

内生放线菌 SG2 与生防放线菌 SC11 融合菌株的筛选

宋 春,刘 亮,任太军,宗兆锋

(西北农林科技大学 植保学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] **【目的】**提高生防放线菌对枯、黄萎病的防治效果。**【方法】**运用原生质体融合技术,对内生放线菌 SG2 和生防放线菌 SC11 进行融合,测定了融合菌株对尖镰孢西瓜专化型和大丽轮枝菌的抑菌效果,并测定了其内生性和产多胺的能力。**【结果】**获得了 G-C1—G-C18 共 18 株形态特征和菌落颜色与亲本菌株有差异、遗传性状稳定的融合菌株,其中 G-C1、G-C2、G-C8、G-C10、G-C11、G-C12、G-C16 和 G-C18 等 8 株融合菌株对大丽轮枝菌的抑菌率均 $\geq 70\%$, G-C12 和 G-C8 对尖镰孢西瓜专化型的抑菌率均 $> 75\%$ 。融合菌株分泌物的抑菌效果均有所降低。融合菌株 G-C1、G-C2、G-C10、G-C11、G-C12 和 G-C16 继承了亲本 SG2 的内生性;上述 8 株融合菌株均继承了双亲产生多胺的特性。**【结论】**实现了植物内生放线菌和土壤中生防放线菌的原生质体融合,为枯、黄萎病的生物防治奠定了基础。

[关键词] 内生放线菌;生防放线菌;原生质体融合;尖镰孢西瓜专化型;大丽轮枝菌

[中图分类号] S476

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2009)09-0065-06

Screening of recombinants of endophytic actinomycetes SG2 and biocontrol actinomycetes SC11

SONG Chun, LIU Liang, REN Tai-jun, ZONG Zhao-feng

(Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, College of Plant Protection,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study was to improve the effect of the biocontrol actinomycetes against the verticillium wilt and fusarium wilt. **【Method】** The protoplast fusion to fuse the endophytic actinomycetes SG2 and the biocontrol actinomycetes SC11 was used. **【Result】** Eighteen recombinants were isolated based on the morphological character, color of colony and stabilization characteristics of genetics, and determined their inhibition, the difference between the volume of secretions, as well as the endophytic character and the capacity of producing polyamines. The eight recombinants G-C1, G-C2, G-C8, G-C10, G-C11, G-C12, G-C16 and G-C18 had obvious inhibiting effects ($\geq 70\%$) on *Verticillium dahliae*. The strain G-C12 and G-C8 had obvious inhibiting effects ($> 75\%$) on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. But the recombinants reduced the volume of secretions. Recombinants G-C1, G-C2, G-C10, G-C11, G-C12 and G-C16 were isolated from two different plants and also could produce polyamines. The parents' endophytic character and producing polyamines were maintained by eight recombinant strains. **【Conclusion】** Apparently, this study has achieved the proteplast fusion between endophytic actinomycetes and biocontrol actinomycetes, and has become one of the most promising alternatives in controlling the verticillium wilt and fusarium wilt.

Key words: endophytic actinomycetes; biocontrol actinomycetes; protoplast fusion; *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; *Verticillium dahliae*

* [收稿日期] 2009-01-07

[基金项目] 教育部创新团队发展计划项目(200558);国家高等学校学科创新引智计划项目(B07049);西北农林科技大学创新团队项目

[作者简介] 宋 春(1981—),女,山东临沂人,在读硕士,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:songchun0227@163.com

[通信作者] 宗兆锋(1956—),男,陕西泾阳人,教授,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:zfzong@nwsuaf.edu.cn

植物枯、黄萎病是当前病害防治的一大难题,直接利用从自然界中分离筛选出的放线菌对其进行生物防治,效果并不理想,因此需要对这些放线菌进行人工改良。目前,对生防放线菌菌种改良的方法主要有自然选育、诱变育种和基因工程方法,但这些方法均存在一定的缺陷,如自然选育自发突变率低,筛选周期长;诱变育种工作量大,盲目性大;基因工程则要求具备高精尖的仪器设备,且要对试验菌株的详细遗传背景进行研究,一般实验室很难具备这些研究条件^[1]。原生质体融合技术简单易行,融合重组频率高,不受亲缘关系影响,可实现种间、属间及更远缘基因的交流^[2-3],是现阶段菌种改良的有效方法之一,在微生物育种和病虫害防治^[4]方面应用广泛。

目前,放线菌的原生质体融合主要是普通放线菌之间的融合^[2]。基于植物内生放线菌在植物中定殖可增强寄主抗病性和提高植物产量等优点^[5],本研究将内生放线菌 SG2 与具有较强拮抗作用的生防放线菌 SC11^[6-7] 进行融合,并测定了融合菌株对尖镰孢西瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*) 和大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 的抑菌效果,以期得到对枯、黄萎病具有更好防效的放线菌。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株植物内生放线菌 SG2 和生防放线菌 SC11,靶标菌西瓜枯萎病病原真菌尖镰孢西瓜专化型和茄子黄萎病病原真菌大丽轮枝菌,均由西北农林科技大学植保学院病害生物防治实验室提供。

1.2 原生质体的融合

1.2.1 原生质体的制备 取供试菌株 SG2 和 SC11 孢子悬浮液各 0.2 mL,分别添加到装有 25 mL 菌丝培养液的三角瓶中,在 25 ℃、150 r/min 条件下恒温摇床培养 48 h,转接入含有 0.5% Gly 和 30% 蔗糖的菌丝培养液^[8]中,继续培养 48 h。取培养物反复洗涤离心,收集菌丝体,SG2 中加溶菌酶和蜗牛酶混合酶液(质量比 1:1),SC11 中加溶菌酶液,35 ℃ 水浴中酶解。用差速离心法除去未酶解菌丝,然后 3 000 r/min 离心 10 min,沉淀原生质体。最后将原生质体悬于磷酸缓冲液中^[9-12]。

1.2.2 原生质体的灭活 将已制备好的原生质体分别进行热灭活和紫外灭活^[13],以不做任何灭活处

理的为对照。

1.2.3 原生质体的融合与再生 将上述处理过的双亲原生质体悬液相互两两等量混合,离心,使原生质体沉降;加入 2 mL 400 g/L 的 PEG6000,35 ℃ 水浴融合;以磷酸缓冲液中止融合,并将原生质体重新悬浮,涂布于再生平板上,28 ℃ 恒温培养 5~6 d,使其再生^[14]。

1.3 融合菌株的筛选

1.3.1 融合菌株的获得 根据菌落特征,在再生培养基上初选与亲本菌株菌落形态或颜色不同的菌落作为融合菌株,进行 7 次继代培养,选出性状稳定的融合菌株。

1.3.2 融合菌株的初筛 用平板对峙法^[15]测定融合菌株及其亲本对 2 种靶标菌的皿内抑菌效果,以只接种靶标菌为对照,每处理重复 3 次。测量抑菌圈大小,计算抑制率,对融合菌株进行初筛。

$$\text{抑制率}/\% = (1 - \frac{\text{处理菌落半径}}{\text{对照菌落半径}}) \times 100\%$$

1.3.3 发酵液及其滤液抑菌作用的测定 分别将融合菌株接种于 SNB 发酵液中摇床培养 7 d,得其发酵液。将发酵液差速离心,取上清液,经细菌过滤器过滤,获得发酵滤液。将靶标菌的孢子悬浮液涂布在 PDA 平板上,在距平板中心 25 mm 处对称打孔($\Phi=5$ mm),将融合菌株的发酵液及发酵滤液分别注入孔内,于 28 ℃ 培养,2 d 后测定抑菌圈大小。以只接种亲本菌株为对照,每处理重复 3 次。

1.3.4 融合菌株内生性的测定 用浸种法和灌根法^[7]对西瓜和茄子 2 种植物接种融合菌株发酵液,温室培养,20 d 后取接种植物的根、茎、叶组织进行分离,以确定是否含有融合菌株,每处理重复 3 次。

1.3.5 融合菌株产多胺能力的测定 在产多胺鉴别培养基上划线接种融合菌株及其亲本,于 28 ℃ 恒温培养,以不接种为对照,每处理重复 3 次。5~7 d 后,观察培养基颜色的变化,用 Imagine-Pro Plus 软件进行图片颜色统一量化^[16]分析,从而确定融合菌株是否保持产生多胺的特性。

2 结果与分析

2.1 融合菌株的获得

由于供试菌株经过紫外灭活和热灭活后失去再生能力,而获得的融合菌株与亲本菌株又有明显不同,因此,可根据再生培养基上菌落的颜色、形态等特征筛选融合菌株。通过原生质体融合共获得 18

株与双亲培养特征不同、遗传性状稳定的融合菌株， 结果见表 1。

表 1 18 株融合菌株的菌落特征

Table 1 Colony characters of the eighteen recombinant strains

菌株 Strain	菌落形态 Colony character	气生菌丝颜色 Colony colour	基内菌丝颜色 Pigment in medium	产孢量 Production of spores
SG2	辐射状,表面粉状	象灰色	中灰驼色	+++
	Radiate with powdery surface	Grey	Camel	
SC11	辐射状,中间突起	粉白色	玫瑰粉	++
	Radiate with central salience	Albino white	Rosy pink	
G-C1	辐射状,中间平坦	蜚白	灰白	+++
	Radiate without central salience	White like cocoon	Greyish white	
G-C2	辐射状,表面粉状	白皮松绿	满江红	++++
	Radiate with powdery surface	Green like bungeana	Azolla color	
G-C3	圆形,表面粗糙	中灰驼色	金黄色	+++
	Round with coarse surface	Medium grey	Yellow like golden	
G-C4	圆形,中间突起	莲子白	乌贼灰色	+++
	Round with central salience	White like lotus seed	Grey like cuttlefish	
G-C5	圆形,表面粗糙	灰白	砚灰色	+++
	Round with coarse surface	Greyish white	Grey like inkstone	
G-C6	辐射状,表面粉状	白色	灰白	++
	Radiate with powdery surface	White	Greyish white	
G-C7	圆形,表面粗糙	白色	莲子白	+++
	Round with coarse surface	White	White like lotus seed	
G-C8	辐射状,中间突起	荔肉白	象牙黄	+
	Radiate with central salience	White like lai meat	Yellow like ivory	
G-C9	辐射状,中间突起	白色	豆汁黄色	+++
	Radiate with central salience	White	Yellow like juice	
G-C10	圆形,表面粉状	灰白	橄榄石灰	++++
	Round with powdery surface	Greyish white	Gray like peridot	
G-C11	辐射状,表面粉状	象灰	珠母灰	+++
	Radiate with powdery surface	Gray	Gray like bead	
G-C12	辐射状,中间突起	白色	莲子白	+
	Radiate with central salience	White	White like lotus seed	
G-C13	辐射状,表面粉状	田鼠灰色	大理石灰色	++++
	Radiate with powdery surface	Murine	Grey like marble	
G-C14	圆形,表面粉状	黄昏灰色	灰蓝色	+++
	Round with powdery surface	Dark grey	Bice	
G-C15	圆形,中间突起	白皮松绿	淡棕色	+++
	Round with central salience	Green like bungeana	Light brown	
G-C16	辐射状,表面粉状	银鼠灰	苏木紫	++++
	Radiate with powdery surface	Silver gray	Purple like brazilwood	
G-C17	圆形,中间突起	乌贼灰色	淡棕色	+++
	Round with central salience	Grey like cuttlefish	Light brown	
G-C18	圆形,表面粗糙	白色	豆汁黄	+
	Round with coarse surface	White	Yellow like juice	

注:+.产孢较少;++.产孢中等;+++.产孢较多;++++.大量产孢。
Note:+. Indicates number of sporulation are few;++. Indicates number of sporulation are moderate;+++. Indicates number of sporulation are many;++++. Indicates number of sporulation are more.

2.2 融合菌株的初筛

由表 2 可见 ,大部分融合菌株对靶标病原真菌的抑制率介于 2 个亲本之间,同一融合菌株对不同靶标病原真菌的抑菌效果不同,不同融合菌株对同一靶标病原真菌的抑菌效果差异也较大。18 株融合菌株中,55.6%的融合菌株对尖镰孢西瓜专化型的抑制率超过亲本 SG2 ,对大丽轮枝菌有较强抑制作用且抑制率超过 SG2 的融合菌株占 83.3%;融合菌株 G-C12 和 G-C8 抑菌效果表现突出,对 2 种靶

标病原真菌的抑制率均超过 75%。可见融合菌株不仅继承了亲本较强的抑菌作用,部分还超过了亲本。另外,部分融合菌株对 1 种或 2 种靶标病原真菌均无抑制作用,这可能是由于融合菌株丧失了亲本的某一性状。

本研究以融合菌株对 1 种或 2 种靶标病原菌抑制率≥70% 为标准,筛选出 G-C1、G-C2、G-C8、G-C10、G-C11、G-C12、G-C16 和 G-C18 共 8 株融合菌株用于进一步研究。

表 2 融合菌株及其亲本对靶标病原真菌的抑菌效果

Table 2 Inhibiting effects of the recombinant strains on the target pathogens

%

菌株 Strain	尖镰孢西瓜专化型 <i>F. oniveum</i>	大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	菌株 Strain	尖镰孢西瓜专化型 <i>F. oniveum</i>	大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>
SG2	28.3	47.8	G-C9	0	44.4
SC11	72.8	77.2	G-C10	22.8	70.0
G-C1	39.9	70.0	G-C11	0	76.1
G-C2	47.2	70.0	G-C12	89.4	87.2
G-C3	41.1	68.3	G-C13	23.3	61.7
G-C4	32.2	0	G-C14	0	60.6
G-C5	42.8	62.2	G-C15	0	0
G-C6	52.2	54.4	G-C16	0	71.1
G-C7	30.6	55.6	G-C17	0	63.3
G-C8	76.1	83.3	G-C18	59.7	82.8

注:供试菌株对尖镰孢西瓜专化型的抑菌效果为接种病原菌饼后 7 d 测量,大丽轮枝菌抑菌效果为接种后 11 d 测量。
Note:Inhibiting effects of the strains to *F. oniveum* was measured in 7th day after inoculating,and inhibiting effects of the strains to *V. dahliae* was measured in the 11th day.

2.3 融合菌株发酵液及发酵滤液的抑菌效果

为了确定融合菌株的分泌物有无变化,本研究测定了融合菌株发酵液及发酵滤液对 2 种靶标病原真菌的抑菌效果,结果见表 3。由表 3 可知,入选 8 株融合菌株的发酵液对 2 种靶标病原真菌均有一定的抑制作用,但发酵滤液的抑菌作用差异很大:融合菌株 G-C2、G-C8、G-C11、G-C12、G-C16 和 G-C18

的发酵滤液对尖镰孢西瓜专化型无抑制作用,G-C1 和 G-C10 的抑制圈直径小于亲本 SC11;除 G-C18 外,入选融合菌株的发酵滤液对大丽轮枝菌均无抑制作用,菌株 G-C18 的抑制圈直径小于亲本 SC11。由此可以推断,入选融合菌株分泌物的抑菌效果基本上均有所降低,且不同融合菌株之间存在一定的差异。

表 3 融合菌株及其亲本发酵液、发酵滤液对靶标病原真菌的抑菌作用

Table 3 Inhibition effects of the ferment broth and filtrate of the recombinant strains on two target pathogens mm

菌株 Strain	尖镰孢西瓜专化型 <i>F. oniveum</i>		大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	
	发酵液 FB	发酵滤液 FT	发酵液 FB	发酵滤液 FT
SG2	12.0	0	24.5	0
SC11	15.5	12.8	32.1	15.3
G-C1	12.7	12.0	20.3	0
G-C2	12.1	0	18.9	0
G-C8	12.6	0	20.2	0
G-C10	11.8	12.0	20.0	0
G-C11	11.2	0	19.1	0
G-C12	10.9	0	21.4	0
G-C16	12.8	0	28.0	0
G-C18	11.4	0	19.4	12.5

2.4 融合菌株的内生性

鉴于融合菌株亲本之一 SG2 具有内生性,本研究测定了融合菌株的内生性。由表 4 可以看出,G-C1、G-C2、G-C10、G-C11、G-C12 和 G-C16 等 6 株融合菌株继承了亲本 SG2 的内生特性,其中融合菌株

G-C1、G-C2、G-C10、G-C11 和 G-C16 可以从 2 种植物根中同时分离得到,且根部较茎部多,叶部未分离出,说明融合菌株继承了 SG2 的强定殖能力,且能够在植物组织中运转。

表 4 融合菌株对西瓜和茄子植物组织的定殖能力

Table 4 Colonization ability of the eight recombinant strains in watermelon and eggplant tissue

供试作物 Test plant	根组织 Root tissue	茎组织 Stem tissue
西瓜 Watermelon	G-C1,G-C2,G-C10,G-C11,G-C16,	G-C1,G-C11,G-C16
茄子 Eggplant	G-C1,G-C2,G-C10,G-C 11,G-C12,G-C16	G-C1,G-C2,G-C10,G-C12,G-C16

2.5 融合菌株产多胺的能力

多胺包括精胺、亚精胺、腐胺,广泛存在于放线

菌中,是一种具有生物活性的低分子质量脂肪族含氮碱,在植物生长发育过程中具有广泛的生理作用。

多胺可以使鉴别培养基的红色加深,因此根据融合菌株在鉴别培养基上的颜色变化,可以判断是否产生多胺,根据颜色变化的程度,可以判断产生多胺量的变化。

从图 1 可知,融合菌株的 r 值与 CK 差别明显(r 值越小,红色越深),说明融合菌株均继承了亲本

菌株产多胺的特性;从颜色变化程度看,融合菌株 G-C8、G-C16 和 G-C18 的 r 值均低于其任一亲本 SG2 和 SC11,说明产生多胺较多。本研究根据培养基的颜色变化判断是否产生多胺,根据颜色的深浅说明多胺的含量不同,但详细的含量值还有待于进一步测定。

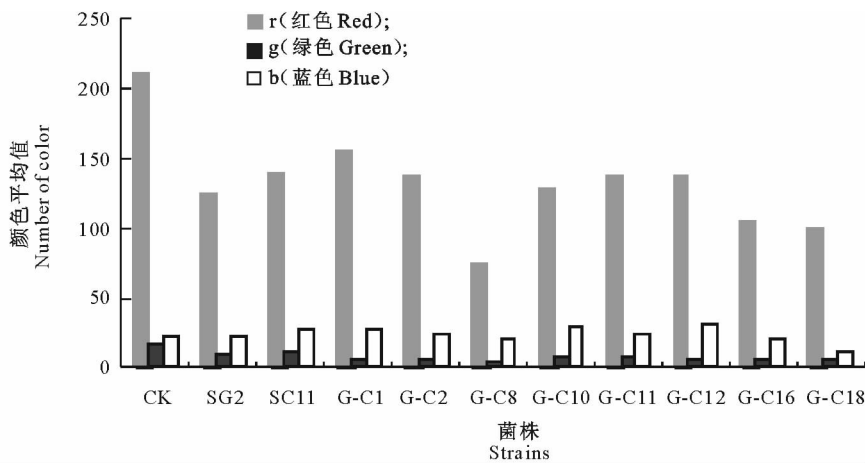


图 1 融合菌株产多胺的能力
Fig. 1 Ability of producing Polyamines of the recombinant strains

3 结论与讨论

本研究用不同的原生质体灭活方式,按常规方法^[8-10]将现有的植物内生放线菌 SG2 和土壤生防放线菌 SC11 进行融合,以再生菌株对靶标菌的抑制作用为筛选指标,共获得 8 株对 1 种或 2 种靶标菌抑制率 $\geq 70\%$,且对大丽轮枝菌抑菌率均高于亲本 SG2 的融合菌株。此 8 株融合菌株继承了 2 个亲本产多胺的特性及 SC11 较强的抑菌活性,大部分还继承了亲本 SG2 的内生特性。可见,用内生放线菌和普通放线菌进行融合来改良生防放线菌是可行的,用原生质体融合方法来提高放线菌对枯、黄萎病菌的抑制作用也是可行的。

利用生防放线菌防治枯、黄萎病等土传病害的关键是生防放线菌能否在植物根际定殖,生防放线菌在根际的定殖受许多环境因素的影响,如土壤 pH 值、矿质营养、含水量、土壤微生物的种类以及植物种类等。本研究中,融合亲本 SG2 为内生放线菌,具有稳定的生存环境,可定殖于寄主植物体内,占据有利的生防位置,避免与外界环境中的微生物直接竞争^[5],从而更好的发挥其生防作用。可见,内生放线菌在原生质体融合及土传病害生物防治领域具有广泛的应用前景,会越来越受到重视,这将会为生物防治的进一步发展提供新依据、新途径。

〔参考文献〕

[1] 史晓昆,王秀然,刘东波. Genome shuffling 技术在微生物遗传育种中的应用 [J]. 农业与技术, 2005, 25(1): 145-147.
Shi X K, Wang X R, Liu D B. Genome shuffling accelerate the process of microbial breeding [J]. Agriculture & Technology, 2005, 25(1): 145-147. (in Chinese)

[2] 刘 秋, 吴元华, 于基成, 等. 链霉菌原生质体融合技术研究进展 [J]. 沈阳农业大学学报, 2002, 33(5): 383-386.
Liu Q, Wu Y H, Yu J C, et al. Protoplast fusion in *Streptomyces* and its reseach prospect [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2002, 33(5): 383-386. (in Chinese)

[3] Kieser T, Bibb M J, Hopwood D A, et al. Practical *Streptomyces* genetics [M]. Norwisch, United Kingdom: The John Innes Foundation, 2000.

[4] 朱河水, 刘记强, 杨国宇, 等. 原生质体融合技术的应用 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(5): 131-132.
Zhu H S, Liu J Q, Yang G Y, et al. Application of protoplast fusion technology [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2007, 35(5): 131-132. (in chinese)

[5] 梁亚萍, 宗兆锋, 马 强. 6 株野生植物内生放线菌防病促生作用的初步研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(7): 131-136.
Liang Y P, Zong Z F, Ma Q. Inhibiting and promoting effect on plants of six strains endophytic actinomycetes isolated from wild plants [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(7): 131-136. (in Chinese)

[6] 宗兆锋, 郭小芳, 韩立荣, 等. 诱捕分离土壤中的生防放线菌 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(11): 19-22.

- Zong Z F, Guo X F, Han L R, et al. Traping and isolation of biocontrol actinomycetes from soil [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2004, 32(11): 19-22. (in Chinese)
- [7] 郭小芳, 宗兆锋, 杨洪俊. 6 种放线菌的抗药性标记和在植物体内定殖能力测定 [J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 69-73.
Guo X F, Zong Z F, Yang H J. Resistance tag of 6 strains of actinomycetes and their colonized ability in plants [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2005, 14(2): 69-73. (in Chinese)
- [8] 皇甫张娟, 顾彪, 宗兆锋. 生防放线菌原生质体融合条件研究 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(4): 109-114.
Huangfu Z J, Gu B, Zong Z F. Studies on protoplast fusion between strain of F46 and strain of SC1, SC11 [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2007, 35(4): 109-114. (in Chinese)
- [9] 刘冰, 宗兆锋, 王记侠. 重寄生链霉菌 F46 与生防放线菌 SC11 融合菌株的筛选 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34(3): 93-97.
Liu B, Zong Z F, Wang J X. Identification of recombinants of hyperparasitic *Streptomyces* F46 and biocontrol actinomycetes SC11 [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2006, 34(3): 93-97. (in Chinese)
- [10] 王记侠, 宗兆锋, 刘冰. 重寄生链霉菌 F46 与生防放线菌 SC1 融合子的筛选 [J]. 西北农业学报, 2005, 14(6): 125-127.
Wang J X, Zong Z F, Liu B. The fusants screen of hyperparasitic *Streptomyces* F46 and streptomycetes SC1 [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2005, 14(6): 125-127. (in Chinese)
- [11] 李祥镨, 安志东, 朱非. 林肯链霉菌双亲灭活原生质体融合的研究 [J]. 氨基酸和生物资源, 2001, 23(4): 24-27.
Li X K, An Z D, Zhu F. Study on fusion of biparental inactivated protoplast of *Streptomyces incolnensis* [J]. Amino Acids & Biotic Resources, 2001, 23(4): 24-27. (in Chinese)
- [12] 程骥, 洪文荣, 苏建章, 等. 黑暗链霉菌与卡那链霉菌原生质体融合研究 [J]. 福州大学学报: 自然科学版, 2003, 31(2): 111-115.
Cheng J, Hong W R, Su J Z, et al. Study on protoplast fusion between *Streptomyces tenebriarius* and *Streptomyces kanamyceticus* [J]. Journal of Fuzhou University: Natural Sciences Edition, 2003, 31(2): 111-115. (in Chinese)
- [13] Richard H, Baltz. Genetic recombination by protoplast fusion in *Streptomyces* [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 1999(22): 460-471.
- [14] Maria G C, José L L F, Galba M C T. Protoplast formation and regeneration from *Streptomyces clavuligerus* NRRL 3585 and clavulanic acid production [J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2002, 33: 347-351.
- [15] 宗兆锋, 乔宏萍, 何杞真. 2 株重寄生菌的分离和对靶标菌的抑制作用 [J]. 西北农业学报, 2002, 11(4): 1-4.
Zong Z F, Qiao H P, He Q Z. Isolation of 2 strains of hyperparasite and its inhibiting effects on target pathogens [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2002, 11(4): 1-4. (in Chinese)
- [16] 耿国华, 周明全. 常用色彩量化算法的性能分析 [J]. 小型微型计算机系统, 1998, 8(3): 47-49.
Geng G H, Zhou M Q. Characters analysis of current algorithms for colour quantization [J]. Mini-micro System, 1998, 8(3): 47-49. (in Chinese)