

## 番茄匍柄霉叶斑病拮抗细菌的筛选与鉴定

李新宇<sup>1,2</sup>, 李磊<sup>1</sup>, 陈利达<sup>1</sup>, 石延霞<sup>1</sup>, 柴阿丽<sup>1</sup>, 谢学文<sup>1,\*</sup>, 李宝聚<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; <sup>2</sup>沈阳农业大学植物保护学院, 沈阳 110866)

**摘要:** 应用平板对峙法从连作多年的番茄根际土样中筛选得到对番茄匍柄霉叶斑病具有较强拮抗活性的细菌菌株 ZF161, 该菌株对番茄匍柄霉的平板抑制率达到 70.51%。离体叶片试验显示, 菌株 ZF161 对番茄匍柄霉叶斑病防治效果达到 69.83%。通过菌落形态观察、生理生化特性、Biolog 测定和多基因系统发育树综合分析, 鉴定菌株 ZF161 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。番茄盆栽试验结果表明, 菌株 ZF161 对番茄匍柄霉叶斑病的防治效果达到 63.27%。进一步平板对峙抑菌谱试验结果显示, 菌株 ZF161 对其他 7 种病原真菌也具有较好的抑制效果。上述结果说明, 菌株 ZF161 对番茄匍柄霉叶斑病具有良好的防治效果, 且对多种病原真菌也具有抑制作用, 具有开发应用的潜力。

**关键词:** 番茄; 拮抗细菌; 枯草芽孢杆菌; 番茄匍柄霉叶斑病; 防治效果

**中图分类号:** S 641.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2020) 04-0741-08

## Screening and Identification of Antagonistic Bacteria Against Gray Leaf Spot of Tomato Caused by *Stemphylium solani*

LI Xinyu<sup>1,2</sup>, LI Lei<sup>1</sup>, CHEN Lida<sup>1</sup>, SHI Yanxia<sup>1</sup>, CHAI Ali<sup>1</sup>, XIE Xuewen<sup>1,\*</sup>, and LI Baoju<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>Plant Protection College, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** Gray leaf spot is one of major diseases on tomato. At present, chemical control was the only way against the disease. So it has a significant meaning to screen and use biocontrol bacteria to deal with the disease. A bacterial strain, named ZF161, isolated from rhizosphere soil of tomato in a continuous cropping system, exhibited a high antagonistic effect on gray leaf spot of tomato caused by *Stemphylium solani* Weber. The plate bioassay showed that the inhibition rate on *S. solani* was 70.51%. The control effect of ZF161 against tomato gray leaf spot of inoculated tomato detached leaf was 69.83%. The strain was identified as *Bacillus subtilis* based on morphological, biochemical and physiological analysis. The pot experiment result revealed that the control effect of ZF161 against tomato gray leaf spot was 63.27%. The antifungal activity of strain ZF161 was tested by plate confrontation method. The result showed that strain ZF161 exhibited a broad spectrum against seven pathogenic fungi. Overall, *B. subtilis* ZF161 is a beneficial bacteria in biocontrol of plant disease.

**Keywords:** tomato; antagonistic bacteria; *Bacillus subtilis*; gray leaf spot of tomato; control effect

**收稿日期:** 2019-12-23; **修回日期:** 2020-03-03

**基金项目:** 国家重点研发计划项目 (2017YFD0201102); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: libaoju@caas.cn, xiexuewen@caas.cn)

番茄匍柄霉叶斑病主要为害番茄的叶片、茎蔓和果实，全生育期均可发病，从局部发病到全株感染只需要 2~3 d，防治难度较大（李戌清 等，2015）。番茄匍柄霉叶斑病由茄匍柄霉（*Stemphylium solani* Wallr.）和番茄匍柄霉 [*Stemphylium lycopersici* (Enjoji) Yamamoto] 引起，其中茄匍柄霉是主要病原菌（李宝聚 等，2009）。

近几年，芽孢杆菌（*Bacillus* sp.）制剂得到了广泛的应用，大量实践证明芽孢杆菌容易从植株根际土壤、根系和叶片等部位分离，并且能产生耐热、耐旱、抗紫外线和有机溶剂的芽孢，可迅速在植株及根系定殖和扩繁（谢学文 等，2016；石玉莹 等，2017；申顺善 等，2019）。目前已有大量报道关于应用芽孢杆菌进行植物病害的防治。王伟等（2010）筛选到 1 株对番茄灰霉病菌具有较强拮抗效果的贝莱斯芽孢杆菌（*B. velezensis*）；Chen 等（2014）筛选到 1 株对核盘菌具有拮抗效果的枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）；Mohammad 等（2018）发现 1 株对疫霉菌具有拮抗效果的枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）。

本研究中从番茄根际土壤中分离并筛选出 1 株对番茄匍柄霉叶斑病有明显拮抗活性的生防芽孢杆菌，对其拮抗效果进行了初步研究，以期对番茄匍柄霉叶斑病的生物防治及生物药剂的开发提供理论基础和科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

供试番茄品种为‘齐达利’，购于先正达生物科技（中国）有限公司。病原真菌包括茄匍柄霉（*S. solani*）、多主棒孢菌（*Corynespora cassiicola*）、葫芦科刺盘孢菌（*Colletotrichum orbiculare*）、辣椒疫霉菌（*Phytophthora capsici*）、灰葡萄孢菌（*Botrytis cinerea*）、茄病镰孢菌（*Fusarium solani*）、立枯丝核菌（*Rhizoctonia solani*）和茄链格孢（*Alternaria solani*）等，均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所保存。供试培养基：PDA 培养基（马铃薯 200 g·L<sup>-1</sup>、葡萄糖 20 g·L<sup>-1</sup>、琼脂 18 g·L<sup>-1</sup>）；PD 培养基（马铃薯 200 g·L<sup>-1</sup>、葡萄糖 20 g·L<sup>-1</sup>）；LB 固体培养基（胰蛋白胨 10 g·L<sup>-1</sup>、酵母提取物 5 g·L<sup>-1</sup>、NaCl 10 g·L<sup>-1</sup>、琼脂 18 g·L<sup>-1</sup>）；LB 液体培养基（胰蛋白胨 10 g·L<sup>-1</sup>、酵母提取物 5 g·L<sup>-1</sup>、NaCl 10 g·L<sup>-1</sup>）；脱脂牛奶培养基（蛋白胨 10 g·L<sup>-1</sup>、牛肉粉 3 g·L<sup>-1</sup>、NaCl 5 g·L<sup>-1</sup>、pH 7.0，脱脂牛奶 100 mL·L<sup>-1</sup>）。对照药剂为 50% 异菌脲（陕西皇牌作物科技有限公司）可湿性粉剂。

### 1.2 拮抗细菌的分离、纯化与筛选

从山东寿光、北京大兴、天津武清等多年连续种植番茄的大棚采集根际土样共 14 份，使用无菌样品袋带回实验室及时保存处理。

拮抗细菌的分离步骤：称取 10 g 土样，放入盛有 90 mL 无菌水的锥形瓶中，置于 28 °C、180 r·min<sup>-1</sup> 的摇床上振荡 30 min 使之充分悬浮，80 °C 水浴处理 15 min 后梯度稀释至 10<sup>-3</sup>、10<sup>-4</sup>，分别吸取 100 μL 滴加到 LB 固体平板的中央，用涂布器涂匀后正向静置 2 h，使溶液充分渗进平板中。每个梯度重复 3 次。平板倒置于 28 °C 恒温培养箱中培养 2 d。挑取形态不同的细菌菌落通过平板划线法纯化后进行编号保存。

采用平板对峙法（郭芳芳 等，2014）将直径 5 mm 的茄匍柄霉菌菌饼接种于 PDA 平板（直径 90 mm）中央，培养 24 h 后，在距离培养皿中心 30 mm 处以十字交叉法均匀打 4 个孔，注入拮抗细菌发酵液，以接种无菌 LB 培养基作为对照。每个处理 3 次重复，将培养皿倒置于 28 °C 培养箱内

培养。当对照菌落菌丝即将布满整个平板时, 测量菌落的直径。抑制率 (%) = [ (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径) ] × 100。

在 LB 平板上活化菌株 ZF161 后, 挑取单菌落接种于装有 200 mL 液体培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、180 r · min<sup>-1</sup> 振荡培养 36 h, 此时菌悬液含菌量约为 10<sup>8</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>。匍柄霉菌在 PDA 培养基上培养 3 d, 在菌落边缘用打孔器取 6 mm 的菌饼, 接种于装有 200 mL PD 培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C、140 r · min<sup>-1</sup> 培养振荡 7 d 后, 将菌体打碎备用。

参考杨利敏 (2015) 方法, 选取大小、形状相近的番茄叶片, 用 75%乙醇表面消毒, 再用无菌水冲洗 3 次, 晾干后采用喷雾法接芽孢发酵液 (10<sup>8</sup> cfu · mL<sup>-1</sup>) 以及对照药剂 (3 g · L<sup>-1</sup>), 然后接匍柄霉菌悬液, 28 °C, 相对湿度 95% ~ 100% 黑暗条件下保湿培养直至对照充分发病。按《农药田间药效实验准则》(农业部农药检定所生测室, 1993) 调查叶片发病情况。设 3 次重复, 每个重复 5 个叶片。

番茄匍柄霉叶斑病病情按病斑面积占叶片面积比例分级: 0 级, 0; 1 级, 1% ~ 5%; 3 级, 6% ~ 10%; 5 级, 11% ~ 25%; 7 级, 26% ~ 50%; 9 级, 50% 以上。

病情指数 =  $\Sigma$  (各级值 × 各级病叶数) / (调查总叶数 × 最高级值) × 100。

防治效果 (%) = (对照组病情指数 - 处理组病情指数) / 对照组病情指数 × 100。

### 1.3 拮抗细菌 ZF161 的鉴定

参考伯杰氏细菌鉴定手册 (Buchanan & Gibbons, 1994) 和《常见细菌系统鉴定手册》(东秀珠和蔡妙英, 2001) 进行 ZF161 的形态特征及生理生化特性分析。

使用 BIOLOG GENIII 试剂盒 (按照试剂盒说明书操作) 测定菌株 ZF161 唯一碳源利用。

采用 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 提取菌株 ZF161 的总 DNA, 利用细菌 16S rDNA 通用引物 27F/1492R (Weisburg et al., 1990) 和针对目标基因设计引物 *gyrB*-F/R、*atpD*-F/R 和 *rpoA*-F/R (表 1) 对菌株 ZF161 进行 PCR 扩增。反应体系 (50 μL): 2 × Rapid Taq Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司) 25 μL、上游引物和下游引物各 0.5 μL (10 μmol · L<sup>-1</sup>)、DNA 模板 0.2 μL (60 ng · mL<sup>-1</sup>), ddH<sub>2</sub>O 补足剩余体积。PCR 扩增程序均为: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s, 34 个循环; 72 °C 8 min。PCR 产物直接测序 (北京博迈德基因技术有限公司)。参与比较分析的序列均来源于 GenBank, 用 MEGA 6.0、Sequence Matrix、Seaview4 按顺序连接、比对不同菌株的 16S rDNA、*gyrB*、*atpD*、*rpoA* 基因, 采用最大似然法构建系统发育树, 分析其亲缘关系。

表 1 本研究中所用引物  
Table 1 Primers used in this research

引物与序列 (5'→3')	目标基因	PCR 产物大小/bp
Sequence	Target gene	PCR product
27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG; 1492R: ACGGCTACCTGTTCGACTT	<i>16S rDNA</i>	1 466
<i>gyrB</i> -F: GCAGCAAAACAGTTATGATGAA; <i>gyrB</i> -R: AGTCTTCTCCGATACCTGTGC	<i>gyrB</i>	1 448
<i>rpoA</i> -F: TCAGCGACGATGCCAAA; <i>rpoA</i> -R: TCTTTGCGAAGTCCGAGTC	<i>rpoA</i>	898
<i>atpD</i> -F: ACAAGTTTGCTTCTCCTCGCC; <i>atpD</i> -R: TGAGGTCGCTCTTCAITTAGG	<i>atpD</i>	1 053

### 1.4 菌株 ZF161 对番茄匍柄霉叶斑病的盆栽防治

盆栽番茄长至 5 片真叶时喷施菌株 ZF161 发酵液, 以喷雾 50% 异菌脲可湿性粉剂和清水为对照。

待叶片表面晾干后采用叶面喷雾的方式接种匍柄霉菌菌悬液,然后放入相对湿度95%,温度26~28℃玻璃棚中保湿培养48h,之后转入正常育苗温室培养。每处理20株番茄,3次重复。接种后10d清水对照充分发病时调查防治效果。

### 1.5 菌株 ZF161 抗真菌谱的测定

采用平板对峙法测定菌株 ZF161 对 7 种病原真菌的抑菌活性。方法参照 1.2。

## 2 结果与分析

### 2.1 拮抗细菌的分离、纯化和筛选

从采集土样中共分离出细菌 82 株,通过平板对峙培养,获得 7 株对茄匍柄霉菌平板抑菌率大于 50%的菌株,其中菌株 ZF161 的抑菌效果最好,抑菌率为 75.64% (表 2)。

表 2 筛选获得的 7 株拮抗细菌对茄匍柄霉菌的抑制效果  
 Table 2 Inhibition activity of acquired antagonistic bacterial strain against *Stemphylium solani*

处理 Treatment	菌落直径/mm Colony diameter	抑菌率/% Inhibition rate
IVF19	23.0 ± 0.4 de	70.51 ± 0.93 ab
IVF43	31.7 ± 0.5 b	59.40 ± 1.60 d
A-5	31.0 ± 2.3 b	60.26 ± 5.67 d
ZF161	19.0 ± 1.1 e	75.64 ± 2.60 a
18051709-2-1	28.7 ± 1.7 bc	43.16 ± 4.27 cd
18051709-2-2	24.7 ± 0.5 cd	68.38 ± 1.25 bc
18051709-2-3	27.7 ± 0.9 bcd	64.53 ± 2.73 bcd
空白培养基 Control	78.0 ± 0.4 a	

注: 同列数字后小写英文字母不同表示 Duncan's 新复极差法分析差异显著 ( $P < 0.05$ )。下同。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). The same below.

应用离体叶片法检测发现,拮抗菌株 ZF161 对番茄匍柄霉叶斑病的防效达到 69.83%,对照药剂 50%异菌脲可湿性粉剂的防效为 72.34%,二者无显著差异 (表 3)。

表 3 拮抗菌株 ZF161 对番茄匍柄霉叶斑病的预防结果  
 Table 3 Control efficacy of strain ZF161 to gray leaf spot

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防效/% Control efficacy
IVF19	33.33 cd	64.79 ± 4.96 abc
IVF43	43.70 bcd	53.41 ± 3.68 abc
A-5	42.22 bcd	55.03 ± 12.11 abc
ZF161	28.15 cd	69.83 ± 5.96 ab
18051709-2-1	48.15 bc	48.67 ± 3.85 bc
18051709-2-2	35.56 bcd	61.55 ± 14.75 abc
18051709-2-3	54.81 b	42.22 ± 16.99 c
50%异菌脲可湿性粉剂 Iprodione	25.93 d	72.34 ± 3.02 a
清水对照 Control	94.07 a	

### 2.2 菌株 ZF161 的鉴定结果

ZF161 菌体为杆状,革兰氏阳性,在 LB 固体培养基上菌落呈乳白色,菌落周边不规则,表面有褶皱。

生理生化反应特征表明, 菌株 ZF161 的耐盐性为 4%, 在含 10% 盐培养基上不能生长。厌氧生长、接触酶、硝酸还原反应、水解淀粉、V-P 反应、水解酪蛋白、H<sub>2</sub>S 产生、氧化酶反应等均为阳性, 与枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 的生理生化反应特点相同。

Biolog 测定结果表明, 菌株 ZF161 能利用蔗糖、乳糖、D-果糖、D-木糖、D-葡萄糖、D-甘露醇、D-葡糖二酸等 19 种碳源, 不能利用 D-海藻糖、D-纤维二糖、D-松二糖、水苏糖、葡聚糖等 61 种碳源。初步鉴定菌株 ZF161 属于芽孢杆菌属细菌。

构建 ZF161 的多基因系统发育树, 发现该菌株与枯草芽孢杆菌模式菌株聚在一簇, 因此确定菌株 ZF161 为枯草芽孢杆菌 (图 1)。

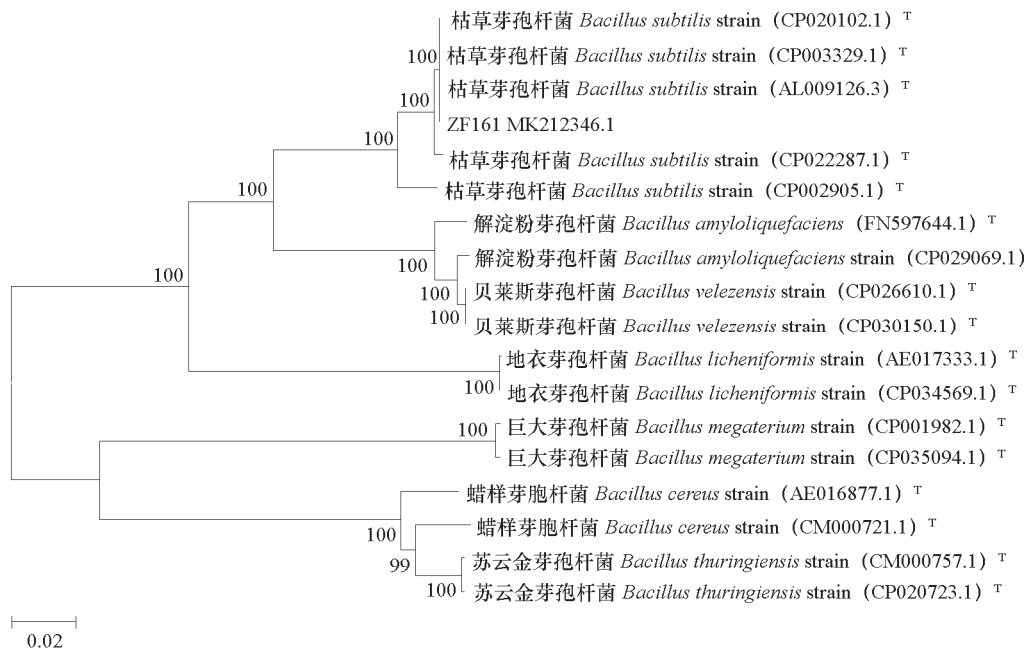


图 1 基于多基因序列构建的菌株 ZF161 系统发育树

括号内显示了核苷酸序列数据的 GenBank 登录号。T 代表模式菌株。

Fig. 1 Phylogenetic tree based on the multigene sequences of strain ZF161

The GenBank accession numbers for nucleotide sequence data are shown in the brackets. T means type strain.

### 2.3 菌株 ZF161 对番茄匍柄霉叶斑病的防治效果

接种 5 d 后, 清水对照开始发病, ZF161 处理无病斑出现。10 d 后对照病情指数达到 45.44, 番茄幼苗发病, 叶片干枯, 部分植株整株干枯, ZF161 处理轻微发病。拮抗菌株 ZF161 对番茄匍柄霉叶斑病的防效为 63.27%, 对照药剂 50% 异菌脲可湿性粉剂 (3 g · L<sup>-1</sup>) 的防效为 83.47% (表 4)。

表 4 枯草芽孢杆菌 ZF161 盆栽预防结果

Table 4 Control efficacy of strain ZF161 to gray leaf spot

处理 Treatment	病情指数 Disease index	防治效果/% Control efficacy
ZF161	16.93 b	63.27 ± 3.32 b
50% 异菌脲可湿性粉剂 Iprodione	7.31 c	83.47 ± 5.49 a
清水对照 Control	45.44 a	

## 2.4 菌株 ZF161 抗真菌谱的测定

抑菌谱测定结果表明, 菌株 ZF161 的抑菌谱较广, 对 7 种引起蔬菜叶部、根部病害的病原真菌均具有较好的抑制效果, 其中对黄瓜棒孢叶斑病(多主棒孢菌 *Corynespora cassiicola*) 的抑制效果最高, 达到了 62.00%, 对白菜茎基腐病(立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*) 的抑制效果最低, 为 47.24%, 对其他病原菌的抑制率在 50%~60% 之间(表 5)。

表 5 菌株 ZF161 对植物病原真菌的抑制作用  
 Table 5 Inhibitory effect of strain ZF161 on plant pathogenic fungi

病原菌 Pathogenic fungi	菌落直径/mm Colony diameter		抑菌率/% Inhibition rate
	对照 Control	处理 Treatment	
葫芦科刺盘孢菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i>	79.7 ± 0.9	39.8 ± 0.2	50.00 ± 0.26 d
茄病镰孢菌 <i>Fusarium solani</i>	80.2 ± 0.5	37.7 ± 0.5	53.01 ± 0.76 c
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	81.3 ± 0.2	43.8 ± 1.0	47.24 ± 1.26 e
灰葡萄孢菌 <i>Botrytis cinerea</i>	79.8 ± 0.9	35.8 ± 0.2	55.11 ± 0.24 b
茄链格孢菌 <i>Alternaria solani</i>	79.7 ± 0.5	37.8 ± 0.2	52.51 ± 0.50 c
辣椒疫霉菌 <i>Phytophthora capsici</i>	80.7 ± 0.9	40.0 ± 0.5	50.41 ± 0.92 e
多主棒孢菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	79.8 ± 0.4	30.3 ± 0.2	62.00 ± 0.27 a

## 3 讨论

植物体内、植物根际土壤、水样内存在大量对病原菌具有拮抗作用的有益微生物(Kloepper, 1992)。芽孢杆菌是公认的抗逆性强、抗菌谱广泛的有益微生物, 其中枯草芽孢杆菌是近些年生防菌研究最多的, 应用于各种作物的病害防治。汪雪静等(2011)从土壤中分离得到两株枯草芽孢杆菌, 对草莓根腐病菌拮抗活性很高, 其抑菌圈直径均在 15 mm 以上; 卫甜等(2016)从不同生境筛选得到 3 株枯草芽孢杆菌对黄瓜绿斑驳花叶病毒的防效在 40% 以上。也有不少关于番茄病害的研究, 胡朋等(2008)从根际土壤中筛选得到 1 株对番茄灰霉病发病率的抑制率达 83% 的枯草芽孢杆菌; 张斌等(2015)从番茄根际土壤中分离得到 1 株枯草芽孢杆菌, 其对番茄枯萎病和青枯病的防效均在 60% 以上。

16S rDNA 序列分析已广泛应用于细菌的鉴定和系统分类研究中。解淀粉芽孢杆菌与枯草芽孢杆菌亲缘关系很近, 序列间相似度也很高, 16S rDNA 基因序列分析并不能精准鉴定(Christensen et al., 1998), 谢学文等(2016)通过 16S rDNA 与 *gyrB* 序列分析, 对 1 株甲基营养型芽孢杆菌进行准确鉴定; 赵昱榕等(2019)通过 16S rDNA、*rpoD*、*pgk* 及 *gyrB* 联合序列分析, 对 1 株贝莱斯芽孢杆菌进行准确鉴定。本研究中获得 1 株对番茄匍柄霉叶斑病具有较高防治效果的芽孢杆菌 ZF161, 通过 16S rDNA、*gyrB*、*rpoA* 以及 *atpD*——四基因联合建树, 准确地将其鉴定为枯草芽孢杆菌。

番茄匍柄霉叶斑病的防治药剂较少, 目前仅有 45% 乙霉·苯菌灵登记用于该病害防治。李长松等(2012)发现吡唑醚菌酯与啶啉铜复配对番茄匍柄霉叶斑病具有较高的防效。化学防治药剂种类单一, 长时间连续使用容易导致抗药性提高。本研究中通过盆栽试验发现枯草芽孢杆菌 ZF161 对番茄匍柄霉叶斑病的防治效果达到 63.27%, 虽然低于化学药剂, 但是利用有益微生物防治植物病害可以减少化学农药的使用量, 不仅降低了病原菌抗药性风险, 也避免了作物和土壤中农药残留量的增加对人类健康的威胁。此外, 生防菌较化学药剂防治谱更广(林福呈和李德葆, 2003; 刘雪等, 2006; 沙月霞等, 2019)。本研究中 ZF161 对匍柄霉菌之外的 7 种病原真菌也表现出较好的拮抗效果, 一次施用可以兼防多种病害。因此, 枯草芽孢杆菌 ZF161 可以应用于番茄匍柄霉叶斑病的防治, 在蔬

菜病害预防领域具有广阔的应用前景, 其作用机理及发酵工艺还有待深入研究。

## References

- Buchanan R E, Gibbons N E. 1994. Bergeys manual of systematic bacteriology 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins Company.
- Chen Ya-fei, Gao Xiao-ning, Chen Yong-xuan, Qin Hu-qiang, Huang Li-li, Han Qing-mei. 2014. Inhibitory efficacy of endophytic *Bacillus subtilis* EDR4 against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed. *Biol Control*, 78: 67 - 76.
- Christensen H, Nordentoft S, Olsen J E. 1998. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequence. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48 (2): 605 - 610.
- Dong Xiu-zhu, Cai Miao-ying. 2001. Manual of systematic methods of determinative bacterial. Beijing: Science Press: 349 - 388. (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: 349 - 388.
- Guo Fang-fang, Xie Zhen, Lu Peng, Guo Yan-bin, Zhang Li-qin, Wang Yong-jun. 2014. Identification of a novel *Paenibacillus polymyxa* strain and its biocontrol and plant growth-promoting effects. *Chinese Journal of Biological Control*, (4): 489 - 496. (in Chinese)
- 郭芳芳, 谢镇, 卢鹏, 郭岩彬, 张立钦, 王勇军. 2014. 一株多粘类芽孢杆菌的鉴定及其生防促生效果初步测定. *中国生物防治学报*, (4): 489 - 496.
- Hu Peng, Shen Lin, Fan Bei, Yu Meng-meng, Sheng Ji-ping. 2008. Isolation and identification of antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea*. *Food Sciences*, 29 (6): 248 - 251. (in Chinese)
- 胡朋, 申琳, 范蓓, 于萌萌, 生吉萍. 2008. 番茄灰霉病拮抗细菌 *Bacillus*-1 的筛选和鉴定. *食品科学*, 29 (6): 248 - 251.
- Kloepper J W. 1992. A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 38 (6): 667 - 672.
- Li Bao-ju, Zhou Yan-fang, Zhao Yan-jie, Chai A-li, Gao Wei. 2009. Occurrence and control of tomato gray leaf spot. *China vegetables*, (17): 24 - 26, 61. (in Chinese)
- 李宝聚, 周艳芳, 赵彦杰, 柴阿丽, 高苇. 2009. 李宝聚博士诊病手记 (十六) 番茄灰叶斑病的发生与防治. *中国蔬菜*, (17): 24 - 26, 61.
- Li Chang-song, Xu Zuo-ting, Wang Shao-min, Qi Jun-shan, Zhang Bo, Zhao Xin-lan, Chen Bai-shun, Li Lin. 2012. Antibacterial activity and control of pyraclostrobin against Gray leaf spot of tomato. *Shandong Agriculture Sciences*, 44 (5): 103 - 105, 119. (in Chinese)
- 李长松, 徐作琨, 王绍敏, 齐军山, 张博, 赵新兰, 陈百顺, 李林. 2012. 吡唑醚菌酯等对番茄灰叶斑病菌的抑菌活性与防治试验. *山东农业科学*, 44 (5): 103 - 105, 119.
- Li Xu-qing, Zheng Ji-rong, Lü Xiao-han, Wang Hong. 2015. Research progress on tomato grey leaf spot in China. *China Plant Protection*, 35 (3): 24 - 27. (in Chinese)
- 李戌清, 郑积荣, 吕晓菡, 王宏. 2015. 我国番茄灰叶斑病研究进展. *中国植保导刊*, 35 (3): 24 - 27.
- Lin Fu-cheng, Li De-bao. 2003. Cell-lytic of *Bacillus subtilis* on plant fungal pathogens. *Acta Phytopythologica Sinica*, 33 (2): 174 - 177. (in Chinese)
- 林福呈, 李德葆. 2003. 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) S9 对植物病原真菌的溶菌作用. *植物病理学报*, 33 (2): 174 - 177.
- Liu Xue, Mu Chang-qing, Jiang Xi-liang, Guo Ping, Tian Yun-long, Zhu Chang-xiong. 2006. Research progress of the metabolic substances produced by *Bacillus subtilis* and their application on biocontrol of plant disease. *Chinese Journal of Biological Control*, 22 (S1): 179 - 184. (in Chinese)
- 刘雪, 穆常青, 蒋细良, 郭萍, 田云龙, 朱昌雄. 2006. 枯草芽孢杆菌代谢物质的研究进展及其在植病生防中的应用. *中国生物防治*, 22 (S1): 179 - 184.
- Ministry of Agriculture Pesticide Test Laboratory. 1993. Guidelines for the field efficacy of pesticides in the field. Beijing: China Standard Press: 45 - 51. (in Chinese)
- 农业部农药检定所生测室. 1993. 农药田间药效实验准则. 北京: 中国标准出版社: 45 - 51.
- Mohammad M, Jafari N F, Shahidi B G H, Reza F S, Mahmudi M B, Claudia P, Mehrdad M. 2018. Efficacy of *Bacillus subtilis* native strains for biocontrol of phytophthora crown and root rot of pistachio in iran. *Tropical Plant Pathology*, 43: 306 - 313.
- Sha Yue-xia, Sui Shu-ting, Zeng Qing-chao, Shen Rui-qing. 2019. Biocontrol potential of *Bacillus velezensis* strain E69 against rice blast and other fungal diseases. *Scientia Agricultura Sinica*, 52 (11): 1908 - 1917. (in Chinese)

- 沙月霞, 隋书婷, 曾庆超, 沈瑞清. 2019. 贝莱斯芽孢杆菌 E69 预防稻瘟病等多种真菌病害的潜力. *中国农业科学*, 52 (11): 1908 - 1917.
- Shen Shunshan, Zhang Tao, Wang Juan, Liu Dongping, Zhang Shanshan, Sun Zhiqiang, Piao Fengzhi. 2019. Antifungal activity of *Paenibacillus polymyxa* HK18-8 against pepper anthracnose and its colonization ability. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (3): 499 - 507. (in Chinese)
- 申顺善, 张涛, 王娟, 刘东平, 张珊珊, 孙治强, 朴凤植. 2019. 多粘类芽孢杆菌 HK18-8 对辣椒炭疽病菌的抑制作用及其定殖能力. *园艺学报*, 46 (3): 499 - 507.
- 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 WXCD51 of tomato gray mold disease and tomato leaf mold disease. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (10): 94 - 105. (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 WXCD51 的筛选鉴定及其生防促生作用. *园艺学报*, 44 (10): 94 - 105.
- 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.
- Wang Xue-jing, Bu Chun-ya, Jin Yong-sheng, Liang Wei, Tong Bao-sheng, Shi Guang-lu, Wang You-nian. 2011. Identification and inhibitory effects of antagonistic bacteria against strawberry root rot (*Fusarium oxysporum*). *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (9): 1657 - 1666. (in Chinese)
- 汪雪静, 卜春亚, 靳永胜, 梁为, 仝宝生, 师光禄, 王有年. 2011. 草莓根腐病菌拮抗细菌的分离与鉴定. *园艺学报*, 38 (9): 1657 - 1666.
- Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, Lane D J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, 173 (2): 697 - 703.
- Wei Tian, Li Hong-wei, Su Jian-kun, Liu Jian-feng, Liu Hong-xia. 2016. Screening bacteria for biological control of *Cucumber green mottle mosaic virus* disease. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (12): 2391 - 2400. (in Chinese)
- 卫甜, 李宏伟, 苏建坤, 刘建凤, 刘红霞. 2016. 黄瓜绿斑驳花叶病毒病生防菌株的分离与筛选. *园艺学报*, 43 (12): 2391 - 2400.
- Xie Xue-wen, Dong Rui-li, Shi Yan-xia, Chai A-li, Zhu Fa-di, Li Bao-ju. 2016. Screening and inhibition effect of antagonistic bacteria against cucumber anthracnose caused by *Colletotrichum orbiculare*. *Chinese Journal of Biological Control*, 32 (2): 215 - 220. (in Chinese)
- 谢学文, 董瑞利, 石延霞, 柴阿丽, 朱发娣, 李宝聚. 2016. 黄瓜炭疽病拮抗细菌的筛选及其抑制效果. *中国生物防治学报*, 32 (2): 215 - 220.
- Yang Li-min. 2015. Screening, identification and biocontrol mechanism of antagonist against *Botrytis cinerea* from tomato [M. D. Dissertation]. Hefei: Anhui Agricultural University. (in Chinese)
- 杨利敏. 2015. 番茄灰霉生防菌的筛选、鉴定及生防机制研究 [硕士论文]. 合肥: 安徽农业大学.
- Zhang Bin, Qiao Jun-qing, Liang Xue-jie, Liu You-zhou, Chen Zhi-yi. 2015. Evaluation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Protection*, 42 (3): 353 - 361. (in Chinese)
- 张斌, 乔俊卿, 梁雪杰, 刘邮洲, 陈志谊. 2015. 番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗细菌的评价. *植物保护学报*, 42 (3): 353 - 361.
- Zhao Yu-rong, Li Lei, Xie Xue-wen, Shi Yan-xia, Chai A-li, Sun Guang-yu, Li Bao-ju. 2019. Biocontrol effect of *Bacillus velezensis* strain ZF2 against *Corynespora cassicola*. *Chinese Journal of Biological Control*, 35 (2): 217 - 225. (in Chinese)
- 赵昱榕, 李磊, 谢学文, 石延霞, 柴阿丽, 孙广玉, 李宝聚. 2019. 贝莱斯芽孢杆菌 ZF2 对多主棒孢病菌防治效果. *中国生物防治学报*, 35 (2): 217 - 225.