20 mL EDTA (0.5 mol/L)；调节 pH 至 8.0；用纯水定容至 1 L。

② 琼脂糖凝胶的制备：称取 1 g 琼脂糖粉末，加入 100 mL 电泳缓冲液，混匀后放入微波炉加热熔化成澄清透明液体。将溶液倒入胶槽，冷却后备用。

③ 点样：取 PCR 产物 3.5 μ L，与 2 μ L 的上样缓冲液混匀，点入胶孔内，以 DL2000 DNA 为 Maker 为对照进行电泳。

④ 电泳完成后将胶放入含 EB 的溶液中染色，10 min 后在凝胶成像系统下观察，16S rDNA 的条带位置与 Maker 的 1400 bp 左右，确认条带位置正确，亮度较好（见图 2-1）即可送至测序公司测序。

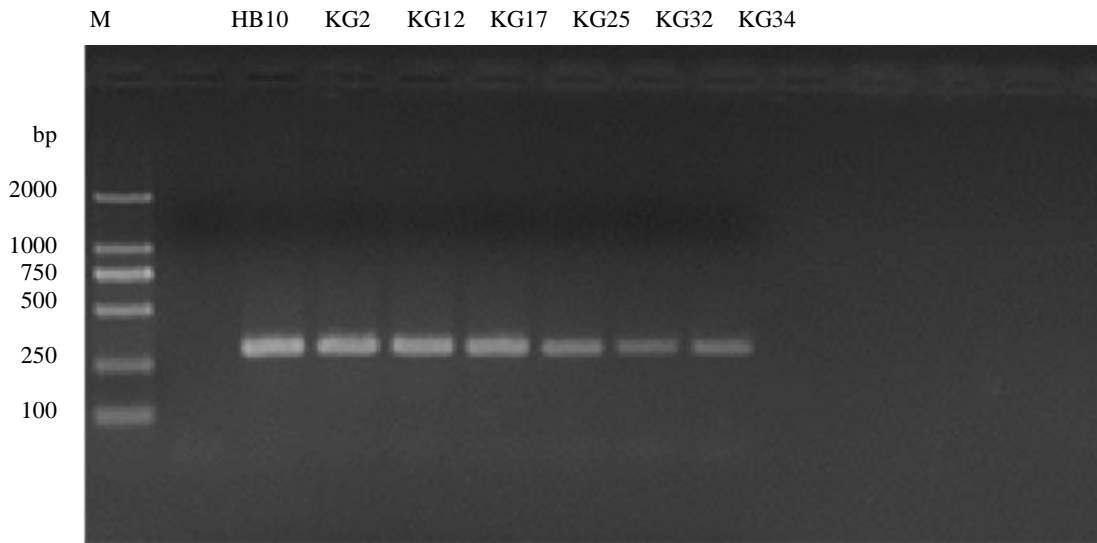


图 2-1 拮抗菌电泳

(4) 测序结果比对及拮抗菌种属的初步分析

将测序所得基因序列登录 EZBiocloud 进行 BLAST 分析和最近种属预测，即可对该菌株的种属进行初步预测。

2.1.2.3 拮抗菌抑菌效果的对比实验

使用液体 LB 过夜培养已筛选保存得到的拮抗菌菌株，再用液体 LB 调节 OD₆₀₀ 至 1.0，各取 3 μL 菌悬液，接种在厚度一致的 LB、PDA、AW 平板上，每块平板上 4 个单菌落，每个菌株在每种平板作 3 个重复，30 °C 培养 48 h 后，向平板上喷已经备好的禾谷镰刀菌孢子液，重复平板对峙实验。待拮抗菌产生拮抗作用后，用十字交叉法测拮抗菌菌落的生长半径 R 以及拮抗圈半径 r，计算 r/R 的比值来比较拮抗效果。

2.1.2.4 优势拮抗菌在十一种农药平板上的适应性

为了使拮抗菌更好地适应大田实验环境，从所筛得的拮抗菌中选取 12 株优势拮抗菌 HB10、KG2、KG12、KG17、KG25、KG32、KG34、KG41、KG47、KG57、ZS4 和 HB23 进行农药平板适应性实验。采用十一种常见农药分别为 98% 咯菌腈、98% 丙硫菌唑、95% 氰烯菌酯、98% 氟啶脲 TC (百力)、98% 氟硅唑、95.6% 己唑醇、95.5% 叶菌唑、97% 氟环唑、50% 氟啶胺、96.8% 戊唑醇和 98% 多菌灵，以上所用农药均由江苏省农科院食检所实验室保存。

分别配置各个农药浓度为 10000ppm 的原液，向 LB 培养基 (500mL/瓶) 内加入

50 μ L、1mL、2.5mL 和 5mL 配置成 1ppm、20ppm、50ppm 和 100ppm 浓度的农药平板待用。使用液体 LB 过夜培养已筛选保存得到的拮抗菌菌株，再用液体 LB 调节 OD₆₀₀ 至 1.0，各取 500 μ L 菌悬液，采用梯度稀释法（取 500 μ L 的菌悬液加入含 4.5 mL 无菌水的试管中，混匀，获得 10⁻¹ 浓度的稀释液，依次稀释得到不同稀释倍数的菌悬液），取 10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 菌悬液 100 μ L，分别在不同农药、不同浓度的 LB 培养基上涂布，每个培养基做三个平行，放入 30 °C 培养箱中培养 2 天，观察并做好记录。

2.1.2.5 抗赤霉病菌的病原真菌的拮抗谱

选取实验室保存的 11 种常见植物病原真菌，用平板对峙法检测拮抗菌对病原真菌的拮抗谱。把病原真菌接种在 PDA 平板中央，25 °C 培养 3 天待用。

为了避免用牙签点接待测菌株有菌落大小不一的影响，本研究对 PDA 平板做了一些改进，即先倒一层薄层 PDA 培养基在平板上，待培养基凝固后，用已灭菌的牛津杯放在等距离中央大约 2.5 cm 左右的位置，每个平板放置 4 个牛津杯，再倒入 PDA 培养基，待培养基凝固后就形成了 4 个距中央等距离，大小一致的孔，再将待测拮抗菌株接入其中，避免因用牙签力度不一致造成菌落大小不同。

为了便于定量检测拮抗菌体的密度，使用液体 LB 过夜培养已筛选保存得到的拮抗菌菌株，再用液体 LB 调节 OD₆₀₀ 至 1.0，各取 3 μ L 菌悬液，加入到 4 个孔里。在其长满菌丝的病原真菌的平板上打孔转接至 PDA 平板中央，4 个孔中加同一个拮抗菌，以不接任何拮抗菌菌株的病原真菌平板作为对照，28 °C 条件下培养 3-4 天，再与对照组比较，观察有无抑菌圈。

2.2 结果与分析

2.2.1 拮抗菌株的筛选结果

通过平板对峙法从 100 余份土壤样品中分离到 191 株禾谷镰刀菌的拮抗菌，拮抗菌在 LB 和 PDA 培养基上的拮抗效果图见图 2-2 和图 2-3。其中，HB10 是本次实验中筛到的一株纺锤链霉菌，此外没有关于此菌拮抗赤霉病的报道，是关于拮抗赤霉病菌的新种。从拮抗圈的大小比较，其拮抗性是普通拮抗菌的 2-3 倍（见图 2-4），目前正在申请专利中。

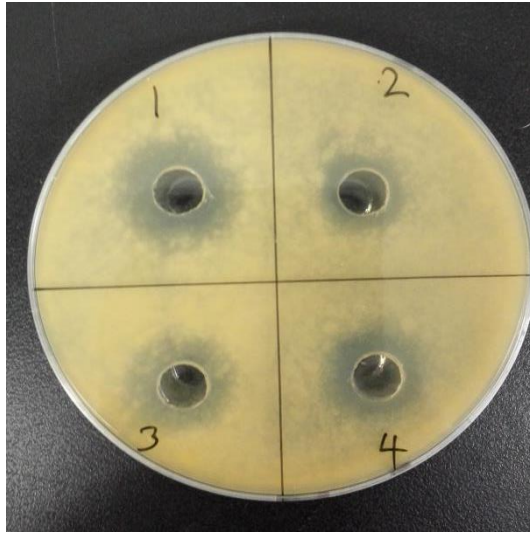


图 2-2 LB 培养基上的平板对峙实验

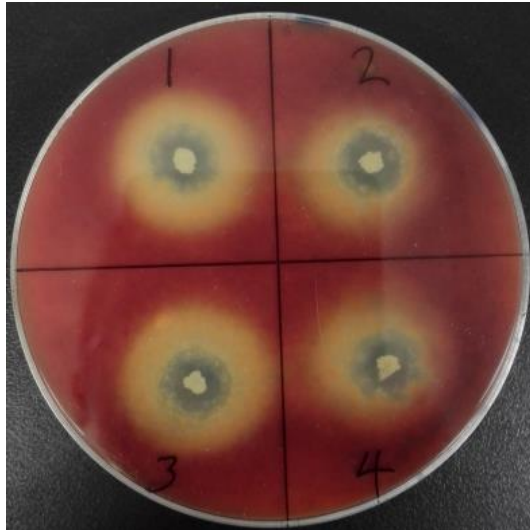


图 2-3 PDA 培养基上的平板对峙实验

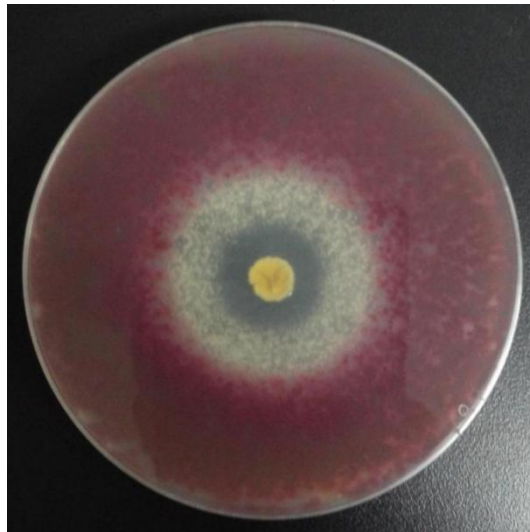


图 2-4 HB10 在 PDA 培养基上的抑菌圈

2.2.2 拮抗菌的鉴定

根据拮抗菌的拮抗效果比较，选出十几株拮抗效果较好拮抗菌分别做 16S rDNA 序列分析。将测序所得基因序列登录 EZBiocloud 进行 BLAST 分析和最近种属预测，两者结果相同即认为测序结果正确。

其中拮抗性最突出的 HB10 拮抗菌，分析得到该菌是一株纺锤链霉菌 (*Streptomyces netropsis*)。为了进一步验证结果的准确性，通过对其 TA 克隆得到基因序列，提交到 NCBI 上进行 BLAST 分析，结合在 NCBI 数据库中构建的系统发育树 (见图 2-5) 和 HB10 在电子显微镜下的形态 (见图 2-6)，最终确定了其就是纺锤链霉菌 (*Streptomyces netropsis*)，部分优势拮抗菌株鉴定结果见表 2-3。

装 订 线

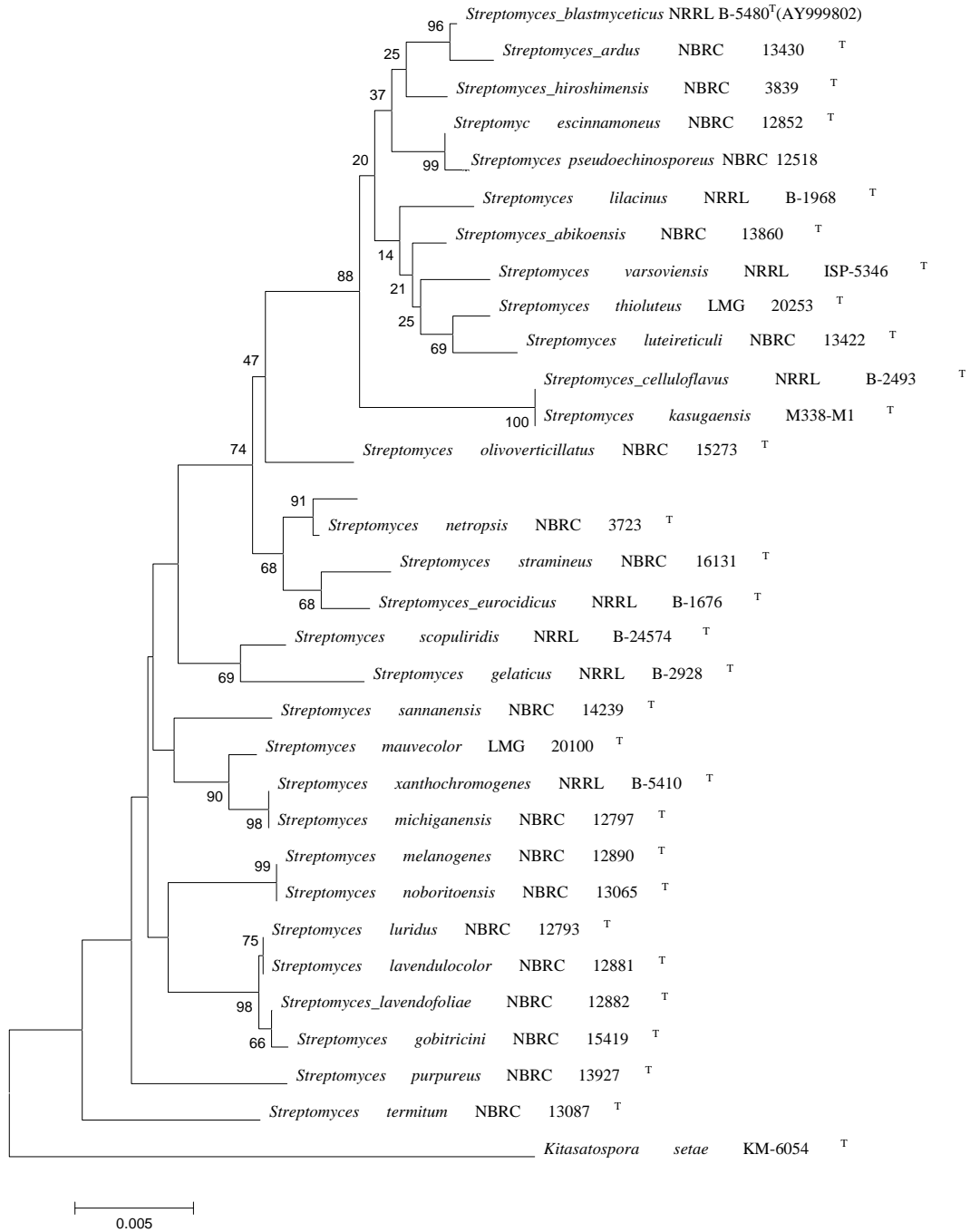


图 2-5 基于 16S rDNA 基因序列构建的菌株 HB10 系统发育树

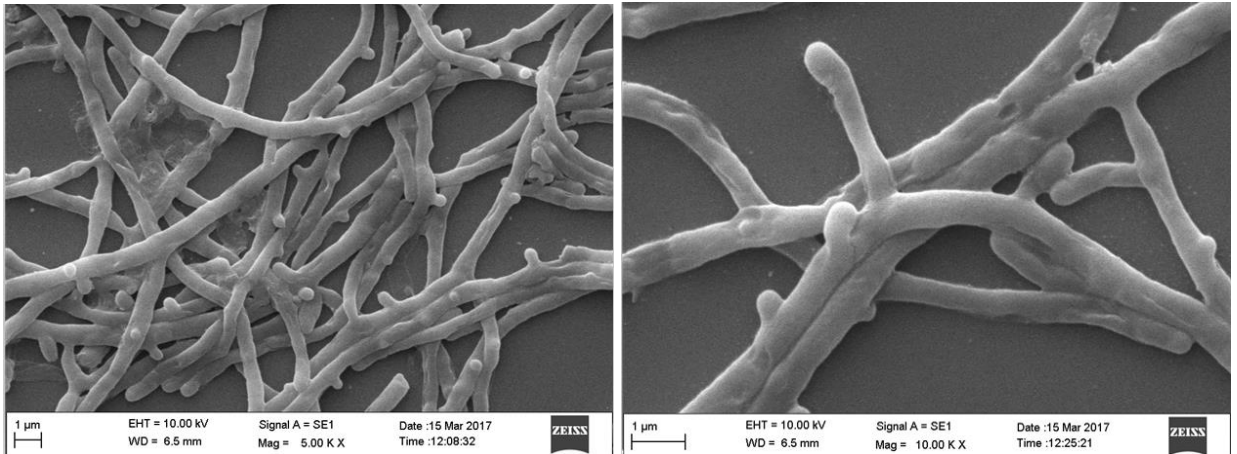


图 2-6 HB10 在电子显微镜下的图片

表 2-3 优势拮抗菌株的鉴定结果

菌株编号	鉴定结果	鉴定结果
HB10	<i>Streptomyces netropsis</i>	纺锤链霉菌
KG29	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	解淀粉芽孢杆菌
KG37	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	解淀粉芽孢杆菌
KG40	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	解淀粉芽孢杆菌
KG41	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	解淀粉芽孢杆菌
KG47	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	解淀粉芽孢杆菌
HB25	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	解淀粉芽孢杆菌
ZS4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	解淀粉芽孢杆菌
ZS15	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	解淀粉芽孢杆菌
KG32	<i>Pantoea agglomerans</i>	成团泛菌
KG34	<i>Pantoea agglomerans</i>	成团泛菌
KG52	<i>Pantoea agglomerans</i>	成团泛菌
KG57	<i>Pantoea agglomerans</i>	成团泛菌
ZS18	<i>Bacillus siamensis</i>	暹罗芽孢杆菌
XY10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	铜绿假单胞菌
XY9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	铜绿假单胞菌

2.2.3 拮抗菌的抑制结果

关于拮抗菌的拮抗效果对比结果见附表 1，其中 AW 培养基未达到实验效果，由于 AW 培养基的营养成分较少，好多菌株在其上表现不出拮抗效果，甚至很难完成正常的生长代谢。在 LB、PDA 培养基中的拮抗效果分析较明显。其中在 LB 培养基上，

泛菌属的拮抗菌通过抑菌圈直径 D / 菌落直径 d 的比值来比较拮抗效果，抑菌圈直径 D / 菌落直径 d 的比值大于 6 的有 35 株；由于芽孢属，假单胞属菌落长得较大，所以直接比较抑菌圈大小，抑菌圈的直径超过 17 mm 的有 18 株。在 LB 培养基与 PDA 培养基中拮抗效果基本一致。

2.2.4 优势拮抗菌在十一种农药平板上的适应性

以本实验室保存的优势拮抗菌 HB10、KG2、KG12、KG17、KG25、KG32、KG34、KG41、KG47 和 KG57 为标靶，梯度稀释在咯菌腈、丙硫菌唑、氰烯菌酯、氟啶脲、氟硅唑、己唑醇、叶菌唑、氟环唑、氟啶胺、多菌灵、戊唑醇这 11 中常见的农药平板上，得到优势拮抗菌在不同浓度的农药平板上的生长结果见表 2-4。

表 2-4 优势拮抗菌对 11 种不同农药的适应性

浓度	HB10	KG2	KG12	KG17	KG25	KG32	KG34	KG41	KG47	KG57
咯菌晴	1ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100ppm	+	+	+	-	+	+	+	+	+
丙硫菌唑	1ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20ppm	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	50ppm	-	-	-	-	-	+	+	+	-
氰烯菌酯	100ppm	-	+	-	-	-	+	+	+	-
	1ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氟啶脲	1ppm	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	100ppm	-	-	-	-	-	-	-	+	-
氟硅唑	1ppm	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	20ppm	-	+	-	+	+	-	+	+	+
	50ppm	-	-	-	-	-	-	+	+	-
已唑醇	100ppm	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	1ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	20ppm	-	+	+	+	-	+	+	+	+
叶菌唑	50ppm	-	-	-	-	-	+	-	+	-
	100ppm	+	+	-	-	-	-	+	+	-
	1ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氟环唑	20ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	100ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
氟啶胺	1ppm	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	100ppm	-	-	-	-	-	-	-	+	-
多菌灵	20ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	50ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1ppm	+	+	+	+	+	+	+	+	+
戊唑醇	20ppm	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	50ppm	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	100ppm	-	-	-	-	-	-	+	+	-

注：“+”表示该菌生长，“-”表示该菌不生长。

2.2.5 拮抗菌的抗菌谱

以实验室保存的 11 株常见植物病原真菌为标靶，得到了优势拮抗菌的抗菌谱，有无拮抗性见表 2-5，拮抗效果见图 2-7 和图 2-8。

表 2-5 优势拮抗菌对 11 种不同病原真菌的拮抗性

病原真菌	KG2	KG25	KG32	KG57	KG34	KG17	KG12	KG47	ZS4	HB10	HB23	KG41
雪腐镰刀菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
炭疽菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
轮枝镰刀菌	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
厚垣镰刀菌	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
小麦纹枯菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
番茄晚疫菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
黑附球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
棉花黄萎菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
灰霉菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
亚洲镰刀菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
禾谷镰刀菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

注：“+”表示该菌有拮抗性，“-”表示该菌无拮抗性。

从表 2-5 中可知，对 11 种菌都有拮抗性的只有 KG12、KG17、KG41、KG47 四个菌株，其中 KG41 对多个病原真菌的拮抗产生的拮抗圈较大。HB10 菌株对灰霉菌无拮抗性，整体拮抗效果不佳。

装 订 线

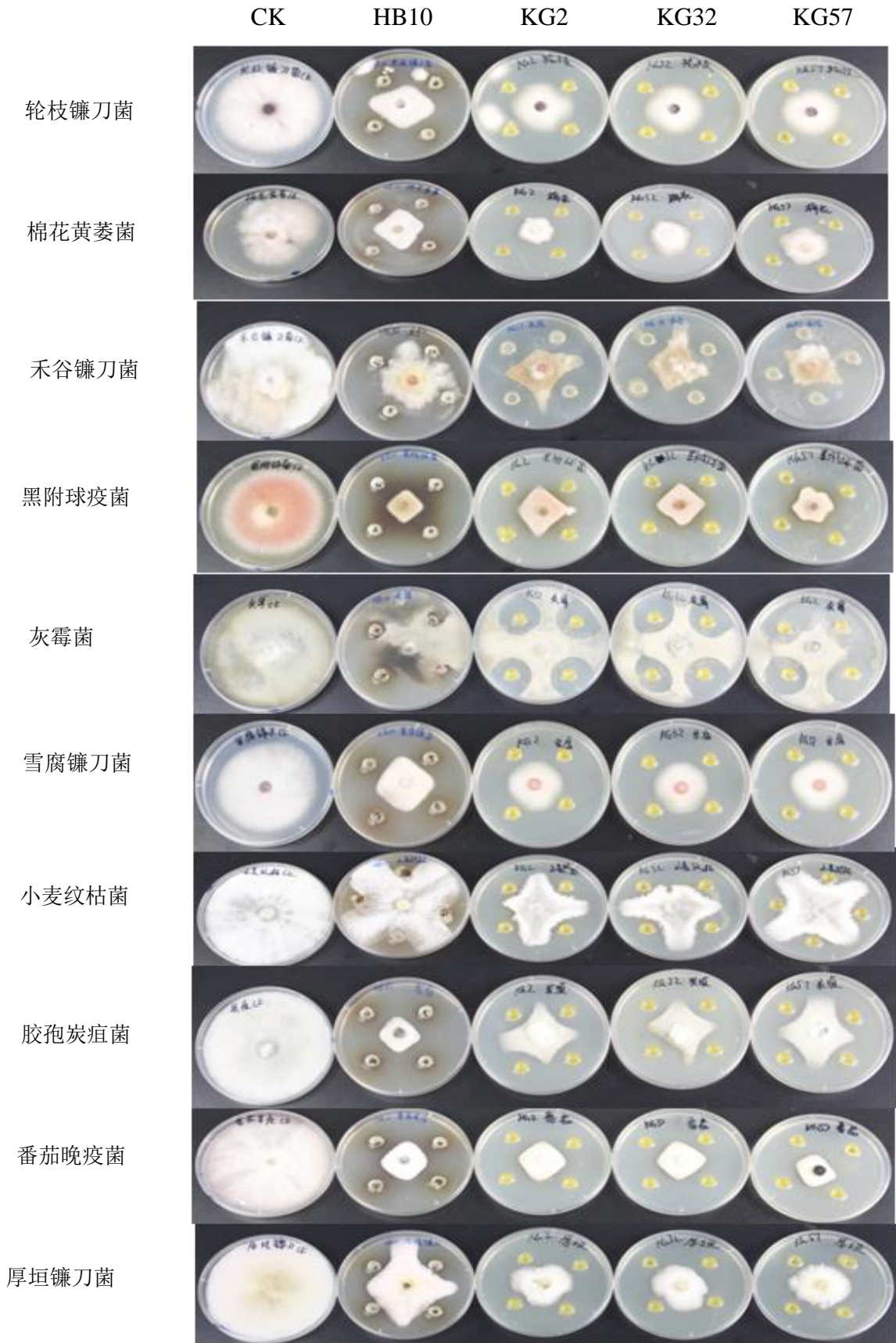


图 2-7 拮抗菌对病原真菌的拮抗作用 (1)

装订线

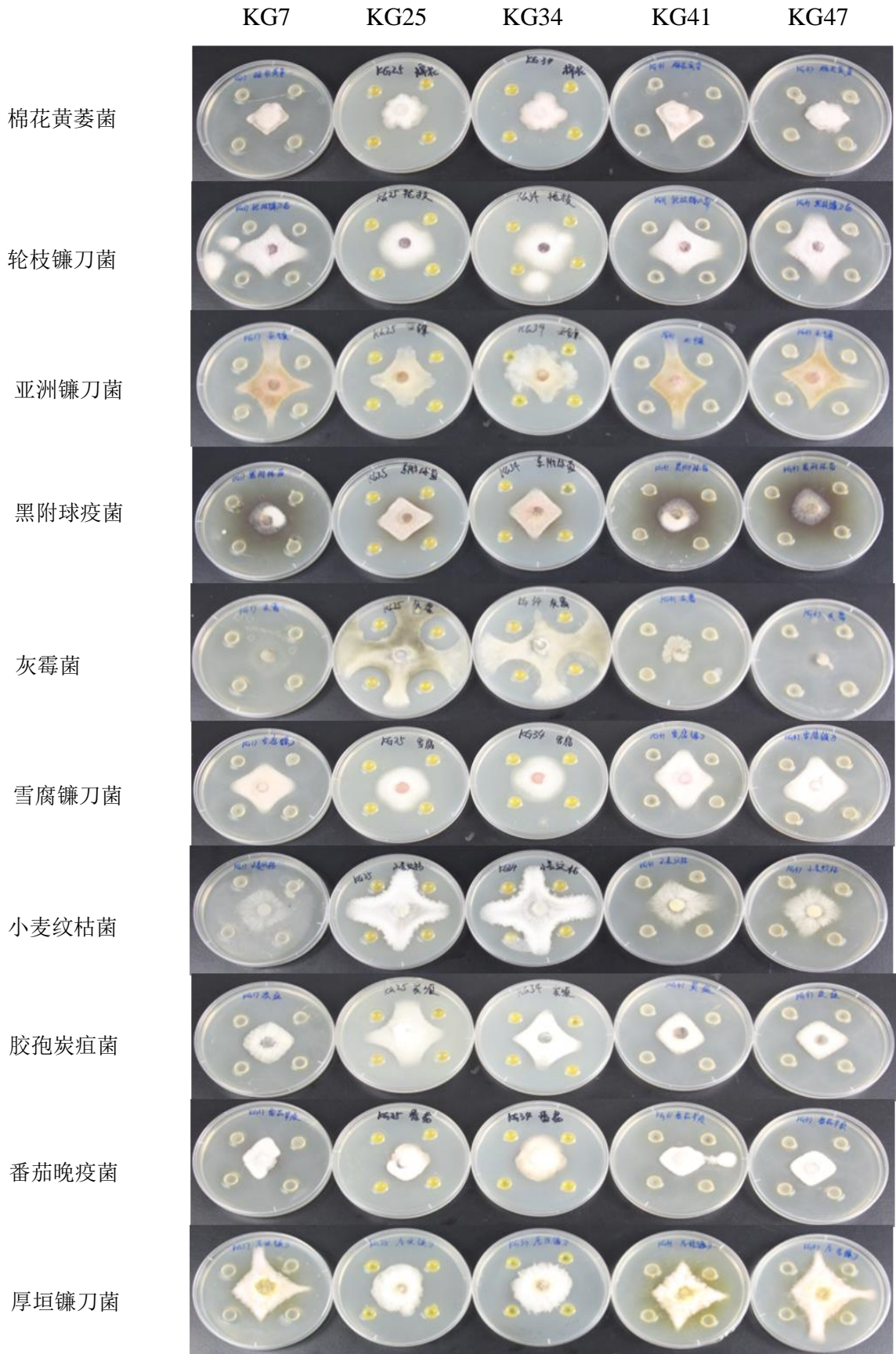


图 2-8 拮抗菌对病原真菌的拮抗作用 (2)

2.3 讨论

近年来，利用细菌的菌体或发酵代谢产物进行生物防治，已逐步成为预防多种农业病害的研究热点。作为一种更环保、无污染、无残留的防治手段，生物防治有望取代化学农药成为农业领域的新兴防病技术。本研究从麦田土壤中分离纯化禾谷镰刀菌的拮抗菌，构建拮抗菌库。为后期大田生防实验做好充足的菌株资源准备。所筛细菌必须能够很好地适应大田环境中复杂多变的环境、匮乏的营养来源等诸多因素。此外，近年来的生防菌的研究主要以芽孢杆菌、假单胞菌、鞘氨醇单胞菌等为主，尤其是芽孢杆菌，凭借其突出的环境适应性、顽强的生存能力以及优秀的抑菌、拮抗效果而倍受青睐。本研究中筛选到大量的泛菌，也能对禾谷镰刀菌起到不错的拮抗效果，而目前针对泛菌的研究则很少，因此，分离、研究泛菌的拮抗物质，或许能在第二种生防思路上有新突破。

第三章 小结

通过一系列试验研究，取得以下成果：

(1) 通过平板对峙法，从 100 余份土壤样品中筛选得到 191 株小麦赤霉病拮抗菌。通过对 191 株拮抗菌的拮抗性能进行比较，其中对赤霉病菌表现出较好拮抗效果的是纺锤链霉菌 (*Streptomyces netropsis*) HB10，但目前尚无其拮抗赤霉病的研究报道，属于一种拮抗赤霉病菌的新种，其产生拮抗圈的大小是普通拮抗菌的 2-3 倍。

(2) 将筛选出的十几株拮抗效果较好拮抗菌分别进行 16S rDNA 序列分析，并对测序所得基因序列登录 EZBiocloud 进行 BLAST 分析和最近种属预测，两者结果相同即认为测序结果正确，其中拮抗性最突出的是一株称为 HB10 拮抗菌的纺锤链霉菌

(*Streptomyces netropsis*)。通过进一步对其 TA 克隆得到基因序列，提交到 NCBI 上进行 BLAST 分析，结合在 NCBI 数据库中构建的系统发育树和 HB10 在电子显微镜下的形态，最终确定其就是纺锤链霉菌。

(3) 由于 AW 培养基的营养成分较少，故 AW 培养基未达到实验效果，许多菌株在其上表现不出拮抗效果，甚至很难完成正常的生长代谢。在 LB、PDA 培养基中的拮抗效果分析较明显。其中在 LB 培养基上，泛菌属的拮抗菌通过抑菌圈直径 D / 菌落直径 d 的比值来比较拮抗效果，抑菌圈直径 D / 菌落直径 d 的比值大于 6 的有 35 株；由于芽孢属，假单胞属菌落长得较大，所以直接比较抑菌圈大小，抑菌圈的直径超过 17 mm 的有 18 株。在 LB 培养基与 PDA 培养基中拮抗效果基本一致。

(4) 以本实验室保存的优势拮抗菌 HB10、KG2、KG12、KG17、KG25、KG32、KG34、KG41、KG47 和 KG57 为标靶，梯度稀释在咯菌腈、丙硫菌唑、氰烯菌酯、氟啶脲、氟硅唑、己唑醇、叶菌唑、氟环唑、氟啶胺、多菌灵、戊唑醇等 11 中常见的农药平板上，得到优势拮抗菌的常见农药的耐受限度。

(5) 对 11 种实验室保存的 11 株常见植物病原真菌都有拮抗性的只有 KG12、KG17、KG41、KG47 四个菌株，其中 KG41 对多个病原真菌的拮抗产生的拮抗圈较大。HB10 菌株对灰霉菌无拮抗性，整体拮抗效果不佳。

谢辞

在本论文即将完成之际，谨此向教导我的黄小洋、刘金根等老师致以衷心的感谢和崇高的敬意！本论文从选题到定稿，是在刘金根老师的悉心指导下完成的。刘老师不仅为我创造了优越的实验和学习环境，更能在我遇到难题的情况下，能以积极的方式开导我，帮助我解决问题，在此再一次感谢刘老师。

感谢江苏省农业科学院食品质量与安全检测研究所实验室负责人一史建荣老师在科研方案和思路上给予的指导和帮助！史老师百忙之中仍然关心学生、关心实验室各组科研进展，在此，向史老师致以最衷心的感谢！感谢本实验室的徐剑宏、吴季荣、邢宇俊、殷宪超、祭芳、仇剑波、刘馨、王刚、王园园、董飞、俞明正等老师在实验中提供的指导和帮助！

感谢本实验室的寇程坤、徐丽梅、周义东、陆丹丹等师兄师姐在我实验中给予的协助和支持。感谢同届的刘月、孙悦、严叶同学在实验和生活中与我携手共进。

最后，我要特别感谢我的家人多年来给予我的无限关爱和理解，你们不懈的支持给了我前进的动力，为我安心学习和生活创造了良好条件，籍此机会，献上最诚挚的敬意和谢忱。

谨以此论文献给我的亲人、老师和朋友们！

张淑

2016.7-2017.5 于江苏省农科院实习

参考文献

- [1] 张旭, 邢锦城, 马鸿翔, 等. 江淮流域小麦赤霉病菌的遗传多样性[J]. 江西农业大学学报, 2010, 32 (6) : 1146-1151.
- [2] McMullen M, Jones R, Gallenberg D. Scab of wheat and barley: Are-emerging disease of devastating impact.[J]. Plant Disease, 1997, 81 (12) : 1340-1348.
- [3] O'Donnell K, Ward T J, Geiser D M, *et al.* Genealogical concordance between the mating type locus and seven other nuclear genes supports formal recognition of nine phylogenetically distinct species within the *Fusarium graminearum*, clade [J]. Fungal Genetics & Biology, 2004, 41 (6) : 600-623.
- [4] Zhang H, Van der Lee T, Waalwijk C, *et al.* Population analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat in China show a shift to more aggressive isolates[J]. PloS one, 2012, 7 (2) : 31722.
- [5] 俞刚, 陈利锋, 姚红燕, 等. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇在小麦赤霉病病程中的作用[J]. 植物病理学报, 2003, 33 (1) : 40-43.
- [6] Pirgozliev S R, Edwards S G, Hare M C, *et al.* Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals[J]. European Journal of Plant Pathology, 2003, 109 (7) : 731-742.
- [7] 陆维忠, 程顺和, 沈晓蓉, 等. 细胞工程在小麦抗赤霉病育种中的利用[J]. 江苏农业学报, 1998, (1) : 9-14.
- [8] 台莲梅, 金红. 农作物病害生物防治研究进展[J]. 黑龙江八一农垦大学学报, 2002, 14 (3) : 21-24.
- [9] 马鸿翔, 陆维忠. 小麦赤霉病抗性改良研究进展[J]. 江苏农业学报, 2010, 26 (1) : 197-203.
- [10] Xu X M, Parry D W, Nicholson P, *et al.* Within-field variability of *Fusarium* head blight pathogens and their associated mycotoxins[J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 120 (1) : 21-34.
- [11] Desjardins A E, Hohn T M, McCORMICK S P. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance[J]. Microbiological reviews, 1993, 57 (3) : 595-604.



- [12] 王雅平, 刘伊强, 潘乃穉, 等. 枯草芽孢杆菌 TG26 防病增产效应的研究[J]. 中国生物防治, 1993, 9 (2) : 63-68.
- [13] 余桂容, 张敏. 小麦赤霉病的生物防治研究: I. 拮抗芽孢杆菌的分离, 筛选, 筛选, 鉴定和防病效果[J]. 四川农业大学学报, 1998, 16 (3) : 314-318.

附表 1 拮抗菌株的鉴定结果与拮抗性能

菌株	LB 抑菌圈直径 D (mm)	LB 菌落直径 d (mm)	D/d	PDA 抑菌圈直径 D (mm)	PDA 菌落直径 d (mm)	D/d	AW 抑菌圈直径 D (mm)	AW 菌落直径 d	D/d
HB10	33.50	4.30	7.79	28.70	2.90	9.90	17.80	4.30	4.14
HB11	11.80	4.20	2.81	16.40	5.10	3.22	6.20	1.90	3.26
HB13	15.60	3.90	4.00	17.10	11.80	1.45	6.70	2.40	2.79
HB18	15.70	4.40	3.57	13.80	4.20	3.29	5.90	1.80	3.28
HB19	14.60	3.90	3.74	14.20	3.30	4.30	4.90	2.10	2.33
HB20	15.10	4.80	3.15	16.30	3.20	5.09	4.90	0.80	6.13
HB21	16.30	4.30	3.79	13.20	2.10	6.29	5.10	1.20	4.25
HB22	14.20	4.20	3.38	13.50	2.90	4.66	7.90	2.30	3.43
HB23	18.20	4.30	4.23	16.90	7.90	2.14	7.10	1.20	5.92
HB24	17.90	4.50	3.98	14.50	6.10	2.38	8.00	1.60	5.00
HB25	17.10	5.30	3.23	15.10	4.30	3.51	7.20	1.30	5.54
HB27	15.20	5.10	2.98	16.20	4.20	3.86	6.30	1.10	5.73
HB28	12.90	4.80	2.69	10.40	4.70	2.21	4.20	2.60	1.62
HB29	15.20	5.10	2.98	12.20	3.20	3.81	7.10	1.50	4.73
HB30	13.80	4.10	3.37	14.70	4.30	3.42	5.60	1.50	3.73
HB31	11.20	4.10	2.73	12.70	2.90	4.38	6.10	1.80	3.39
HB35	14.10	3.90	3.62	14.80	3.30	4.48	6.30	1.90	3.32
HB42	12.50	4.10	3.05	14.20	3.80	3.74	6.20	1.80	3.44
HB49	17.20	4.30	4.00	14.20	7.50	1.89	6.80	2.20	3.09
HB51	6.20	1.90	3.26	9.10	3.10	2.94	9.20	1.40	6.57
HB52	14.10	3.60	3.92	15.10	4.50	3.36	6.20	2.10	2.95
HB53	11.70	2.90	4.03	14.90	4.10	3.63	5.80	1.60	3.63
HB54	14.50	3.60	4.03	12.30	7.20	1.71	6.20	1.60	3.88
HB55	14.30	3.80	3.76	16.20	5.20	3.12	6.40	1.70	3.76
HB57	14.20	4.10	3.46	14.70	4.20	3.50	7.20	1.90	3.79
HB58	14.30	3.90	3.67	13.80	2.60	5.31	5.30	1.20	4.42
HB63	15.20	3.40	4.47	14.30	3.20	4.47	6.20	1.40	4.43
HB64	15.30	4.70	3.26	14.60	2.60	5.62	6.50	1.60	4.06
HB65	11.20	4.90	2.29	12.30	3.10	3.97	4.80	1.80	2.67
HB67	13.60	4.30	3.16	13.50	3.20	4.22	4.20	1.70	2.47
HB68	14.50	3.20	4.53	14.30	2.70	5.30	3.80	1.20	3.17
HB69	14.70	5.10	2.88	14.10	4.10	3.44	3.90	1.30	3.00
HB80	14.20	3.90	3.64	15.10	3.10	4.87	5.10	1.20	4.25
KG1	22.70	2.80	8.11	11.40	3.90	2.92	5.20	1.40	3.71
KG2	22.10	2.60	8.50	9.20	2.90	3.17	5.60	1.60	3.50
KG3	17.80	6.20	2.87	9.50	2.10	4.52	8.90	2.10	4.24
KG4	19.10	3.40	5.62	\	\	无效果	\	\	无效果
KG6	18.50	2.60	7.12	10.40	3.10	3.35	\	\	无效果
KG7	19.60	3.10	6.32	9.20	1.90	4.84	\	\	无效果

装 订 线



续附表 1

菌株	LB 抑菌圈直径 D (mm)	LB 菌落直径 d (mm)	D/d	PDA 抑菌圈直径 D (mm)	PDA 菌落直径 d (mm)	D/d	AW 抑菌圈直径 D (mm)	AW 菌落直径 d	D/d
KG8	17.80	5.20	3.42	11.10	2.20	5.05	8.30	1.90	4.37
KG9	16.10	3.10	5.19	13.10	2.10	6.24	6.70	2.10	3.19
KG10	17.60	3.10	5.68	11.10	1.90	5.84	\	\	无效果
KG11	16.20	3.90	4.15	15.20	2.20	6.91	\	\	无效果
KG12	18.20	7.30	2.49	16.10	7.10	2.27	7.30	1.90	3.84
KG13	21.50	2.60	8.27	13.20	2.60	5.08	\	\	无效果
KG14	16.70	4.70	3.55	15.40	2.90	5.31	\	\	无效果
KG15	15.60	2.20	7.09	\	\	无效果	\	\	无效果
KG16	17.80	5.20	3.42	16.20	3.40	4.76	11.10	2.70	4.11
KG17	22.60	3.90	5.79	17.20	3.80	4.53	8.20	1.90	4.32
KG18	18.10	3.40	5.32	17.80	3.20	5.56	\	\	无效果
KG19	14.90	3.80	3.92	19.10	3.70	5.16	\	\	无效果
KG21	15.30	4.50	3.40	7.80	2.30	3.39	7.20	2.30	3.13
KG22	16.10	4.70	3.43	10.10	1.90	5.32	\	\	无效果
KG23	16.50	3.10	5.32	10.90	2.40	4.54	\	\	无效果
KG24	16.70	3.20	5.22	10.50	3.30	3.18	\	\	无效果
KG25	16.50	2.50	6.60	9.10	2.50	3.64	\	\	无效果
KG26	16.10	3.90	4.13	9.30	3.10	3.00	5.20	1.40	3.71
KG27	15.20	5.10	2.98	16.20	4.20	3.86	6.30	1.10	5.73
KG28	15.90	4.10	3.88	12.10	3.20	3.78	8.20	1.30	6.31
KG29	15.10	2.20	6.86	7.30	2.40	3.04	\	\	无效果
KG30	18.90	2.30	8.22	11.50	2.10	5.48	5.30	0.50	10.60
KG31	21.10	2.80	7.54	11.10	1.30	8.54	3.90	0.60	6.50
KG32	21.20	2.20	9.64	14.70	3.80	3.87	6.10	0.70	8.71
KG33	21.90	2.90	7.55	12.20	2.10	5.81	4.10	0.90	4.56
KG34	21.40	2.10	10.19	11.40	1.90	6.00	9.40	0.90	10.44
KG35	20.10	2.20	9.14	12.50	2.50	5.00	9.50	0.80	11.88
KG36	21.50	3.20	6.72	11.30	2.10	5.38	5.30	0.80	6.63
KG37	16.60	5.70	2.91	10.90	2.20	4.95	7.20	1.10	6.55
KG38	16.10	4.20	3.83	10.30	2.10	4.90	\	\	无效果
KG39	20.50	2.30	8.91	14.20	3.80	3.74	5.70	1.30	4.38
KG40	16.90	3.80	4.45	11.20	2.10	5.33	\	\	无效果
KG41	19.80	4.20	4.71	11.10	3.20	3.47	\	\	无效果
KG42	15.90	4.30	3.70	11.70	2.20	5.32	\	\	无效果
KG43	18.20	1.80	10.11	12.10	2.90	4.17	4.10	2.60	1.58
KG44	19.20	2.30	8.35	18.20	2.80	6.50	3.90	0.60	6.50
KG45	19.80	3.10	6.39	15.80	3.20	4.94	5.20	0.60	8.67
KG45 (1)	17.50	2.30	7.61	8.60	3.10	2.77	5.80	1.00	5.80

装 订 线



续附表 1

菌株	LB 抑菌圈直径 D (mm)	LB 菌落直径 d (mm)	D/d	PDA 抑菌圈直径 D (mm)	PDA 菌落直径 d (mm)	D/d	AW 抑菌圈直径 D (mm)	AW 菌落直径 d	D/d
KG46	18.50	3.10	5.97	13.20	2.50	5.28	3.20	0.80	4.00
KG47	16.20	5.10	3.18	16.20	2.80	5.79	5.10	1.20	4.25
KG48	21.10	2.80	7.54	17.30	3.20	5.41	5.30	0.80	6.63
KG49	21.90	2.80	7.82	10.90	2.30	4.74	4.10	0.50	8.20
KG50	19.90	2.30	8.65	10.80	2.70	4.00	\	\	无效果
KG51	16.70	2.90	5.76	12.10	2.80	4.32	\	\	无效果
KG52	20.10	3.10	6.48	8.10	4.10	1.98	5.90	1.20	4.92
KG53	19.70	2.90	6.79	8.60	4.20	2.05	6.20	1.10	5.64
KG54	19.60	2.40	8.17	9.10	4.20	2.17	5.10	1.20	4.25
KG55	18.90	2.20	8.59	9.20	3.90	2.36	5.20	1.10	4.73
KG56	18.20	2.40	7.58	11.10	4.10	2.71	5.70	1.20	4.75
KG57	19.10	2.20	8.68	12.30	5.80	2.12	5.80	1.20	4.83
KG58	18.90	3.10	6.10	11.10	4.10	2.71	\	\	无效果
KG59	16.20	4.20	3.86	11.20	5.80	1.93	6.80	1.20	5.67
KG60	14.30	4.20	3.40	11.70	3.20	3.66	4.20	1.30	3.23
KG61	17.80	3.80	4.68	14.50	3.60	4.03	\	\	无效果
KG62	14.30	2.70	5.30	11.70	2.40	4.88	4.20	2.10	2.00
KG63	14.10	2.60	5.42	8.20	2.20	3.73	\	\	无效果
KG64	14.30	3.10	4.61	7.90	2.10	3.76	\	\	无效果
KG66	14.40	4.20	3.43	10.30	2.40	4.29	\	\	无效果
KG67	14.90	3.80	3.92	14.40	3.40	4.24	7.90	2.20	3.59
KG68	11.80	2.20	5.36	8.10	4.20	1.93	\	\	无效果
KG69	16.90	2.80	6.04	7.80	4.10	1.90	\	\	无效果
KG70	17.10	3.10	5.52	8.20	4.10	2.00	\	\	无效果
KG71	15.90	2.80	5.68	8.20	5.10	1.61	\	\	无效果
KG72	13.70	2.90	4.72	7.30	3.90	1.87	\	\	无效果
KG73	16.10	2.90	5.55	9.40	3.80	2.47	3.90	1.40	2.79
KG74	12.90	3.70	3.49	12.90	6.70	1.93	4.20	1.70	2.47
KG75	16.60	3.10	5.35	9.20	3.20	2.88	\	\	无效果
KG76	15.40	3.20	4.81	7.90	3.90	2.03	\	\	无效果
KG77	14.80	5.20	2.85	13.10	3.10	4.23	3.20	1.20	2.67
KG78	18.20	2.90	6.28	9.10	4.70	1.94	\	\	无效果
KG79	19.10	4.90	3.90	9.30	2.20	4.23	5.40	2.20	2.45
KG81	15.70	4.20	3.74	8.20	1.90	4.32	5.60	1.90	2.95
KG82	16.90	4.10	4.12	12.10	3.10	3.90	\	\	无效果
KG83	16.90	5.20	3.25	8.30	1.90	4.37	\	\	无效果
KG84	14.20	5.10	2.78	9.20	1.80	5.11	\	\	无效果
KG85	16.10	3.10	5.19	8.90	3.40	2.62	\	\	无效果
KG86	16.20	3.20	5.06	10.60	2.50	4.24	\	\	无效果

装
订
线

续附表 1

菌株	LB 抑菌圈直径 D (mm)	LB 菌落直径 d (mm)	D/d	PDA 抑菌圈直径 D (mm)	PDA 菌落直径 d (mm)	D/d	AW 抑菌圈直径 D (mm)	AW 菌落直径 d	D/d
KG87	12.10	4.50	2.69	8.20	1.90	4.32	\	\	无效果
KG88	15.10	5.30	2.85	11.40	2.80	4.07	\	\	无效果
KG89	14.80	4.30	3.44	8.20	2.10	3.90	\	\	无效果
KG90	13.80	4.10	3.37	7.80	2.20	3.55	\	\	无效果
KG91	17.10	2.80	6.11	10.80	3.10	3.48	\	\	无效果
KG92	12.30	2.20	5.59	12.20	3.20	3.81	\	\	无效果
KG93	15.40	3.20	4.81	9.30	2.40	3.88	\	\	无效果
KG94 (1)	16.30	4.10	3.98	9.10	2.10	4.33	\	\	无效果
KG94 (2)	16.70	2.80	5.96	12.20	3.30	3.70	\	\	无效果
KG95	18.20	2.90	6.28	13.20	3.80	3.47	\	\	无效果
KG96	17.10	2.30	7.43	8.70	3.60	2.42	\	\	无效果
KG97	20.20	7.20	2.81	17.80	10.90	1.63	5.20	2.10	2.48
KG98	20.10	7.20	2.79	17.90	10.90	1.64	6.20	1.30	4.77
KG99	17.80	5.20	3.42	18.30	13.40	1.37	6.90	2.10	3.29
KG100	15.10	2.50	6.04	12.40	3.10	4.00	\	\	无效果
KG101	12.30	4.20	2.93	10.20	3.30	3.09	\	\	无效果
KG102	16.70	2.50	6.68	9.50	3.20	2.97	\	\	无效果
KG103	14.80	2.60	5.69	11.60	3.80	3.05	\	\	无效果
KG104	18.20	3.20	5.69	11.70	3.10	3.77	\	\	无效果
KG105	15.70	5.20	3.02	12.10	4.40	2.75	4.90	1.80	2.72
KG106	16.50	3.80	4.34	10.00	3.60	2.78	\	\	无效果
KG107	7.80	3.00	2.60	8.50	3.20	2.66	5.70	1.80	3.17
KG108	10.30	5.20	1.98	9.20	4.10	2.24	\	\	无效果
KG109	16.00	3.50	4.57	10.50	2.30	4.57	\	\	无效果
KG111	13.90	2.40	5.79	10.40	2.10	4.95	\	\	无效果
KG112	14.50	2.70	5.37	9.40	1.90	4.95	\	\	无效果
KG113	15.20	2.30	6.61	10.70	2.20	4.86	\	\	无效果
KG114	16.80	4.70	3.57	11.30	2.70	4.19	5.30	1.20	4.42
KG115	15.90	3.30	4.82	7.30	3.10	2.35	\	\	无效果
KG116	11.10	2.20	5.05	8.20	2.90	2.83	\	\	无效果
KG117	14.60	3.20	4.56	7.90	3.10	2.55	\	\	无效果
KG118	14.30	4.80	2.98	9.10	2.20	4.14	\	\	无效果
KG119	13.10	2.20	5.95	10.90	1.90	5.74	\	\	无效果
KG120	16.90	3.10	5.45	12.10	2.60	4.65	\	\	无效果
KG121	14.90	5.20	2.87	12.90	3.10	4.16	\	\	无效果
XY1	17.90	3.20	5.59	10.90	4.20	2.60	\	\	无效果
XY2	16.20	2.30	7.04	12.20	3.70	3.30	\	\	无效果

装 订 线

续附表 1

菌株	LB 抑菌圈直径 D (mm)	LB 菌落直径 d (mm)	D/d	PDA 抑菌圈直径 D (mm)	PDA 菌落直径 d (mm)	D/d	AW 抑菌圈直径 D (mm)	AW 菌落直径 d	D/d
XY4	15.20	5.80	2.62	14.70	3.20	4.59	\	\	无效果
XY5	14.20	3.10	4.58	7.60	3.10	2.45	\	\	无效果
XY6	12.20	2.90	4.21	7.20	3.10	2.32	\	\	无效果
XY7	\	\	无效果	\	\	无效果	\	\	无效果
XY8	13.10	2.40	5.46	7.20	3.20	2.25	\	\	无效果
XY9	\	\	无效果	16.10	3.20	5.03	4.20	1.10	3.82
XY10	\	\	无效果	15.20	3.30	4.61	7.20	1.20	6.00
XY12	\	\	无效果	15.20	2.40	6.33	6.20	1.30	4.77
XY13	16.10	2.90	5.55	11.80	3.10	3.81	5.20	1.30	4.00
XY14	\	\	无效果	9.30	2.90	3.21	\	\	无效果
XY16	\	\	无效果	\	\	无效果	\	\	无效果
ZS3	18.10	5.30	3.42	14.20	7.30	1.95	7.10	2.50	2.84
ZS4 (2)	20.20	4.30	4.70	16.20	6.30	2.57	5.10	1.80	2.83
ZS5	16.20	4.50	3.60	16.80	8.20	2.05	4.90	2.10	2.33
ZS6	\	\	无效果	11.10	4.90	2.27	7.50	4.20	1.79
ZS8	15.20	4.10	3.71	13.20	8.70	1.52	8.10	1.80	4.50
ZS10	\	\	无效果	12.10	5.20	2.33	7.80	2.20	3.55
ZS11	15.30	3.90	3.92	13.30	6.10	2.18	8.20	1.50	5.47
ZS12	\	\	无效果	\	\	无效果	7.50	2.10	3.57
ZS13	16.70	3.80	4.39	16.70	10.80	1.55	5.20	1.90	2.74
ZS14	\	\	无效果	15.20	1.30	11.69	6.90	1.80	3.83
ZS15	17.10	3.20	5.34	13.10	7.10	1.85	\	\	无效果
ZS18	14.50	8.60	1.69	16.10	1.50	10.73	6.90	1.20	5.75
ZS19	15.20	5.20	2.92	13.20	5.10	2.59	5.10	1.90	2.68
ZS20	15.90	4.10	3.88	11.90	4.20	2.83	\	\	无效果
ZS22	\	\	无效果	11.10	1.40	7.93	5.20	5.10	1.02
ZS23	16.10	4.10	3.93	10.50	5.90	1.78	\	\	无效果
ZS24	13.50	4.70	2.87	19.20	4.50	4.27	\	\	无效果
ZS25	6.30	2.10	3.00	10.30	2.80	3.68	6.80	2.20	3.09
ZS26	15.10	4.80	3.15	15.40	8.80	1.75	7.10	1.60	4.44
ZS27	16.20	3.70	4.38	15.60	9.60	1.63	5.20	1.30	4.00
ZS28	15.80	4.50	3.51	19.40	4.20	4.62	5.70	1.90	3.00
ZS29	15.90	3.90	4.08	16.80	8.90	1.89	4.30	3.20	1.34
ZS30	16.70	4.20	3.98	16.10	8.80	1.83	6.90	2.10	3.29
ZS31	14.80	4.70	3.15	13.40	3.60	3.72	7.60	2.90	2.62
ZS32	15.70	4.20	3.74	14.20	8.90	1.60	5.60	2.30	2.43
ZS33	13.40	4.10	3.27	15.20	2.30	6.61	\	\	无效果

注：“\”表示该菌无抑菌圈。

装 订 线