

# 解淀粉芽胞杆菌防治番茄果实灰霉病及其抑菌物质分析

王亚杰, 高 宇, 陈晓萌, 刘梦灵, 张冬冬\*

(河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071000)

**摘 要:** 通过对峙培养法筛选对灰葡萄孢菌有显著拮抗性的产芽胞细菌, 利用番茄果实检测拮抗菌及其发酵上清液对灰霉病的防治效果, 采用 ESI-MS 检测拮抗菌发酵上清液粗提取物中主要抑菌物质并利用 PCR 检测合成抑菌物质的相关基因, 通过菌体菌落形态观察、生理生化试验、16S rDNA 及 *gyrB* 分析对拮抗细菌进行种属鉴定。结果表明, 分离筛选的拮抗菌 fqhm-13 及其发酵上清液对番茄果实灰霉病防治效果分别达到 69.0% 和 78.1%。fqhm-13 发酵上清液粗提取物中主要抑菌物质为脂肽抗生素 C14 ~ C16 的 surfactin A 和 C15 ~ C17 的 iturin A。fqhm-13 基因组中含有脂肽抗生素合成基因 *ituC*、*itud*、*fenD* 和 *srfAB*。fqhm-13 菌株为解淀粉芽胞杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。该研究为利用芽胞杆菌及其代谢产物防治番茄果实灰霉病奠定了材料基础。

**关键词:** 番茄; 果实; 灰霉病; 灰葡萄孢菌; 解淀粉芽胞杆菌; 脂肽抗生素

**中图分类号:** S 641.2; S 436.412.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2018) 07-1296-09

## Biocontrol Ability of *Bacillus amyloliquefaciens* Against Gray Mold on Tomato Fruit

WANG Yajie, GAO Yu, CHEN Xiaomeng, LIU Mengling, and ZHANG Dongdong\*

(College of Life Science, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China)

**Abstract:** Gray mold caused by *Botrytis cinerea* has been found to be the main fungal disease of tomato fruit. The dual culture method was used to screen for *Bacillus* strains with significant antagonistic activity to *B. cinerea*. Further testing of control efficiency was completed by spraying the antagonistic bacterium and its fermentation supernatant on tomato fruits. ESI-MS was utilized to detect main antifungal substances in the antagonistic bacterium's fermentation supernatant crude extract. Further analysis using PCR allowed for the detection of genes related to antimicrobial substances synthesis. The species of the antagonist bacterium was identified through its colony and cell morphology, physiological and biochemical tests, and 16S rDNA and *gyrB* analysis. The control effect of the screened antagonist fqhm-13 and its fermentation supernatant on gray mold of tomato fruit was identified to be 69.0% and 78.1%, respectively. The main antimicrobial substances in the qhm-13 fermentation supernatant crude extract include lipopeptide antibiotics of C14 - C16 surfactin A and C15 - C17 iturin A. PCR detection showed

**收稿日期:** 2018 - 03 - 04; **修回日期:** 2018 - 06 - 15

**基金项目:** 河北农业大学大学生创新创业训练计划项目 (2017101); 河北农业大学教改项目 (2015JM04); 河北省教育厅课题生物技术品牌特色专业建设研究项目 (2012GJJG054); 教育部、河北省教育厅生物技术专业综合改革试点项目 (201202)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangdongcumt@163.com; Tel: 0312-7528273)

that the genome of fqhm-13 contained genes related to antibiotic synthesis, such as *ituC*, *ituD*, *fenD* and *srfAB*. Through species identification techniques, strain fqhm-13 was identified as *Bacillus amyloliquefaciens*. This study laid the foundation for the use of *B. amyloliquefaciens* and its metabolites to prevent and control gray mold on tomato fruit.

**Keywords:** tomato; fruit; gray mold; *Botrytis cinerea*; *Bacillus amyloliquefaciens*; lipopeptide antibiotics

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 灰霉病是由半知菌亚门灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea* Pers.) 引起的真菌病害 (Ahmed et al., 2017), 在中国绝大多数番茄种植区均有发生, 给番茄生产造成巨大损失, 以花期和果实膨大期最为严重 (Xie et al., 2017)。Gong 等 (2017) 报道, 粉红粘帚霉 (*Clonostachys rosea*) 能够抑制灰葡萄孢菌的增殖并有效防治番茄灰霉病的发生, 增加 3-吲哚乙酸、水杨酸和 NO 的水平, 促进苯丙氨酸解氨酶和多酚氧化酶的合成。罗伦隐球酵母 (*Cryptococcus laurentii*) 能够诱导番茄的防卫反应, 并增强过氧化物酶、苯丙氨酸脱氨酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和超氧化物歧化酶的活性 (Zhang et al., 2013)。从健康番茄植株根际土壤中分离筛选的假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) WXCDD51 对番茄灰霉病的防治效果达 66.23%, 对番茄种子萌发及幼苗生长均具有促进作用 (石玉莹 等, 2017)。绿针假单胞菌 (*Pseudomonas choleoaphtis*) HL5-4 对番茄苗期灰霉病的防治效果为 62.88%, 且在番茄果实和叶片保持一定的定殖密度 (申顺善 等, 2016)。

芽胞杆菌 (*Bacillus* spp.) 在自然界中广泛分布, 为非致病菌和植物内生细菌, 通过多种机制发挥抑制植物病害的作用。芽胞杆菌能够形成抗逆耐热的芽胞, 赋予它长期生存能力且容易开发利用 (Sun et al., 2013); 其分泌产生多种次生代谢产物而具有显著的抗病促生作用。因此, 它是理想的生防菌筛选对象 (Falardeau et al., 2013)。脂肽抗生素具有广谱抗真菌活性, 是芽胞杆菌发挥生防作用的主要因素 (Velho et al., 2011; Yang et al., 2015)。脂肽抗生素根据其碳原子数以及氨基酸种类不同分为 3 大家族: 表面活性素 (surfactins)、丰革素 (fengycins) 和伊枯草菌素 (iturins)。枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) B-FS06 发酵无菌上清液能抑制黄曲霉的生长和孢子萌发, 其主要抑菌物质为表面活性素和 bacillomycin D (Zhang et al., 2008)。枯草芽胞杆菌 YB-05 对小麦全蚀病的防治效果优于化学试剂, 主要抑菌物质为伊枯草菌素 A 和表面活性素 (Yang et al., 2015)。

本研究从番茄果实中分离筛选对灰霉病菌有显著拮抗活性的内生芽胞杆菌, 检测拮抗菌及其发酵上清液对番茄灰霉病的防治效果, 利用质谱检测拮抗菌发酵上清液粗提取物中的主要抑菌物质, 为番茄灰霉病的生物防治及采摘后番茄果实的储存奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 番茄材料及产芽胞细菌的分离

红熟期‘千禧’樱桃番茄果实从河北农业大学校园超市购买, 番茄灰霉病病原菌, 即灰葡萄孢菌保存于河北农业大学制药工程实验室, 分离自保定市满城区番茄大棚感染灰霉病的番茄果实。

将健康的番茄果实依次用 5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 表面消毒 3 min, 75%酒精处理 30~60 s, 无菌水冲洗 3 次, 然后在无菌研钵中碾碎, 放入装有玻璃珠和 50 mL 蒸馏水的灭菌三角瓶中, 摇床振荡 1 h, 80 °C 水浴加热 15 min, 进行系列梯度稀释后涂板分离单菌落。

## 1.2 拮抗灰葡萄孢菌的产芽胞细菌筛选及其对番茄果实灰霉病的防治检测

采用对峙培养法进行拮抗灰葡萄孢菌的产芽胞细菌的筛选。挑取活化的灰葡萄孢菌菌片接种到马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基平板中央, 在距离菌片 3 cm 处接种分离的产芽胞细菌, 每个平板接种 4 株 (图 1), 27 °C 培养箱倒置培养 5 d, 观察抑菌带生成情况 (Zhang et al., 2017a)。

将拮抗菌接种到营养琼脂 (NA) 斜面上, 37 °C 恒温培养过夜, 挑取活化的菌苔转接到 50 mL 营养肉汤 (NB) 培养基中, 37 °C 摇床 220 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养过夜。将发酵液按照 10% 接种量转接到基础培养基 (蛋白胨 1%, 葡萄糖 1%, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.2%, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.4%, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.05%, pH 7.0~7.2), 37 °C 摇床 220 r·min<sup>-1</sup> 振荡培养 48 h (Zhang et al., 2017b)。分别回收菌体和上清液, 将菌体用无菌水悬浮, 制成活菌含量为 1 × 10<sup>8</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> 的菌悬液; 将上清液采用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 回收滤液。选取健康番茄果实进行表面消毒, 用灭菌针在果实表面均匀扎 4 个小孔, 分别放入菌悬液和上清液中放置 10 s 后在超净工作台内晾干。用灭菌针将少量灰葡萄孢菌丝接入番茄小孔中, 将只接种灰葡萄孢菌的处理作为病原菌对照, 将只扎孔的处理作为空白对照。每个处理 5 个平行, 每个平行 5 个番茄果实, 分别用塑料盒密封, 28 °C 培养箱中培养 5 d。试验共重复 3 次。根据番茄果实灰霉病的分级标准 (Lima et al., 2013) 记录番茄果实的病级。病情指数 = 100 × Σ (各级发病果实数量 × 相对级数值) / (调查总数 × 最高级数值)。防病效果 (%) = 100 × (对照区病情指数 - 处理区病情指数) / 对照区病情指数。

用 SPSS 17.0 软件的 ANOVA 程序进行方差分析, 差异显著性比较使用 Duncan's 新复极差法。

## 1.3 拮抗菌发酵上清液的粗提取及质谱检测

将在基础培养基培养 48 h 的拮抗菌发酵上清液用 6 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸调节至 pH 2.0 并于 4 °C 保存过夜, 8 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min 去除上清, 沉淀用 pH 2.0 盐酸溶液冲洗 2 遍, 用甲醇萃取 2 遍。萃取液用 0.22 μm 疏水微孔滤膜过滤, 化合物分子量利用安捷伦 6410 质谱仪进行测定, 电离方式采用电喷雾离子源, 喷雾电压为 4.5 kV, 毛细管温度为 300 °C, 检测方式为负离子 (Waseem et al., 2009)。

## 1.4 拮抗菌抑菌物质合成相关基因的检测

以 CTAB 法提取的拮抗菌基因组 DNA 为模板进行脂肽抗生素合成基因 *ituC*、*ituD*、*srfAB* 和 *fenD* 的 PCR 检测, 引物分别采用 ITUCF1/ITUCR3、ituD2F/ituD2R、110F/110R 和 FNDF1/FNDR1 (Joshi & Gardener, 2006)。基因序列与 GenBank 数据进行比对分析。

## 1.5 拮抗菌种属鉴定

参考《伯杰氏细菌鉴定手册》的方法进行菌落、菌体形态观察和生理生化指标检测 (Buchanan & Gibbons, 1994)。利用通用引物 27F/1495R (Robertson et al., 2001) 和 UP-1S/UP-2Sr (Yamamoto & Harayama, 1995) 分别扩增拮抗菌 16S rDNA 和 *gyrB* 序列。PCR 产物测序结果在 NCBI 数据库中用 BLAST 进行分析, 与模式菌株序列进行同源性比较, 用 MEGA5.0 软件构建系统发育树。

# 2 结果与分析

## 2.1 拮抗灰葡萄孢菌的芽胞杆菌的筛选

从番茄果实中共分离获得产芽胞细菌 186 株。经对峙培养检测, 有 68 株呈现对灰葡萄孢菌的

拮抗活性, 占分离菌株的 36.56%。选择 10 株对灰葡萄孢菌抑菌活性最强的菌株, 利用其发酵上清液进行灰葡萄孢菌拮抗活性检测, 最终筛选出 1 株拮抗活性最强的菌株, 命名为 fqhm-13 (图 1)。

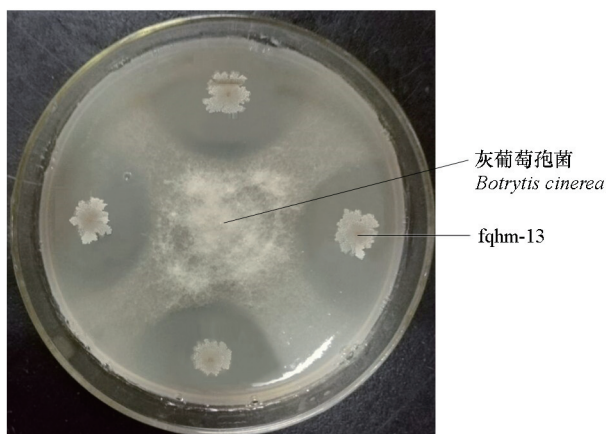


图 1 拮抗菌 fqhm-13 对灰葡萄孢菌的拮抗作用  
Fig. 1 The antagonism of antagonist fqhm-13 against *Botrytis cinerea*

## 2.2 拮抗菌对番茄果实灰霉病的防治效果

在接种灰霉病菌灰葡萄孢菌 5 d 后对各处理进行病情指数和防治效果调查 (表 1), 只接种病原菌的对照处理发病严重, 病情指数为 79.3。拮抗菌 fqhm-13 及其发酵上清液处理发病显著低于病原菌处理, 病情指数分别为 24.6 和 17.4, 防治效果为 69.0%和 78.1%; 发酵上清液处理防治效果优于拮抗菌处理。

表 1 拮抗菌 fqhm-13 及其发酵上清液对番茄果实灰霉病的防治效果

Table 1 The control effects of antagonist fqhm-13 and its fermentation supernatant against tomato fruit gray mold disease

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防治效果/% Control efficiency
病原菌 Pathogenic fungi	79.3 ± 5.7 a	—
拮抗菌 Antagonistic bacteria	24.6 ± 2.1 b	69.0
发酵上清液 Fermentation supernatant	17.4 ± 1.9 c	78.1

注: 表中数值为平均值 ± 标准差。不同字母表示处理间存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。

Note: The data were average ± SD. Different letters indicate significant difference at 0.05 level.

## 2.3 拮抗菌发酵上清液粗提物质质谱检测

将拮抗菌 fqhm-13 发酵上清液粗提取物利用 ESI-MS 进行分析, 分别发现  $m/z$  值为 1 020.6591、1 034.6719、1 048.6887、1 077.5125、1 091.5284 和 1 105.5442 的化合物 (图 2)。其中 1 020.6591、1 034.6719 和 1 048.6887 之间分子量相差 14, 恰好为 1 个  $-CH_2-$ , 表明 3 种化合物为同系物, 与报道的脂肽抗生素——表面活性素 (surfactin) 家族的相对分子量一致, 为 C14 ~ C16 的 surfactin A。 $m/z$  为 1 077.5125、1 091.5284 和 1 105.5442 的化合物之间分子量也相差 14, 与报道的脂肽抗生素——伊枯草菌素 (iturin) 家族的相对分子量一致, 为 C15 ~ C17 的 iturin A。

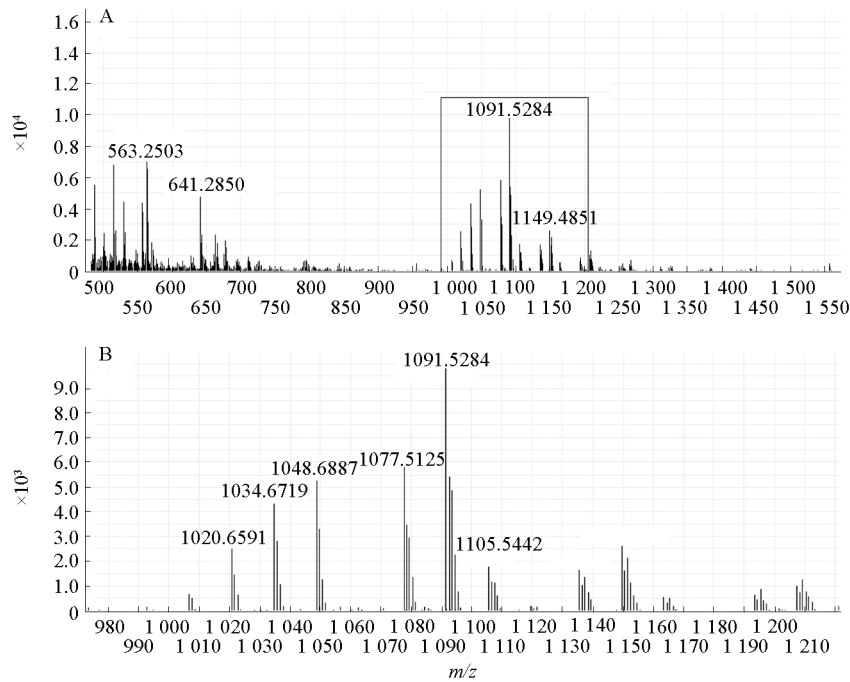


图2 拮抗菌 fqhm-13 发酵上清液的粗提取物 ESI-MS 检测图谱

A 图方框部分放大为 B 图。

Fig. 2 ESI-MS analysis of antagonist fqhm-13 fermentation supernatant crude extract  
The frame section of figure A is figure B.

## 2.4 拮抗菌合成脂肽类抗生素基因检测

用 PCR 方法检测了拮抗菌 fqhm-13 合成脂肽类抗生素的 *ituC*、*ituD*、*fenD* 和 *srfAB* 基因，结果如图 3 所示。

将测序结果在 NCBI 上分别进行 BLAST 同源性分析，比对结果表明，*srfAB* 编码 surfactin 合成酶亚基 2，*ituC* 编码 iturin A 合成酶 C，*ituD* 编码丙二酸单酰辅酶 A 酰基转移酶，*fenD* 编码 fengycin 合成酶。其中 *ituC* 和 *ituD* 合成 iturin A，*srfAB* 合成 surfactin，*fenD* 合成 fengycin。

## 2.5 拮抗菌种属鉴定

在 NA 培养基上，拮抗菌 fqhm-13 培养初期菌落乳白色，圆形，表面湿润粘稠；培养后期表面干燥有皱褶，中央凹陷，呈火山口状。菌体呈杆状，常成串出现，可形成椭圆形的中生芽胞，革兰氏染色呈阳性。

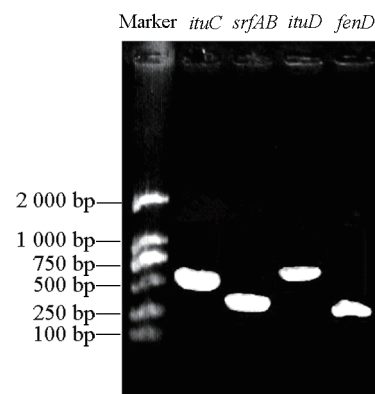


图3 琼脂糖凝胶电泳检测拮抗菌 fqhm-13 合成脂肽类抗生素基因 PCR 产物

Fig. 3 Agarose gel-electrophoresis detection of PCR products for lipopeptide antibiotic biosynthesis genes from antagonist fqhm-13

生理生化指标检测如表 2 所示。接触酶试验、3-酮基乳糖、脓青素、丙二酸利用、酒石酸盐利用、甲基红和苯丙氨酸脱氨酶试验结果均为阴性。V-P 试验、硝酸盐及亚硝酸盐还原试验、淀粉水解试验、吲哚试验、柠檬酸盐试验、脲酶试验、硫化氢试验、糖醇发酵（葡萄糖、乳糖、甘露糖）试验和产氨试验结果均为阳性。

将拮抗菌 fqhm-13 菌体形态、菌落特征及生理生化试验与《伯杰氏细菌鉴定手册》进行对照，初步鉴定其为芽胞杆菌属（*Bacillus* spp.）。

表 2 拮抗菌 fqhm-13 生理生化试验结果  
Table 2 Results of physiological and biochemical experiments of antagonist fqhm-13

项目 Item	试验结果 Result	项目 Item	试验结果 Result
接触酶试验 Catalase test	-	甘露糖酵解 Mannose fermentation	+
硝酸盐还原试验 Nitrate reduction test	+	3-酮基乳糖 3-keto lactose	-
亚硝酸盐还原试验 Nitrite reduction test	+	脓青素 Pyocyanine	-
淀粉水解试验 Starch hydrolysis test	+	吲哚试验 Indole test	+
V-P 试验 V-P test	+	产氨试验 Ammonia production test	+
柠檬酸盐试验 Citrate test	+	丙二酸利用 Malonate utilization	-
脲酶试验 Urease test	+	酒石酸盐利用 Tartrate utilization	-
硫化氢 Hydrogen sulfide	+	甲基红 Methyl red	-
葡萄糖酵解 Glucose fermentation	+	苯丙氨酸脱氨酶试验 Phenylalanine deaminase test	-
乳糖酵解 Lactose fermentation	+		

注：+ 为阳性，- 为阴性。

Note: + means positive, - means negative.

将 fqhm-13 菌株的 16S rDNA 和 *gyrB* 序列与 GenBank 序列进行比较，获得相近的芽胞杆菌属标准菌株的 16S rDNA 和 *gyrB* 序列，得到 fqhm-13 及相关菌株的进化距离并构建系统发育树（图 4，图 5）。

根据 16S rDNA 和 *gyrB* 序列相似性分析，确定 fqhm-13 为解淀粉芽胞杆菌（*Bacillus amyloliquefaciens*）。

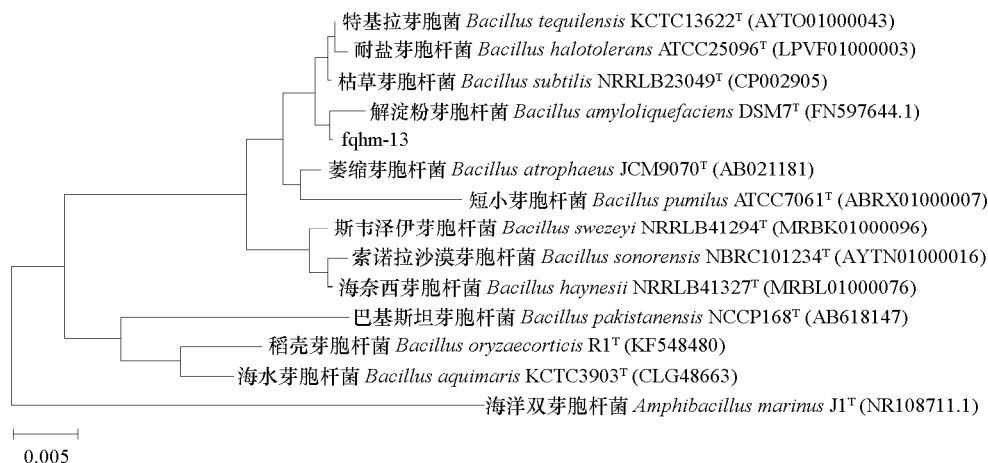


图 4 基于 16S rDNA 序列的拮抗菌 fqhm-13 及相关菌株的系统发育树  
Fig. 4 Neighbor-joining tree showing relationship between fqhm-13 and related strains based on the 16S rDNA sequence

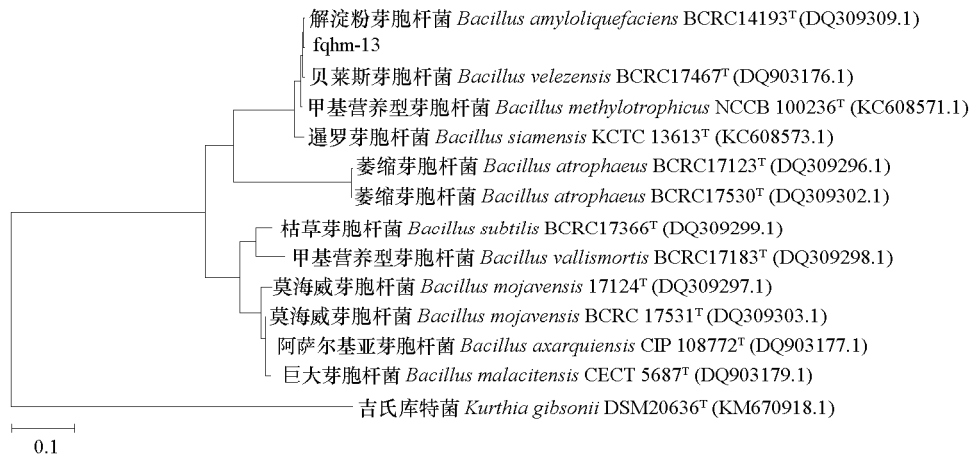


图5 基于 *gyrB* 序列的拮抗菌 fqhm-13 及相关菌株的系统发育树

Fig. 5 Neighbor-joining tree showing relationship between antagonist fqhm-13 and related strains based on the *gyrB* sequence

### 3 讨论

已经分离获得多种芽胞杆菌菌株, 对不同植物的多种病害呈现显著的拮抗作用, 这些菌株大多来源于植物的根际土壤、根系表面及植株体内 (张霞 等, 2007; 王伟 等, 2010; Liu et al., 2011; Wang et al., 2016)。 *B. pumilus* SQR-N43 能够诱导立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) Q1 菌丝发生变形, 细胞质液泡膨大和细胞质泄露。盆栽试验表明, SQR-N43 能够降低土壤中 *R. solani* 的数量 (Huang et al., 2012)。 *B. licheniformis* N1 制剂显著降低番茄植株及花朵的灰霉病的发生, 效果优于化学试剂, 并且具有促生活性 (Lee et al., 2006)。在本研究中, *B. amyloliquefaciens* fqhm-13 能够抑制灰葡萄孢菌在番茄果实的增殖, 减轻番茄果实灰霉病的发生, 便于制备芽胞菌剂进行应用, 但其抗病机理尚需进一步研究。

通过分泌次生代谢产物抑制或者杀灭植物病原菌, 是芽胞杆菌防控植物病害最直接的体现 (Touré et al., 2004), 产生抗菌活性物质是其防病促生的主要机制 (Leclère et al., 2005)。芽胞杆菌产生的脂肽抗生素具有广谱抗菌活性, 对植物体内、体表及土壤有害微生物有广泛而显著的抑制效果。此外, 脂肽类物质在自然条件下易分解, 对环境友好 (Baysal et al., 2013; Hamdache et al., 2013)。

Surfactin 具有一定程度的抗细菌作用, 本身没有抗真菌活性, 但对其他脂肽特别是 iturin 的抗真菌活性有显著增强效果 (Pérez-García et al., 2011)。Surfactin 还能促进生防菌在植物根部有效定殖并形成生物膜, 保护植物根部免受病原菌侵染 (Bais et al., 2004)。C13 ~ C15 surfactin A 和羊毛硫抗生素 subtilosin 是枯草芽胞杆菌 *fmbR* 产生的主要抗菌物质 (别小妹 等, 2006)。

伊枯草菌素有强溶血活性, 但和表面活性素不同的是对于植物病原真菌有强抑制作用, 对大多数的致病酵母和霉菌有强烈的拮抗作用, 但无抗细菌和抗病毒活性 (Stein, 2005)。从番茄中分离的内生细菌 *B. subtilis* B47 分泌产生的 iturin A<sub>2</sub> 能显著抑制玉米小斑病菌的生长, 经部分纯化后, 田间防效达 64.2%, 优于百菌清 (Ye et al., 2012)。Caldeira 等 (2011) 利用 LC-MS 和抗菌活性检测相结合的方法快速鉴定了 *B. amyloliquefaciens* CCMI 1051 合成的伊枯草菌素, 而不需要进行提纯, 显示了较高的效率和应用前景。

本试验中, 利用 *B. amyloliquefaciens* fqhm-13 发酵上清液防治番茄果实灰霉病, 效果优于菌体, 其活性成分为脂肽抗生素。直接利用芽胞杆菌的代谢产物进行生物防治的报道较少。本研究为直接

利用脂肽抗生素防治番茄果实灰霉病提供了参考。抑菌物质的产生受多种因素影响, 这往往导致实验室条件下和实际应用中的效果不一致, 直接利用抑菌物质可以减少干扰。利用 fqhm-13 发酵上清液的 surfactin A 和 iturin A 为防治番茄果实灰霉病及采摘后番茄的储存提供了良好的应用前景。

## References

- Ahmed F A, Sipes B S, Alvarez A M. 2017. Postharvest diseases of tomato and natural products for disease management. *African Journal of Agricultural Research*, 12 (9): 684 - 691.
- Bais H, Fall R, Vivanco J. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of arabidopsis roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiology*, 134: 307 - 319.
- Baysal Ö, Lai D, Xu H H, Siragusa M, Çalışkan M, Carimi F, da Silva J A T, Tör M. 2013. A proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. *PLoS One*, 8 (1): 1 - 12.
- Bie Xiaomei, Lu Zhaoxin, Lü Fengxia, Zhao Haizhen, Yang Shengyuan, Sun Lijun. 2006. Isolation and identification of the antimicrobial substance produced by *Bacillus subtilis* fmbR. *Scientia Agricultura Sinica*, 39 (11): 2327 - 2334. (in Chinese)
- 别小妹, 陆兆新, 吕凤霞, 赵海珍, 杨胜远, 孙力军. 2006. *Bacillus subtilis* fmbR 抗菌物质的分离和鉴定. *中国农业科学*, 39 (11): 2327 - 2334.
- Buchanan R E, Gibbons N E. 1994. *Bergey's manual of systematic bacteriology* 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Company.
- Caldeira A T, Arteiro J M S, Coelho A V, Roseiro J C. 2011. Combined use of LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCM1 1051. *Process Biochemistry*, 46 (9): 1738 - 1746.
- Falardeau J, Wise C, Novitsky L, Avis T J. 2013. Ecological and mechanistic insights into the direct and indirect antimicrobial properties of *Bacillus subtilis* lipopeptides on plant pathogens. *Journal of Chemical Ecology*, 39: 869 - 878.
- Gong C, Liu Y, Liu S Y, Cheng M Z, Zhang Y, Wang R H, Chen H Y, Li J F, Chen X L, Wang A X. 2017. Analysis of *Clonostachys rosea*-induced resistance to grey mould disease and identification of the key proteins induced in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 123: 83 - 93.
- Hamdache A, Azarken R, Lamarti A, Aleu J, Collado I G. 2013. Comparative genome analysis of *Bacillus* spp. and its relationship with bioactive nonribosomal peptide production. *Phytochemistry Reviews*, 12: 685 - 716.
- Huang X Q, Zhang N, Yong X Y, Yang X M, Shen Q R. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiological Research*, 167: 135 - 143.
- Joshi R, Gardener B B M. 2006. Identification and characterization of novel genetic markers associated with biological control activities in *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*, 96 (2): 145 - 154.
- Leclère V, Béchet M, Adam A, Guez J S, Wathelet B, Ongena M, Thonart P, Gancel F, Chollet-Imbert M, Jacques P. 2005. Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (8): 4577 - 4584.
- Lee J P, Lee S W, Kim C S, Ji H S, Ju H S, Lee K Y, Kim H J, Soon J J, Byung J M. 2006. Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 37 (3): 329 - 337.
- Lima J R, Gondim D M F, Oliveria F S A, Goncalves L R B, Viana F M P. 2013. Use of killer yeasts in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology & Technology*, 83: 58 - 64.
- Liu Y, Tao J, Yan Y J, Li B, Li H, Li C. 2011. Biocontrol efficiency of *Bacillus subtilis* SL-13 and characterization of an antifungal chitinase. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19 (1): 128 - 134.
- Pérez-García A, Romero D, de Vicente A. 2011. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of *Bacilli* in agriculture. *Current Opinion in Biotechnology*, 22: 187 - 193.
- Robertson B R, Tezuka N, Watanabe M M. 2001. Phylogenetic analyses of *Synechococcus* strains (cyanobacteria) using sequences of 16S rDNA and part of the phycocyanin operon reveal multiple evolutionary lines and reflect phycobilin content. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51 (3): 861 - 871.



- Shen Shunshan, Zhang Yingying, Zhang Weina, Lü Yayou, Zhu Zhuolin, Piao Fengzhi. 2016. Antifungal activity of *Pseudomonas choleoaphitis* HL5-4 against tomato gray mold and its colonization ability. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (6): 1195 - 1202. (in Chinese)  
申顺善, 张莹莹, 张维娜, 吕雅悠, 朱卓琳, 朴凤植. 2016. 绿针假单胞菌 HL5-4 对番茄灰霉菌的抑制活性及其定殖能力. *园艺学报*, 43 (6): 1195 - 1202.
- Shi Yuying, Song Haihui, Miao Shuang, Gong Chao, Wang Hui, Huang Haifeng, Chen Xiuling, Zhang Shumei, Wang Aoxue. 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): 1897 - 1910. (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): 1897 - 1910.
- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56 (4): 845 - 857.
- Sun Z B, Yuan X F, Zhang H, Wu L F, Liang C, Feng Y J. 2013. Isolation, screening and identification of antagonistic downy mildew endophytic bacteria from cucumber. *European Journal of Plant Pathology*, 137: 847 - 857.
- Touré Y, Ongena M, Jacques P, Guiro A, Thonart P. 2004. Role of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* GA1 in the reduction of grey mould disease caused by *Botrytis cinerea* on apple. *Journal of Applied Microbiology*, 96 (5): 1151 - 1160.
- Velho R V, Medina L F C, Segalin J, Brandelli A. 2011. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. *Folia Microbiology*, 56: 297 - 303.
- Wang B B, Shen Z Z, Zhang F G, Waseem R, Yuan J, Huang R, Ruan Y Z, Li R, Shen Q R. 2016. *Bacillus amyloliquefaciens* strain W19 can promote growth and yield and suppress *Fusarium wilt* in banana under greenhouse and field conditions. *Pedosphere*, 26 (5): 733 - 744.
- 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.
- Waseem R, Yang X M, Wu H S, Wang Y, Xu Y C, Shen Q R. 2009. Isolation and characterization of fusaricidin-type compound-producing strain of *Paenibacillus polymyxa* SQR-21 active against *Fusarium oxysporum* f. sp. *Nevium*. *European Journal of Plant Pathology*, 125 (3): 471 - 483.
- Xie C Q, Yang C, He Y. 2017. Hyperspectral imaging for classification of healthy and gray mold diseased tomato leaves with different infection severities. *Computers and Electronics in Agriculture*, 135: 154 - 162.
- Yamamoto S, Harayama S. 1995. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61 (3): 1104 - 1109.
- Yang L R, Quan X, Xue B G, Goodwin P H, Lu S B, Wang J H, Wei D, Wu C. 2015. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biological Control*, 85: 52 - 58.
- Ye Y F, Li Q Q, Fu G, Yuan G Q, Miao J H, Lin W. 2012. Identification of antifungal substance (Iturin A<sub>2</sub>) produced by *Bacillus subtilis* B47 and its effect on Southern Corn Leaf Blight. *Journal of Integrative Agriculture*, 11 (1): 90 - 99.
- Zhang C F, Chen K S, Wang G L. 2013. Combination of the biocontrol yeast *Cryptococcus laurentii* with UV-C treatment for control of postharvest diseases of tomato fruit. *BioControl*, 58 (2): 269 - 281.
- Zhang D D, Gao T G, Li H Y, Lei B S, Zhu B C. 2017b. Identification of antifungal substances secreted by *Bacillus subtilis* Z-14 that suppress *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biocontrol Science and Technology*, 27 (2): 237 - 251.
- Zhang D D, Guo X J, Wang Y J, Gao T G, Zhu B C. 2017a. Novel screening strategy reveals a potent *Bacillus* antagonist capable of mitigating wheat take-all disease caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Letters in Applied Microbiology*, 65 (6): 512 - 519.
- Zhang T, Shi Z Q, Hu L B, Cheng L G, Wang F. 2008. Antifungal compounds from *Bacillus subtilis* B-FS06 inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24: 783 - 788.
- Zhang Xia, Tang Wenhua, Zhang Liqun. 2007. Biological control of plant diseases and plant growth promotion by *Bacillus subtilis* B931. *Acta Agronomica Sinica*, 33 (2): 236 - 241. (in Chinese)  
张霞, 唐文华, 张力群. 2007. 枯草芽孢杆菌 B931 防治植物病害和促进植物生长的作用. *作物学报*, 33 (2): 236 - 241.