

芽孢杆菌对大豆根腐病防治效果研究

朱文静, 伍辉军, 高学文

(南京农业大学 植物保护学院/农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要:选择20株从西藏地区植物根际土壤分离鉴定的具有生防潜力的芽孢杆菌,通过平板抑菌试验,筛选出对大豆根腐病原菌尖孢镰刀菌嗜管专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*)拮抗效果好的菌株11株,并利用这些菌株的发酵液作为活性成分,添加一定比例的各种助剂,制备出生物种衣剂。室内沙培试验结果表明:由萎缩芽孢杆菌LSSC3和枯草芽孢杆菌SYST2制备的种衣剂对大豆发芽及生长都有显著促进作用。用这2种生物种衣剂对大豆进行温室盆栽试验,在接种有病原菌的条件下,由2种生物种衣剂包衣大豆的株高、鲜重、主根长等都显著的高于化学种衣剂包衣和未包衣处理,同时对大豆根腐病也起到了很好的防治作用,防效分别达72.38%和73.69%。

关键词:芽孢杆菌;生物种衣剂;大豆;促生;生防

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)04-0621-05

Control Efficacy of *Bacillus* spp. to Soybean Root Rot

ZHU Wen-jing, WU Hui-jun, GAO Xue-wen

(Key Laboratory of Integrated Management of Crop Diseases and Pests, Ministry of Education, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

Abstract: Twenty *Bacillus* strains, with biocontrol potential, were selected from many *Bacillus* strains which were isolated from rhizosphere soil of plants in Tibet. Through the experiment of dual-culture test in plate, we selected 11 strains which showed strong inhibitory to *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*, and prepared biological seed coating agent by using their fermentation liquor as active ingredient, and a certain proportion of different material as additives. The indoor test demonstrated that seed coating agent which were prepared with LSSC3 and SYST2 strains could enhance the germination and growth of soybean. The results of greenhouse experiment which had inoculated with pathogenetic fungi in soil showed that, the plant height, fresh weight and root length of soybeans which treated with these two biological agents were evidently higher than chemical agent and uncoated treatment. Besides, two biological seed coating agents could control soybean root rot disease effectively, with good control efficiency of 72.38% and 73.69%.

Key words: *Bacillus* spp.; Biological seed coating agent; Soybean; Growth promotion; Biocontrol

大豆根腐病是一种重要的土传病害,它分布广、危害重、防治困难,被认为是世界范围内限制大豆产量的主要因素。随着大豆种植面积,特别是连作种植面积的扩大,大豆根腐病造成的危害逐渐增加。尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)是大豆根腐病重要病原菌之一,在许多国家都造成了严重的大豆病害,可使大豆平均产量减少59%^[1]。

长期以来,人们主要使用化学农药来防治土传病害,不但污染了环境,对人类健康也产生了不良影响,而且,病原菌抗药性的产生使得化学防治越来越困难。利用自然界微生物资源防治植物病害可克服化学防治的这些弊病,因此,近年来利用有益微生物制剂代替或部分代替化学农药得到了越来越多的关注^[2]。种子处

理是生物菌剂一种很好的应用方式,在生物防治中占有重要地位,它具有高效、经济、安全、持效期长、功能多样等优点,已有研究证明利用生防菌进行种子处理能有效防治多种植物病害^[3-5]。

虽然用生防菌防治大豆根腐病已有研究报道^[6-7],但是利用芽孢杆菌制备种衣剂对大豆根腐病进行生物防治方面在国内还鲜有报道。我国西藏地区地理环境特殊,孕育着丰富的微生物资源。实验室在前期研究中,从西藏地区植物根际土壤分离和鉴定出多种芽孢杆菌,并通过研究证明某些菌株的低温适生能力以及在抗病促生方面的作用^[8]。该研究在这些菌株中选取20株有生防潜力的芽孢杆菌,通过拮抗实验筛选出对尖孢镰刀菌拮抗作用

收稿日期:2011-04-22

基金项目:国际科技合作资助项目(2009DFA32740);公益性行业(农业)科研专项资助项目(3-23);国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2006AA10Z172);国家大学生创新性实验计划资助项目(091030707)。

第一作者简介:朱文静(1987-),女,在读硕士,研究方向为植物病害生物防治。E-mail: zhuwenjing870104@163.com。

通讯作者:高学文(1965-),男,教授,博士生导师,主要从事分子植物病理学与植物病害生物防治研究。E-mail: gaoxw@njau.edu.cn。

好的菌株,用其发酵液作为活性成分制备出生物种衣剂,并研究生物种衣剂在促进大豆生长及根腐病防治方面的作用,为生物制剂的开发以及大田实际应用提供了基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

生防菌株为实验室从西藏植物根际土壤分离

表 1 供试生防菌株

Table 1 Bacterial strains for testing

菌株 Bacterial strains	芽孢杆菌(种) <i>Bacillus</i> spp. (species)	菌株 Bacterial strains	芽孢杆菌(种) <i>Bacillus</i> spp. (species)
LSSC22	<i>B. atrophaeus</i>	YBWC18	<i>B. pumilus</i>
GBSC56	<i>B. atrophaeus</i>	NMCN6	<i>B. pumilus</i>
RJGP16	<i>B. atrophaeus</i>	NMCC46	<i>B. pumilus</i>
NMTD54	<i>B. atrophaeus</i>	GBSW19	<i>B. pumilus</i>
LSSC3	<i>B. atrophaeus</i>	SYST2	<i>B. subtilis</i>
GBSW11	<i>B. amyloliquefaciens</i>	NMSL88	<i>B. cereus</i>
YBWC43	<i>B. amyloliquefaciens</i>	RJGP41	<i>B. simplex</i>
DJFZ40	<i>B. amyloliquefaciens</i>	NMTD81	<i>B. thuringiensis</i>
GBSW2	<i>B. pumilus</i>	LNXM37	<i>B. axarquiensis</i>
NMTD17	<i>B. pumilus</i>	CJLC2	<i>B. megaterium</i>

1.2 拮抗菌株的筛选

采用 PDA 平板对峙法测定供试芽孢杆菌对大豆根腐病病原菌尖孢镰刀菌的拮抗作用。在 25℃ 培养箱中用 PDA 平板活化尖孢镰刀菌,用直径 5 mm 的打孔器在活化的菌落边缘打取菌块,接种于新的 PDA 平板中央,然后将 5 μL 供试芽孢杆菌 48 h LB 发酵液接种于距平板中央等距离(2.5 cm)的 4 个灭菌滤纸片上(直径 5 mm),每处理 3 次重复,25℃ 培养 5 d 后测量真菌生长半径的大小,计算抑菌率。抑菌率(%) = (对照真菌的生长半径 - 拮抗菌作用后真菌的生长半径)(mm) / 对照真菌的生长半径(mm) × 100。

1.3 生物种衣剂的制备

以芽孢杆菌作为活性成分,按以下方法制备生物种衣剂。将芽孢杆菌接种于 LB 液体培养基中,于 37℃,200 r · min⁻¹ 的摇床中培养 48 h,得到菌的发酵液,备用;用 60~90℃ 热水以及 2% 醋酸水溶液分别配制 5% 聚乙烯醇和 3% 壳聚糖溶液,然后以 4:1 的体积比混合 5% 聚乙烯醇和 3% 壳聚糖溶液,搅拌均匀,制得物理性能优良的复合成膜剂溶液;将芽孢杆菌发酵液与复合成膜剂溶液以 1:4 的体积比混合,搅拌均匀;将山梨酸钾(防腐剂),丙二醇(防冻剂)和番红(着色剂)分别以 0.5%,5% 和 0.3% 的重量体积比加入上述混合液中,并在磁力搅拌器的作用下充分搅拌均匀,即制得生物种衣剂。

1.4 室内沙培实验

选取对尖孢镰刀菌抑菌效果好的菌株作为活

鉴定的 20 个芽孢杆菌菌株,见表 1。大豆根腐病病原真菌尖孢镰刀菌嗜管专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum*),由南京农业大学真菌实验室提供。生防菌和病原菌的培养分别采用 LB 培养基和 PDA 培养基,培养基配方详见文献[9]。试剂为聚乙烯醇、醋酸、壳聚糖、山梨酸钾、丙二醇、番红、化学种衣剂洛菌腈。大豆品种为合丰 41。

性成分,按照 1.3 中所述方法分别制备出生物种衣剂。挑选籽粒饱满,大小均一的大豆种子,用 1% NaClO 消毒 3 min,清水冲洗 3~4 次,置于通风处晾干。用生物种衣剂分别对经表面消毒的大豆种子按药种比 1:40 的比例包衣,置于通风处晾干。将实验用培养皿和细沙用高压蒸汽灭菌器进行灭菌处理,在培养皿中垫上一层圆形滤纸,清水润湿后,均匀放入经包衣处理的大豆种子,盖上湿润细沙。将培养皿置于温度为(25 ± 1)℃、相对湿度为 85% 的光照培养箱中进行种子培养。每个培养皿播 15 粒种子,每个处理设 4 个重复,以未包衣的大豆种子作为对照处理。7 d 后调查各处理大豆幼苗的发芽率,芽长,主根长与鲜重。

1.5 温室盆栽实验

选取对大豆室内促生效果好的生物种衣剂处理,用于温室盆栽防病促生实验。取高粱粉 100 g,砂子 50 g,放入 500 mL 的三角瓶中,摇晃均匀后用水润湿,于 121℃ 高压湿热灭菌 20 min。每个三角瓶中接入直径为 5 mm 的尖孢镰刀菌菌块 5 块,28℃ 培养 10~15 d 后将病原菌培养物以 2% 的重量比与灭菌土充分混合均匀^[10]。将大豆种子按前述方法进行表面消毒并用种衣剂包衣,晾干后,播入盛有灭菌土与病原菌混合物的花盆中,每盆播 6 粒种子,每 5 盆作为一个重复,共设 3 个重复,以化学种衣剂洛菌腈在规定剂量下包衣(药种比 1:125)和未包衣处理作为对照。将花盆放于(25 ± 5)℃ 的温室中,7 d 调查发芽率,30 d 调查株高,主根长,鲜重

以及病情指数,并计算防病效果^[11]。大豆根腐病的分级标准参照韩庆新等的方法^[12]。

1.6 数据分析

试验数据用 SPSS 15.0 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 尖孢镰刀菌拮抗菌株的筛选

平板抑菌试验(表 2)表明,20 株芽孢杆菌对尖

孢镰刀菌表现出不同的抑制作用。菌株 LSSC22, GBSC56, RJGP16, LSSC3, GBSW11, YBWC43, DJFZ40, NMTD17, YBWC18, SYST2, LNXM37 抑菌作用较显著,抑菌率都在 50% 以上,其中 DJFZ40 的抑菌效果最好,抑菌率达到 69.30%。剩余菌株抑菌效果相对较弱,菌株 NMCN6, NMCC46, GBSW19, RJGP41 和 NMTD81 基本没有抑菌效果,抑菌率小于 1%。部分菌株的抑菌效果对比见图 1。

表 2 不同芽孢杆菌菌株对尖孢镰刀菌的抑菌效果

Table 2 Inhibitory activity of different *Bacillus* spp. to *F. oxysporum*

菌株	真菌生长半径	抑菌率	菌株	真菌生长半径	抑菌率
Bacterial strains	Radius of the fungi/mm	Inhibition rate/%	Bacterial strains	Radius of the fungi/mm	Inhibition rate/%
CK	42.67 ± 0.76 a	—	YBWC18	19.00 ± 0.50 fg	55.47
LSSC22	16.30 ± 0.36 h	61.80	NMCN6	42.50 ± 0.50 a	0.40
GBSC56	15.13 ± 0.11 ij	64.54	NMCC46	42.49 ± 0.57 a	0.42
RJGP16	15.33 ± 0.35 i	64.07	GBSW19	42.80 ± 0.18 a	—0.30
NMTD54	22.00 ± 1.00 e	48.44	SYST2	14.47 ± 0.45 j	66.09
LSSC3	14.40 ± 0.36 j	66.25	NMSL88	36.00 ± 0.30 c	15.63
GBSW11	19.67 ± 0.76 f	53.90	RJGP41	42.89 ± 0.40 a	—0.52
YBWC43	15.00 ± 0.50 ij	64.85	NMTD81	42.33 ± 0.58 a	0.80
DJFZ40	13.10 ± 0.17 k	69.30	LNXM37	18.50 ± 0.50 g	56.64
GBSW2	30.17 ± 0.15 d	29.29	CJLC2	41.23 ± 0.25 b	3.37
NMTD17	19.67 ± 0.29 f	53.90			

同列数据后的不同小写字母表示 0.05 水平上差异显著,下表同。
Values followed by different lowercase letters within a column are significantly different at 0.05 level,the same as below.

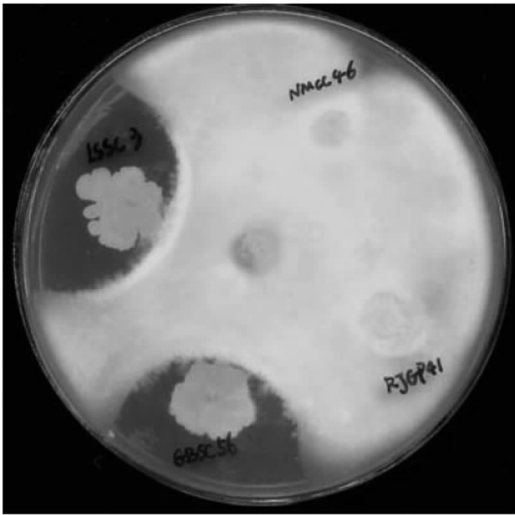


图 1 不同芽孢杆菌对尖孢镰刀菌的抑菌效果图
Fig.1 Inhibitory activity of different *Bacillus* spp. to *F. oxysporum*

2.2 室内沙培实验

根据 2.1 的结果,挑选出 11 株对尖孢镰刀菌抑菌效果好,抑菌率在 50% 以上的菌株,并利用这些菌株作为活性成分分别制备出生物种衣剂,对大豆种子包衣后,用于室内沙培实验。结果表明(表 3),由 YBWC18 制备的种衣剂包衣的大豆种子的发芽率稍小于对照,由 LSSC22、GBSC56、LSSC3、GB-

SC11、DJFZ40、SYST2 和 LNXM37 制备种衣剂包衣的大豆种子的发芽率要高于对照;在所有种衣剂处理中,仅 SYST2 处理的发芽率(95%)显著高于对照;说明由 SYST2 制备的种衣剂有促进大豆发芽的作用,而由其它菌制备的种衣剂对大豆的发芽无显著的影响。对比各种衣剂包衣的大豆幼苗的芽长、鲜重和主根长可以看出,含菌 LSSC3 和 SYST2 的 2 个种衣剂处理中大豆的 3 个生长指标均显著的高于对照,其中,由 LSSC3 制备的种衣剂处理的大豆幼苗的芽长、鲜重和主根长较对照分别高出 8.15%、21.31%、18.58%,由 SYST2 制备的种衣剂处理的大豆幼苗的芽长、鲜重和主根长较对照分别高出 11.66%、26.23%、19.91%;由 YBWC18 制备的种衣剂处理的大豆的 3 个生长指标均低于对照,其中鲜重与对照达显著差异;由 GBSW11 制备的种衣剂处理的大豆芽长要显著高于对照,但主根长小于对照,鲜重与对照相同;由 GBSC56 制备的种衣剂主根长要显著的高于对照,芽长与鲜重与对照差异不显著;由其它菌制备的种衣剂处理的大豆的 3 个生长指标与对照差异均不显著。

综上所述,由萎缩芽孢杆菌 LSSC3 和枯草芽孢杆菌 SYST2 制备的种衣剂对大豆的生长和发芽有显著的促进作用。

表 3 不同芽孢杆菌制备的种衣剂对大豆发芽及生长的影响
Table 3 Effect of seed coating agents prepared with different *Bacillus* spp. on germination and growth of soybean

处理 Treatments	发芽率 Germination percentage/%	芽长 Seedling height/cm	鲜重 Fresh weight/g	主根长 Main root length/cm
LSSC22	86.67 ± 5.44 b	8.85 ± 0.12 cd	0.60 ± 0.01 c	6.25 ± 0.69 c
GBSC56	88.33 ± 6.38 ab	8.89 ± 0.08 cd	0.62 ± 0.02 bc	7.03 ± 0.39 b
RJGP16	85.00 ± 3.34 b	8.91 ± 0.13 cd	0.61 ± 0.01 bc	6.46 ± 0.08 c
LSSC3	90.00 ± 3.85 ab	9.55 ± 0.21 b	0.74 ± 0.01 a	7.53 ± 0.50 a
GBSC11	86.67 ± 5.44 b	9.46 ± 0.09 b	0.61 ± 0.01 bc	6.02 ± 0.51 c
YBWC43	85.00 ± 3.34 b	8.76 ± 0.13 d	0.59 ± 0.02 cd	6.38 ± 0.49 c
DJFZ40	86.67 ± 5.44 b	8.97 ± 0.18 c	0.62 ± 0.02 bc	6.46 ± 0.43 c
NMTD17	85.00 ± 6.38 b	8.86 ± 0.10 cd	0.61 ± 0.01 bc	6.37 ± 0.29 c
YBWC18	83.34 ± 3.85 b	8.73 ± 0.16 d	0.58 ± 0.03 d	6.31 ± 0.22 c
SYST2	95.00 ± 3.34 a	9.86 ± 0.15 a	0.77 ± 0.01 a	7.83 ± 0.36 a
LNXM37	86.67 ± 5.44 b	8.99 ± 0.11 c	0.62 ± 0.02 b	6.53 ± 0.45 bc
CK	85.00 ± 3.34 b	8.83 ± 0.13 cd	0.61 ± 0.01 bc	6.35 ± 0.63 c

2.3 生物种衣剂对大豆的温室防病促生作用

选取对尖孢镰刀菌有良好抑制作用同时在室内沙培条件下对大豆生长有显著促生作用的菌株 LSSC3 和 SYST2 作为活性成分,分别制备出生物种衣剂,对大豆种子包衣后,用于温室盆栽实验。结果(图 2,表 4)表明,由于土壤中接种有病原菌,大豆的发芽受到影响,各处理大豆种子的发芽率普遍较低,不包衣的对照处理发芽率仅为 80.00%,由含 SYST2 的种衣剂包衣的大豆种子发芽率(87.78%)最高;在 30 d 内,未包衣处理的大豆生长情况最差,

植株矮小,发病严重,而由 2 株生防芽孢杆菌制备的种衣剂包衣的大豆则生长情况良好,幼苗多根系发达,植株较洛菌腈包衣的处理和未包衣处理生长强壮,发病轻。其中,由 LSSC3 制备的生物种衣剂包衣的大豆的株高、鲜重和主根长较未包衣的对照分别高出 43.04%、52.37%、65.12%,对大豆根腐病的防治效果达 72.38%;由 SYST2 制备的生物种衣剂包衣的大豆的株高、鲜重和主根长较未包衣的对照分别高出 45.19%、58.04%、69.10%,对大豆根腐病的防治效果达 73.69%。

表 4 不同种衣剂对大豆的温室防病促生效果
Table 4 Efficacy of different seed coating agents in promoting soybean plants growth and controlling disease in greenhouse

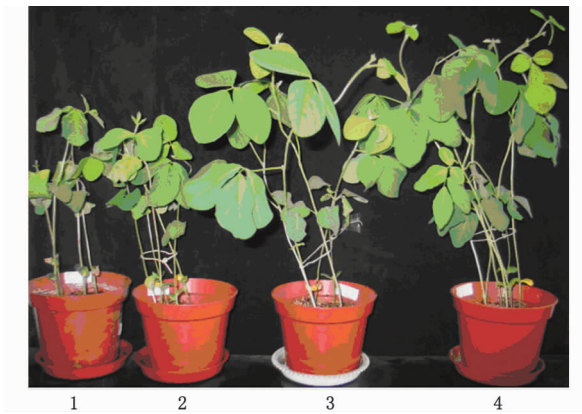
处理 Treatments	发芽率 Germination percentage/%	株高 plant height/cm	鲜重 Fresh weight/g	主根长 Root length/cm	病情指数 Disease index/%	防病效果 Control effic/%
LSSC3	84.44 ± 1.93 a	33.93 ± 1.67 a	4.83 ± 0.11 a	15.34 ± 1.02 a	20.42 ± 0.97 c	72.38 a
SYST2	87.78 ± 1.92 a	34.44 ± 0.45 a	5.01 ± 0.10 a	15.71 ± 0.52 a	19.45 ± 0.90 c	73.69 a
咯菌腈 Fludioxonil	84.44 ± 1.93 a	25.94 ± 1.16 b	3.82 ± 0.16 b	11.30 ± 1.05 b	36.59 ± 0.89 b	50.51 b
不包衣 Uncoated	80.00 ± 3.33 b	23.72 ± 1.11 c	3.17 ± 0.06 c	9.29 ± 0.58 c	73.94 ± 0.93 a	

3 讨 论

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是自然界广泛存在的一类细菌,在土壤生态系统中占有重要地位,在农业、工业应用,食品安全和医学研究等方面都有广泛的应用价值^[13]。由于芽孢杆菌可产生强抗逆性的内生孢子,相比其它不产生抗逆孢子的微生物,更容易成功制备出防治植物病害的生物制剂^[14]。芽孢杆菌制备的菌剂,具有易储存,便于运输,大规模生产工艺简单,成本较低,环保无毒害等优点。因此,芽孢杆菌是目前较为理想的生防微生物^[15],其生防菌剂已在植物病虫害防治中广泛应用。

1997 年浙江省种子公司首次研制出利用芽孢

杆菌为活性成分的 ZSB 系列生物种衣剂,不仅能有效防治水稻纹枯病、细条病,小麦赤霉病、纹枯病,西瓜枯萎病、炭疽病等,也能促进这些植物的生长,而且对人畜及环境低毒^[16-17]。近年来,国内已有许多研究人员用不同生防菌株进行了生物种衣剂的研究,取得了一定的进展^[18-20]。该研究通过平板抑菌实验和室内沙培实验筛选出对大豆根腐病病原菌尖孢镰刀菌有很好的抑制作用同时对大豆的生长发芽有促进作用的生防菌 LSSC3(*B. atrophaeus*)和 SYST2(*B. subtilis*)。温室实验表明,用这 2 种菌的发酵液作为活性成分制备的生物种衣剂在接种有病原菌的盆栽条件下,对大豆根腐病的防治作用要好于化学种衣剂洛菌腈包衣的处理,防效分别是



1. 不包衣;2. 用化学种衣剂咯菌腈包衣;3. 用含 LSSC3 的种衣剂包衣;4. 用含 SYST2 的种衣剂包衣。

1. Uncoated;2. Coated with fludioxonil;3. Coated with agent prepared with LSSC3;4. Coated with agent prepared with SYST2.

图2 不同种衣剂包衣的大豆生长情况

Fig.2 Growth of soybean plants coated with different agents

72.38% 和 73.69%, 此外, 由 2 种生物种衣剂包衣的大豆的发芽率以及株高、鲜重和根长都要显著的高于洛菌腈处理和未包衣的处理, 对大豆的生长起到了显著的促进作用。实验室在前期研究中也证明了菌株 LSSC3 对一些植物病原真菌和细菌有很强的抑制作用, 对拟南芥有良好的促生长作用^[8]。由于研究只是在实验室和温室条件进行的, 而在大田环境复杂多样的条件下, 生物种衣剂是否效果稳定, 还需进一步研究。

参考文献

- [1] Sinclair J B, Backmen P A. Compendium of soybean diseases, Third ed. [M]. The American Phytopathological Society, 1989.
- [2] Dixon R A. Natural products and plant disease resistance[J]. Nature, 2001, 411: 843-847.
- [3] Abd-Allah E F, El-Didamony G. Effect of seed treatment of *Arachis hypogaea* with *Bacillus subtilis* on nodulation in biocontrol of southern blight (*Sclerotium rolfsii*) disease [J]. Phytoparasitica, 2007, 35: 8-12.
- [4] Jahn M, Puls A. Investigations for development of a combined biological physical method to control soil borne and seed borne pathogens in carrot seed[J]. Journal of Plant Diseases and Protection, 1998, 105: 359-375.
- [5] Callen N W, Mathre D T, Miller J B. Yield performance of sweet corn seed bio-primed and coated with *Pseudomonas fluorescence* AB 254[J]. HortScience, 1991, 26: 1163-1165.
- [6] 全赞华, 王学士. 大豆根腐病拮抗菌的室内筛选及温室测定[J]. 中国生物防治, 1997, 14(1): 25-27. (Tong Z H, Wang X S. Screening for antagonistic isolates against soybean root rot disease in the laboratory and greenhouse[J]. Chinese Journal of Biological Control, 1997, 14(1): 25-27.)
- [7] Kun X, Kinkel L L, Samac D A. Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces* [J]. Biological Control, 2002, 23(3): 285-295.
- [8] 刘芳, 薛鹏琦, 乔俊卿, 等. 西藏低温适生芽孢杆菌的分离鉴定及其抗菌和促生作用[J]. 中国生物防治, 2010, 26(4): 453-460. (Liu F, Xue P Q, Qiao J Q, et al. Isolation and identification of a low-temperature-adapted *Bacillus* in Tibet and its antagonistic and growth-promoting effect [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2010, 26(4): 453-460.)
- [9] 郝士海. 现代细菌学培养基和生化试验手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1992. (Hao S H. Modern bacteriology substrate and biochemical test manual [M]. Beijing: China Science and Technology Press, 1992.)
- [10] Bardin S D, Huang H C. Efficacy of stickers for seed treatment with organic matter or microbial agent for the control of damping-off of sugar beet[J]. Plant Pathology Bulletin, 2003, 12: 19-26.
- [11] 方中达. 植病研究法[M]. 北京: 农业出版社, 1977. (Fang Z D. Plant pathology approach [M]. Beijing: China Agriculture Press, 1977.)
- [12] 韩庆新, 辛惠普. 大豆根腐病主要病原菌对大豆幼苗致病性的初步研究[J]. 大豆科学, 1990, 9(2): 157-162. (Han Q X, Xin H P. A preliminary study on the pathogenicity of the main pathogens causing soybean seedling root rot [J]. Soybean Science, 1990, 9(2): 157-162.)
- [13] 吴秀红, 张新中, 周永灿, 等. 关于芽孢杆菌 (*Bacillus*) 应用概述[J]. 现代渔业信息, 2007, 22(7): 16-18. (Wu X H, Zhang X Z, Zhou Y C, et al. Outline of related *Bacillus* spp. [J]. Modern Fisheries Information, 2007, 22(7): 16-18.)
- [14] Emmert E A B, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: A (Gram-) positive perspective [J]. FEMS Microbiology Letters, 1999, 171: 1-9.
- [15] Elliott M L. Pest management [J]. Science, 2001, 57(8): 695-706.
- [16] 李长文, 王发, 刘凤沂. 生物种衣剂在几种作物上的应用效果[J]. 现代化农业, 2001(11): 20. (Li C W, Wang F, Liu F Y. Application effect of biological seed coating agent on several crops [J]. Modernizing Agriculture, 2001(11): 20.)
- [17] 蒋美明, 兰月相. 生物型系列种衣剂的特性和应用效应[J]. 种子科技, 1997(1): 35-36. (Jiang M M, Lan Y X. Property and application effect of biological seed coating agents [J]. Seed Science and Technology, 1997(1): 35-36.)
- [18] 李春, 姚丽霞, 陶晶, 等. 一种多功能生物种衣剂及制备方法[P]. 中国, 101444227A, 2009-1-9. (Li C, Yao L X, Tao J, et al. A multifunction biological seed coating agent and its preparation method [P]. China, 101444227A, 2009-1-9.)
- [19] 吴继星, 陈在珥, 曹春霞, 等. 苏云金杆菌悬浮种衣剂[P]. 中国, 1849890A, 2006-4-6. (Wu J X, Chen Z E, Cao C X, et al. Flowable concentrate for seed coating of *Bacillus thuringiensis* [P]. China, 1849890A, 2009-1-9.)
- [20] 林开春, 罗振亚, 冯斌, 等. 一种枯草芽孢杆菌及其种衣剂和用途[P]. 中国, 101358176A, 2009-2-4. (Lin K C, Luo Z Y, Feng B, et al. A seed coating agent of *Bacillus subtilis* and its application [P]. China, 101358176A, 2009-2-4.)