

海洋微藻活性物质对烟草青枯病原菌抑菌性研究

李小姣, 钟雪峰, 杜国英* (中国海洋大学海洋生命学院, 山东青岛 266003)

摘要 采用杯碟法, 选取3种海洋微藻: 2种硅藻(小新月菱形藻 *Nitzschia closterium* f. *minutissima*、三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornutum*)、1种绿藻(塔胞藻 *Pyramimonas* sp.), 测定了其石油醚和85%乙醇提取物对烟草青枯病的抗菌试验。结果表明, 塔胞藻的乙醇提取物抑菌性最强, 三角褐指藻的石油醚和乙醇提取物、新月菱形藻的石油醚和乙醇提取物也表现出一定的抑菌性, 而塔胞藻的石油醚提取物无抑菌活性。该研究为烟草病害生防制剂提供了新资源, 也为进一步研究微藻抗菌活性物质奠定了基础。

关键词 海洋微藻; 活性物质; 烟草青枯病; 抑菌性; 生物防治

中图分类号 S482.2⁺92 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)04-0131-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.04.036



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Antibacterial Activities of Three Marine Microalgae against Tobacco Wilt Pathogen (*Ralstonia solanacearum*)

LI Xiao-jiao, ZHONG Xue-feng, DU Guo-ying (College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003)

Abstract The antibacterial activities against tobacco wilt pathogen (*Ralstonia solanacearum*) were investigated on petroleum ether and ethanol extracts of three microalgae, two diatoms (*Nitzschia closterium* f. *minutissima* and *Phaeodactylum tricornutum*) and one green microalgae (*Pyramimonas* sp.). The cup assay method was employed to assess the antibacterial properties. The ethanol extracts from *Pyramimonas* sp. had the strongest antibacterial activities against tobacco wilt pathogen of all six extracts. The ethanol and petroleum ether extracts from *P. tricornutum*, and the ethanol and petroleum ether extracts from *N. closterium* inhibited the growth of pathogen bacteria. The petroleum ether extracts from *Pyramimonas* sp. did not show bactericidal activity against tobacco wilt pathogen.

Key words Microalgae; Active compounds; Tobacco bacterial wilt; Antibacterial activity; Biological control

自 Pratt 等^[1] 在小球藻中发现绿藻素(chlorellin)后, 海洋微藻生物活性物质在近几十年中得到越来越广泛的研究。研究表明, 很多微藻提取物和胞外产物具有抗菌性, 即抗细菌、抗真菌、抗原生动植物和抗疟原虫等^[2-6]。目前微藻中发现的具有抑菌性的物质为几大类化学物质, 包括多糖、吡啶类、萜烯类、乙酰胆碱类、酚类和脂肪酸类等^[7-10]。除多糖类外, 抗菌物质主要以脂肪酸复合物的形式存在, 如绿藻素和其他生物活性脂肪酸^[11]。雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)的加压乙醇提取物对革兰氏阴性菌大肠杆菌(*Escherichia coli*)和革兰氏阳性菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)具有抑菌性, 这也与短链脂肪酸即丁酸酐和甲基乳酸的结合有关^[12]。

烟草青枯病的病原菌为青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*), 其侵染的宿主范围广泛, 涵盖44个科植物^[13]。青枯病由青枯菌导致, 是田间作物中最具破坏性、最严重以及传播最广泛的细菌性病害之一^[13-14]。烟草青枯病因其控制的难度大, 也被称作烟草的癌症^[15-16]。生物防治作为一种病害治理策略, 由于其亲环境、环保, 因而具有良好的应用前景。生物的抗菌活性通常来源于通过稳定或不稳定的毒性代谢物, 以这些抗性物质直接杀死病原为主要作用机制^[17-18]。目前, 烟草青枯病的生物防治, 主要集中在利用无致病力菌株、真菌、噬菌体以及转基因植物等方面^[19-20]。

我国已有微藻提取物抗菌性的研究^[21-22], 并有微藻大量培养和活性物质提取的跟进技术研究^[23-25]。因此, 作为极有

发展潜力的生物资源, 微藻适用于筛选高效、低毒、低残留、生态环保的烟草病害抗菌剂。为此, 笔者研究3种海洋微藻的提取物对烟草青枯病菌的抑菌性。

1 材料与方法

1.1 微藻培养 3种海洋微藻: 2种硅藻(小新月菱形藻 *Nitzschia closterium* f. *minutissima*、三角褐指藻 *Phaeodactylum tricornutum*)、1种绿藻(塔胞藻 *Pyramimonas* sp.) (图1), 由海洋生物种质库(MBCC, 中国科学院海洋研究所, 青岛)提供, 采用半连续培养法培养。因为微藻生长快速及其脂质成分含量相对较高, 3种微藻根据各自特性采用不同培养条件(表1), 经3d缺氮条件(培养基去除氮营养元素)培养, 以促进脂质转化。

1.2 提取物制备 培养微藻经离心收集后, 进行真空冷冻干燥(ALPHA 1-4, 德国 Christ)。冷冻干燥的藻粉超声破碎(200 W, 10 min, 3次(超声3 s, 间隔3 s))(GA92-IIID, 无锡上佳)。干燥并超声破碎的3种藻粉分别置于石油醚和85%乙醇中进行提取, 共6种提取物。提取物放入4℃冰箱2~3 h, 4 000 r/min, 离心10 min (UNIVERSAL 320R, 德国 Hettich)。上清液用旋转蒸发器干燥, 70%二甲基亚砜(DMSO, 最终浓度为50 mg/mL)溶解, 4℃条件下保存, 以备下一步抗菌试验使用。

1.3 供试菌 烟草青枯病病原菌(*Ralstonia solanacearum*)菌株从中国农业科学院烟草研究所获得, 4℃条件下, 牛肉膏蛋白胨琼脂培养基保存。菌悬液用 ddH₂O 溶解制备, 浓度为 2×10⁶~6×10⁶ mL。

1.4 抗菌试验 采用杯碟法测定抑菌性^[26]。在每个培养皿中, 用玻璃涂布棒将100 μL 的菌悬液涂布在琼脂平板上。放置4个牛津杯(Φ 8 mm×10 mm), 其中3个用于不同微藻提取溶剂, 1个加入70% DMSO溶液作为对照。每个杯中加

基金项目 山东省自然科学基金项目(ZR2011CM018); 国家自然科学基金项目(41276137)。

作者简介 李小姣(1995—), 女, 山东青岛人, 硕士研究生, 研究方向: 海洋藻类遗传学。*通信作者, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事藻类资源、藻类生理生态及分子生物学研究。

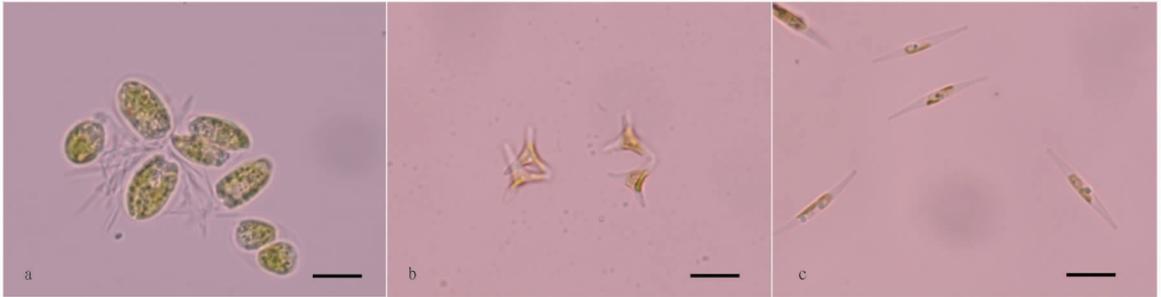
收稿日期 2020-06-29

入 150 μL 提取物或 DMSO 溶液, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后, 当牛津杯周围有明显的抑菌圈时, 测定其平均直径 (以 mm 为单位)。每种提取物设置 3 次重复。

2 结果与分析

3 种微藻的石油醚和乙醇提取物对青枯菌抑菌性的结果见图 2, 汇总数据见表 2。考虑到牛津杯外径为 8 mm, 为了

更好地表示抑菌圈的直径, Y 轴刻度从 8 开始。结果表明, 在 6 种提取物中, 塔胞藻的乙醇提取物对烟草青枯病原菌的抑菌性最强, 而其石油醚提取物的抑菌性最低。三角褐指藻的石油醚和乙醇提取物、新月菱形藻的石油醚和乙醇提取物表现出一定的抑菌性, 但二者无显著差异 ($P>0.05$)。



注: a. 塔胞藻, b. 三角褐指藻, c. 小新月菱形藻

Note: a. *Pyramimonas* sp., b. *Phaeodactylum tricornutum*; c. *Nitschia closterium* f. *minutissima*

图 1 试验藻种

Fig.1 Experiment microalgae species

表 1 3 种试验微藻培养条件

Table 1 Culture conditions of three microalgae

微藻种类 Microalgae species	温度 Temperature $^{\circ}\text{C}$	盐度 Salinity	光照 Illumination $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$	光暗周期 (L:D) Light and dark cycles	培养基 Culture medium	参考文献 References
塔胞藻 <i>Pyramimonas</i> sp.	25	35	100	12:12	f/2 培养液	[25]
三角褐指藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	15	30	80	12:12	f/2 培养液	[25]
小新月菱形藻 <i>Nitschia closterium</i> f. <i>minutissima</i> .	18	30	50	12:12	绿藻培养液	MBCC 配方

为比较不同提取物的抗菌活性, 抗菌试验以 70% DMSO 为最终溶剂。DMSO 溶剂本身具有一定的抑菌性, 70% DMSO 的抑菌圈直径为 (10.3 \pm 0.5) mm。因此, 根据抑菌圈直径大小, 进一步将抗菌活性等级定义为 (+) 低活性 (10~15 mm)、(++) 高活性 (15~20 mm) 以及 (-) 无活性 (<10 mm)。结果表明, 塔胞藻的乙醇提取物对烟草青枯病原菌的抑菌性为高活性, 而其石油醚提取物无抑菌活性。其余微藻的提取物在抑制病原菌的生长上表现为较弱的低活性。

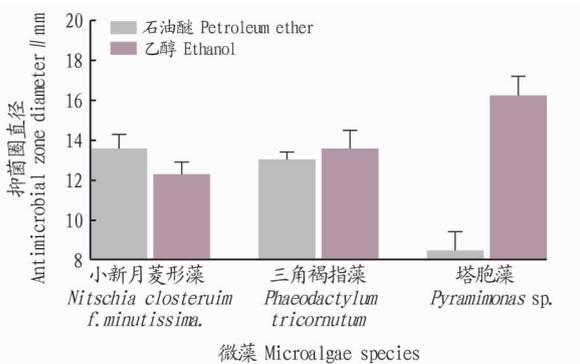


图 2 3 种微藻不同提取物对烟草青枯病原菌的抑菌圈直径

Fig.2 Diameter of inhibition halo of three microalgae against tobacco wilt pathogen

3 讨论

该研究发现, 硅藻 (小新月菱形藻、三角褐指藻) 和绿藻

表 2 3 种微藻提取物对烟草青枯病原菌的抑菌性

Table 2 Antibacterial activities of extracts from three microalgae against tobacco wilt pathogen

微藻 Microalgae species	提取溶剂 Extraction solvent	
	石油醚 Petroleum ether	85% 乙醇 85% ethanol
小新月菱形藻 <i>Nitschia closterium</i> f. <i>minutissima</i>	+	+
三角褐指藻 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	+	+
塔胞藻 <i>Pyramimonas</i> sp.	-	++

(塔胞藻) 的抑菌作用不同, 说明两类微藻的活性物质不同。首先两类微藻在色素组成和储存物质上不同, 除两者都含有叶绿素 a 外, 硅藻包含叶绿素 c1 和 c2、墨角藻黄素 (主要的类胡萝卜素), 以藻昆布多糖作为其储存物质, 而绿藻含叶绿素 b, 以淀粉作为其储存物质^[27]; 再者, 其抗细菌和抗真菌特性也不同^[28-29]。研究表明, 三角褐指藻的抑菌性来源于一些脂肪酸, 包括十二碳五烯酸、十六碳三烯酸和棕榈烯酸^[11,30]。从伞勒氏角毛藻中的超临界提取物的抗菌性也与其油脂组成有关^[31]。盐生杜氏藻的几个加压提取物中, 抗微生物活性不仅来自几种脂肪酸, 还来源于如 α 、 β 紫罗酮、 β 环柠檬醛新植二烯和叶绿醇等物质^[32]。江红霞等^[22] 研究表明, 塔胞藻属的一种娇柔塔胞藻其抗菌活性也主要来自其粗脂提取物中的苯洗脱组分。

另一方面,由于石油醚和乙醇的极性不同,即使二者都是脂溶性物质的有机溶剂,但它们从生物体内提取出的成分并不一致,分别以脂类和酚类为主。在该研究中,塔胞藻的乙醇提取物对烟草青枯病病原菌的抑菌性最强,而其石油醚提取物的抑菌性最弱;而对于 2 种硅藻,2 种溶剂之间的差异并不明显。这与江红霞等^[22]的研究结果较为一致,该研究表明娇柔塔胞藻的乙醚提取物对稻瘟病菌的抗菌活性最强,且其粗脂对供试 3 种植物病原菌都有一定的抗菌活性,但其他溶剂提取物抗菌活性表现均不明显。这表明不仅活性物质不同会造成不同的抑菌性,而且它们的提取方式对于其抗菌性的发挥也很重要^[33]。

二甲基亚砜(DMSO)经常被用作天然和合成的抗菌物质的溶剂。对于天然产物,使用不同极性溶剂得到的干燥提取物不容易再溶解,而且为了比较不同提取物的抗菌活性,通常使用 DMSO 作为抗菌试验的最终溶剂^[34]。然而,DMSO 本身在许多生物测定中也表现出一定的抗微生物作用^[35-36]。该研究做了 DMSO 对青枯菌的抑菌性预试验,DMSO 浓度设为 0~90%以 5%为梯度的浓度,结果表明,浓度 55%以下的 DMSO 无抑菌性,但 70%以下的 DMSO 溶解度较低。考虑到溶解性的需求为主,最终选择有较低抑菌性的 70% DMSO 作为溶剂进行抗菌试验。因此,鉴于不同生物对同一溶剂相同浓度的反应不同,生物测定试验需要先做溶剂最低可能浓度的预试验^[37]。

已有的生物防治,利用无致病力菌株、其他细菌、真菌、噬菌体以及转基因植物等则均有一定防治效果,但也存在不稳定性或其他负面作用^[19]。也有研究利用感染细菌病的土壤中的抗性微生物种群,通过体内和体外抗青枯病病原菌的测定,尝试生物防治青枯病^[38],但这些可能有效的微生物本身也会带来潜在的危害。活性物质可能是一种更为安全的生防制剂,但还需要针对病原菌从不同生物如微藻中进行筛选。海洋微藻生长快、周期短,还不占用陆上农用耕地,是很有潜力的活性物质的生物资源。该研究结果为今后的研究奠定了基础。

4 结论

该研究首次以青枯病病原菌为对象,筛选出易于大量培养且具有高抑菌活性物质的微藻。结果表明,塔胞藻的乙醇提取物对烟草青枯病病原菌的抑菌性最强,而其石油醚提取物对烟草青枯病病原菌无抑菌活性,小新月菱形藻、三角褐指藻 2 种硅藻的乙醇和石油醚提取物对烟草青枯病病原菌表现出一定的抑菌性。该研究结果对青枯病的生物防治具有一定的参考价值。

参考文献

[1] PRATT R H, DANIELS T C, EILER J J, et al. Chloroform, an antibacterial substance from *Chlorella* [J]. *Science*, 1944, 99(2574): 351-352.
 [2] 高亚辉. 海洋微藻分类生态及生物活性物质研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2001, 40(2): 566-573.
 [3] KELLAM S J, WALKER J M. Antibacterial activity from marine microalgae in laboratory culture [J]. *British phycollogical journal*, 1989, 24(2): 191-194.
 [4] PESANDO D. Antibacterial and antifungal activities of marine algae [M]// AKATSUKA I. Introduction to applied phycology. The Hague: SPB Academic Publishing, 1990, 3-26.

ic Publishing, 1990, 3-26.
 [5] KOKOU F, MAKRIDIS P, KENTOURI M, et al. Antibacterial activity in microalgae cultures [J]. *Aquaculture research*, 2012, 43(10): 1520-1527.
 [6] NAJDENSKI H M, GIGOVA L G, ILIEV I I, et al. Antibacterial and antifungal activities of selected microalgae and cyanobacteria [J]. *International journal of food science & technology*, 2013, 48(7): 1533-1540.
 [7] 陈晓清, 郑怡, 林雄平, 等. 紫球藻多糖的分离纯化及抗菌活性 [J]. 漳州师范学院学报(自然科学版), 2008, 21(2): 95-98.
 [8] CARDOZO K H, GUARATINI T, BARRIOS M P, et al. Metabolites from algae with economical impact [J]. *Comparative biochemistry and physiology part C: Toxicology & pharmacology*, 2007, 146(1/2): 60-78.
 [9] DESBOIS A P, SMITH V J. Antibacterial free fatty acids: Activities, mechanisms of action and biotechnological potential [J]. *Applied microbiology & biotechnology*, 2010, 85(6): 1629-1642.
 [10] PLAZA M, SANTOYO S, JAIME L, et al. Screening for bioactive compounds from algae [J]. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 2010, 51(2): 450-455.
 [11] SMITH V J, DESBOIS A P, DYRYNDA E A. Conventional and unconventional antimicrobials from fish, marine invertebrates and micro-algae [J]. *Marine drugs*, 2010, 8(4): 1213-1262.
 [12] SANTOYO S, RODRIGUEZ-MEIZOSO I, CIFUENTES A, et al. Green processes based on the extraction with pressurized fluids to obtain potent antimicrobials from *Haematococcus pluvialis* microalgae [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2009, 42(7): 1213-1218.
 [13] HE L Y, SEQUEIRA L, KELMAN A. Characteristics of strains of *Pseudomonas* sp. and other bacterial plant pathogens [J]. *Phytopathology*, 1983, 61: 1430.
 [14] 何明兴, 沈亮, 邱恒良, 等. 烟草青枯病的发生及防治 [J]. 现代农业科技, 2019(1): 111-112, 115.
 [15] AKIEW E, TREVORROW P R, TONELLO P E. Management of bacterial wilt of tobacco [M]// HARTMAN G L, HAYWARD A C. Bacterial wilt: The disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 1993: 270.
 [16] 王杰, 龙世芳, 王正文, 等. 番茄青枯病防治研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2020(1): 22-30.
 [17] DENNIS C, WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics [J]. *Transactions of the British mycological society*, 1971, 57(1): 25-39.
 [18] DENNIS C, WEBSTER J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics [J]. *Transactions of the British mycological society*, 1971, 57(1): 41-48.
 [19] 冯吉, 黎妍妍, 程玲, 等. 烟草青枯病的生物防治研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2016, 44(1): 203-205, 215.
 [20] 陈雪, 代园凤, 余祥文, 等. 烟草青枯病生物防治研究进展 [J]. 农业灾害研究, 2016, 6(5): 10-12.
 [21] 李侠, 郑法新, 程璐. 6 种海洋微藻提取物抑菌活性研究 [J]. 德州学院学报, 2007, 23(6): 61-64.
 [22] 江红霞, 雷红娟, 轩文娟. 11 种微藻提取物对 3 种植物病原菌抗菌活性的研究 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36(10): 4167-4169.
 [23] 宁修仁, 胡锡钢, 蔡显明, 等. 海洋微藻的大容量培养与生物活性物质开发技术 [J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2000, 30(2): 32-38.
 [24] 胡蓓娟, 王雪青, 姚领, 等. 从微藻中分离提取生物活性物质 [J]. 食品科学, 2006, 27(7): 264-269.
 [25] GUILLARD R R L, RYTHER J H. Studies of marine planktonic diatoms: I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran [J]. *Canadian journal of microbiology*, 1962, 8(2): 229-239.
 [26] TOBIE W C. Neomycin: Nature, formation, isolation, and practical application. Selman A. Waksman [J]. *The quarterly review of biology*, 1953, 29(3): 285-286.
 [27] LEE R E. *Phycology* [M]. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2018.
 [28] VISO A C, PESANDO D, BABY C. Antibacterial and antifungal properties of some marine diatoms in culture [J]. *Botanica marina*, 1987, 30(1): 41-46.
 [29] AMARO H M, GUEDES A C, MALCATA F X. Antimicrobial activities of microalgae: An invited review [J]. *Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances*, 2011, 3: 1272-1284.

数分别为 0.539 和 0.598; 穗粒数与实粒数呈极显著正相关, 与结实率和千粒重呈显著负相关, 相关系数分别为 0.953、-0.478 和 -0.567; 此外, 实粒数与千粒重也呈显著负相关, 相关系数为 -0.539。在高氮水平下, 穗长与穗粒数、实粒数呈极显著正相关, 相关系数分别为 0.731 和 0.778; 穗粒数与实粒数呈极显著正相关, 与结实率呈极显著负相关, 相关系数分别为 0.981 和 -0.588; 此外, 结实率与千粒重也呈极显著正相关, 相关系数为 0.704。

3 结论与讨论

氮是影响水稻生产和产量形成的最关键营养元素之一。筛选氮高效的水稻材料, 对于提高水稻氮肥利用率、降低氮肥用量、避免环境污染具有重要意义。氮高效型品种由于对氮素的利用效率更高, 因此在较低氮水平下能发生更多的分蘖, 成穗率和收获指数也高于中效型品种^[15-16]。张兆冬等^[17]研究表明, 两优 100 在氮水平较低的情况下, 可以获得更高的干物质积累量、分蘖数、氮肥农学利用率及氮肥偏生产力, 是氮高效品种。该研究结果表明, 参试材料在高氮肥水平下的生长及产量性状高于低氮肥水平, 除 SPAD 值外, 其他测定值差异均未达显著水平, 暗示参试材料可能为氮不敏感型材料, 有待于进一步研究。

研究表明, 合理地施入氮肥能够提高水稻功能叶的叶绿素含量, 进而增加干物质积累, 增加水稻产量^[18-19]。该研究结果表明, 参试材料叶片 SPAD 值随着氮肥使用量的增加呈逐渐增加趋势, 这一点与前人研究结果完全吻合。同时, 研究还发现在不同施氮量下, 叶绿素含量在分蘖盛期和抽穗期差异不显著, 但在成熟期, 2 个氮肥水平之间差异达极显著水平, 这也直接证明了氮肥施入量增加会导致水稻贪青晚熟的观点。

对穗部产量性状分析发现, 不同氮肥施用量对有效穗数、穗粒数和实粒数 3 个性状影响较大, 其变异系数均超过 10%。由此可知, 氮肥施用量的增加, 直接提高了参试梗稻的有效穗数、穗粒数和实粒数, 最终实现增产。然而, 考虑到环境和农业的可持续发展, 在减肥不减产的前提下, 筛选出氮高效的水稻品种, 提高氮肥利用效率将是下一步工作的

重点。

参考文献

- [1] FAO.FAO statistical databases [Z].Rome:Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, 2004.
- [2] 刘丹, 孙玉友, 柴永山, 等. 水稻氮高效基因型筛选及相关基因研究进展 [J]. 中国种业, 2018(10): 18-21.
- [3] FAN X R, TANG Z, TAN Y W, et al. Overexpression of a pH-sensitive nitrate transporter in rice increases crop yields [J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2016, 113(26): 7118-7123.
- [4] LI S, TIAN Y H, WU K, et al. Modulating plant growth-metabolism coordination for sustainable agriculture [J]. Nature, 2018, 560: 595-600.
- [5] WU K, WANG S S, SONG W Z, et al. Enhanced sustainable green revolution yield via nitrogen-responsive chromatin modulation in rice [J/OL]. Science, 2020, 367(6478) [2020-03-25]. https://science.sciencemag.org/content/367/6478/eaaz2046.DOI:10.1126/science.aaz2046.
- [6] ZHU G L, PENG S B, HUANG J L, et al. Genetic improvements in rice yield and concomitant increases in Radiation-and Nitrogen use efficiency in middle reaches of Yangtze River [J]. Scientific reports, 2016, 6: 1-12.
- [7] TANG W J, YE J, YAO X M, et al. Genome-wide associated study identifies NAC42-activated nitrate transporter conferring high nitrogen use efficiency in rice [J]. Nature communications, 2019, 10: 1-11.
- [8] GAO Z Y, WANG Y F, CHEN G, et al. The *indica* nitrate reductase gene *OsNR2* allele enhances rice yield potential and nitrogen use efficiency [J]. Nature communications, 2019, 10: 1-10.
- [9] 郑兴飞, 胡建林, 董华林, 等. 水稻氮高效利用相关基因的研究进展与展望 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(24): 1-4.
- [10] 刘晴, 刘宇强, 高世伟, 等. 黑龙江省第二积温带水稻新品种产量稳定性分析 [J]. 中国稻米, 2017, 23(2): 50-52.
- [11] 高世伟, 聂守军, 史淑春, 等. 黑龙江省第二积温带水稻产量性状分析 [J]. 中国稻米, 2016, 22(5): 44-47.
- [12] 薛英会, 李靖阳. 黑龙江省第二积温带水稻品种食味品质性状稳定性分析 [J]. 中国稻米, 2017, 23(5): 32-34, 37.
- [13] 王翠玲. 黑龙江省第二积温带水稻品种 (系) 耐冷性鉴定 [J]. 黑龙江农业科学, 2014(12): 1-3.
- [14] 韩龙植, 魏兴华. 水稻种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [15] 袁嫚嫚, 郭刚, 李若清, 等. 配方肥对早、晚稻的茎蘖动态、养分积累和产量的影响 [J]. 磷肥与复肥, 2015, 30(2): 43-45.
- [16] 孙志贵. 氮肥施用量对江汉平原机插水稻分蘖成穗及产量的影响 [D]. 荆州: 长江大学, 2019.
- [17] 张兆冬, 王家宝, 郭刚, 等. 不同水稻品种对施氮量的响应研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(13): 147-149.
- [18] 杨安中, 段素梅, 朱启升, 等. 孕穗肥氮用量对抛栽杂交中稻后期光合性能及产量的影响 [J]. 杂交水稻, 2011, 26(3): 68-70.
- [19] 刘丹, 孙玉友, 刘天生, 等. 氮肥水平对黑龙江省梗稻叶片 SPAD 值和产量性状的影响 [J]. 中国稻米, 2018, 24(S1): 6-11.
- [20] 张兆冬, 王家宝, 郭刚, 等. 不同水稻品种对施氮量的响应研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(13): 147-149.
- [21] 袁嫚嫚, 郭刚, 李若清, 等. 配方肥对早、晚稻的茎蘖动态、养分积累和产量的影响 [J]. 磷肥与复肥, 2015, 30(2): 43-45.
- [22] 孙志贵. 氮肥施用量对江汉平原机插水稻分蘖成穗及产量的影响 [D]. 荆州: 长江大学, 2019.
- [23] 张兆冬, 王家宝, 郭刚, 等. 不同水稻品种对施氮量的响应研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(13): 147-149.
- [24] 杨安中, 段素梅, 朱启升, 等. 孕穗肥氮用量对抛栽杂交中稻后期光合性能及产量的影响 [J]. 杂交水稻, 2011, 26(3): 68-70.
- [25] 刘丹, 孙玉友, 刘天生, 等. 氮肥水平对黑龙江省梗稻叶片 SPAD 值和产量性状的影响 [J]. 中国稻米, 2018, 24(S1): 6-11.
- [26] 张兆冬, 王家宝, 郭刚, 等. 不同水稻品种对施氮量的响应研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(13): 147-149.
- [27] 袁嫚嫚, 郭刚, 李若清, 等. 配方肥对早、晚稻的茎蘖动态、养分积累和产量的影响 [J]. 磷肥与复肥, 2015, 30(2): 43-45.
- [28] 孙志贵. 氮肥施用量对江汉平原机插水稻分蘖成穗及产量的影响 [D]. 荆州: 长江大学, 2019.
- [29] 张兆冬, 王家宝, 郭刚, 等. 不同水稻品种对施氮量的响应研究 [J]. 安徽农业科学, 2020, 48(13): 147-149.
- [30] WARD O P, SINGH A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production [J]. Process biochemistry, 2005, 40(12): 3627-3652.
- [31] MENDIOLA J A, TORRES C F, TORÉ A, et al. Use of supercritical CO₂ to obtain extracts with antimicrobial activity from *Chaetoceros muelleri* microalga. A correlation with their lipidic content [J]. European food research and technology, 2007, 224(4): 505-510.
- [32] HERRERO M, IBÁÑEZ E, CIFUENTES A, et al. Dunaliella salina microalga pressurized liquid extracts as potential antimicrobials [J]. Journal of food protection, 2006, 69(10): 2471-2477.
- [33] MOLINA GRIMA E, BELARBI E H, ACIÉN FERNÁNDEZ F G, et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: Process options and economics [J]. Biotechnology advances, 2003, 20(7/8): 491-515.
- [34] RANDHAWA M A. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the growth of dermatophytes [J]. Nippon ishinkin gakkai zasshi, 2006, 47(4): 313-318.
- [35] BASCH H, GADEBUSCH H H. In vitro antimicrobial activity of dimethylsulfoxide [J]. Applied microbiology, 1968, 16(12): 1953-1954.
- [36] ELOFF J N, MASOKO P, PICARD J. Resistance of animal fungal pathogens to solvents used in bioassays [J]. South African journal of botany, 2007, 73(4): 667-669.
- [37] WADHWANI T, DESAI K, PATEL D, et al. Effect of various solvents on bacterial growth in context of determining MIC of various antimicrobials [J]. The internet journal of microbiology, 2007, 7(1): 1-14.
- [38] LWIN M, RANAMUKHAARACHCHI S L. Development of biological control of *Ralstonia solanacearum* through antagonistic microbial populations [J]. International journal of agriculture and biology, 2006, 8(5): 657-660.

(上接第 133 页)