

拮抗大豆疫霉菌植物内生细菌的筛选与鉴定

韩祥东^{1,2}, 花美娜², 冯永君², 吴存祥¹

(1. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081; 2. 北京理工大学 生命学院, 北京 100081)

摘要:大豆疫霉根腐病是世界范围内危害严重的毁灭性大豆病害, 筛选内生菌进行生物防治是未来该病害防治的重要发展方向。以大豆根系为材料筛选得到 67 株内生细菌, 采用平板对峙生长实验, 发现其中 18 株对大豆疫霉菌的菌丝生长具有抑制作用, 其中以 A2、A4、A7 和 B8 效果最佳, 抑制率分别达到 72.8%、55.5%、76.0% 和 87.1%。利用无菌发酵滤液与大豆疫霉孢子共培养发现, A2 和 A4 对孢子萌发具有明显抑制效果, 抑制率达 75.4% 和 85.8%。盆栽实验表明, A2 和 A4 无菌发酵滤液能使经大豆疫霉孢子侵染后的大豆种子萌发率由 63.1% 分别提高到 80.0% 和 80.3%, 健康幼苗率由 31.4% 提高到 45.7% 和 50.9%。根据 16S rDNA 序列系统发育分析, 初步确定 A2 为假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.), A4、A7 和 B8 皆为芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.)。

关键词:生物防治; 大豆疫霉菌; 根腐病; 内生细菌

中图分类号: S435.651; S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)01-0085-07

Isolation and Characterization of Endophytic Bacteria for *Phytophthora sojae* Inhibition from Soybean Plant

HAN Xiang-dong^{1,2}, HUA Mei-na², FENG Yong-jun², WU Cun-xiang¹

(1. Institute of Crop Science, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 2. School of Life Sciences, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

Abstract: *Phytophthora sojae* is a worldwide destructive pathogen to soybean. To isolate endophytic bacteria from soybean is an important idea in dealing with the diseases caused by *P. sojae*. In this study, 67 endophytic bacterial strains were isolated from soybean root, of which 18 strains showed obvious inhibition ability on the mycelia of *P. sojae*. Especially, the strains A2, A4, A7 and B8 showed an even strong inhibition effect, with the inhibition rates being 72.8%, 55.5%, 76.0% and 87.1%, respectively. The sterile fermentation filtrate of A2 and A4 inhibited germination rates of *P. sojae* spores by 75.4% and 85.8% in a plate test. These two endophytes also promoted the germination rates of pathogen-infected soybean seeds from 63.1% to 80.0% and 80.3%, of which the seedlings showing a healthy growth state increased from 31.4% to 45.7% and 50.9%, respectively. Based on 16S rDNA sequence phylogenetic analysis, A2 was identified as *Pseudomonas* sp. and A4, A7, B8 as *Bacillus* spp.

Key words: Biological control; *Phytophthora sojae*; Root rot; Endophytic bacteria

大豆疫霉根腐病是由大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) 引起的毁灭性病害之一, 在适宜条件下发病可导致大豆绝产。在世界范围内, 每年由于该病导致的经济损失可达 10 ~ 20 亿美元^[1]。该病自 1948 年首先在美国发现以来, 又相继在澳大利亚、加拿大、阿根廷、新西兰等许多国家发现; 在我国, 该病于 1991 年由沈崇尧和苏彦纯首次在东北发现, 随后在山东、北京等地也被发现^[2-3]。该病主要病症表现在根上: 幼苗期, 侧根几乎完全腐烂, 主根变为深褐色; 真叶期, 抗病性差的品种植株死亡, 抗病性好的品种植株矮化。根部受损会进一步导致其它部

位的病变, 如叶片发黄, 茎部表现水渍状等。在农田中, 该病一般成片发病, 很少单株发病^[3]。尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌 (*F. solani*) 和立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 也能引起大豆根腐病, 且病症与大豆疫霉根腐病极其相似, 单凭症状难以鉴别, 从病株或根际土壤中分离病原菌是比较有效的鉴定方法^[4]。大豆疫霉菌有性生殖结构卵孢子为主要越冬菌源, 可随土壤远距离传播。卵孢子遇适宜条件萌发, 或产生芽管直接发育成菌丝侵染寄主, 或于芽管顶端形成孢子囊并释放游动孢子。游动孢子是主要侵染源^[5], 从孢子萌发水平

收稿日期: 2011-11-13

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871464, 30870055, 31170035); 现代农业产业技术体系建设专项资金 (CARS-04)。

第一作者简介: 韩祥东 (1986 -), 男, 在读硕士, 研究方向为大豆内生细菌。E-mail: hxdtjnu@126.com。

通讯作者: 吴存祥 (1969 -), 男, 博士, 副研究员, 从事大豆遗传育种工作。E-mail: wucx@mail.caas.net.cn。

冯永君 (1973 -), 男, 博士, 副教授, 从事植物内生菌的研究工作。E-mail: fengyj@bit.edu.cn。

上实现对大豆疫霉菌的抑制对于切断及预防该菌的传播和发生具有重要的意义。

目前,大豆疫霉根腐病的防治方法主要包括抗病品种的选育,化学杀菌剂的使用,耕作条件的优化等^[6],而利用生防菌进行生物防治被认为是未来植物病害防治的重要发展方向^[7]。目前,已有部分研究以土壤及大豆植株为材料筛选得到了一些对大豆疫霉菌具有拮抗效果的细菌^[8-10],但相关研究主要侧重于对大豆疫霉菌菌丝生长的抑制,而大豆疫霉根腐病的传播主要依赖其孢子,筛选得到抑制其孢子萌发的生防菌对于预防该病的传播与发生具有更为重要的意义。

该研究选取大豆疫霉根腐病发病地块边缘的健康植株,从根部筛选并鉴定了4株对大豆疫霉菌菌丝生长有明显抑制作用的内生细菌,并检测到其中2株对病菌孢子萌发有强烈抑制,盆栽实验也证明这2株内生细菌能明显抑制大豆疫霉孢子对大豆萌发及幼苗生长的影响,是具有应用潜力的拮抗菌株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆植株:大豆疫霉根腐病发病地块边缘的健康植株,于2010年9月6日上午采自山东省济宁农业科学院大豆种植区。

培养基:牛肉膏蛋白胨液体培养基(NA):牛肉膏3g,蛋白胨10g,NaCl5g,加蒸馏水定容至1000mL,pH7.2~7.4,121℃灭菌20min;牛肉膏蛋白胨固体培养基:在上述培养基中加琼脂15~20g;V8培养基:100mL V8混合蔬菜汁加入蒸馏水900mL,CaCO₃0.2g,琼脂15~20g,pH5.8,121℃灭菌20min。

病原菌:大豆疫霉菌,由南京农业大学王源超先生提供。

1.2 试验方法

1.2.1 内生细菌的分离与纯化 将采集的根用自来水冲洗干净后进行表面消毒:依次用70%酒精浸泡60s,2%次氯酸钠溶液浸泡4min,70%酒精浸泡30s。用无菌水冲洗5次,吸取最后一次冲洗液0.1mL涂布NA平板,检测表面消毒是否彻底。

将消毒后的根放入灭过菌的含有少量石英砂的研钵中,加入适量无菌生理盐水研磨。取上清液及其梯度稀释液(10⁻¹和10⁻²2个梯度)各0.1mL涂布NA平板,每个梯度进行3个重复。将涂布的平板置于28℃培养箱中培养3~5d,待NA平板上长出大量菌落后尽可能多的挑取形态不同的单菌落,于NA平板上划线分离培养,再将纯化的菌株接种于NA液体培养基中,28℃震荡培养至指数期,制

成甘油管在-80℃冻存。

1.2.2 抑制大豆疫霉菌菌丝生长的内生细菌的筛选 在V8固体培养基平板中央接种直径5mm的大豆疫霉菌菌饼,在菌饼两侧3cm处打孔后用少量琼脂封闭孔底。待菌饼上的菌丝明显生长进入V8平板后(约2d),分别在2个孔中加入0.01mL的过夜培养的细菌培养物和空白的NA培养基(对照),每个实验菌株5次重复。置于28℃培养箱中培养,至对照侧菌丝长到培养皿边缘(约7d),显微镜下观察对照侧及实验侧菌丝生长状态,并测量菌饼中心到培养皿边缘的距离(a)及菌饼中心与接菌孔连线上菌饼中心到菌丝边缘的距离(b),计算菌丝生长抑制率:

$$\text{菌丝生长抑制率}(\%) = (a - b) / a \times 100$$

1.2.3 内生细菌发酵液对大豆疫霉菌孢子萌发的抑制作用 向培养8d的大豆疫霉菌平板中加入10mL无菌水,25℃条件下静置培养72h,制备孢子悬液^[11]。将孢子悬液用无菌水梯度稀释(10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴共4个梯度),取0.1mL涂布V8平板,选择合适浓度的孢子悬液备用。

选取对大豆疫霉菌菌丝生长有明显抑制效果的菌株,28℃,220r·min⁻¹震荡培养48h后,先5000g离心2min,再取上清12000r·min⁻¹离心10min,最后取上清经0.22μm Millipore细菌过滤器过滤后,获得无菌滤液。取100μL无菌发酵液涂布NA平板,检测是否将细菌过滤彻底。

将无菌发酵液与上述合适浓度的孢子悬液各0.5mL混合,28℃培养箱中静置6h后,取0.2mL涂布V8平板,置于28℃培养箱中培养至孢子萌发。用无菌的NA液体培养基处理的孢子悬液作为空白对照,每种细菌培养物及空白对照各进行5次重复。统计对照平板(m)和实验平板(n)萌发孢子数量并计算孢子萌发抑制率:

$$\text{孢子萌发抑制率}(\%) = (m - n) / m \times 100$$

1.2.4 内生细菌对大豆幼苗期疫霉根腐病的抑制效果 按照1.2.3的方法制备50mL孢子悬液,用无菌水稀释100倍后均匀喷洒于蛭石中。将拌有孢子的蛭石等量分装于19×13×12cm发芽盒中。每个发芽盒中按7×5比例种35粒自贡冬豆,每2个发芽盒(即70粒自贡冬豆)作为一个处理,每个处理的自贡冬豆周围分别滴加100μL的A2、A4的无菌发酵液及无菌水(对照组),共计3个处理。以未经孢子侵染和内生菌发酵液处理的幼苗作为对照。将发芽盒置于人工气候箱中培养8d。各处理均重复5次。观察幼苗发病情况,分别统计种子萌发数及健康幼苗数并计算种子萌发率和健康幼苗率:

$$\text{种子萌发率}(\%) = (\text{萌发种子数} / \text{种植种子总数}) \times 100$$

健康幼苗率(%) = 健康幼苗数/种植种子总数) × 100

1.2.5 拮抗内生细菌的鉴定 具有明显抑菌活性的内生细菌的鉴定主要通过 16S rDNA 序列分析完成。16S rDNA 的 PCR 扩增时,细菌 DNA 的提取使用百泰克公司的细菌基因组提取试剂盒完成;扩增引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 由深圳华大基因合成部完成;PCR 扩增条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 90 s, 30 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存;PCR 产物测序由深圳华大基因测序部完成。测序结果提交 EzTaxon server 2.1,分析得到与其同源性高的菌种的 16S rDNA 序列,并利用 MEGA4.1 软件构建系统发育树。菌种的 16S rDNA 序列信息提交 Genebank 数据库,并获得相应编号。

2 结果与分析

2.1 内生细菌的分离与纯化及抑菌活性检测

将大豆根表面消毒后,进行内生细菌的分离和培养,在平板上得到大量菌落,根据菌落形态(大小、颜色、边缘、厚度、光泽等)从大豆根中共分离纯化得到 67 株内生细菌。采用平板对峙生长实验,以大豆疫霉菌为目标菌,从分离获得的 67 株内生

细菌中初步筛选得到对大豆疫霉菌菌丝生长有抑制作用的细菌 18 株,分别计算菌丝生长抑制率(表 1)。其中菌株 A2、A4、A7 和 B8 对大豆疫霉菌菌丝的生长抑制效果较好,抑制率分别达到 72.8%、55.5%、76.0% 和 87.1% (图 1)。这 4 种细菌作为该研究重点考察的菌株。

表 1 抑制大豆疫霉菌菌丝生长的 18 株内生细菌
Table 1 The 18 endophytes showed inhibition ability on *P. sojae* mycelia

菌丝生长抑制率 Mycelia growth inhibition rate	菌株数量 Number of strains	菌株编号 Strains No.
<25%	11	A3、A6、A7、A12、 B1、B7、B9、C4、 C5、C8、N2
25 ~ 50%	3	B5、C1、C6
50 ~ 75%	2	A2、A4
>75%	2	A7、B8

为研究内生细菌抑制大豆疫霉菌丝生长的机制,将大豆疫霉菌用上述 4 株内生细菌处理后,用显微镜观察发现,其大部分菌丝明显呈现弯曲状;而且视野内出现更多的具有横隔结构的菌丝(图 2),由于横隔结构是衰老的菌丝所特有的,说明上述 4 株内生细菌能够加速大豆疫霉菌丝的衰老过程。

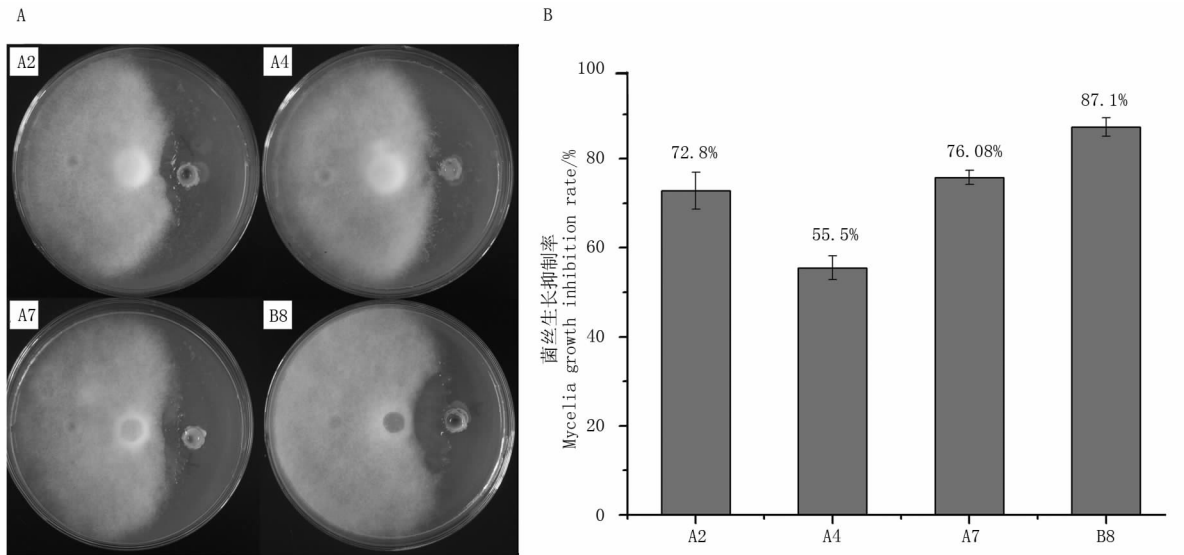
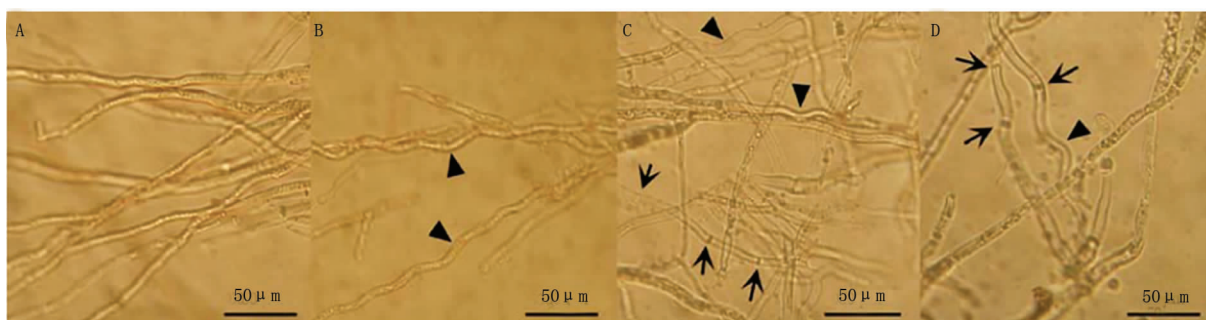


图 1 内生细菌 A2、A4、A7 和 B8 对大豆疫霉菌菌丝生长的抑制效果(A)及菌丝生长抑制率(B)
Fig.1 The inhibition effects(A) and rates(B) of endophytes A2、A4、A7 and B8 on *P. sojae* mycelia

2.2 内生细菌培养物对大豆疫霉菌孢子萌发的抑制作用

采用共培养后平板涂布的方法,检测上述筛选得到的 4 株内生细菌的无菌发酵液对大豆疫霉菌孢子萌发的抑制效果。结果 A7、B8 对孢子萌发的抑制效果较弱,抑制率分别为 14.3% 和 4.6%;但是

A2、A4 能高效的抑制大豆疫霉菌孢子的萌发,抑制率分别达到 75.4% 和 84.8% (图 3)。由于孢子在大豆疫霉菌根腐病传播过程中的重要作用,A2、A4 对大豆种子萌发及幼苗期疫霉根腐病的抑制效果值得重点研究。



图中由内生细菌对大豆疫霉菌丝生长造成的弯曲,用黑色三角▲指示;菌丝内横隔的形成,用黑色箭头↑指示
Endophytes inhibit *P. sojae* growth by increasing curved mycelia(▲) and promoting the production of septum(↑)

图2 未经内生菌处理(A)及处理后(B、C、D)的大豆疫霉菌丝生长的状态

Fig. 2 The growth state of *P. sojae* mycelia treated (B、C、D) or untreated (A) with endophytes

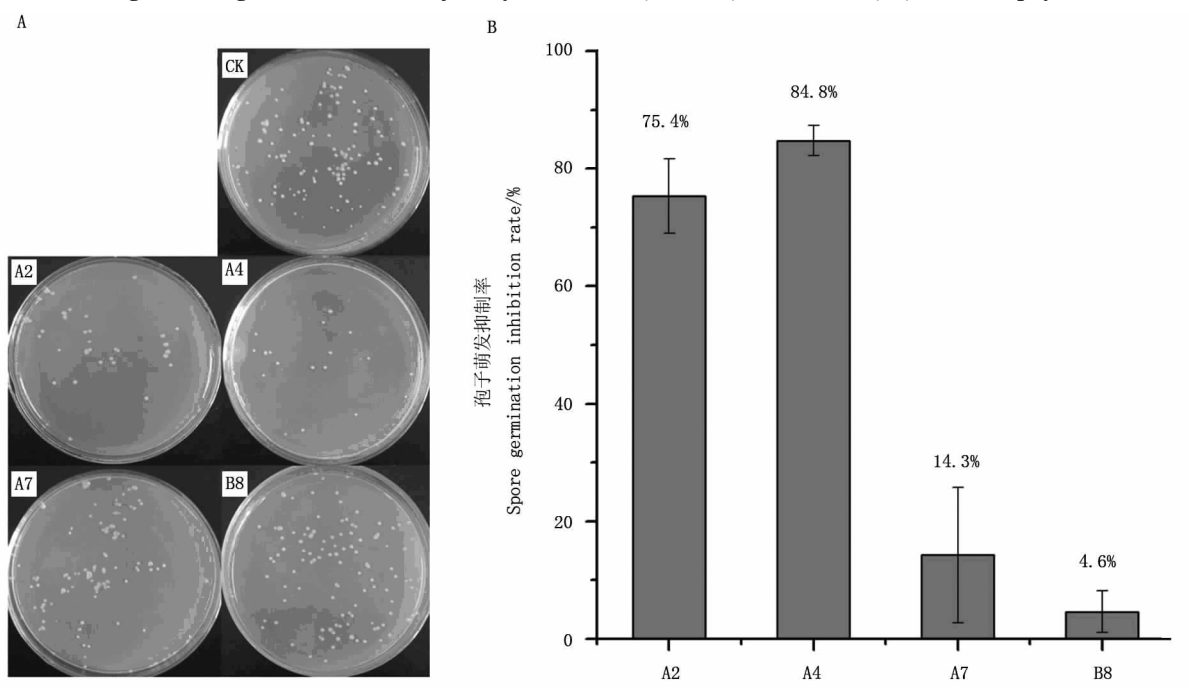


图3 内生细菌 A2、A4、A7 和 B8 对大豆疫霉菌孢子萌发的抑制效果(A)及孢子萌发抑制率(B)

Fig. 3 The inhibition effects (A) and rates (B) of endophytes A2、A4、A7 and B8 on *P. sojae* spores

2.3 内生细菌对大豆种子萌发及幼苗期疫霉根腐病的抑制效果

以 A2 和 A4 菌株为供试菌株,检测其无菌过滤发酵液在大豆种子萌发及幼苗生长过程中对大豆疫霉根腐病的抑制作用。研究发现,大豆疫霉孢子能够抑制大豆种子的萌发(图 4B),降低其萌发率至 63.1%(图 5A);而且大豆疫霉孢子的侵染还强烈影响幼苗的生长发育,使健康的幼苗仅占总种植数量的 31.4%(图 5B)。大豆疫霉孢子对幼苗生长发育的影响主要表现在两个方面:一是抑制根的生长,进而导致幼苗的生长受到影响,植株矮小;二是导致幼苗在子叶节处断裂(图 4E),这可能是由于大豆疫霉的侵染使子叶节处受损,在大豆萌发出土过程中,子叶受土壤阻力作用导致脆弱的子叶节断

裂。而内生细菌 A2、A4 无菌发酵滤液的施用能有效提高大豆对大豆疫霉孢子侵染的抵抗能力(图 4C、D),分别将大豆种子萌发率提高到 80.0% 和 80.3%,将健康幼苗率提高到 45.7% 和 50.9%(图 5)。

2.4 拮抗内生细菌的鉴定

将测序获得的 A2、A4、A7 和 B8 各自的 16S rDNA 序列提交 Genbank 数据库,获得的编号分别为 JN656162、JN656163、JN656164 和 JN656165。16S rDNA 产物序列分析及 MEGA4.1 构建系统发育树结果表明:A2 的 16S rDNA 的核苷酸序列与多株假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)的 16S rDNA 同源性超过 99%,与蒙氏假单胞菌(*P. monteilii*)进化距离最近(图 6A)。A4、A7、B8 的 16S rDNA 的核苷酸序列均与多株芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)的同源性超过

99%,其中 A4 与甲基营养型芽孢杆菌 (*B. methyl-* 杆菌(*B. pumilus*)进化距离最近(图 6B)。
otrophicus)进化距离最近,A7 和 B8 均与短小芽孢

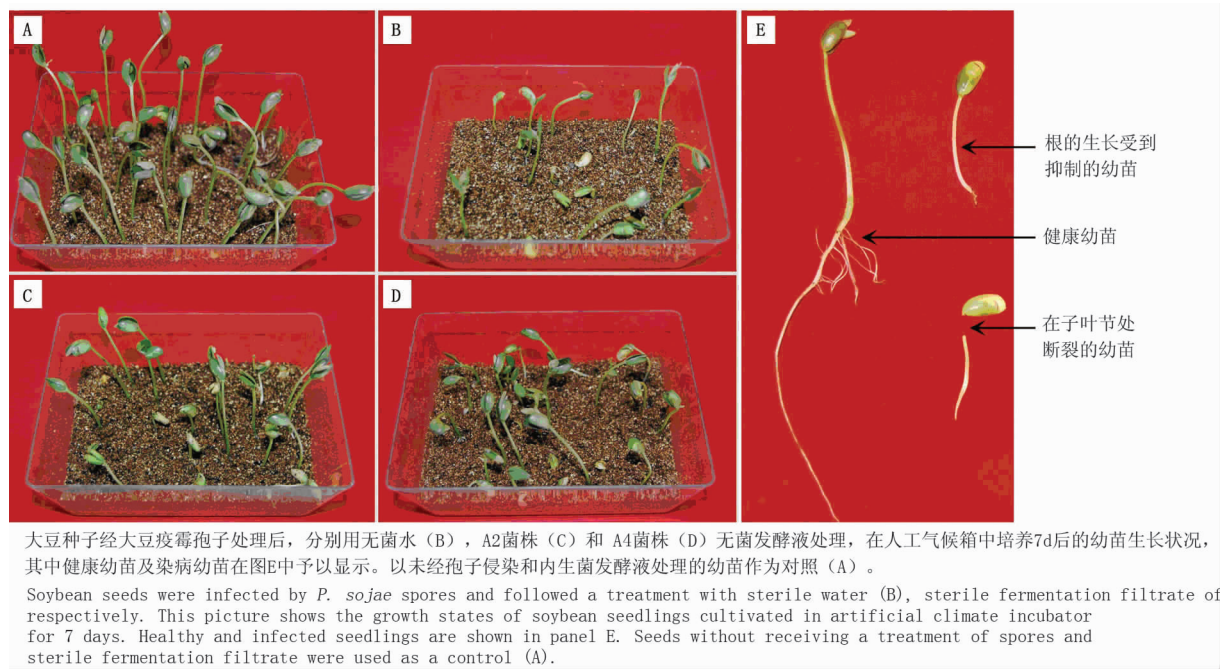


图 4 内生细菌 A2、A4 对大豆幼苗期疫霉根腐病的抑制效果

Fig. 4 The disease symptoms of seedlings infected by *P. sojae* spores and disease-resistance effect of the endophytes A2 and A4

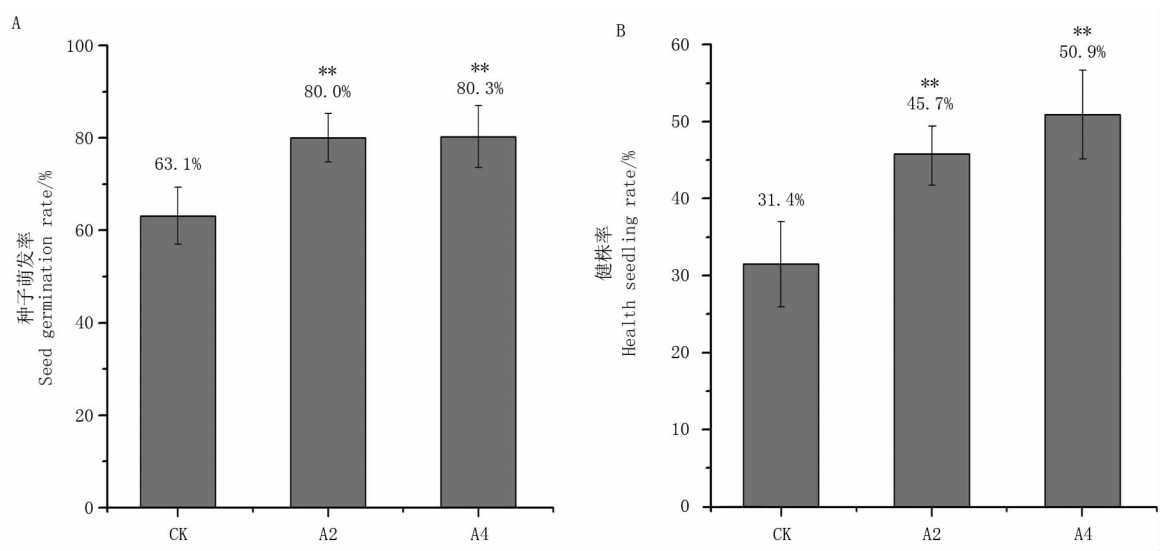


图 5 内生细菌 A2、A4 在种子萌发 (A) 和幼苗生长 (B) 阶段对大豆疫霉根腐病的防治效果 (** $P < 0.01$)

Fig. 5 Inhibition effect of endophytes A2 and A4 on *Phytophthora* root rot in seed germination (A) and seedling growth (B) (** $P < 0.01$)

3 讨 论

出于环境保护、经济效益等方面的考虑,生物防治是未来植物病害防治的重要发展方向,而具有拮抗活性的内生细菌的筛选在生物防治中占有举

足轻重的地位。该研究从大豆根部分离得到了 4 株对大豆疫霉菌丝生长具有明显拮抗活性的细菌,经 16S rDNA 序列分析及进化树构建,初步确定其中 1 株为假单胞菌(菌丝生长抑制率 72.8%),3 株为芽孢杆菌(菌丝生长抑制率分别为 55.5%、

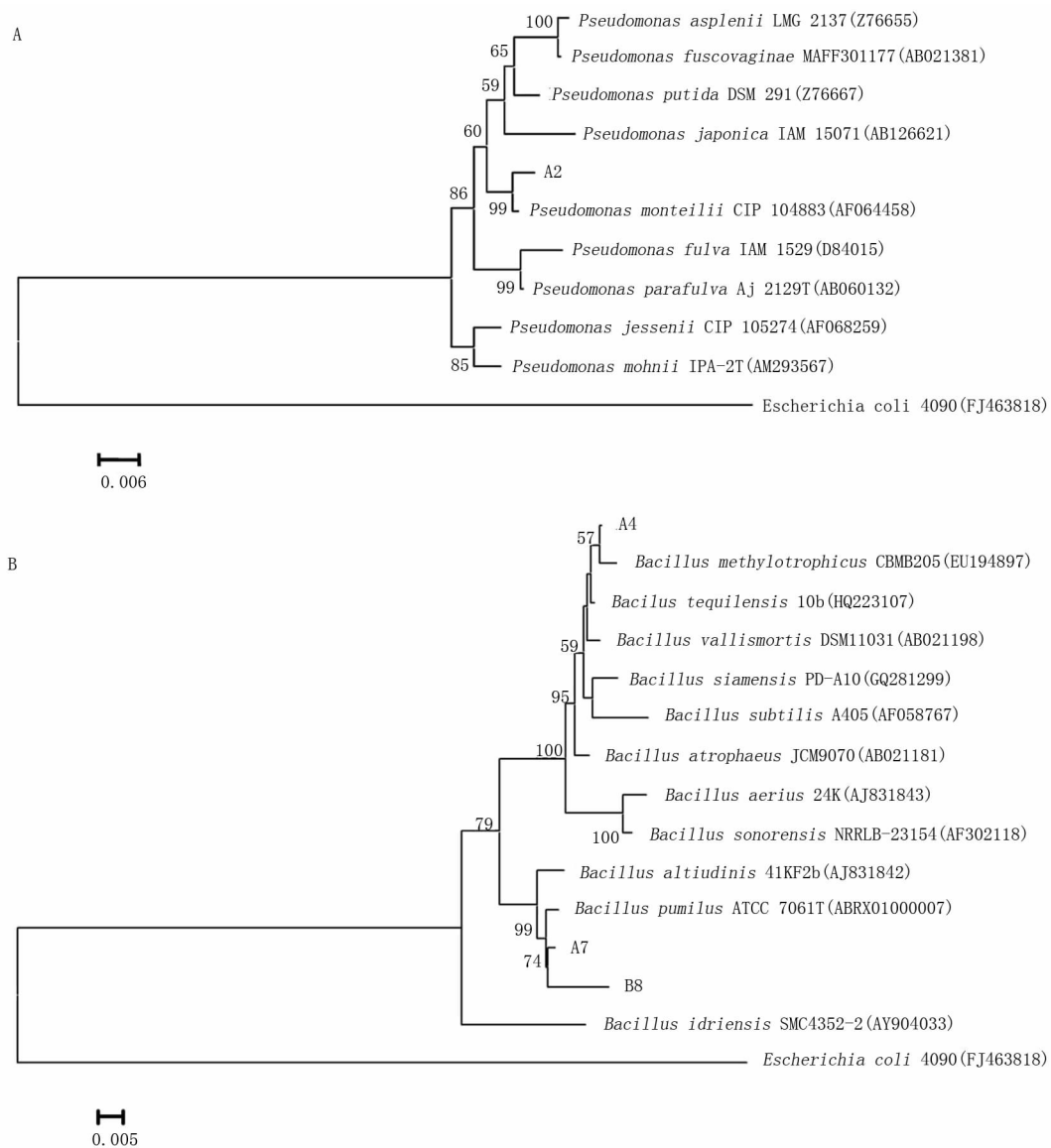


图6 内生细菌 A2 (A) 和 A4、A7、B8 (B) 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 6 Phylogenetic trees of endophytes A2 (A) and A4, A7, B8 (B) based on 16S rDNA analysis

76.0% 和 87.1%)。目前,从各种生境中筛选得到的对病原真菌具有拮抗作用的细菌多分布在芽孢杆菌 (*Bacillus* spp.) 和假单胞菌 (*Pseudomonas* spp.) 2 个属中^[7,12]。如 Haas 等^[13]发现一株荧光假单胞菌 (*P. fluorescent*) 对多种土传病害具有生物防治功能;张淑梅等^[8]从大豆中分离得到一株解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*), 该菌具有抑菌谱广, 抑菌率高的特点;Berger 等^[14]研究发现枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) Cot1 能够有效抑制某些疫霉和腐霉的生长。该研究丰富了具有生防功能的芽孢杆菌和假单胞菌的种类。大量研究发现,在大豆疫霉菌生长史及侵染大豆过程中,游动孢子起着举足轻重的作用,目前公认的田间发病机理为,土壤中的卵孢子经历不良环境后,在温度适宜、土壤潮湿

的环境中会产生孢子囊;水分饱和(下雨或者灌溉)时,孢子囊会释放出大量的游动孢子,游动孢子附着于种子或幼苗根部并侵染植株,导致病害产生^[1,3]。因此,筛选得到能够抑制大豆疫霉孢子萌发的内生细菌对于该病的生物防治具有重要的意义。该研究发现假单胞菌 A2 和芽孢杆菌 A4 对孢子萌发均有很强抑制效果,盆栽实验也证明这 2 种细菌的确能够缓解大豆疫霉孢子给种子萌发及幼苗生长带来的危害。更为重要的是,初步形态学观察显示, A2 和 A4 是 18 株对大豆疫霉菌丝生长具有抗性作用的菌株中分离量较大的,是该大豆品种的优势内生菌菌株,这保证了筛选得到的细菌在后续试验及应用中发挥抗病效果的剂量效应;而且,很可能正是由于这些内生细菌的存在,才使得

宿主大豆植株未感染大豆疫霉根腐病。在后续研究中,可以通过大田试验重点研究 A2 和 A4 菌株在自然条件下对大豆疫霉根腐病的防治效果,为该病的生物防治提供可行的方案。

参考文献

- [1] Tyler B M. *Phytophthora sojae*: root rot pathogen of soybean and model oomycete[J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(1): 1-8.
- [2] 沈崇尧, 苏彦纯. 中国大豆疫霉菌的发现及初步研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 298. (Shen C Y, Su Y C. Discovery and preliminary studies of *Phytophthora megasperma* on soybean in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1991, 21(4): 298.)
- [3] 苏彦纯, 沈崇尧. 大豆疫霉菌在中国的发现及其生物学特性的研究[J]. 植物病理学报, 1993, 23(4): 341-347. (Su Y C, Shen C Y. The discovery and biological characteristics studies of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* on soybean in China[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1993, 23(4): 341-347.)
- [4] 张国栋. 大豆疫霉根腐病[J]. 植物病理学报, 1998, 28(3): 193-200. (Zhang G D. *Phytophthora* root rot of soybean[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1998, 28(3): 193-200.)
- [5] 左豫虎, 臧忠婧, 韩文革, 等. 影响大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)卵孢子萌发的条件[J]. 大豆科学, 2002, 21(2): 101-106. (Zuo Y H, Zang Z J, Han W G, et al. Studies on germination condition of oospores of *Phytophthora sojae* [J]. Soybean Science, 2002, 21(2): 101-106.)
- [6] Dorrance A E, Schmitthenner A F. New sources of resistance to *Phytophthora sojae* in the soybean plant introductions[J]. Plant Disease, 2000, 84(12): 1303-1308.
- [7] Weller D M. Biological control of soil-borne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria[J]. Annual Review of Phytopathology, 1988, 26: 379-407.
- [8] 张淑梅, 沙长青, 王玉霞, 等. 大豆内生细菌的分离及根腐病拮抗菌的筛选鉴定[J]. 微生物学通报, 2008, 35(10): 1593-1599. (Zhang S M, Sha C Q, Wang Y X, et al. Isolation and characterization of antifungal endophytic bacteria from soybean[J]. Microbiology, 2008, 35(10): 1593-1599.)
- [9] 李春杰, 许艳丽, 李兆林, 等. 大豆根腐病菌拮抗细菌筛选及抗生作用[J]. 大豆科学, 2004, 23(3): 174-177. (Li C J, Xu Y L, Li Z L, et al. Screening of antagonistic bacteria against pathogenic fungus of soybean root rot and their biocontrol efficiency[J]. Soybean Science, 2004, 23(3): 174-177.)
- [10] 黄珊珊, 韩雪, 李丽璐, 等. 大豆根腐病生防菌株的筛选及鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(10): 6-10. (Huang S S, Han X, Li L J, et al. Screening and identification of biocontrol strains against soybean root rot[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(10): 6-10.)
- [11] 吕慧颖, 孔凡江, 杨庆凯, 等. 大豆疫霉根腐病菌游动孢子的产生因素[J]. 植物病理学报, 2002, 32(2): 190-191. (Lu H Y, Kong F J, Yang Q K, et al. Factors affecting zoospores production by *Phytophthora megasperma* var. *sojae* [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2002, 32(2): 190-191.)
- [12] 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.
- [13] Haas D, Defago G. Biological control of soil-borne pathogens by *Pseudomonas fluorescens* [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3(4): 307-319.
- [14] Berger F, Li H, White D, et al. Effect of pathogen inoculum, antagonist density, and plant species on biological control of *phytophthora* and pythium damping-off by *Bacillus subtilis* Cot1 in high-humidity fogging glasshouses[J]. Phytopathology, 1996, 86(5): 428-433.

(上接第 84 页)

- [4] 陈怀珠, 孙祖东, 杨守臻, 等. 荫蔽对大豆主要性状的影响及大豆耐荫性鉴定方法研究初报[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(4): 78-82. (Chen H Z, Sun Z D, Yang S Z, et al. Effect of shading on major characters of soybean and preliminary study on the identification method of soybean shade endurance [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2003, 25(4): 78-82.)
- [5] 李初英, 孙祖东, 陈怀珠, 等. 不同遮光胁迫对大豆产量性状及产量的影响[J]. 大豆科学, 2006, 25(3): 294-298. (Li C Y, Sun Z D, Chen H Z, et al. Study of the influence of shading stress to yield and yield characters of soybean [J]. Soybean Science, 2006, 25(3): 294-298.)
- [6] 李初英, 孙祖东, 陈怀珠, 等. 不同遮光胁迫对大豆生长发育进程及形态性状的影响[J]. 中国农学通报, 2006, 22(9): 170-173. (Li C Y, Sun Z D, Chen H Z, et al. Study of the influence of shading stress to the development stages and the form characters of soybean [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(9): 170-173.)
- [7] 盖钧镒. 作物育种学各论[M]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 262-265. (Gai J Y. The theory of crop breeding[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006: 262-265.)