放线菌 PY-C-21 菌株鉴定及其活性产物的结构分析

赵三娥[1,2]，吴清平[1]，张菊梅[1]，吴克刚[2]，郭伟鹏[1]，吴军林[3]

（1.广东省微生物研究所省部共建华南应用微生物国家重点实验室，广东省菌种保藏与应用重点实验室，广东省微生物应用新技术公共实验室，广东广州 510070）（2.广东工业大学轻工化工学院食品工程与科学系，广东广州 510006）（3.广东环凯微生物科技有限公司，广东广州 510663）

摘要：拮抗性放线菌是开发高效安全食品生物防腐剂的基础。本研究从广州及其周边采集的土样中通过平板稀释法获得 190 株放线菌，分别采用琼脂块法和牛津杯定量扩散法进行初筛和复筛，然后通过 16S rDNA 序列分析，结合形态特征、培养特性和生理生化特性，对菌株 PY-C-21 进行鉴定。采用溶剂萃取法提取菌株 PY-C-21 发酵产物的活性成分，接着采用硅胶柱层析分离该菌株的粗提取物，再通过高效液相色谱、薄层色谱和制备色谱制备纯品化合物，采用气质比对法和高分辨质谱法等分析具有抑菌活性的单体化合物。结果表明，菌株 PY-C-21 具有稳定且广谱抗菌活性，并被鉴定为毒三素链霉菌（*Streptomyces toxytricini*），该菌株发酵产物的活性物质主要为邻苯二甲酸二丁酯、苯甲酸、2,2-亚甲基双（4-甲基-6-叔丁基苯酚）和邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯。

关键字：放线菌；鉴定；活性物质

文章篇号：1673-9078(2016)3-36-41 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.3.007

Identification of Actinomycete Strain PY-C-21 and Structural Analysis of Its Active Products

ZHAO San-e[1,2], WU Qing-ping[1], ZHANG Ju-mei[1], WU Ke-gang[2], GUO Wei-peng[1], WU Jun-lin[3]

(1.State Key Laboratory of Applied Microbiology Southern China, Guangdong Provincial Key Laboratory of Microbial Culture Collection and Application, Guangdong Open Laboratory of Applied Microbiology, Guangdong Institute of Microbiology, Guangzhou 510070, China) (2.Department of Food Science and Technology, School of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China) (3.Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Company Limited, Guangzhou 510663, China)

Abstract: Antagonistic actinomycetes are the important microbes for development of efficient and safe biological food preservatives. In this study, a total of 190 actinomycete strains were separated using the plate dilution method for soil samples collected from Guangzhou and its surrounding areas, and then preliminary screening and rescreening were conducted using the agar disc and Oxford cylinder diffusion methods, respectively. Strain PY-C-21 was identified by 16S rDNA sequence analysis, morphological and cultural characteristics, and physiological and biochemical characteristics. The active ingredients of the fermentation products from PY-C-21 were extracted using the solvent extraction method, and then the crude extracts of the PY-C-21 fermentation products were purified by silica gel column chromatography. The pure compounds were obtained by high-performance liquid chromatography, thin layer chromatography, and preparative chromatography, and monomeric compounds with antibacterial effects were analyzed by gas chromatography mass spectrometry, and high resolution mass spectrometry. The results showed that PY-C-21 possessed a stable and broad-spectrum antimicrobial activity, and was identified as *Streptomyces toxytricini*. The main active products in the fermentation products were identified as dibutyl phthalate, benzoic acid, phenol, 2,2′-methylenebis(6-*tert*-butyl-4-methylphenol), and bis(2-ethylhexyl) phthalate.

Key words: actinomycetes; identification; active products

目前，鉴于放线菌在自然界巨大的开发潜力，关于拮抗性放线菌的筛选、鉴定及其活性产物的结构鉴定等研究逐渐受到国内外学者的青睐，国内学者岳雷娜等[2]从广东湛江近海海泥中分离得到134株放线菌，得到活性菌株南-148，初步确定南-148菌株为弗氏链霉菌（*Streptomyces fradiae*）。国外学者Atika Meklat等

收稿日期：2015-05-11

基金项目：广东省自然科学基金项目(No. 2014A030313667)；广州市科技计划项目（201508020068）

作者简介：赵三娥（1988-），硕士研究生，主要从事抗菌活性物质产生菌筛选和产物结构鉴定

通讯作者：吴清平（1962-），研究员，博士生导师

[3]从撒哈拉沙漠中筛选到一株具抑菌活性的放线菌，经鉴定为*Actinopolyspora mortivallis*；Pachaiyappan Saravana Kumar等[4]从印度土壤中筛选到一株活性放线菌，鉴定为*Actinobacterium Loyola* VAS 10；杨立宾等[5]在哈茨木霉T28 发酵液提取物对致病疫霉的抑菌作用及有效成分的研究中，先提取发酵液中活性组分，通过GC-MS鉴定了活性组分的结构主要为邻苯二甲酸二丁酯等一系列化合物。Eun Hye Ryu等[6]从植物乳杆菌的发酵培养基中分离纯化抗真菌物质，固相萃取活性成分之后，再通过制备色谱进一步分离，结果分离得到3个活性单体物质分别为MW 214、MW 188、和MW 214。

近年来，筛选具抗菌活性放线菌和菌株产活性化合物的结构鉴定及发酵代谢调控研究成为本实验室的重要课题之一，Liu等[7]探究了ε-聚赖氨酸的生物合成及代谢调控，有助于提升对ε-聚赖氨酸生物合成的进一步认识，为ε-聚赖氨酸生物过程优化及控制提供了理论依据。此外，黄静敏等通过对Nishikawa的方法进行改进，在广东各地土样中筛选到一株产量为0.846 g/L的新ε-聚赖氨酸(ε-PL)产生菌株，命名为Str-8，对Str-8菌株进行形态、生理生化和16S rDNA分析，初步确定为不吸水链霉菌（*Streptomyces ahygroscopic*）[8]。同时袁林等通过分离筛选，共得到95株抗菌活性菌株，并复筛得到5株优良菌株，并对优良菌株GX-21进行鉴定，通过形态特征观察、培养特性观察、生理生化试验和16S rDNA序列分析，确定菌株GX-21为多产色链霉菌（*Streptomyces polychromogenes*）[9]。本研究通过采集广州及周边土壤，分离得到放线菌分离菌株，进行抗菌活性初筛和复筛之后，进一步结合形态特性、生理生化特性和16S rDNA序列分析，对产抗菌活性物质的菌株进行鉴定。同时通过TLC、HPLC、制备色谱和质谱等分析该菌株发酵液的活性物质结构，将进一步丰富抗菌活性物质产生菌菌种库和筛选广谱抗菌活性物质产生菌菌株，希望为研发高效、安全食品生物防腐剂提供新菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

按采样计划在广州番禺区、白云区和增城区的11个不同点采集土样64份，共分离放线菌190株。

指示菌均为由广东省微生物研究所分析检测中心提供的标准菌株。

细菌包括革兰氏阳性菌：金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)ATCC6538、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)ATCC9372；革兰氏阴性菌：大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)ATCC25922、变形杆菌(*Proteusbacillus vulgaris*)CMCC49027。

真菌：黑曲霉(*Aspergillus niger*) ATCC16404。

1.2 培养基

1.2.1 分离培养基

高氏一号琼脂培养基(g/L)：可溶性淀粉20，KNO_3 1，NaCl 0.5，K_2HPO_4 0.5，$MgSO_4$ 0.5，$FeSO_4$ 0.01，琼脂 20；pH 7.1~7.5；1×10^5 Pa灭菌20 min。

1.2.2 摇瓶培养基

高氏一号液体培养基(g/L)：可溶性淀粉20，KNO_3 1，NaCl 0.5，K_2HPO_4 0.5，$MgSO_4$ 0.5，$FeSO_4$ 0.01；pH 7；1×10^5 Pa灭菌15 min。

1.3 仪器设备

CJ-IFD 超净工作台（HDL APPARATUS）；高效液相色谱仪（METTLER-TOLEDO INTERN）；旋转蒸发仪（上海琪特分析仪器有限公司）；ES-215 全自动高压灭菌锅（TOMY KOGYO）；气相色谱-质谱联用仪（7890-5975C，美国 Agilent 科技有限公司）；GHP-9160 隔水式恒温培养箱（上海一恒科技有限公司）。

1.4 化学试剂

石油醚、丙酮、乙酸乙酯（AR：广州化学试剂厂）；二氯甲烷、甲醇（AR/HPLC：广州化学试剂厂）。

1.5 实验方法

1.5.1 放线菌的筛选与鉴定

分别采用琼脂块法和牛津杯定量扩散法筛选由平板稀释法分离得到的土壤放线菌，测定分离菌株的抑菌活性，再通过 16S rDNA 序列测定，构建系统发育树并分析其系统发育地位，结合形态特征、培养特性和生理生化特性确定菌株的分类地位。

1.5.2 发酵产物的提取与分离

发酵液的预处理采用离心去沉淀的方法，将发酵完全的20 L放线菌发酵液离心，8000 r/min，15 min，4 ℃，由于放线菌发酵产物中的活性物质大多为有机成分，所以粗分离采用有机萃取的方法，将已离心的上清液用有机溶剂萃取，过程分两步进行，首先利用乙酸乙酯将发酵液萃取两遍，尽量提取出极性小分子活性物质，接着再利用二氯甲烷重新萃取一遍，提取极性相对大点的活性物质。离心后的菌体用二氯甲烷和乙酸乙酯再充分溶解，合并上清液备用。

1.5.3 硅胶柱层析分离

先将萃取产物溶解于适量乙酸乙酯溶液中，通过反复点板，筛选最佳洗脱剂比例，但由于产物中物质种类过多，单一的洗脱剂很难将产物分离开，最终选择洗脱剂极性由弱到强的梯度洗脱法，将产物分离。

以石油醚与乙酸乙酯混合溶液作为初始流动相，柱层析硅胶（200～300 目）为固定相，使用湿法装柱，控制流动相流速在 1.5 mL/min，用试管收集产物，按点板情况选择不同极性洗脱剂，将不同产物分别收集干燥。

1.5.4 制备色谱法进一步纯化产物

由于过硅胶柱分离得到的化合物还掺有其他物质，所以，首先通过高效液相色谱分析粗产物的纯度，再根据分析纯度进行制备分离，进一步纯化产物。放线菌PY-C-21菌株发酵产物中活性化合物分离纯化流程图，如图1。

分析色谱条件：色谱型号：岛津LC-20A；色谱柱：Ultimate AQ-C18，4.6×250 nm，5 μm；流动相：甲醇:水=80:20；流量：1 mL/min。

制备色谱条件：色谱型号：岛津LC-20A；色谱柱：Ultimate AQ-C18，10×250 nm，5 um；柱箱温度：30 ℃；流动相：甲醇:水=80:20；流量：3.5 mL/min；压力：13.5 MPa；上样量：50~100 μL/针。

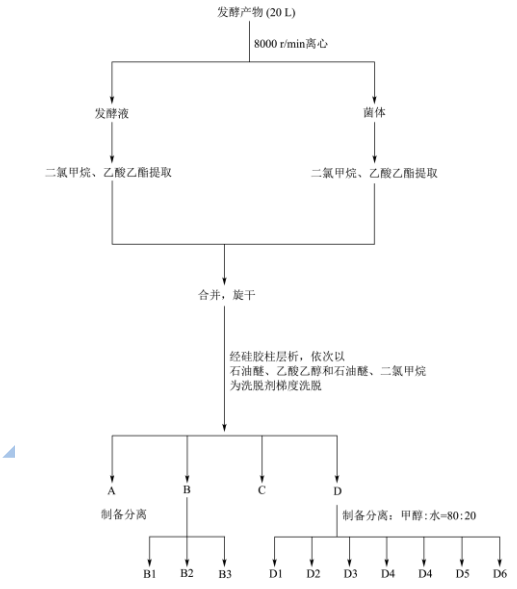


图 1 放线菌 PY-C-21 菌株代谢产物活性成分分离流程

Fig.1 Separation process of active metabolite ingredients of actinomycete PY-C-21 strain

1.5.5 菌株 PY-C-21 活性单体物质的活性测试

通过制备色谱分离后，将分别收集得到的物质在旋转蒸发仪上把流动相甲醇和水旋干，再以枯草芽孢杆菌为指示菌，采用牛津杯（直径：6 mm）定量扩散法进行活性测试，并确定具有活性的物质，进行下一步结构鉴定。

1.5.6 菌株 PY-C-21 活性单体物质的结构鉴定

将制备分离得到的活性物质用甲醇稀释溶解到一定程度，通过气质和高分辨质谱等，初步确定其化学结构。气相色谱条件：HP-5MS毛细色谱柱（30 m×250 μm，0.25 μm）；载气为高纯He，流速：1.0 mL/min；柱温升温程序：初始温度35 ℃，保持1 min,然后以15 ℃/min升温至100 ℃，再以4 ℃/min升温至140 ℃，最后以6 ℃/min升温至280 ℃，保持3 min。自动进样器进样1 μL，不分流，进样口温度为260 ℃。

质谱条件：色谱-质谱接口温度280 ℃；电子轰击源（EI）；离子源温度230 ℃；全扫描模式，质量扫描范围50 u~1000 u。

2 结果与分析

2.1 放线菌 PY-C-21 的抑菌活性及分类地位

通过抗菌活性试验筛选，菌株PY-C-21对指示菌表现出显著且稳定的抑制作用（表1），所以本研究进一步鉴定该菌株的分类地位。

表 1 菌株 PY-C-21 的抑菌活性

Table 1 Antifungal activities of PY-C-21

抗菌活性	菌株 PY-C-21 抑制不同指示菌的抑菌圈直径/mm				
试验筛选	*S.aureus*	*B.subtilis*	*Proteus*	*E.coli*	*A.niger*
初筛	16.83	17.89	17.02	10.05	8.91
复筛	14.17	14.47	13.46	8.17	8.13

注：-，无抑菌圈产生；琼脂块直径d=6 mm；*S.aureus*，金黄色葡萄球菌；*B.subtilis*，枯草芽孢杆菌；*Proteus*，变形杆菌；*E.coli*，大肠埃希氏菌；*A.niger*，黑曲霉。

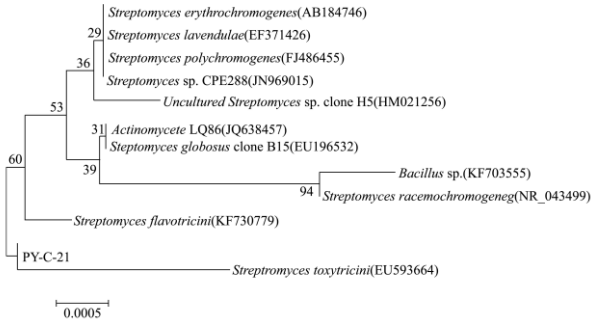


图 2 菌株 PY-C-21 的 16S rDNA 序列系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree based on partial 16S rDNA sequences of PY-C-21

通过该菌株的16Sr DNA序列分析，构建系统发育树，发现菌株PY-C-21与链霉菌属的绝大多数种的相似性达到99%以上，并与毒三素链霉菌（*Streptomyces toxytricini*）在同一个分支上，可见他们是同源的，如

图 2。该菌株在高氏一号合成培养基上气丝丰茂，粉状，肉桂粉色。采用插片法观察菌株的显微形态，在物镜(40倍)×目镜(10倍)的光学显微镜下观察发现其营养菌丝体长且不分割，不断裂为杆状体。扫描电镜下观察菌株，发现其孢子丝长，顶端存在螺旋形，孢子椭圆形至柱形，表面光滑，符合链霉菌属特征。再结合培养特性观察、生理生化试验的验证，结果表明菌株PY-C-21的培养特性和生理生化特性与毒三素链霉菌基本符合，所以将菌株PY-C-21鉴定为毒三素链霉菌[10]。

2.2 菌株PY-C-21发酵液粗分离产物的活性测定

通过以乙酸乙酯与石油醚作为洗脱剂的硅胶柱层析分离纯化[11]，共得到4种分离产物（A、B、C、D）。通过用牛津杯定量扩散法测定四种分离产物的活性，结果如图 3，物质B和物质D对枯草芽孢杆菌表现出显著的抑菌作用，抑菌圈的直径分别达到了12.15 mm和13.86 mm，而分离产物A和C并未表现出明显的抑菌作用。

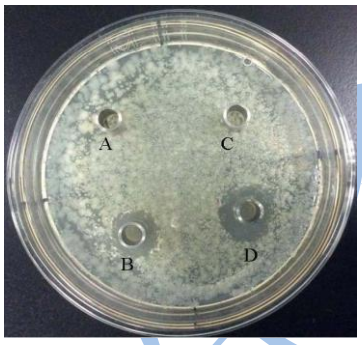


图 3 牛津杯法测定分离产物A、B、C、D的抑菌活性

Fig.3 Antibacterial effect of separated products A, B, C, and D determined by Oxford cylinder diffusion method

2.3 制备色谱纯化活性产物

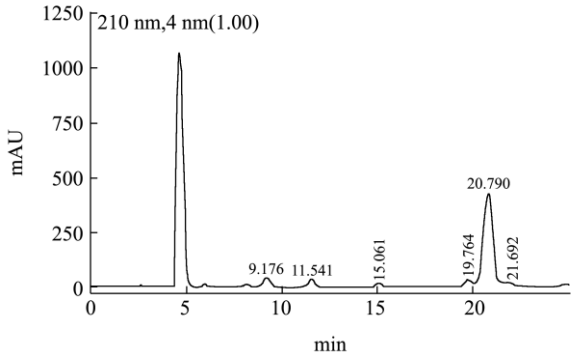


图 4 分离产物B的高效液相色谱分析

Fig.4 HPLC analysis of separated product B

通过以甲醇与水作流动相的制备色谱法反复处理[12]，将上述4种分离产物中的B、D进一步纯化。首先通过HPLC分析分离产物B和D的纯度，如图3和图4。

结果显示，两种物质仍然还是混合物，需要进一步采用制备色谱分离纯化，分离产物B总共制备分离得到B1（保留时间t=9.176）、B2（t=11.541）、B3（t=20.790），分离产物D总共制备分离得到D1（t=8.381）、D2（t=9.487）D3（t=9.693）、D4（t=12.140）、D5（t=12.687）、D6（t=15.200）。

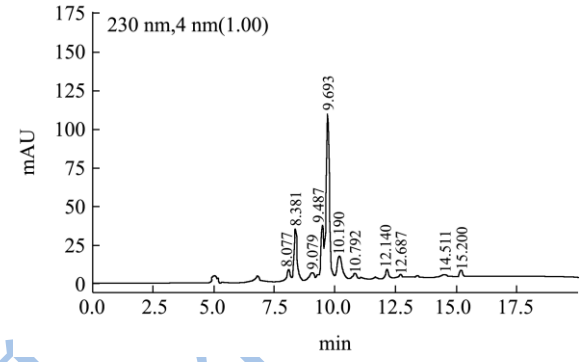


图 5 分离产物D的高效液相色谱分析

Fig.5 HPLC analysis of separated product D

2.4 活性产物结构的初步鉴定

2.4.1 制备分离产物的活性测定

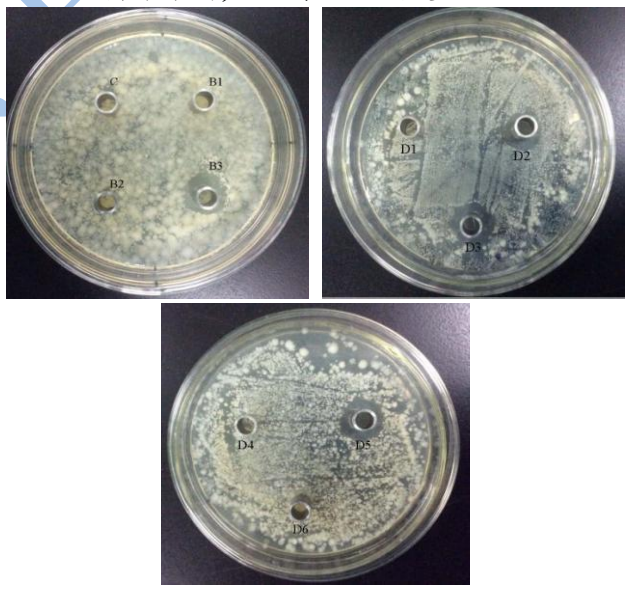


图 6 牛津杯定量扩散法测定制备产物的抑菌活性

Fig.6 Antibacterial effect of the prepared products determined by Oxford cylinder diffusion method

通过用牛津杯定量扩散法测定制备产物B1、B2、B3和制备产物D1、D2、D3、D4、D5和D6的活性，制备产物B3和制备产物D2、D3、D5对枯草芽孢杆菌表现出明显的抑菌作用，其中C为溶剂二氯甲烷最为对照组，结果如图 6。

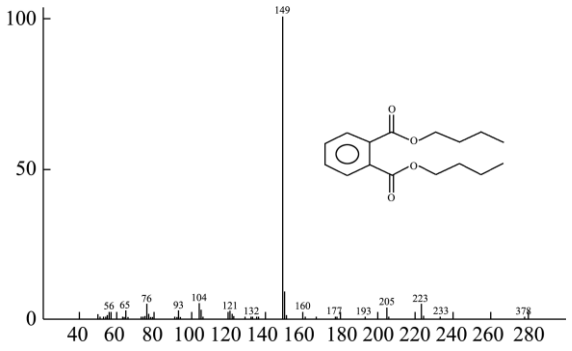


图 7 物质 B3 的 GC-MS 分析

Fig.7 GC-MS analysis of product B3

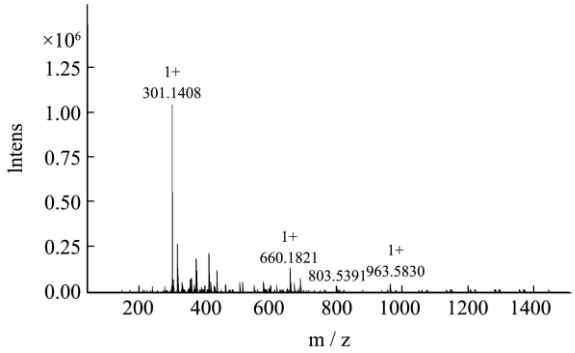


图 8 物质 B3 的高分辨质谱分析

Fig.8 HRMS analysis of product B3

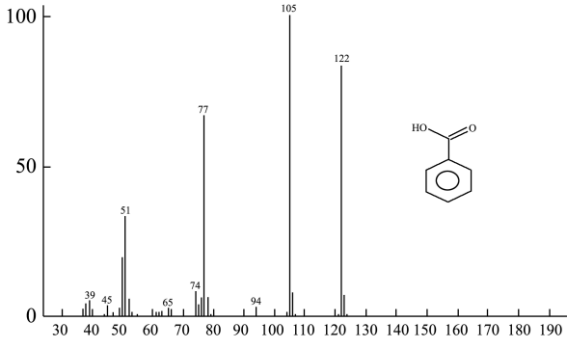


图 9 物质 D2 的 GC-MS 分析

Fig.9 GC-MS analysis of product D2

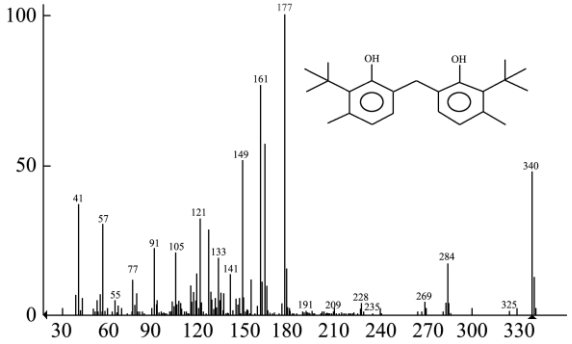


图 10 物质 D3 的 GC-MS 分析

Fig.10 GC-MS analysis of product D3

2.4.2 GC-MS 和高分辨质谱初步鉴定活性产物的结构

用气相色谱质谱联用技术进一步对制备分离的活性产物B3、D2、D3和D5进行分析，所得质谱图经NIST11质谱数据库检索并与标准图谱核对，鉴定其组分[13]。活性产物B3经气相色谱质谱联用分析，将所得质谱与数据库比对，鉴定物质B3为邻苯二甲酸二丁酯（图 7）。再通过高分辨质谱分析[14]，进一步验证物质B3的结构，结果，得到该物质的化学式为$C_{16}H_{22}O_4$（图 8）。因此，鉴定活性物质B3为邻苯二甲酸二丁酯。活性产物D2、D3和D5通过GC-MS分析，分别鉴定为苯甲酸（如图9）、2,2-亚甲基双（4-甲基-6-叔丁基苯酚）（如图 10）和邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯（如图 11）。

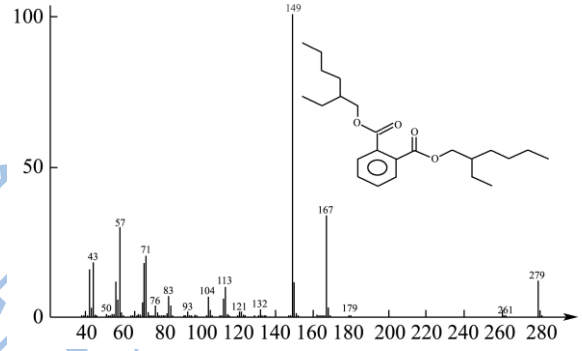


图 11 物质 D5 的 GC-MS 分析

Fig.11 GC-MS analysis of product D5

3 结论

3.1 通过形态特征观察、培养特性观察、生理生化试验和 16S rDNA 序列分析，确定菌株 PY-C-21 为毒三素链霉菌（*Streptomyces toxytricini*）。该菌株及其代谢产物对革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌和真菌均表现出显著且稳定的抑制作用，因此，作为抗菌活性物质产生菌的优良菌株，通过萃取、硅胶柱层析和制备色谱等方法，从该菌株的发酵产物中提取、分离纯化活性产物及初步鉴定产物的结构。最终通过 GC-MS 核对和高分辨质谱分析，确定活性产物为邻苯二甲酸二丁酯、苯甲酸、2,2’-亚甲基双（4-甲基-6-叔丁基苯酚）和邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯，将为进一步研制新型食品生物防腐剂提供参考和借鉴。

3.2 据报道，苯甲酸是广泛应用的防腐剂，邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二辛酯是一系列具有抑菌活性的物质，杨立宾等[5]在哈茨木霉T28 发酵液中提取物对致病疫霉具有抑菌作用的有效成分，先提取发酵液中活性组分，通过GC-MS鉴定了活性组分的结构主要为邻苯二甲酸酯类化合物，其中，邻苯二甲酸二丁酯和邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯被鉴定为对致病疫霉菌

具有抑制作用的有效成分。徐宁等[15]通过GC-MS分析大葱根系分泌物，研究其对黄瓜种子萌芽及其枯萎病病原菌的化感作用，鉴定邻苯二甲酸酯类相对含量较高，虽然2，2，-亚甲基双（4-甲基-6-叔丁基苯酚）相对含量较低，但也是其活性物质之一。

3.3 本研究通过分离筛选得到具显著抗菌活性的毒三素链霉菌（*Streptomyces toxytricini*）PY-C-21，并首次从该菌株的发酵产物中分离纯化得到活性产物邻苯二甲酸二丁酯、苯甲酸、2,2′-亚甲基双（4-甲基-6-叔丁基苯酚）和邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯，这在微生物源产生抗真菌活性物质中比较少见。

参考文献

[1] 张姗姗,来航线,韦小敏,等.红碱淖湖滨土壤微生物及稀有放线菌研究[J].西北农林科技大学学报，2013，41(8): 117-124
ZHANG Shan-shan, LAI Hang-xian, WEI Xiao-min, et al. Soil microorganism and actinomycetes resources in Hongjiannao Lake [J]. Journal of Northwest A&F University, 2013, 41(8): 117-124

[2] 岳雷娜,温清玲,易润华等.海洋放线菌抗菌活性菌株的筛选及南-148 菌株的鉴定[J].广西农业科学, 2010, 41(2): 126-129
YUE Lei-na, WEN Qing-ling, YI Run-hua, et al. Screening of anti-bacterial marine-derived actinomycetes and identification of strain Nan-148 [J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2010, 41(2): 126-129

[3] Atika Meklat, Nasserdine Sabaou, Noureddine Bouras, et al. A novel strain of *actinopolyspora mortivallis* with antibacterial activity isolated from a saharan soil [J]. Ann Microbiol, 2012, 62: 1049-1057

[4] Pachaiyappan Saravana Kumar, John Poonga Preetam Raj, Veeramuthu Duraipandiyan, et al. Antibacterial activity of some actinomycetes from tamil nadu, india [J]. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 2012, 1-8

[5] 杨立宾,宋瑞清,邓勋,等.哈茨木霉T28发酵液提取物对致病疫霉的抑菌作用及有效成分[J].林业科学，2013，49(7): 118-122
YANG Li-bin, SONG Rui-qing, DENG Xun, et al. Active components of extracts from the fermentation liquid of *trichoderma harzianum* strain t28 and their inhibiting activities to phytophthora infestans [J]. SCIENTIA SILVAE SINICAE, 2013, 49(7): 118-122

[6] Eun Hye Ryu, Eun Ju Yang, Eun Rhan Woo, et al. Purification and characterization of antifungal compounds from *Lactobacillus plantarum* HD1 isolated from kimchi [J]. Food Microbiology, 2014, 41: 19-26

[7] Liu S, Wu Q, Zhang J, et al. Effects of l-lysine and d-lysine on ε-Poly-l-lysine biosynthesis and their metabolites by *Streptomyces ahygroscopicus* GIM8 [J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012, 17(6): 1205-1212

[8] 黄静敏,吴清平,刘盛荣,等.ε-聚赖氨酸产生菌新菌株的筛选和产物结构鉴定[J].微生物学通报，2011，38(6): 871- 877
HUANG Jing-Min, WU Qing-Ping, LIU Sheng-Rong, et al. Screening of new ε-polylysine producing strain and structure identification of its product [J]. Microbiology China, 2011, 38(6): 871-877

[9] 袁林,吴清平,吴克刚,等.广谱抑菌物质产生菌 GX-21 的筛选及鉴定[J].现代食品科技,2014,30(12):68-73
YUAN Lin, WU Qing-ping, WU Ke-gang, et al. Identification and screening of broad-spectrum antibiotics-producing strain GX-21 [J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(12): 68-73

[10] 闫逊初.放线菌的分类和鉴定[M].北京:科学出版社,1992
YAN Xun-chu. The Classification and Identification of Actinomycetes [M]. Beijing: Science Press, 1992

[11] Houssam M Atta, Maged S Ahmad. Antimycin-A antibiotic biosynthesis produced by *Streptomyces* Sp. AZ-AR-262: taxonomy, fermentation, purification and biological activities [J]. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2009, 3(1): 126-135

[12] R Gandhimathi, G Seghal Kiran, T A Hema, et al. Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10 [J]. Bioprocess Biosyst Eng., 2009, 32: 825-835

[13] Joseph Selvin, S Shanmughapriya, R Gandhimathi, et al. Optimization and production of novel antimicrobial agents from sponge associated marine actinomycetes *Nocardiopsis dassonvillei* MAD08 [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2009, 83: 435-445

[14] Raoudha Ben Ameur Mehdi, Samiha Sioud, Lilia Fourati Ben Fguira, et al. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain [J]. Process Biochemistry, 2006, 41: 1506-1513

[15] 徐宁,王超,魏珉,等.大葱根系分泌物对黄瓜种子萌芽和

枯萎病病原菌的化感作用及其GC-MS分析[J].园艺学报 2012,39(8):1511-1520

XU Ning, WANG Chao, WEI Min, et al. Allelopathy of welsh onion root exudates on cucumber seed germination and *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum and the GC-MS analysis [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2012, 3 9(8): 1511-1520

现代食品科技