

# 枣炭疽病菌拮抗芽孢杆菌的筛选鉴定及其抑菌物质分析

李嘉维, 徐兰依, 王冬霜, 吕丽洁, 陈晓萌, 张冬冬\*

(河北农业大学生命科学学院, 河北保定 071000)

**摘要:** 从冬枣果实中分离芽孢杆菌, 通过对峙培养法筛选对炭疽病菌有显著拮抗活性的菌株, 利用冬枣果实检测拮抗菌对炭疽病的防治效果并对拮抗菌进行种属鉴定, 采用抑菌圈法及液相色谱-质谱联用技术分别对拮抗菌合成抑菌物质进行抑菌活性检测和结构鉴定。获得 1 株对枣炭疽病菌有显著拮抗活性的芽孢杆菌 Tj-19, 经鉴定为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。Tj-19 菌体及其发酵上清液对冬枣果实炭疽病的防治效果分别达到 74.9% 和 75.8%, 主要抑菌物质为伊枯草菌素 A 和伊枯草菌素 B。

**关键词:** 枣; 炭疽病; 芽孢杆菌; 拮抗; 筛选; 抑菌物质

**中图分类号:** S 665.1

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2019) 12-2406-09

## Screening and Identification of *Bacillus* Antagonist Against Anthracnose of Jujube and Analysis of Its Antifungal Substances

LI Jiawei, XU Lanyi, WANG Dongshuang, LÜ Lijie, CHEN Xiaomeng, and ZHANG Dongdong\*

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

**Abstract:** *Bacillus* strains isolated from jujube fruits with significant antagonistic activity against anthracnose was screened by confrontation culture method. The control effect of antagonistic bacteria against anthracnose was tested by *in vivo* experiment using winter jujube fruits. The activity and structure of the antifungal substance from the fermentation supernatant of the antagonistic bacterium were tested by inhibition zone method and liquid chromatography-mass spectrometry (LC - MS), respectively. Strain Tj-19 which exhibited significant antagonistic activity against jujube anthracnose was identified as *Bacillus amyloliquefaciens* based on the morphological observation, physiological and biochemical characteristics and *16S* rDNA and *gyrB* sequence analysis. The biocontrol effect of Tj-19 bacteria cell and its fermentation supernatant on anthracnose of winter jujube fruit reached 74.9% and 75.8%, respectively. The main antifungal substances from the fermentation broth of strain Tj-19 were Iturin A and Iturin B.

**Keywords:** jujube; anthracnose; *Bacillus*; antagonism; screening; antifungal substance

枣 (*Ziziphus jujuba* Mill.) 炭疽病 (Anthracnose) 在河北、山西、山东、河南等枣生产区多有发生 (魏书艳 等, 2017), 多在枣接近成熟时发病, 感病后的枣品质下降, 严重者丧失经济价值 (李

收稿日期: 2019-07-18; 修回日期: 2019-09-06

基金项目: 河北农业大学教改项目 (15JM04); 河北省教育厅课题 (12GJG054); 教育部、河北省教育厅专业综合改革试点项目 (201202)

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

坤英 等, 2006)。枣炭疽病病原菌为真菌半知菌亚门的刺盘胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.), 菌丝体在果肉内生长旺盛, 病菌以菌丝体潜伏于枣头、枣吊、枣股及病果、僵果内越冬。翌年分生孢子借助风雨从自然孔口、伤口或直接穿透表皮侵入 (常慧红 等, 2011)。

目前, 枣炭疽病的防治尚缺乏抗病品种和有效的化学药剂, 而轮作在大面积种植中较难实现 (魏书艳 等, 2017)。芽孢杆菌在自然界中广泛存在, 为非致病细菌, 对人畜无毒无害, 可在植物根际土壤及植株体内有效定殖, 对多种植物病原菌有拮抗活性 (Khan et al., 2018)。芽孢杆菌突出的特征是生长活力旺盛, 极易分离培养, 能产生抗逆耐热的芽孢, 有利于菌种筛选和菌剂制备 (Sun et al., 2013)。

脂肽抗生素是芽孢杆菌合成的重要抗菌物质。表面活性素 (Surfactin)、伊枯草菌素 (Iturin) 和泛革素 (Fengycin) 为主要的脂肽类抗生素 (Liu et al., 2014)。表面活性素具有抗病毒、抗肿瘤、抗支原体活性, 并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, 特别是伊枯草菌素的抗真菌活性有显著增强效果 (Pérez-García et al., 2011)。表面活性素还能促进生防菌在植物根部定殖并形成生物膜, 保护植物根部免受病原菌侵染 (Bais et al., 2004)。伊枯草菌素对植物病原真菌有较强的抑制作用, 对大多数致病酵母和霉菌有强烈地拮抗作用, 没有抗细菌和抗病毒的活性, 家族成员包括伊枯草菌素 A、B、C、D、E, 杆菌霉素 D、F、L、LC 和抗霉枯草菌素等 (Stein, 2005)。Vanittanakom 等 (1986) 发现, *Bacillus subtilis* F-29-3 能产生抑制多种丝状真菌生长的脂肽类抗生素, 将其命名为泛革素 (Fengycin)。泛革素对真菌尤其是丝状真菌的拮抗活性强烈 (Guo et al., 2014)。

本研究中从冬枣果实分离筛选对炭疽病菌有显著拮抗活性的芽孢杆菌, 检测其对冬枣炭疽病的防治效果, 并对筛选的拮抗菌进行种属鉴定, 利用液相色谱-质谱联用仪对拮抗菌产生的抑菌物质进行鉴定, 在国内外文献中尚未见报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料与芽孢杆菌的分离、筛选

2017 年 10 月从河北农业大学校园超市购买红熟期‘沾化冬枣’果实, 枣炭疽病菌刺盘胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*) 由河北农业大学制药工程实验室保存, 分离自河北省黄骅市冬枣种植园感染炭疽病的冬枣果实。

将健康冬枣果实依次用 5%  $H_2O_2$  表面消毒 3 min, 75%乙醇处理 30~60 s, 无菌水冲洗 3 次, 在无菌研钵中碾碎, 放入装有玻璃珠和 50 mL 蒸馏水的三角瓶中, 摇床振荡 30 min, 80 °C 水浴加热 15 min, 进行系列梯度稀释后涂板分离芽孢杆菌单菌落。

采用对峙培养法筛选对刺盘胶孢炭疽菌有显著拮抗效果的芽孢杆菌 (陈晓萌 等, 2018)。挑取活化的刺盘胶孢炭疽菌片接种到马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato dextrose agar, PDA) 培养基平板中央, 在距离病原菌 3 cm 处接种分离的芽孢杆菌, 每个平板接种 4 株, 25 °C 培养箱倒置培养 5 d, 观察抑菌带生成情况。每个菌株设置 3 个平行, 试验共重复 3 次。

### 1.2 拮抗芽孢杆菌对枣果实炭疽病防治效果检测

拮抗菌的培养及发酵上清液的制备参照王亚杰等 (2018) 的方法。将拮抗菌体用无菌水悬浮, 制成活菌含量为  $1 \times 10^8$  cfu · mL<sup>-1</sup> 的菌悬液; 拮抗菌发酵上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 回收滤液。

选取健康冬枣果实进行表面消毒,用灭菌针在表面均匀扎4个小孔,分别在拮抗菌悬液和其发酵上清液中预处理10 s后在超净工作台内晾干。用灭菌针将少量炭疽病菌菌丝接入冬枣小孔中,将未经预处理只接种炭疽病菌的作为对照。每个处理5次重复,每次重复5个冬枣果实,分别用塑料盒密封,28 ℃培养箱中培养7 d。试验共重复3次。根据冬枣果实炭疽病的分级标准(陆德玲等,2017)记录冬枣果实的病级,计算病情指数。防病效果(%)=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100。用SPSS 17.0软件的ANOVA程序进行方差分析,使用Duncan's新复极差法进行差异显著性比较。

### 1.3 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。

### 1.4 拮抗菌发酵上清液中抑菌物质的抑菌活性检测和结构分析

用6 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液调节拮抗菌发酵上清液至pH 2.0,并于4 ℃保存过夜;8 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min,去除上清液,沉淀用pH 2.0的去离子水冲洗2遍,并用甲醇萃取2遍,将萃取液合并用0.22 μm疏水滤膜过滤。将甲醇萃取液通过旋转蒸发去除甲醇,剩余粗提取物用等体积的无菌水悬浮用于检测抑菌活性(Zhang et al., 2017b)。

通过琼脂扩散法检测拮抗菌发酵上清液粗提取物对枣炭疽病菌的抑制活性(Che et al., 2015)。将病原菌接种到PDA斜面,25 ℃恒温培养7 d。将10 mL无菌水加入病原菌斜面,用无菌玻璃棒轻刮病原菌,使孢子悬浮。用无菌水调整悬浮液中孢子数量使其浓度为1×10<sup>6</sup>个·mL<sup>-1</sup>,孢子数量通过血球计数板进行计数。将10 mL病原菌孢子悬浮液和100 mL PDA培养基混合后倒平板,凝固后在距离平板中心2.2 cm的位置均匀打4个直径为0.7 cm的孔,在3个孔中各加入30 μL粗提取物,另外1个孔中加入30 μL无菌培养基作为对照,试验共重复3次。将平板置于25 ℃恒温培养箱,5 d后测量抑菌圈直径。

### 1.5 拮抗菌发酵上清液抑菌物质结构分析

将甲醇萃取液通过LC-MS分析,鉴定其中抑菌物质结构。采用安捷伦1200系列高效液相色谱仪(Santa Clara, USA)和MS-C18反相柱(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm)进行分离。流动相为(A)0.1%甲酸水溶液和(B)乙腈以60:40比例混合,流速为0.8 mL·min<sup>-1</sup>,柱温为25 ℃,检测波长为210 nm。高效液相分离的化合物分子量利用安捷伦6410三重四极杆质谱仪进行测定,电离方式采用电喷雾离子源,质量检测器为四级质量分析器,喷雾电压为4.5 kV,毛细管温度为300 ℃,检测方式为正离子(Waseem et al., 2009)。

## 2 结果与分析

### 2.1 刺盘胶孢炭疽菌拮抗细菌的筛选

从冬枣果实中共分离获得芽孢杆菌248株,其中83株呈现对刺盘胶孢炭疽菌的拮抗活性。选择对炭疽病菌抑菌活性最强的12个菌株,利用其发酵上清液进行刺盘胶孢炭疽菌拮抗活性检测,最

终获得 1 株拮抗活性最强的菌株, 编号为 Tj-19 (图 1)。

## 2.2 拮抗菌对冬枣刺盘胶孢炭疽菌的防治效果

在接种刺盘胶孢炭疽菌 7 d 后对各处理进行病情指数和防治效果调查 (图 2, 表 1)。只接种刺盘胶孢炭疽菌的对照处理发病严重, 病情指数为 84.6。Tj-19 菌体及 Tj-19 发酵上清液预处理发病显著低于对照, 其中 Tj-19 菌体处理病情指数为 21.2, 防治效果为 74.9%, Tj-19 发酵上清液处理病情指数为 20.5, 防治效果为 75.8%。



图 2 芽孢杆菌拮抗菌 Tj-19 (A) 及其发酵上清液 (B) 预处理对冬枣炭疽病的防治效果  
Fig. 2 The control effects of *Bacillus* antagonist Tj-19 (A) and its fermentation supernatant (B) against jujube fruit anthracnose disease

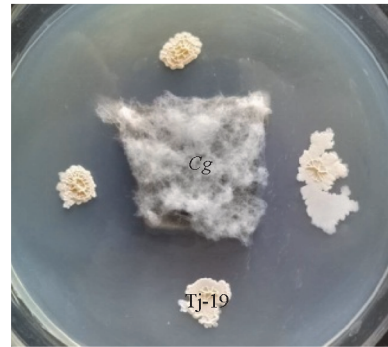


图 1 芽孢杆菌 Tj-19 对刺盘胶孢炭疽菌 (Cg) 的拮抗作用  
Fig. 1 The antagonism of *Bacillus* Tj-19 against *Colletotrichum gloeosporioides* (Cg)

表 1 芽孢杆菌拮抗菌 Tj-19 及其发酵上清液对冬枣炭疽病的防治效果

Table 1 The control effects of *Bacillus* antagonist Tj-19 and its fermentation supernatant against jujube fruit anthracnose disease

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防治效果/% Control efficiency
对照 Control	84.6 ± 4.3 a	—
Tj-19 菌体 Tj-19 bacteria cells	21.2 ± 2.7 b	74.9
Tj-19 发酵上清液 Tj-19 fermentation supernatant	20.5 ± 2.2 b	75.8

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

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

## 2.3 拮抗菌种属鉴定

在 NA 培养基上, 拮抗菌 Tj-19 培养初期菌落呈圆形, 白色不透明, 边缘不整齐, 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。菌体呈短杆状, 芽孢中生且呈椭圆形, 革兰氏染色呈阳性, 可产生异染粒。

生理生化指标检测中过氧化氢酶试验、产氨试验、V-P 试验、甲基红试验、糖醇发酵 (葡萄糖、乳糖、甘露糖) 试验、吡啶试验、柠檬酸盐利用试验、丙二酸盐利用试验、硝酸还原试验、明胶液化试验、硫化氢试验及淀粉水解试验结果均为阳性。亚硝酸盐还原试验、脲酶试验、苯丙氨酸脱氨酶试验、荧光色素试验、酒石酸盐利用试验结果均为阴性。将拮抗菌 Tj-19 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, 初步鉴定其为芽孢杆菌属 (*Bacillus* spp.)。

将 Tj-19 菌株 *16S* rDNA 和 *gyrB* 序列与 GenBank 中序列进行比较, 获得相近的芽孢杆菌属标准菌株的 *16S* rDNA 和 *gyrB* 序列, 得到 Tj-19 及相关菌株的进化距离并构建系统发育树 (图 3, 图 4)。

Tj-19 菌株 *16S* rDNA 序列与解淀粉芽孢杆菌 NBRC 3035<sup>T</sup> 菌株的同源相似性为 99.85%，*gyrB* 序列与解淀粉芽孢杆菌 BCRC 14193<sup>T</sup> 菌株的同源相似性为 96.84%。根据 *16S* rDNA 和 *gyrB* 序列相似性分析，确定 Tj-19 为解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)。

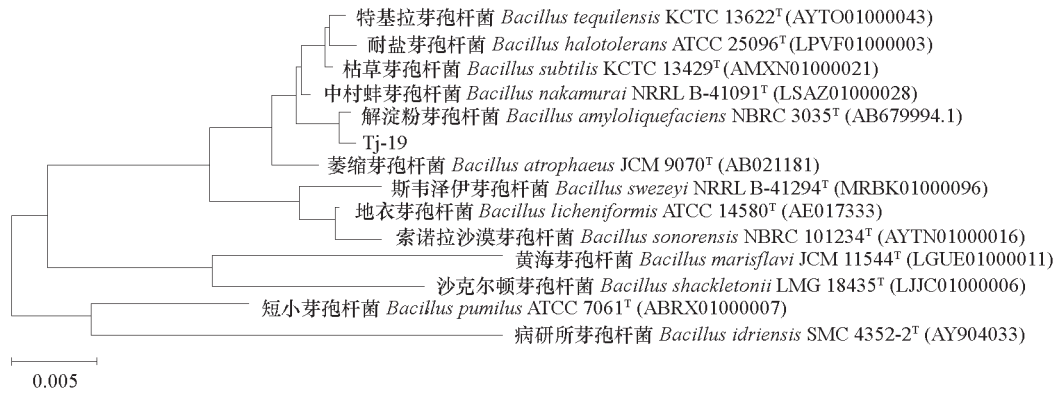


图 3 基于 *16S* rDNA 序列的拮抗菌 Tj-19 及相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining tree showing relationship between Tj-19 and related strains based on the *16S* rDNA sequence

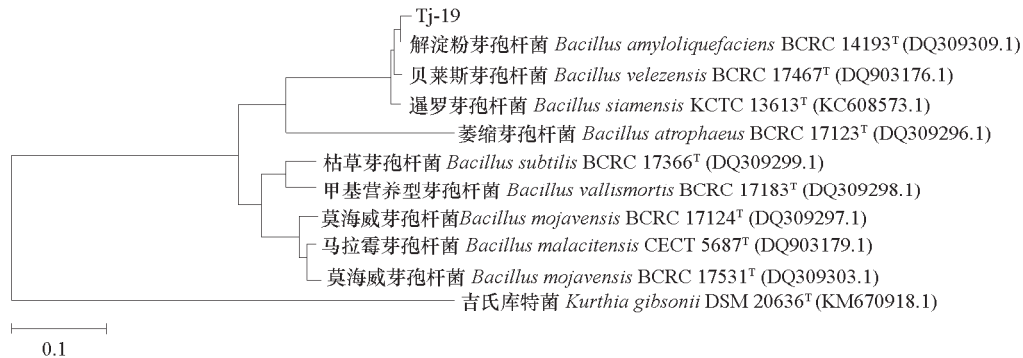


图 4 基于 *gyrB* 序列的拮抗菌 Tj-19 及相关菌株的系统发育树

Fig. 4 Neighbor-joining tree showing relationship between antagonist Tj-19 and related strains based on the *gyrB* sequence

## 2.4 拮抗菌抑菌物质鉴定

*B. amyloliquefaciens* Tj-19 发酵无菌上清液粗提取物对枣炭疽病菌抑制效果显著 (图 5)。采用 LC-MS 鉴定了 Tj-19 发酵上清液中抑菌物质结构, 根据 LC-MS 的阳离子流谱图 (图 6), 选取保留时间分别为 0.67、0.92、1.15、1.58、2.36 和 3.24 min 的质谱图进行分析。结果表明, 分子离子峰其  $m/z$  为 1 043.79 对应的  $[M + H]^+$  为 C14 伊枯草菌素 A (图 7, A); 1 057.82 对应的  $[M + H]^+$  为 C15 伊枯草菌素 A (图 7, B); 1 058.17 对应的  $[M + H]^+$  为 C15 伊枯草菌素 B, 1 079.76 对应的  $[M + Na]^+$  为 C15 伊枯草菌素 A, 1 095.19 对应的  $[M + K]^+$  为 C15 伊枯草菌

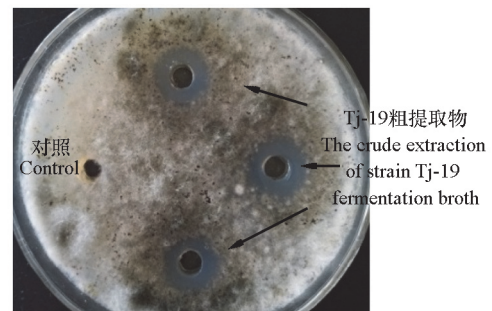


图 5 *B. amyloliquefaciens* Tj-19 发酵上清液粗提取物对刺盘胶孢炭疽菌的抑制活性

Fig. 5 Antifungal activity of the crude extract from *B. amyloliquefaciens* Tj-19 fermentation against *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.

素 A (图 7, C); 1 071.83 对应的  $[M+H]^+$  为 C16 伊枯草菌素 A (图 7, D); 1 068.66 对应的  $[M+K]^+$  为 C13 伊枯草菌素 B, 1 085.76 对应的  $[M+H]^+$  为 C17 伊枯草菌素 A, 1 109.86 对应的  $[M+K]^+$  为 C16 伊枯草菌素 A (图 7, E); 1 071.94 对应的  $[M+H]^+$  为 C16 伊枯草菌素 A, 1 108.93 对应的  $[M+K]^+$  为 C17 伊枯草菌素 B (图 7, F)。综上所述, Tj-19 菌株合成 C14~C17 伊枯草菌素 A 和 C13、C15、C17 伊枯草菌素 B 等脂肽抗生素。

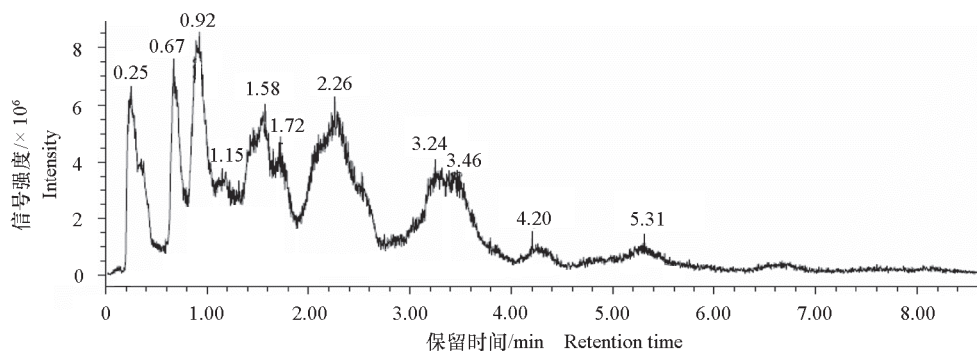


图 6 *Bacillus amyloliquefaciens* Tj-19 菌株发酵液粗提取物液质联用阳离子流谱图

Fig. 6 The positive ion flow spectra of LC-MS for the crude extract from *Bacillus amyloliquefaciens* Tj-19 fermentation broth

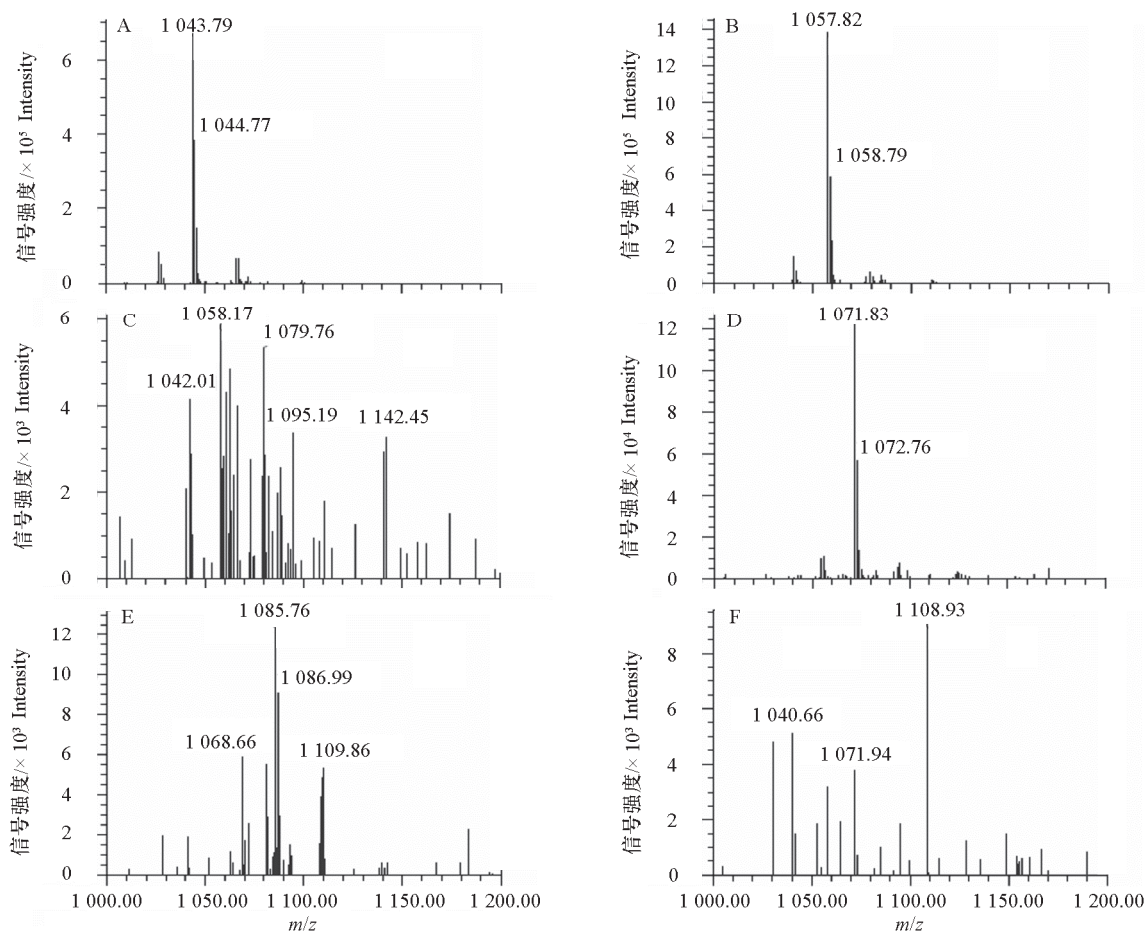


图 7 保留时间分别为 0.67 (A)、0.92 (B)、1.15 (C)、1.58 (D)、2.26 (E) 和 3.24 (F) min 的质谱图

Fig. 7 Mass spectrum at the retention time of 0.67 (A), 0.92 (B), 1.15 (C), 1.58 (D), 2.26 (E) and 3.24 (F) min

### 3 讨论

许多研究表明生防菌能够有效地抑制炭疽病菌的生长。美极梅奇酵母 (*Metschnikowia pulcherrima*) 能够有效防治炭疽病菌对杧果果实的侵染, 抑制果皮颜色、果实硬度、可溶性固形物、总酸和维生素 C 含量的变化, 保持果实的贮藏品质 (Tian et al., 2017)。萎缩芽孢杆菌 (*Bacillus atrophaeus*) B5 能够有效防治收获后的刺果番荔枝 (*Annona muricata*) 和油梨 (*Persea americana*) 果实炭疽病 (Guardado-Valdivia et al., 2018)。从葡萄酒中分离的酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 能够分泌抗菌物质抑制炭疽病菌分生孢子萌发, 产生  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶和几丁质酶, 可在葡萄果实中定殖并有效防治收获前葡萄炭疽病 (Liu et al., 2018)。不同水果炭疽病的微生物防治为利用生防菌进行枣炭疽病的防治提供了可靠的理论和技术支撑。

目前已经报道从作物的根际土壤、根表、植株及叶片上分离筛选出的解淀粉芽孢杆菌菌株对不同作物的多种病害具有拮抗作用, 如粮食作物、蔬菜、水果等 (Wang et al., 2016; 王亚杰 等, 2018)。解淀粉芽孢杆菌 S1 对由密执安棍状杆菌 (*Clavibacter michiganensis*) 引起的番茄细菌性溃疡病防治效果显著, 并具有溶解无机磷能力及产生吲哚乙酸促进植株生长 (Gautam et al., 2019)。从人参根围土壤分离的解淀粉芽孢杆菌 TB6 能够降低人参根际土壤真菌的丰度和多样性, 提高脲酶、过氧化氢酶和磷酸酶活性, 降低纤维素酶活性; 此外, 菌株 TB6 能够增加多酚氧化酶和过氧化氢酶活性, 促进根的生长, 增加根的鲜质量 (Tian et al., 2018)。 *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 通过产生脂肽抗生素 Bacillomycin D 抑制禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 菌丝和分生孢子; 扫描电镜和透射电镜分析表明, Bacillomycin D 导致禾谷镰刀菌菌丝和分生孢子质膜和细胞壁的形态产生改变; 荧光显微镜观察显示, Bacillomycin D 诱导禾谷镰刀菌菌丝和分生孢子中活性氧的积累, 并导致细胞死亡 (Gu et al., 2017)。本研究中解淀粉芽孢杆菌 Tj-19 对枣炭疽病的防治效果达到 74.9%, 能够有效防治炭疽病的发生, 为利用该菌株进行枣炭疽病的防治提供了可靠的物质基础。

分泌次生代谢产物抑制或者杀灭植物病原菌, 是芽孢杆菌防控植物病害最直接的体现 (Caulier et al., 2019), 产生抗菌活性物质是其防病促生的主要机制 (Calvo-Garrido et al., 2019), 脂肽抗生素是主要抑菌物质。芽孢杆菌的田间防治效果受多种因素影响, 而利用抑菌物质可以直接发挥其拮抗效应, 所受限制因素较少, 并且在环境中易分解, 安全环保, 是一种很好的微生物农药资源 (Zhang et al., 2017b)。从番茄中分离的内生细菌 *Bacillus subtilis* B47 分泌产生的伊枯草菌素 A<sub>2</sub> 能显著抑制玉米小斑病菌的生长, 经过部分纯化后, 田间防效达 64.2%, 明显优于百菌清 (Ye et al., 2012)。Caldeira 等 (2011) 利用 LC-ESI-MS 和抗菌活性检测相结合的方法快速鉴定了 *B. amyloliquefaciens* CCM1 1051 合成的伊枯草菌素脂肽, 并且应用中不需要进行提纯, 显示了较高的效率和应用前景。Tj-19 发酵上清液对枣炭疽病防治效果显著, 其主要抑菌物质为伊枯草菌素。伊枯草菌素的热稳定性好, 在中性及酸性环境中稳定, 能够耐受多种蛋白酶及有机溶剂, 有利于其工业生产, 也为其田间施用稳定发挥防治效果提供了保障 (陈晓萌 等, 2018)。

Tj-19 菌株及其发酵上清液在枣炭疽病的防治中有很好的应用前景, 为开发新型生物农药提供有力的理论依据及物质支持。

### References

- 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.

- Buchanan R E, Gibbons N E. 1994. Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Company.
- Caldeira A, Arteiro J, Coelho A, Roseiro J. 2011. Combined use of LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid identification of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CCMI 1051. *Process Biochemistry*, 46: 1738 - 1746.
- Calvo-Garrido C, Roudet J, Aveline N, Davidou L, Dupin S, Fermaud M. 2019. Microbial antagonism toward *Botrytis* bunch rot of grapes in multiple field tests using one *Bacillus ginsengihumi* strain and formulated biological control products. *Frontiers in Plant Science*, 10: 105.
- Caulier S, Nannan C, Gillis A, Licciardi F, Bragard C, Mahillon J. 2019. Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *Bacillus subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10: 302.
- Chang Huihong, Zhang Lusheng, Ba Xiucheng. 2011. Identification of pathogenic fungus of anthracnose in 'Dongzao' jujube. *Northern Horticulture*, (15): 191 - 192. (in Chinese)
- 常慧红, 张路生, 巴秀成. 2011. 冬枣炭疽病原鉴定. *北方园艺*, (15): 191 - 192.
- Che J, Liu B, Ruan C, Tang J, Huang D. 2015. Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae*, which causes black spot disease of harvested wax apple fruit, using a strain of *Brevibacillus brevis* FJAT-0809-GLX. *Crop Protection*, 67: 178 - 183.
- Chen Xiaomeng, Wang Yajie, Li Jia, Gao Tongguo, Zhang Dongdong, Zhu Baocheng. 2018. Characterization of antifungal substances of *Bacillus subtilis* MG-4 against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* causing wheat take-all. *Journal of Plant Protection*, 45 (3): 511 - 519. (in Chinese)
- 陈晓萌, 王亚杰, 李佳, 高同国, 张冬冬, 朱宝成. 2018. 枯草芽孢杆菌 MG-4 抑制小麦全蚀病菌物质及其性质分析. *植物保护学报*, 45 (3): 511 - 519.
- Gautam S, Chauhan A, Sharma R, Sehgal R, Shirkot C K. 2019. Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* for biocontrol of bacterial canker of tomato incited by *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis*. *Microbial Pathogenesis*, 130: 196 - 203.
- Gu Q, Yang Y, Yuan Q, Shi G, Wu L, Lou Z, Huo R, Wu H, Borriss R, Gao X. 2017. Bacillomycin D produced by *Bacillus amyloliquefaciens* is involved in the antagonistic interaction with the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83: e01075-17.
- Guardado-Valdivia L, Tovar-Pérez E, Chacón-López A, López-García U, Gutiérrez-Martínez P, Stoll A, Aguilera S. 2018. Identification and characterization of a new *Bacillus atropheus* strain B5 as biocontrol agent of postharvest anthracnose disease in soursop (*Annona muricata*) and avocado (*Persea americana*). *Microbiological Research*, 210: 26 - 32.
- Guo Q, Dong W, Li S, Lu X, Wang P, Zhang X, Wang Y, Ma P. 2014. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* NCD-2 plays a major role in biocontrol of cotton seedling damping-off disease. *Microbiological Research*, 169: 533 - 540.
- Khan N, Martínez-Hidalgo P, Ice T A, Maymon M, Humm E A, Nejat N, Sanders E R, Kaplan D, Hirsch A M. 2018. Antifungal activity of *Bacillus* species against *Fusarium* and analysis of the potential mechanisms used in biocontrol. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2363.
- Li Kunying, Ren Junying, Chai Dongyan, Zhao Xingmin. 2006. Occurrence and control of jujube anthracnose. *Northern Fruit*, (3): 54. (in Chinese)
- 李坤英, 任俊英, 柴东岩, 赵兴敏. 2006. 枣炭疽病的发生与防治. *北方果树*, (3): 54.
- Liu J, Hagberg I, Novitsky L, Hadj-Moussa H, Avis T. 2014. Interaction of antimicrobial cyclic lipopeptides from *Bacillus subtilis* influences their effect on spore germination and membrane permeability in fungal plant pathogens. *Fungal Biology*, 118: 855 - 861.
- Liu Z, Du S, Ren Y, Liu Y. 2018. Biocontrol ability of killer yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*) isolated from wine against *Colletotrichum gloeosporioides* on grape. *Journal of Basic Microbiology*, 58 (1): 60 - 67.
- Lu Deling, Wei Shuyan, Wei Hongfei, Cao Hongyu, Cui Shasha, Zhao Man, Huang Yanchang. 2017. Joint toxicity of difenoconazole-azoxystrobin mixture against *Zizyphus jujube* anthracnose and effect on field trial. *Agrochemicals*, 56 (1): 61 - 64. (in Chinese)
- 陆德玲, 魏书艳, 魏洪飞, 曹洪玉, 崔沙沙, 赵曼, 黄延昌. 2017. 苯醚甲环唑、啮菌酯对冬枣炭疽病的联合毒力与田间防效. *农药*, 56 (1): 61 - 64.
- 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.



- Stein T. 2005. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56: 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.
- Tian L, Shi S, Ji L, Nasir F, Ma L, Tian C. 2018. Effect of the biocontrol bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* on the rhizosphere in ginseng plantings. *International Microbiology*, 21 (3): 153 - 162.
- Tian Y Q, Li W, Jiang Z T, Jing M M, Shao Y Z. 2017. The preservation effect of *Metschnikowia pulcherrima* yeast on anthracnose of postharvest mango fruits and the possible mechanism. *Food Science and Biotechnology*, 27 (1): 95 - 105.
- Vanittanakom N, Loeffler W, Koch U, Jung G. 1986. Fengycin-a novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *The Journal of Antibiotics*, 39 (7): 888 - 901.
- Wang B B, Shen Z Z, Zhang F G, Raza W, Yuan J, Huang R, Ruan Y, Li R, Shen Q. 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 Yajie, Gao Yu, Chen Xiaomeng, Liu Mengling, Zhang Dongdong. 2018. Biocontrol ability of *Bacillus amyloliquefaciens* against gray mold on tomato fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (7): 1296 - 1304. (in Chinese)
- 王亚杰, 高宇, 陈晓萌, 刘梦灵, 张冬冬. 2018. 解淀粉芽孢杆菌防治番茄果实灰霉病及其抑菌物质分析. *园艺学报*, 45 (7): 1296 - 1304.
- 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. *neivum*. *European Journal of Plant Pathology*, 125 (3): 471 - 483.
- Wei Shuyan, Lu Deling, Zhang Qingwen, Zhao Jun, Cao Hongyu, Huang Yanchang. 2017. Toxicity and field control effects of five fungicides against the jujube *Colletotrichum gloeosporioides*. *Agrochemicals*, 56 (1): 73 - 75. (in Chinese)
- 魏书艳, 陆德玲, 张庆文, 赵君, 曹洪玉, 黄延昌. 2017. 5种药剂对沾化冬枣炭疽病的室内毒力及田间防控效果. *农药*, 56 (1): 73 - 75.
- 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.
- Ye Yunfeng, Li Qiqin, Fu Gang, Yuan Gaoqing, Miao Jianhua, Lin Wei. 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 D D, Gao T G, Li H Y, Lei B S, Zhu B C. 2017a. 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. 2017b. 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.