

# 拮抗细菌菌株 YJ15 的分离鉴定、发酵条件优化及对越橘灰霉病的防效

王春伟, 王燕\*, 张曦倩, 董田, 温智浩, 刘倩茹, 李田丽, 王怡惠, 王赛凤, 张作刚, 王建明, 王美琴\*

(山西农业大学农学院, 山西太谷 030801)

**摘要:** 从越橘 (*Vaccinium* spp.) 健康果实中分离获得 65 株内生细菌, 采用琼脂平板扩散法筛选出 1 株对灰葡萄孢具有高拮抗作用的菌株 YJ15, 经形态特征观察、生理生化测定和 16S rRNA 序列分析, 鉴定该菌株为暹罗芽胞杆菌 (*Bacillus siamensis*)。在单因素试验的基础上, 通过 Plackett-Burman 设计筛选出 3 个发酵重要因素 (温度、pH 和氮源)。利用最陡爬坡试验和响应面分析对菌株 YJ15 的发酵条件进行优化, 获得最优发酵条件为葡萄糖  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 酵母粉  $36.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{FeSO}_4$   $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 甘油  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 接种量 1 mL, 摇床转速  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 温度  $31.35 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7.43, 培养时间 15 h。采用生长速率法测定菌株 YJ15 的发酵液对 9 种病原真菌均有抑制作用, 抑菌率在 43.42%~92.39%之间。菌株 YJ15 发酵液处理越橘果实后, 灰霉病的发病率和病斑直径均明显小于对照, 与多菌灵防效差异不显著, 可用于越橘灰霉病的防治。

**关键词:** 越橘灰霉病; 拮抗细菌; 鉴定; 发酵条件; 防效

**中图分类号:** S 663.9

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 10-1905-12

## Isolation, Identification, Optimization of Fermentation Conditions and Biocontrol Effects of Antagonistic Bacterium Strain YJ15

WANG Chunwei, WANG Yan\*, ZHANG Xiqian, DONG Tian, WEN Zhihao, LIU Qianru, LI Tianli, WANG Yihui, WANG Saifeng, ZHANG Zuogang, WANG Jianming, and WANG Meiqin\*

(College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi 030801, China)

**Abstract:** Sixty-five endophytic bacteria strains were isolated from healthy blueberry fruits. Antagonistic bacterium strain YJ15 was screened with the agar plate diffusion method, and identified as *Bacillus siamensis* based on the morphological, physiological and biochemical characteristics, and 16S rRNA sequence analysis. Based on single factor tests, three important factors of temperature, pH and nitrogen source were screened by Plackett-Burman experimental design. The optimal fermentation conditions for glucose  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , yeast powder  $36.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{FeSO}_4$   $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , glycerol  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   $1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , inoculation amount 1 mL, rotational speed  $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , temperature  $31.35 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 7.43 and

**收稿日期:** 2018-05-14; **修回日期:** 2018-10-12

**基金项目:** 山西省重点研发计划项目 (201703D221010-2); 山西省应用基础研究项目 (201701D221191); 山西农业大学科技创新基金项目 (2016YJ11, 2016YJ12)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: yan314319@163.com, sxndwmq1973@163.com)

cultural time 15 hours were determined by steepest ascent experiment and response surface methodology. The antifungal effects of fermentation broth of strain YJ15 on nine pathogenic fungi were obvious with the inhibition rate of 43.42% - 92.39%. The fermentation broth of strain YJ15 with lower disease incidence and lesion diameter had better control effects with no significant difference compared with that of carbendazim, and could be useful to effectively control *Botrytis cinerea* causing blueberry gray mold.

**Keywords:** blueberry gray mold; antagonistic bacterium; identification; fermentation condition; control effect

越橘 (*Vaccinium spp.*) 灰霉病由灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 侵染所致, 是生产上的一种重要病害, 具有发病普遍、危害部位多且扩展迅速等特点 (严雪瑞 等, 2014; 戴启东 等, 2016), 尤其在设施栽培条件下更加严重 (Hong, 2011)。1924 年越橘灰霉病首次在美国新泽西州发现 (苏宝玲, 2008), 目前在加拿大 (Hildebrand et al., 2001)、韩国 (Hong, 2011; Kwon et al., 2011)、智利 (Rivera et al., 2013) 均有越橘灰霉病发生危害的报道。在中国, 陈长卿等 (2012) 首次在吉林农业大学越橘种植基地发现灰霉病菌, 可危害果实和叶片, 之后在贵州 (金义兰 等, 2015)、辽宁 (戴启东 等, 2016) 相继发现。另外, 秦士维等 (2017) 发现灰霉病菌在健康越橘果实上也存在, 是一种重要的潜伏侵染病原菌。

灰霉病菌繁殖速度快, 遗传变异大, 对化学农药极易产生抗药性 (张玮 等, 2013; Saito et al., 2016)。生物防治是防治灰霉病的理想方法 (石玉莹 等, 2017), 但目前尚未见利用拮抗细菌防治越橘灰霉病的研究报道。本试验中从越橘果实中分离内生细菌, 筛选出灰霉病菌的拮抗菌株, 完成菌株的形态及分子鉴定, 优化发酵条件, 并对拮抗菌株的抑菌谱及对越橘灰霉病的防效进行了研究, 为防治越橘灰霉病提供新的生防资源, 为进一步利用该拮抗菌株防治越橘灰霉病奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

本试验于 2017 年 5—12 月在山西农业大学植物病理学重点实验室进行。

供试菌种: 灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis paeoniicola*)、链格孢 (*Alternaria alternata*)、毁灭柱孢 (*Cylindrocarpon destructans*)、藤仓镰刀菌 (*Fusarium fujikuroi*)、半裸镰刀菌 (*Fusarium semitectum*)、粉红单端孢 (*Trichothecium roseum*) 和层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*), 由本实验室分离、鉴定并保存。

供试培养基: NA 培养基和 LB 培养基用于拮抗细菌的分离及培养, KMB 培养基用于拮抗细菌的发酵, PDA 培养基用于病原真菌的活化及培养 (方中达, 1998)。

### 1.2 拮抗细菌的分离与筛选

从山西省太原市小店区、清徐县, 晋中市榆次区、太谷县分别采集越橘果实样品, 先用自来水清洗越橘果实表面, 再用无菌水冲洗 1 次, 然后依次用 70%乙醇浸泡 3 min, 2% NaClO 浸泡 5 min, 70%乙醇浸泡 30 s, 最后用无菌水淋洗 5 次, 用无菌吸水纸吸干残留水分。将表面消毒后的果实放入灭菌研钵中, 加入少量石英砂和 10 mL 无菌水, 充分研磨后取 200  $\mu$ L 至 NA 培养基, 涂布均匀,

于 28 °C 恒温培养 2 d。根据生长出的菌落形状、颜色、大小、边缘、突起、透明度等特征, 挑取单菌落划线纯化培养。

将分离得到的细菌菌株转入装有 20 mL LB 培养基的 50 mL 三角瓶中, 于 28 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 10 h, 获得细菌发酵液。参照番茄灰霉病拮抗细菌的筛选方法(王伟等, 2010), 将 1 mL 无菌水加入到长满灰霉病的 PDA 平板, 用接种针将孢子刮下, 制成菌悬液(10<sup>5</sup> spores·mL<sup>-1</sup>), 并与 PDA 培养基混合, 倒入培养皿中, 制成含灰霉病菌的平板。在平板上均匀打孔, 分别注入 50 μL 发酵液, 在 25 °C 恒温条件下培养 3 d, 根据出现的抑菌圈大小筛选获得拮抗菌株。

### 1.3 拮抗细菌菌株的鉴定

#### 1.3.1 形态特征及生理生化特性

将拮抗细菌菌株接种于 NA 培养基上, 在 25 °C 条件下培养 48 h。根据细菌菌株生长的菌落形态特征(包括大小、光泽、隆起、形状、透明度、均匀度、边缘等), 以及革兰氏染色反应和透射电镜观察菌体形态特征, 对菌株生理生化特性(东秀珠和蔡妙英, 2001) 等进行鉴定。

#### 1.3.2 分子鉴定

将菌株接种于 LB 液体培养基于 28 °C, 180 r·min<sup>-1</sup> 条件下振荡培养 10 h, 采用 BioFlux BSC12S1 细菌基因组 DNA 提取试剂盒(杭州博日科技有限公司)提取拮抗细菌的 DNA。

*16S rRNA* 序列分析: 采用 25 μL PCR 反应体系[10× PCR Buffer 2.5 μL, dNTP (10 mmol·L<sup>-1</sup>) 2 μL, MgCl<sub>2</sub> 1 μL, 浓度为 10 mmol·L<sup>-1</sup> 的通用引物 27F 和 1492R 各 1 μL, 模板 DNA 1 μL, *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL], 95 °C 预变性 5 min, 34 个循环(94 °C 45 s, 45 °C 1 min, 72 °C 90 s), 72 °C 10 min。PCR 扩增产物纯化后测序。序列在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对, 并下载相关序列, 使用 MEGA 5.0 软件构建系统发育树。

### 1.4 拮抗细菌的最适发酵条件优化

#### 1.4.1 发酵培养基碳源、氮源和无机盐单因素试验

以 KMB 培养基(葡萄糖 20 g, 蛋白胨 20 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5 g, 甘油 10 mL, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, 蒸馏水 1 000 mL)作为基础发酵培养基, 以葡萄糖、果糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖、小麦粉、玉米粉、可溶性淀粉和柠檬酸钠为碳源, 以蛋白胨、牛肉膏、酵母粉、硝酸钠、硝酸钾、氯化铵和尿素作为氮源, 以 ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O、NaCl 和 FeSO<sub>4</sub> 作为无机盐, 培养条件为接种量 1 mL, 接种液浓度为 10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup>, 培养温度 28 °C, 250 mL 三角瓶中装液量 50 mL, 180 r·min<sup>-1</sup>, 培养 15 h, 测定菌株发酵液的 OD<sub>600</sub>, 菌株生长量以 OD<sub>600</sub> 表示, 获得最适培养基成分。

#### 1.4.2 筛选影响发酵的重要因素

选取碳源、氮源、无机盐、甘油、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、接种量、摇床转速、pH、温度和时间, 共 10 个发酵因素进行 Plackett-Burman 试验(N = 12), 以菌株生长量为评价指标, 根据各因素的主效应和交互作用的一级作用, 从而确定影响发酵的重要因素。

#### 1.4.3 最陡爬坡试验设计

对影响发酵的重要因素进行最陡爬坡试验。对重要因素的变化方向和步长逐渐增大, 获得最大响应区域。选择菌株生长量最大的试验条件作为响应面试验组合的中心点。

#### 1.4.4 发酵条件的响应面分析

根据 Box-Behnken 中心组合原理, 使用 Design-Exper.V8.06 软件设计试验, 采用 3 因素 3 水平

Box-Behnken 设计优化各因素, 从而获得最佳的发酵条件。

### 1.5 拮抗细菌的抑菌谱测定

采用琼脂平板扩散法测定拮抗细菌发酵液对多种病原菌的抑菌活性。将拮抗菌株接种于 LB 培养基, 于 28 °C、220 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 10 h。离心 (10 000 r·min<sup>-1</sup>, 4 °C) 后, 将上清液用微孔滤膜过滤除菌得到无菌发酵液。将 PDA 培养基融化降温至 40~45 °C, 加入发酵液, 制成含 1%、3%、5%、7%、9% 发酵液混合培养基, 充分混匀后倒入无菌培养皿, 以不加无菌发酵液的 PDA 培养基作为对照。将培养 5 d 的 9 种供试病原真菌制成菌饼 (直径 6 mm), 菌丝面朝下放置于平板中央, 于 25 °C 条件下培养 5 d。菌落直径的测量采用十字交叉法, 并计算无菌发酵液对 9 种供试病原菌的抑菌率, 设 3 次重复。抑菌率 (%) = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 6)] × 100。

### 1.6 拮抗细菌菌株对越橘灰霉病的防效试验

参照杀菌剂对越橘镰孢菌果腐病的防效试验 (王春伟 等, 2017) 略有改动。

选用越橘健康果实, 使用 2% 的 NaClO 浸泡处理 2 min, 用无菌水冲洗 3 次后晾干。用灭菌接种针在果实表面制造约 3 mm (深) × 2 mm (宽) 伤口, 往伤口滴加以下处理液: (1) 10<sup>8</sup> CFU·mL<sup>-1</sup> 拮抗细菌发酵液; (2) 对照药剂为 1 000 μg·mL<sup>-1</sup> 多菌灵; (3) 无菌水对照。各处理设 3 次重复, 每处理 10 个果实。处理液接种量均为 20 μL。4 h 后接种 10 μL 灰霉病菌孢子液 (10<sup>5</sup> spores·mL<sup>-1</sup>)。之后将果实晾干, 置于 25 °C, 95% 相对湿度下, 48 和 72 h 后统计病害发病率及病斑直径, 并计算防效 (雍道敬 等, 2014)。防效 (%) = (对照组病斑面积 - 处理组病斑面积) / 对照组病斑面积 × 100。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗细菌的分离筛选与菌株 YJ15 的鉴定

从越橘果实样品中分离获得内生细菌菌株 65 株, 筛选出拮抗菌株 21 株, 以未接种拮抗菌作为对照, 15 号菌株对灰葡萄孢抑菌效果最强, 抑菌圈直径为 23 mm (图 1), 将其命名为 YJ15。

菌株 YJ15 在 NA 培养基上菌落近圆形, 边缘整齐, 不透明, 乳白色, 菌落生长后期中间有褶皱 (图 2, A)。革兰氏染色为蓝紫色, 为革兰氏阳性菌 (图 2, B)。生理生化试验结果见表 1。透射电镜下观察, 菌体为杆状, 大小为 (1.15~1.54) μm × (0.58~0.74) μm (图 2, C)。菌株 YJ15 在 30~40 °C, pH 5.7 和 6.8, 2%~5% NaCl 均可生长, 能产生吲哚, 可利用 D-葡萄糖、L-阿拉伯糖、D-甘露醇和 D-木糖、接触酶、V-P 测定、葡萄糖氧化发酵、明胶液化、硝酸盐还原反应、丙二酸利用、卵黄卵磷脂酶、硫化氢呈阳性, 而运动性、水解淀粉、柠檬酸盐利用、甲基红、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、脂酶、厌氧生长呈阴性 (表 1)。根据形态特征及生理生化试验结果, 初步鉴定菌株 YJ15 属于芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.)。

将菌株 YJ15 的 16S rRNA 序列 (1 451 bp) 提交至 GenBank 数据库, 登录号为 MH118032。同源性比对结果表明: 菌株 YJ15 与 *Bacillus siamensis* JS15E (KX129844) 相似性为 100%, 与 *Bacillus siamensis* JL8 (KX660755) 相似性为 99%。系统发育分析表明菌株 YJ15 与 *Bacillus siamensis* JS15E (KX129844) 聚于同一分支 (图 3)。

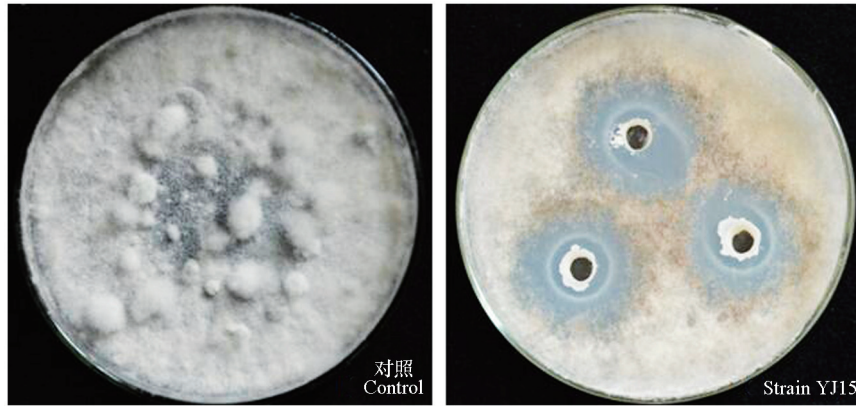


图 1 菌株 YJ15 对灰葡萄孢的拮抗作用  
Fig. 1 Antagonistic effects of strain YJ15 against *Botrytis cinerea*

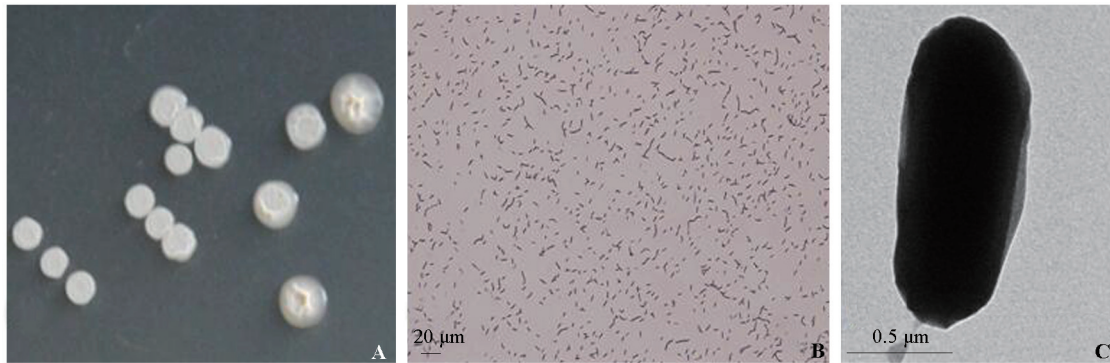


图 2 菌株 YJ15 的菌体形态特征  
A: 28 °C NA 培养基培养 2 d; B: 革兰氏染色后在光学显微镜下; C: 透射电镜下。

Fig. 2 Morphological characteristics of strain YJ15  
A: On NA at 28 °C for 2 days, B: Under optical microscope after gram stain and C: Under transmission electron microscope.

表 1 菌株 YJ15 的的生理生化特性  
Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain YJ15

鉴定项目 Test	结果 Result	鉴定项目 Test	结果 Result
接触酶 Catalase	+	2% NaCl	生长 Growth
V-P 测定 Voges-Proskauer test	+	5% NaCl	生长 Growth
V-P 培养物终 pH pH of V-P production	6.05	7% NaCl	不生长 No growth
葡萄糖氧化发酵 Oxidation-fermentation of glucose	+	10% NaCl	不生长 No growth
运动性 Motility	-	5 °C	不生长 No growth
水解淀粉 Starch hydrolysis	-	10 °C	不生长 No growth
明胶液化 Gelatin hydrolysis	+	30 °C	生长 Growth
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	40 °C	生长 Growth
pH 5.7	生长 Growth	50 °C	不生长 No growth
pH 6.8	生长 Growth	55 °C	不生长 No growth
柠檬酸利用 Citrate utilization	-	60 °C	不生长 No growth
丙二酸利用 Malonate utilization	+	产生吲哚 Indole production	+
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	-	D - 葡萄糖 D-Glucose	+
甲基红 Methyl red	-	L - 阿拉伯糖 L-Arabinose	+
脂酶 Lipase	-	D - 甘露醇 D-Mannitol	+
硫化氢 Hydrogen sulfide production	+	D - 木糖 D-Xylose	+
厌氧生长 Anaerobic digestion	-	卵黄卵磷脂酶 Lecithinase	+

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。

Note: “+” means positive reaction, “-” means negative reaction.

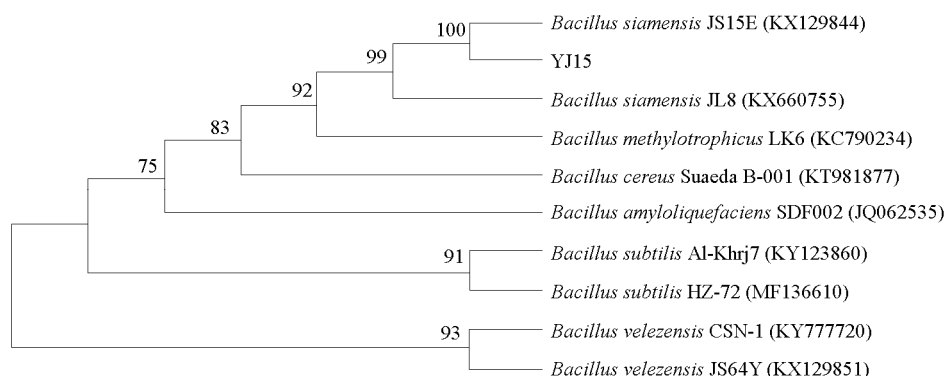


图3 基于16S rRNA构建菌株YJ15的系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree of strain YJ15 based on the 16S rRNA

## 2.2 菌株 YJ15 的最适发酵条件优化

### 2.2.1 发酵培养基中碳源、氮源和无机盐成分的选择

以 KMB 培养基为基础培养基, 测定不同碳源、氮源和无机盐各单因素对菌株 YJ15 生长量的影响 (表 2)。碳源中, 葡萄糖效果最好, 菌株 OD<sub>600</sub> 为 1.951, 且与其他处理差异显著; 氮源中, 酵母粉效果最好, 菌株的 OD<sub>600</sub> 为 2.154, 且与其他处理差异显著; 无机盐中, FeSO<sub>4</sub> 效果最好, 菌株的 OD<sub>600</sub> 为 1.738, 且与其他处理差异显著。因此, 确定最优发酵培养基成分为葡萄糖 + 酵母粉 + FeSO<sub>4</sub> + 甘油 + K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>。

表2 不同碳源、氮源和无机盐成分对菌株 YJ15 生长量的影响

Table 2 Effect of different carbon sources, nitrogen sources and inorganic salts on growth amount of strain YJ15

碳源 Carbon source	OD <sub>600</sub>	氮源 Nitrogen source	OD <sub>600</sub>	无机盐 Inorganic salt	OD <sub>600</sub>
玉米粉 Corn meal	0.092 ± 0.022 f	酵母粉 Yeast powder	2.154 ± 0.002 a	硫酸锌 Zinc sulfate	0.461 ± 0.010e
小麦粉 Wheat flour	0.685 ± 0.013 d	牛肉膏 Beef extract	1.985 ± 0.008 b	氯化钠 Sodium chloride	1.516 ± 0.009 b
蔗糖 Sucrose	1.797 ± 0.024 b	蛋白胨 Peptone	1.951 ± 0.006 b	硫酸镁 Magnesium sulfate	1.473 ± 0.006 c
可溶性淀粉 Soluble starch	0.272 ± 0.049 e	硝酸钠 Sodium nitrate	0.100 ± 0.026 c	磷酸氢二钾	1.452 ± 0.014 c
柠檬酸钠 Sodium citrate	0.329 ± 0.047 e	氯化铵 Ammonium chloride	0.049 ± 0.020 de	Potassium phosphate dibasic	
麦芽糖 Maltose	1.485 ± 0.003 c	尿素 Urea	0.063 ± 0.011 cd	硫酸亚铁 Ferrous sulfate	1.738 ± 0.041 a
乳糖 Lactose	1.852 ± 0.017 ab	硝酸钾 Potassium nitrate	0.018 ± 0.002 e	硫酸锰 Manganese sulfate	1.238 ± 0.009 d
葡萄糖 Glucose	1.951 ± 0.006 a				
果糖 Fructose	1.519 ± 0.044 c				

### 2.2.2 影响发酵的 10 种因素比较

以葡萄糖、酵母粉、FeSO<sub>4</sub>、甘油、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、接种量、摇床转速、温度、pH 和时间等 10 个因素 (B-L) 进行二水平 N = 12 的 Plackett-Burman 试验, 以确定对发酵影响显著的因子, 设置一个虚拟变量 (A) 进行误差估计。效应评价中 P 值用于评价各因素的影响, P < 0.10 说明对结果影响大于 90%。温度效价 P 为 0.0926 (< 0.10), 对试验结果的影响大于 90%, 其次为 pH 和酵母粉, 效价分别为 0.1355 和 0.1600。因此 10 个因素中温度、pH 和酵母粉对菌株生长量的影响最大, 是重要影响因素, 其他 7 个因素影响不显著 (P > 0.1739), 应维持在低水平 (表 3)。

### 2.2.3 最陡爬坡试验设计

对温度、pH 和酵母粉这 3 个 Plackett-Burman 试验筛选出的影响发酵的重要因素进行最陡爬坡试验。将 3 个因素水平值逐步增大, 从而获得最大响应区域。结果 (表 4) 表明第 2 组试验设计, 即温度 30.00 °C, pH 7.50, 酵母粉 35.00 g · L<sup>-1</sup> 时, 菌株生长量最大, OD<sub>600</sub> 为 2.357, 因此以第 2

组试验设计作为响应面试验的中心点进行响应面试验。

表 3 Plackett-Burman 试验设计与响应值表 (N = 12)

Table 3 Experimental design and response of Plackett-Burman (N = 12)

试验设计 Run	虚拟项 Virtual item	(g · L <sup>-1</sup> )					接种量/mL Inoculation amount	转速/ (r · min <sup>-1</sup> ) Rotational speed	温度/°C Temperature	pH	时间/h Time	OD <sub>600</sub>
		葡萄糖 Glucose	酵母粉 Yeast powder	FeSO <sub>4</sub>	甘油 Glycerol	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>						
1	-1	20.00	20.00	2.50	1.00	2.50	1.50	150	28.00	7.00	20.00	1.924 ± 0.196
2	-1	20.00	30.00	1.50	1.50	2.50	1.00	200	28.00	7.00	15.00	2.393 ± 0.030
3	1	20.00	30.00	2.50	1.00	2.50	1.50	200	25.00	5.00	15.00	1.074 ± 0.976
4	1	20.00	20.00	1.50	1.50	1.50	1.50	200	25.00	7.00	20.00	1.374 ± 0.060
5	-1	30.00	20.00	2.50	1.50	1.50	1.50	200	28.00	5.00	15.00	1.725 ± 0.152
6	1	30.00	30.00	1.50	1.00	1.50	1.50	150	28.00	7.00	15.00	2.412 ± 0.054
7	-1	30.00	30.00	2.50	1.00	1.50	1.00	200	25.00	7.00	20.00	1.156 ± 0.069
8	1	30.00	20.00	2.50	1.50	2.50	1.00	150	25.00	7.00	15.00	1.843 ± 0.037
9	-1	30.00	30.00	1.50	1.50	2.50	1.50	150	25.00	5.00	20.00	1.524 ± 0.211
10	1	30.00	20.00	1.50	1.00	2.50	1.00	200	28.00	5.00	20.00	2.124 ± 0.153
11	1	20.00	30.00	2.50	1.50	1.50	1.00	150	28.00	5.00	20.00	1.185 ± 0.028
12	-1	20.00	20.00	1.50	1.00	1.50	1.00	150	25.00	5.00	15.00	0.689 ± 0.078
P 值		0.1739	0.1600	0.2276	0.4678	0.9314	0.4785	0.7321	0.0926	0.1355	0.3922	
P value												

表 4 最陡爬坡试验设计及响应值

Table 4 Experimental design of steepest ascent and responding value

试验设计 Run	温度/°C Temperature	pH	酵母粉/ (g · L <sup>-1</sup> ) Yeast powder	OD <sub>600</sub>
1	28.00	7.00	30.00	2.101 ± 0.152
2	30.00	7.50	35.00	2.357 ± 0.108
3	32.00	8.00	40.00	1.985 ± 0.172
4	34.00	8.50	45.00	1.814 ± 0.119

### 2.2.4 发酵条件的响应面分析

以菌株生长量 OD<sub>600</sub> 为响应值, 利用 Design-Exper.V8.06 软件设计了 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 试验 (表 5)。对试验结果进行多元回归拟合, 获得以 Y (菌株生长量) 为响应值, 以 X<sub>1</sub> (温度)、X<sub>2</sub> (pH)、X<sub>3</sub> (酵母粉) 为变量的二次多项回归模型:  $Y = 2.24 + 0.42X_1 + 0.083X_2 + 0.38X_3 - 0.25X_1X_2 - 0.32X_1X_3 - 0.094X_2X_3 - 0.29X_1^2 - 0.36X_2^2 - 0.43X_3^2$ 。

表 5 Box-Behnken 试验设计

Table 5 Box-Behnken experimental design

试验设计 Run	温度/°C Temperature	pH	酵母粉/ (g · L <sup>-1</sup> ) Yeast powder	OD <sub>600</sub>	试验设计 Run	温度/°C Temperature	pH	酵母粉/ (g · L <sup>-1</sup> ) Yeast powder	OD <sub>600</sub>
1	28.00	7.50	30.00	0.754 ± 0.156	10	30.00	7.50	35.00	2.300 ± 0.148
2	30.00	8.00	40.00	1.856 ± 0.119	11	30.00	7.00	40.00	1.904 ± 0.073
3	30.00	7.00	30.00	0.845 ± 0.252	12	30.00	7.50	35.00	2.245 ± 0.111
4	28.00	7.50	40.00	2.024 ± 0.087	13	32.00	7.50	40.00	1.642 ± 0.104
5	30.00	7.50	35.00	2.324 ± 0.071	14	32.00	7.50	30.00	1.650 ± 0.099
6	28.00	8.00	35.00	1.214 ± 0.120	15	32.00	7.00	35.00	2.453 ± 0.037
7	30.00	7.50	35.00	2.064 ± 0.182	16	30.00	7.50	35.00	2.274 ± 0.155
8	30.00	8.00	30.00	1.174 ± 0.096	17	32.00	8.00	35.00	2.145 ± 0.220
9	28.00	7.00	35.00	0.525 ± 0.113					

葡萄糖、温度和 pH 三因素间的交互作用对 OD<sub>600</sub> 的影响通过响应面及其等高线图反映。椭圆形表示两因素之间的交互作用影响显著, 而圆形说明二者间交互作用影响不显著。葡萄糖、温度、pH 交互影响等高线图均为椭圆形 (图 4 ~ 图 6), 说明葡萄糖、温度、pH 与 OD<sub>600</sub> 存在显著影响。



响应曲面方差分析表明回归模型的  $P$  值为 0.0192 ( $< 0.05$ ), 拟合效果显著。通过二次多项回归模型方程求解得最适条件为温度 31.35  $^{\circ}\text{C}$ , pH 7.43, 酵母粉 36.01  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

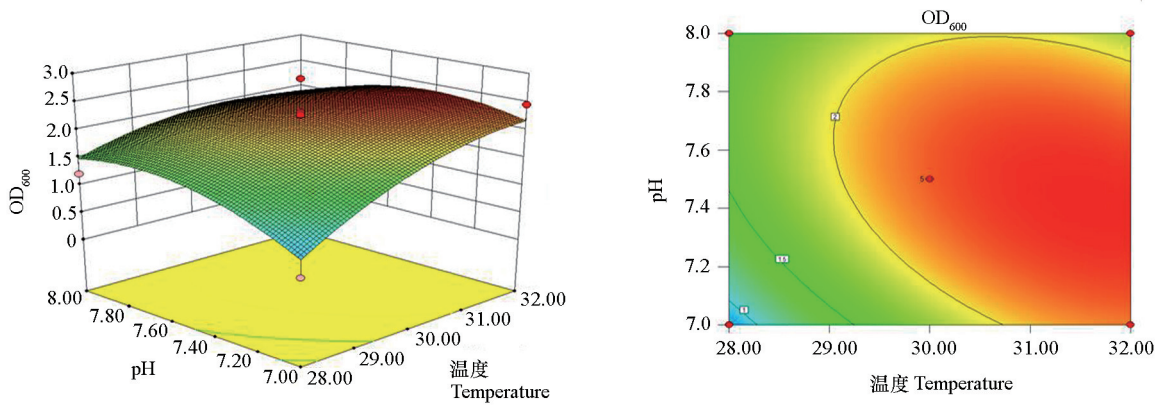


图 4 温度与 pH 交互影响 OD<sub>600</sub> 的曲面图和等高线图

Fig. 4 Response surface plot and contour plot for the effects of temperature and pH on OD<sub>600</sub>

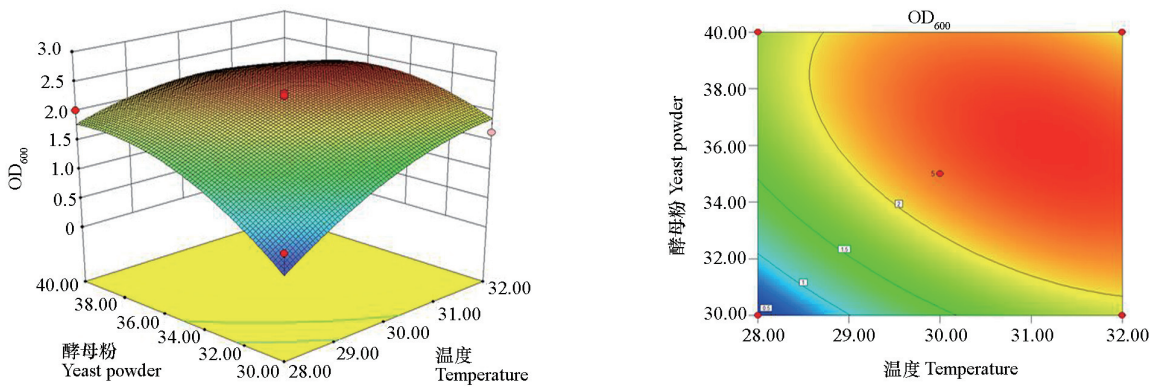


图 5 温度与酵母粉交互影响 OD<sub>600</sub> 的曲面图和等高线图

Fig. 5 Response surface plot and contour plot for the effects of temperature and yeast powder on OD<sub>600</sub>

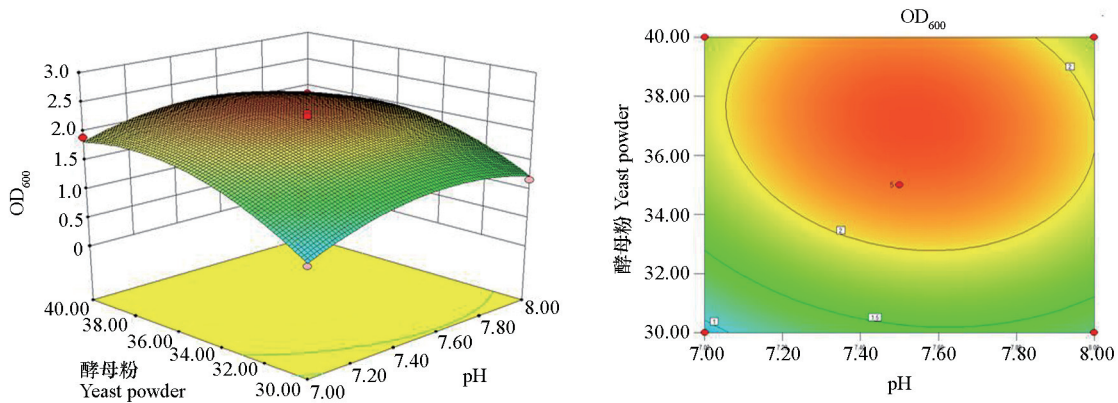


图 6 pH 与酵母粉交互影响 OD<sub>600</sub> 的曲面图和等高线图

Fig. 6 Response surface plot and contour plot for the effects of pH and yeast powder on OD<sub>600</sub>



## 2.3 菌株 YJ15 的抑菌谱

抑菌谱测定结果表明菌株 YJ15 抑菌谱广, 其不同浓度发酵液对 9 种植物病原真菌均有抑制作用, 且随着发酵液浓度增大, 对病原真菌的抑菌率增高。其中发酵液浓度 9% 时, 对粉红单端孢 (*Trichothecium roseum*) 和拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis paeoniicola*) 的抑菌率为 92.39% 和 91.14%, 对藤仓镰刀菌 (*Fusarium fujikuroi*) 的抑菌率为 43.42%, 对其他病原真菌的抑菌率在 48.03% ~ 81.15% 之间 (表 6)。

表 6 菌株 YJ15 的不同浓度发酵液对植物病原真菌的抑制作用

Table 6 Inhibition effects of different concentration of fermentation broth from strain YJ15 on plant pathogenic fungi

病原菌 Pathogenic fungi	不同浓度发酵液的抑菌率/% Inhibition rate of different concentration of fermentation broth				
	1%	3%	5%	7%	9%
禾谷镰刀菌 <i>Fusarium graminearum</i>	5.88 ± 3.70 ab	7.52 ± 1.25 c	29.08 ± 2.69 d	49.35 ± 4.32 d	50.98 ± 3.11 d
拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis paeoniicola</i>	0.63 ± 1.27 b	6.96 ± 8.43 c	53.48 ± 10.76 bc	91.46 ± 6.32 a	91.14 ± 8.20 a
半裸镰刀菌 <i>Fusarium semitectum</i>	4.53 ± 3.03 ab	52.04 ± 8.82 a	64.48 ± 17.46 ab	68.03 ± 4.59 bc	76.91 ± 6.32 b
层出镰刀菌 <i>Fusarium proliferatum</i>	1.88 ± 1.44 ab	4.51 ± 3.13 c	3.01 ± 1.94 d	73.31 ± 4.32 bc	80.08 ± 1.44 ab
链格孢 <i>Alternaria alternata</i>	7.73 ± 7.30 ab	42.28 ± 12.26 ab	74.48 ± 8.05 a	81.94 ± 3.27 ab	81.15 ± 3.85 ab
毁灭柱孢 <i>Cylindrocarpon destructans</i>	5.77 ± 4.24 ab	12.69 ± 9.43 c	35.77 ± 8.74 cd	45.00 ± 3.64 d	50.00 ± 6.71 d
藤仓镰刀菌 <i>Fusarium fujikuroi</i>	2.30 ± 1.26 ab	3.29 ± 0.76 c	42.76 ± 6.67 cd	39.47 ± 10.02 d	43.42 ± 4.43 d
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	1.97 ± 0.76 ab	25.66 ± 5.88 abc	28.62 ± 4.97 d	38.16 ± 5.58 d	48.03 ± 3.13 d
粉红单端孢 <i>Trichothecium roseum</i>	12.32 ± 17.09 a	4.35 ± 3.13 c	79.35 ± 5.72 a	91.30 ± 2.90 a	92.39 ± 3.81 a

注: 不同小写字母表示发酵液对不同病原真菌抑菌率间  $P < 0.05$  差异显著。

Note: The different lowercase letters show significant difference of the inhibition rate of fermentation broth on different plant pathogenic fungi at  $P < 0.05$ .

## 2.4 菌株 YJ15 对越橘灰霉病的防效

以防治灰霉病的常用药剂多菌灵为参照, 进行拮抗菌株 YJ15 对越橘灰霉病的防效试验 (表 7)。菌株 YJ15 发酵液和多菌灵处理的发病率和病斑直径均明显小于清水对照。处理 48 h 和 72 h 后, 菌株 YJ15 发酵液防效分别为 41.55% 和 67.40%, 而多菌灵处理防效分别为 47.87% 和 68.22%, 二者对越橘灰霉病的防效差异不显著。

表 7 菌株 YJ15 对越橘灰霉病的防效

Table 7 Control effects of strain YJ15 on blueberry gray mold

处理 Treatment	48 h			72 h		
	发病率/% Disease incidence	病斑直径/mm Colony diameter	防效/% Control effect	发病率/% Disease incidence	病斑直径/mm Lesion diameter	防效/% Control effect
清水对照 Water as control	83.33 ± 5.77 a	6.33 ± 0.65 a		100.00 ± 0.00 a	12.27 ± 1.15 a	
菌株 YJ15 Strain YJ15	53.33 ± 5.77 b	3.70 ± 0.40 b	41.55 a	86.67 ± 5.77 b	4.03 ± 0.65 b	67.40 a
多菌灵 Carbendazim	60.00 ± 10.00 b	3.30 ± 1.30 b	47.87 a	83.33 ± 5.77 b	3.90 ± 0.61 b	68.22 a

注: 不同小写字母表示处理间的差异显著 ( $P < 0.05$ )。

Note: The different lowercase letters show significant difference of different treatments at  $P < 0.05$ .

## 3 讨论

目前多采用咪菌环胺、啉酰菌胺、环酰菌胺、咯菌腈和吡唑醚菌酯防治越橘灰霉病, 但研究表明其病原菌灰葡萄孢对以上 5 种农药均产生了抗药性 (Saito et al., 2016)。内生细菌在植物体内有稳定的生存空间, 可长期稳定地定殖于植物体, 不易受植物外环境的影响, 与病菌可以直接交互,

是一类重要的生防资源(何玲敏和叶建仁, 2014)。目前已报道粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)可用于越橘病害的防治(Xu et al., 2007; 范永强等, 2008; 徐大可等, 2009; 宫燕伟等, 2017)。

植物内生芽孢杆菌能产生芽孢, 抗逆性强, 且在环境中容易存活、定殖, 在生物防治领域应用广泛。本研究从越橘果实中分离获得1株对9种常见病原真菌具有高效抑菌效果的拮抗内生细菌菌株, 经鉴定为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)。陈兴等(2016)研究表明*Bacillus siamensis*能有效改善烟叶品质, 陈倩倩等(2016)筛选了一株对尖孢镰刀菌有较好抑制作用的菌株, 也鉴定为暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)。Meidong等(2017)从泡菜中分离获得*Bacillus siamensis*, 该菌株对鲢鱼细菌性病害有控制作用。*Bacillus siamensis*作为生防菌, 对灰葡萄孢拮抗作用方面还未见报道。本研究中获得的暹罗芽孢杆菌(*Bacillus siamensis*)菌株对灰葡萄孢拮抗效果好(抑菌圈直径为23 mm), 并且抑菌谱广, 对9种常见病原真菌具有抑菌效果, 对越橘灰霉病防效显著, 发病率和病斑直径均明显小于对照, 与多菌灵的防效相当, 说明该菌株可应用于越橘灰霉病的防治。

目前对生防菌培养条件的研究, 多采用单因素结合正交试验进行(Rahman et al., 2006; Shih et al., 2008; Li & Xu, 2011; 马桂珍等, 2013), 其试验设计及试验处理较多, 且涉及到后期繁琐的数据处理。响应面法是优化因素配比的有效方法, 通过多项式函数对试验模拟和优化, 简便、直观、可信度高(Bezerra et al., 2008)。本研究在单因素试验基础上采用Plackett-Burman设计和响应面方法相结合, 筛选出3个重要影响因素葡萄糖、温度和pH, 然后通过最陡爬坡试验逼近最佳响应面区域, 建立连续变量曲面模型和回归方程, 对菌株YJ15的发酵条件进行整体优化, 确定一套产率最大、最节约有效的发酵模式, 为菌株YJ15的深层发酵及大规模工业化生产奠定了基础。

## References

- Bezerra M A, Santelli R E, Oliveira E P, Villar L S, Escalera L A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76 (5): 965 - 977.
- Chen Qian-qian, Liu Bo, Wang Jie-ping, Che Jian-mei, Liu Guo-hong, Gong Hai-yan, Guan Xiong. 2016. Anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus siamensis* FJAT-28592. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 24 (2): 261 - 269. (in Chinese)
- 陈倩倩, 刘波, 王阶平, 车建美, 刘国红, 龚海艳, 关雄. 2016. 芽孢杆菌 FJAT-28592 抗真菌脂肽的研究. *农业生物技术学报*, 24 (2): 261 - 269.
- Chen Xing, Zhang Tian-dong, Dang Li-zhi, Wang Xian-guo, Chen Wei, Mo Ming-he, Duan Yan-qing. 2016. Study on improving tobacco quality by using *Bacillus siamensis*. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 31 (2): 322 - 327. (in Chinese)
- 陈兴, 张天栋, 党立志, 汪显国, 陈微, 莫明和, 段焰青. 2016. 利用西姆芽孢杆菌改善烟叶品质的研究. *云南农业大学学报(自然科学)*, 31 (2): 322 - 327.
- Chen Chang-qing, Zhang Bo, Yang Li-na, Gao Jie. 2012. Identification and biological characteristics of pathogenic bacteria of blueberry gray mold. *Journal of Jilin Agricultural University*, 34 (5): 511 - 516. (in Chinese)
- 陈长卿, 张博, 杨丽娜, 高洁. 2012. 越橘灰霉病病原菌鉴定及其生物学特性研究. *吉林农业大学学报*, 34 (5): 511 - 516.
- Dai Qi-dong, Li Guang-xu, Yang Hua, Zhang Guang-ren, Jiang Shu-cheng. 2016. Research on the pathogen and infection regularity of blueberry disease while in storage. *Journal of Fruit Science*, 33 (10): 1299 - 1306. (in Chinese)
- 戴启东, 李广旭, 杨华, 张广仁, 姜树成. 2016. 蓝莓采后病害的病原鉴定及发生规律研究. *果树学报*, 33 (10): 1299 - 1306.
- Dong Xiu-zhu, Cai Miao-ying. 2001. *Manual of common bacteria systematic identification*. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 东秀珠, 蔡妙英. 2001. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社.
- Fan Yong-qiang, Luan Yu-shi, Feng Lu. 2008. Selection of antagonistic microorganisms against blueberry spot disease pathogen and optimization of

- fermentation conditions. *Journal of Fruit Science*, 25 (3): 426 - 430. (in Chinese)
- 范永强, 栾雨时, 冯 璐. 2008. 越橘叶斑病原菌的拮抗菌筛选及其发酵条件优化. *果树学报*, 25 (3): 426 - 430.
- Fang Zhong-da. 1998. *Plant pathology research methods*. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- 方中达. 1998. *植病研究方法*. 北京: 中国农业出版社.
- Gong Yan-wei, Wang Jia-ning, Liang Chen, Zhao Hong-hai. 2017. Identification and antifungal activity of antagonistic bacterium HMQAU140045 against blueberry twig blight. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 19 (2): 195 - 202. (in Chinese)
- 宫燕伟, 王佳宁, 梁 晨, 赵洪海. 2017. 蓝莓枝枯病拮抗细菌 HMQAU140045 的鉴定和抑真菌活性. *农药学学报*, 19 (2): 195 - 202.
- He Ling-min, Ye Jian-ren. 2014. Endophytic bacteria: research advances and biocontrol applications. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 38 (6): 153 - 159. (in Chinese)
- 何玲敏, 叶建仁. 2014. 植物内生细菌及其生防作用研究进展. *南京林业大学学报 (自然科学版)*, 38 (6): 153 - 159.
- Hildebrand P D, Mcrae K B, Lu X. 2001. Factors affecting flower infection and disease severity of lowbush blueberry by *Botrytis cinerea*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 23 (4): 364 - 370.
- Hong S K. 2011. Occurrence of gray mold on blueberry trees caused by *Botrytis cinerea* in Korea. *Korean Journal of Mycology*, 39 (3): 213 - 216.
- Jin Yi-lan, Jiang Xuan-li, Huang Sheng-xian, Wang Zheng-wen, Hou Biao, Li Jia-lin. 2015. Investigation and identification of blueberry diseases in Guizhou Province. *China Fruits*, (4): 80 - 82. (in Chinese)
- 金义兰, 蒋选利, 黄胜先, 王正文, 侯 彪, 李佳林. 2015. 贵州省蓝莓病害种类调查与鉴定. *中国果树*, (4): 80 - 82.
- Kwon J H, Cheon M G, Choi O, Kim J. 2011. First report of *Botrytis cinerea* as a postharvest pathogen of blueberry in Korea. *Mycobiology*, 39 (1): 52 - 53.
- Li R F, Xu Y. 2011. Fermentation optimization to improve production of antagonistic metabolites by *Bacillus subtilis* strain BS501a. *Journal of Central South University Technology*, 18 (4): 1047 - 1053.
- Ma Gui-zhen, Ge Ping-hua, Liu Zhao-pu, Wang Shu-fang, Bao Zeng-hai, Wu Shao-jie, Fu Hong-run. 2013. Optimization of medium components and cultural conditions of marine *Bacillus amyloliquefaciens* strain GM-1. *Crops*, (3): 36 - 41. (in Chinese)
- 马桂珍, 葛平华, 刘兆普, 王淑芳, 暴增海, 吴少杰, 付泓润. 2013. 海洋解淀粉芽孢杆菌 GM-1 培养基及摇瓶发酵条件优化. *作物杂志*, (3): 36 - 41.
- Meidong R, Doolindachaporn S, Jamjan W, Sakai K, Tashiro Y, Okugawa Y, Tongpim S. 2017. A novel probiotic *Bacillus siamensis* b44v isolated from thai pickled vegetables (phak-dong) for potential use as a feed supplement in aquaculture. *Journal of General and Applied Microbiology*, 63 (4): 246 - 253.
- Qin Shi-wei, Xia Xiu-ying, An Li-jia. 2017. Isolation and identification of latent pathogenic fungi in blueberry fruits. *Northern Horticulture*, (18): 41 - 48. (in Chinese)
- 秦士维, 夏秀英, 安利佳. 2017. 蓝莓果实潜伏侵染病原真菌的分离与鉴定. *北方园艺*, (18): 41 - 48.
- Rahman M S, Ano T, Shoda M. 2006. Second stage production of iturinA by induced germination of *Bacillus subtilis* RB14. *Journal of Biotechnology*, 125 (4): 513 - 515.
- Rivera S A, Zoffoli J P, Latorre B A. 2013. Infection risk and critical period for the postharvest control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on blueberry in Chile. *Plant Disease*, 97 (8): 1069 - 1074.
- Saito S, Michailides T, Xiao C L. 2016. Fungicide resistance profiling in *Botrytis cinerea* populations from blueberries in California and Washington and their impact on control of gray mold. *Plant Disease*, 100 (10): 2087 - 2093.
- Shi Yu-ying, Song Hai-hui, Miao Shuang, Gong Chao, Wang Hui, Huang Hai-feng, Chen Xiu-ling, Zhang Shu-mei, Wang Ao-xue. 2017. Screening, identification, biocontrol and growth promoting effects of antagonistic bacteria WXCDD51 of tomato gray mold disease and tomato leaf mold disease. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (10): 1925 - 1936. (in Chinese)
- 石玉莹, 宋海慧, 苗 爽, 宫 超, 王 慧, 黄海锋, 陈秀玲, 张淑梅, 王傲雪. 2017. 番茄灰霉病和叶霉病拮抗细菌 WXCDD51 的筛选鉴定及其生防促生作用. *园艺学报*, 44 (10): 1925 - 1936.

- Shih I L, Kuo C Y, Hsieh F C, Kao S S, Hsieh C. 2008. Use of surface response methodology to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis*, in solid-state fermentation. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 39 (6): 635 - 643.
- Su Bao-ling. 2008. Summary of blueberry diseases. Beijing: China Science and Technology Press. (in Chinese)  
苏宝玲. 2008. 越橘病害概述. 北京: 中国科学技术出版社.
- Wang Chun-wei, Wang Yan, Zhang Xi-qian, Zhang Zuo-gang, Wang Mei-qin, Wang Jian-ming. 2017. Determination of biological characteristics and preliminary screening of control fungicides of *Fusarium acuminatum* causing Fusarium fruit rot on blueberry. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (8): 1589 - 1598. (in Chinese)  
王春伟, 王 燕, 张曦倩, 张作刚, 王美琴, 王建国. 2017. 越橘镰孢果腐病菌的生物学特性测定及防治药剂初步筛选. *园艺学报*, 44 (8): 1589 - 1598.
- Wang Wei, Li Shu-na, Li Hong-ya, Hao Zhi-min, Wang Quan, Wang Shu-xiang, Zhu Bao-cheng. 2010. Screening of antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea* and identification of strain X-75. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (2): 307 - 312. (in Chinese)  
王 伟, 李术娜, 李红亚, 郝志敏, 王 全, 王树香, 朱宝成. 2010. 番茄灰霉病拮抗细菌的筛选与 X-75 菌株鉴定. *园艺学报*, 37 (2): 307 - 312.
- Xu D, Xia X, Xu N, An L. 2007. Isolation and identification of a novel endophytic bacterial strain with antifungal activity from the wild blueberry *Vaccinium uliginosum*. *Annals of Microbiology*, 57 (4): 673 - 676.
- Xu Da-ke, Xia Xiu-ying, Wei Li-jun, He Jian-hua, An Li-jia. 2009. Study on chitinase-producing endophytic bacterium with antagonistic activity from *Vaccinium uliginosum*. *Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci)*, 35 (4): 395 - 400. (in Chinese)  
徐大可, 夏秀英, 魏立君, 贺建华, 安利佳. 2009. 1 株产几丁质酶的越橘内生拮抗细菌的研究. *浙江大学学报 (农业与生命科学版)*, 35 (4): 395 - 400.
- Yan Xue-rui, Zhao Rui-jie, Zhou Yuan, Fu Jun-fan, Dai Han-ping, Li Tian-lai. 2014. Differentiation of *Botrytis cinerea* Pers. on blueberry and susceptibility of various blueberry cultivars. *Journal of Fruit Science*, 31 (5): 912 - 916. (in Chinese)  
严雪瑞, 赵睿杰, 周 源, 傅俊范, 代汉萍, 李天来. 2014. 蓝莓灰霉病菌差异性比较及蓝莓品种抗病性鉴定. *果树学报*, 31 (5): 912 - 916.
- Yong Dao-jing, Wang Cai-xia, Li Gui-fang, Li Bao-hua. 2014. Control efficiency of endophytic actinomycetes A-1 against apple fruit ring rot and its influence on the activity of defense-related enzymes. *Acta Phytopythologica Sinica*, 41 (3): 335 - 341. (in Chinese)  
雍道敬, 王彩霞, 李桂舫, 李保华. 2014. 内生放线菌 A-1 对苹果果实轮纹病的防效及防御性酶活性的影响. *植物保护学报*, 41 (3): 335 - 341.
- Zhang Wei, Qiao Guang-xing, Huang Jin-bao, Wang Zhong-yue, Li Xing-hong. 2013. Evaluation on resistance of grape gray mold pathogen *Botrytis cinerea* to Pyrimethanil in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 46 (6): 1208 - 1212. (in Chinese)  
张 玮, 乔广行, 黄金宝, 王忠跃, 李兴红. 2013. 中国葡萄灰霉病菌对啞霉胺的抗药性检测. *中国农业科学*, 46 (6): 1208 - 1212.