

棉铃疫病生防细菌筛选、鉴定及制剂防治效果

鹿秀云¹ 李宝庆² 张晓云¹ 郭庆港¹ 马平¹ 李社增^{1*}

(1. 河北省农林科学院植物保护研究所, 河北省农业有害生物综合防治工程技术研究中心, 农业部华北北部作物有害生物综合治理重点实验室, 保定 071000; 2. 临沂市农业技术推广服务中心, 山东 临沂 276000)

摘要: 为有效防治由苾麻疫霉 *Phytophthora boehmeriae* 引起的棉铃疫病, 采用平板对峙培养法、离体试验和田间小区试验对棉花、玉米、番茄、黄瓜等作物根围细菌进行筛选, 结合形态学观察、16S rDNA 序列分析及 Biolog 微生物自动鉴定系统对筛选出的生防细菌进行分类鉴定, 并通过离体试验对优秀生防菌 2 种制剂的防治效果进行评价。拮抗细菌初筛试验结果表明, 在供试的 1 250 株作物根围细菌中, 399 株细菌菌株有良好的抑菌能力, 其中 40 株拮抗细菌菌株抑菌率在 80.00% 以上, 菌株 HMB22922 抑菌能力突出, 对棉铃疫病菌的抑菌率为 85.71%, 抑菌带宽 10.0 mm。室内筛选试验结果表明, 菌株 HMB22922、HMB23917 和 HMB21405 的病情指数显著低于空白对照, 与化学药剂对照间差异不显著, 人工接种苾麻疫霉 5 d 和 7 d 后, 3 株菌株对棉铃疫病的防治效果分别为 73.92%、69.58%、56.54% 和 81.34%、66.67%、64.60%。田间筛选试验结果表明, 菌株 HMB22922 培养液对棉铃疫病的田间防治效果为 47.12%~58.64%, 优于其它 2 株供试菌株, 与化学药剂的防治效果相当且防治效果稳定。生防菌株 HMB22922 经形态学观察、序列分析和微生物鉴定系统被鉴定为萎蔫芽胞杆菌 *Bacillus atrophaeus*。人工接种苾麻疫霉 5、7 和 12 d 时, 以菌株 HMB22922 为有效成分的 2.5×10^9 CFU/mL 萎蔫芽胞杆菌悬浮剂的防治效果分别为 86.33%、78.66% 和 64.44%, 均优于其相同菌量培养液的防治效果。

关键词: 棉铃疫病; 生防细菌; 苾麻疫霉; 棉花; 微生物杀菌剂

Screening, identification and evaluation of biocontrol bacteria against cotton boll blight

Lu Xiuyun¹ Li Baoqing² Zhang Xiaoyun¹ Guo Qinggang¹ Ma Ping¹ Li Shezeng^{1*}

(1. Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northern Region of North China, Ministry of Agriculture; IPM Center of Hebei Province, Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Baoding 071000, Hebei Province, China; 2. Linyi Agricultural Technology Promotion Center, Linyi 276000, Shandong Province, China)

Abstract: To effectively prevent cotton boll blight caused by *Phytophthora boehmeriae*, the bacterial strains isolated from rhizospheres of crops such as cotton, corn, tomato, cucumber, etc. were screened and evaluated with dual-culture assay, *in vitro* test and field trial. Identification of the potential biocontrol strain was based on morphological characters, 16S rDNA sequences and microbial identification system. The preparations of potential biocontrol bacteria against cotton boll blight were evaluated with *in vitro* test for their control efficacy. A total of 399 antagonistic bacteria with strong inhibitory abilities against *P. boehmeriae* were obtained from 1 250 tested bacterial strains, and 40 bacteria showed more than 80.00% inhibitory rate. Among them, strain HMB22922 showed the highest antagonistic activities

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201900), 国家现代农业(棉花)产业技术体系(CARS-15-17)

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

收稿日期: 2018-05-18

with an inhibition rate of 85.71% and an inhibition zone of 10.0 mm. Strains HMB22922, HMB23917 and HMB21405 showed lower disease indices than the negative control, and no significant difference was observed compared to the chemical fungicide. The control efficacy against cotton boll blight of the strain HMB22922, HMB23917 and HMB21405 were 73.92%, 69.58% and 56.54% at the 5th day after inoculation and 81.34%, 66.67% and 64.60% at the 7th day after inoculation, respectively. Field trials showed that the biocontrol efficacy of strain HMB22922 was stable and similar to chemical fungicide, with a biocontrol efficacy of 47.12%–58.64% against cotton boll blight. Strain HMB22922 was identified as *Bacillus atrophaeus* based on morphological characters, 16S rDNA and microbial identification system. The preparation of 2.5×10^9 CFU/mL *B. atrophaeus* SC, developed from HMB22922, showed higher biocontrol efficacy than the bacterium culture broth, and 86.33%, 78.66% and 64.44% biocontrol efficacies were obtained at the 5th, 7th and 12th day after inoculation, respectively.

Key words: cotton boll blight; biocontrol bacteria; *Phytophthora boehmeriae*; cotton; microbial fungicide

棉花烂铃病是一类由真菌或细菌引起的棉铃病害,包括疫病、红腐病、炭疽病、黑果病、红粉病、角斑病、软腐病、曲霉病、灰霉病和黑斑病等10余种(过崇俭和罗张,1963;棉花铃病联合调查组,1986)。棉铃疫病是我国各主要产棉区棉花铃期的主要病害,其发病率和危害性居各种烂铃病之首(沈其益,1992;李社增等,2017),严重影响棉花的产量和品质。

我国棉铃疫病由苜蓿疫霉 *Phytophthora boehmeriae* 侵染造成,学者在其种属鉴定(李晖等,1999)、生物学特性(陈方新等,2001)、防治技术(鹿秀云等,2014;林玲等,2015)等方面进行了相关研究。杨春萍(2006)和常文周等(2009)将推株并垄、化学调控棉花高度和封行时间、摘早蕾、摘烂铃等防治技术在生产中应用,并初见成效,但这些技术应用时存在难以精准控制、人工费用高等问题,故其在生产实践中并未被普遍推广。行间覆盖地膜的物理防治技术虽然在棉铃疫病防治上取得了较好的防病效果和经济效益(鹿秀云等,2013),但因为较大的经济投入和可能造成土壤污染等问题,在棉花生产中仍未大面积应用。化学农药防治仍是棉农普遍采用的防治措施。针对主要烂铃种类的棉花疫病,我国仅登记了以三乙膦酸铝为有效成分的4种化学杀菌剂制剂,其防效不尽人意,远远不能满足生产需求。利用生防微生物对植物病害进行防治,因具有靶标性强、环保且无毒性残留等优点,越来越受到重视,并逐渐成为化学农药重要的替代品。芽胞杆菌作为具有应用价值的生防微生物之一,因培养周期短、抗逆性强、生产方便而日益成为生防菌的优势菌源(易龙等,2013)。已报道的生防芽胞杆菌有枯草芽胞杆菌 *Bacillus subtilis*、多黏芽胞杆菌 *B. polymyxa*、蜡状芽

胞杆菌 *B. cereus*、巨大芽胞杆菌 *B. megaterium* 和短小芽胞杆菌 *B. pumilus* 等(孙冰冰等,2015;Nayak et al.,2017)。李社增等(2005a)从棉花根围土壤分离筛选到1株枯草芽胞杆菌 NCD-2 菌株,该菌株对棉花黄萎病的2年田间防治效果为85.4%,3年大区示范防治效果为51.2%~60.6%,目前以该菌株为核心成分的微生物杀菌剂已获得正式登记。游晓朝(2018)研究表明,基于短小芽胞杆菌 HQB8021 菌株的生防菌肥显著降低了香蕉枯萎病发病率,显著提高了植物抗氧化酶活性和根际土壤细菌种类丰富度。目前生防芽胞杆菌在棉花立枯病和枯萎病(Adesina et al.,2007)、辣椒疫病(Kim et al.,2008)、小麦纹枯病(李社增等,2005b)、马铃薯黑痣病(马龙等,2017)等植物病害的防治上均取得了较好的效果,但在棉铃疫病防治上研究很少且尚未取得理想效果。

16S rDNA 序列分析作为一种重要的分子鉴定手段被广泛用于细菌鉴定,而16S rDNA 序列不能对亲缘关系较近的细菌进行区分。Biolog 微生物鉴定系统是根据微生物对碳源利用情况进行微生物的鉴定和区分的系统,该系统可提供较多的信息量,鉴定结果可靠,目前已被应用于病原细菌、真菌、生防细菌、有益真菌等微生物的分类鉴定。本研究采用平板对峙培养法、离体试验和田间小区试验对棉花、玉米、番茄、黄瓜等作物根围细菌进行筛选,结合形态学观察、16S rDNA 序列分析及 Biolog 微生物自动鉴定系统对筛选出的生防细菌进行分类鉴定,并通过离体试验对优秀生防菌2种制剂的防治效果进行评价,以期对棉铃疫病有效防治提供新的绿色植保产品。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌、菌株和植物:棉铃疫病病原菌菌株JP5-1,自河北省沧州市献县河城街镇河城街村罹病棉铃上分离,在棉铃上表现为强致病力,由河北省农林科学院植物保护研究所植物病害生物防治实验室保存。在河北省邯郸市、邢台市棉田,辛集市玉米田,定兴县番茄田和保定市黄瓜田分别采集作物根围土壤,采用常规系列稀释法共分离纯化获得1 250株供试细菌菌株。采用实验室通用编号规则对其进行编号并于-80℃保存,其中菌株HMB13496~HMB13542、HMB15830~HMB15869、HMB20800~HMB20868和HMB21265~HMB21493共385株,自棉花根围土壤分离;菌株HMB21962~HMB22278和HMB22870~HMB22926共374株,自玉米根围土壤分离;菌株HMB23318~HMB23448和HMB23606~HMB23784共310株,自番茄根围土壤分离;菌株HMB23807~HMB23987共181株,自黄瓜根围土壤分离。在棉花盛铃期,从河北省保定市高阳县邢家南镇北于八村试验棉田采集带柄、健康、直径约2.5 cm的成铃,备用。棉花品种为农大棉8号。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:20%土豆煎汁、2%葡萄糖、2%琼脂粉、蒸馏水1 000 mL;LB(Luria-Bertani)固体培养基:1%胰蛋白胨、0.5%酵母粉、1% NaCl、2%琼脂粉、蒸馏水1 000 mL;LB液体培养基:1%胰蛋白胨、0.5%酵母粉、1% NaCl、蒸馏水1 000 mL。

药剂、试剂及仪器:80%三乙膦酸铝(phosethyl-Al)可湿性粉剂,浙江嘉华化工有限公司。细菌基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;PCR扩增试剂盒、琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒,宝生物工程(大连)有限公司;rTaq酶、10×PCR Buffer、dNTP Mix,宝生物工程(大连)有限公司;自制的结晶紫染色液,将结晶紫2 g溶于20 mL 95%乙醇中,取20 mL与1%草酸铵水溶液80 mL混匀置24 h后过滤;其它试剂均为国产分析纯。BX63F正置荧光显微镜,日本Olympus公司;2720型PCR仪,德国Biometra公司;DYY-6C电泳仪,北京六一仪器厂;GEN III-Omnilog型Biolog微生物自动鉴定系统,美国Biolog公司;SPX-8085-II生化培养箱,上海新苗医疗器械制造有限公司;ZQZY-80BS振荡培养箱,上海知楚仪器有限公司;VD-650-U洁净工作台,苏州安泰空气技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 苎麻疫霉拮抗细菌的初步筛选及培养液制备

采用平板对峙法(李社增等,2005b)测定1 250株供试菌株对苎麻疫霉的拮抗作用。将4℃下保存的苎麻疫霉转接到PDA平板上,于25℃下培养3 d,在苎麻疫霉菌落边缘用直径6 mm打孔器打取菌饼,将苎麻疫霉菌饼转接到另一个PDA平板中央,将活化后的供试细菌菌株在距苎麻疫霉菌饼20 mm处点接种,以不接种任何供试细菌菌株的苎麻疫霉为空白对照。25℃恒温培养5 d后,测量苎麻疫霉正常生长半径、抑制生长半径和抑菌带,计算抑菌率,抑菌率=(正常生长半径-抑制生长半径)/正常生长半径×100%。以抑菌带和抑菌率为指标初步筛选对苎麻疫霉有较好拮抗作用的供试菌株。

将-80℃下保存的苎麻疫霉拮抗菌菌株转接到LB固体培养基试管斜面上活化,24 h后挑取单菌落接入装有100 mL LB液体培养基的250 mL三角瓶中,在振荡培养箱中于170 r/min、30℃条件下培养48 h,用LB固体平板培养基检测培养液中菌体数量,用无菌0.9%生理盐水将其调配成浓度为 1.0×10^7 CFU/mL的细菌培养液。

1.2.2 棉铃疫病生防细菌的室内筛选试验

称取1 g 80%三乙膦酸铝可湿性粉剂,放入1 L的玻璃量杯中,加入100 mL无菌水,玻璃棒搅拌使之溶解,再加入400 mL无菌水即配制成80%三乙膦酸铝可湿性粉剂500倍药液。

对初步筛选的供试菌株进行室内筛选。采用离体棉铃人工接种病原菌。将田间采集的健康带柄棉铃用75%酒精进行表面灭菌,并将棉铃固定在长40 cm、宽25 cm的长方形白色泡沫板上,室温下晾干。每块泡沫板平均分为8列,每列平均固定5个棉铃,共40个棉铃,每2列的10个棉铃为1个处理的1次重复。在每个棉铃表面喷施浓度为 1.0×10^7 CFU/mL供试拮抗细菌培养液1 mL,以每个棉铃喷施80%三乙膦酸铝可湿性粉剂500倍药液1 mL为化学药剂对照,喷施等量蒸馏水为空白对照,喷施不同处理药剂时用挡板将其它棉铃隔开,保证药液喷施在10个目的棉铃表面,每个处理重复4次。将固定有40个棉铃的泡沫板放入盛有300 mL无菌水、长×宽×高为42.0 cm×27.5 cm×10.5 cm的保湿培养盒内,用保鲜膜封严保湿,置于25℃人工气候室恒温培养。24 h后打开保湿培养盒,在每个棉铃铃缝中上部用消毒针刺3个小孔,深度3 mm,将在PDA培养基上于25℃培养5 d的苎麻疫霉菌落用打孔器打取直径为

6 mm的菌饼,贴接在棉铃铃缝针孔处,继续保湿培养。分别在接种苾麻疫霉后5、7 d按照棉铃疫病病级划分标准对烂铃病发生情况进行分级调查,计算病情指数和防治效果。棉铃疫病病级划分标准:0级:未发病;1级:病斑面积占整个棉铃表面积的25%以下;2级:病斑面积占整个棉铃表面积的25%~50%;3级:病斑面积占整个棉铃表面积的50%~75%;4级:病斑面积占整个棉铃表面积的75%以上。病情指数= Σ (病级 $\times$ 相应病级铃数)/(4 $\times$ 总铃数) $\times$ 100;防治效果=(空白对照病情指数-处理病情指数)/空白对照病情指数 $\times$ 100%。通过室内进一步筛选出对棉铃疫病有较好防治效果的供试菌株。

1.2.3 棉铃疫病生防细菌的田间筛选试验

2013年在河北省河间市瀛州镇四街村对室内筛选出的3株供试菌株进行田间筛选试验。每个小区长10 m,宽6 m,面积60 m²。分别用浓度为 1.0×10^7 CFU/mL的室内筛选的3株供试菌株细菌培养液5 L对每个小区进行喷雾处理,以每个小区喷施80%三乙膦酸铝可湿性粉剂500倍药液5 L为化学药剂对照,以每个小区喷施5 L清水为空白对照,每个小区周围设2行或2 m宽的保护行,每个处理3次重复,共15个小区,随机排列。分别于8月4日、8月9日和8月14日对小区进行喷雾处理,施药时棉株中下部棉铃着药均匀,分别于棉铃疫病发病初期(8月16日)、发病中期(8月23日)和发病后期(8月30日)调查棉花烂铃病发生情况,每个小区选择中间4行,每行定株连续调查10株棉花上的烂铃个数,计算单株烂铃及防治效果。防治效果=(空白对照单株烂铃-处理单株烂铃)/空白对照单株烂铃 $\times$ 100%。通过田间试验筛选出对棉铃疫病田间防治效果较好的生防细菌菌株。

1.2.4 最终筛选的生防细菌菌株的分类鉴定

对田间试验筛选出的生防细菌菌株HMB22922进行形态特征鉴定、16S rDNA序列分析鉴定和微生物自动系统鉴定。

形态特征鉴定:将-80℃冰箱保存的生防细菌菌株HMB22922划线接种到LB固体平板上,37℃培养24 h,观察单菌落形态。挑取单菌落转接到LB液体培养基中,在180 r/min、32℃条件下振荡培养24 h和36 h,分别吸取菌株HMB22922培养液滴于无菌载玻片上,进行结晶紫染色,在荧光显微镜1 000倍油镜下观察HMB22922菌株的菌体及芽胞形态,共观察5个视野。

16S rDNA序列分析鉴定:按照细菌基因组

DNA提取试剂盒说明书提取菌株HMB22922的基因组DNA。以生防细菌菌株HMB22922的基因组DNA为模板,以F27(5'-AGAGTTTGATCATGGCT-CAG-3')和R1492(5'-GGCTACCTTGTTACGAC-TT-3')为16S rDNA引物对其进行PCR扩增。引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。50 μ L PCR反应体系:100 ng/ μ L DNA模板1 μ L、*rTaq*酶0.5 μ L、10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L、2.5 mmol/L dNTP Mix 8 μ L、10 μ mol/L F27引物1 μ L、10 μ mol/L R1492引物1 μ L,加ddH₂O至50 μ L。扩增程序:95℃变性5 min;94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,32个循环;72℃延伸10 min。将所得PCR产物送交生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,将所得序列在GenBank中进行同源性比较,采用DNAMAN 6软件进行核苷酸序列分析比对。基于邻接法应用MEGA 4.0构建系统发育树,初步确定该菌株的分类地位。

微生物自动鉴定系统鉴定:将测得的生防细菌菌株HMB22922生化特性与Biolog自动微生物鉴定系统数据库中的数据进行比对,采用Biolog自动微生物鉴定系统用GEN III微孔板对生防细菌菌株HMB22922进行94种表型测试,其中包括71种碳源利用测试和23种化学敏感测试。根据Biolog微生物自动鉴定系统给出的相似值判断菌株HMB22922的分类地位。

1.2.5 生防细菌菌株HMB22922制剂的防治效果

生防细菌菌株HMB22922培养液制备方法同1.2.1。采用LB固体平板检测培养液中含菌量,当浓度为 3.25×10^9 CFU/mL时,将其中一部分用无菌水调配成浓度为 2.5×10^9 CFU/mL萎缩芽胞杆菌培养液,另一部分添加助剂和无菌水制备成浓度为 2.5×10^9 CFU/mL萎缩芽胞杆菌悬浮剂。HMB22922菌株悬浮剂质量检测方法参照HG/T2467.5—2003。棉花品种、棉铃采集、棉铃表面灭菌、棉铃用量、苾麻疫霉接种、保湿培养等同1.2.2; 2.5×10^9 CFU/mL的萎缩芽胞杆菌培养液和 2.5×10^9 CFU/mL萎缩芽胞杆菌悬浮剂喷施时分别稀释100倍,在每个棉铃表面喷施1 mL,以喷施等量蒸馏水为空白对照。通过室内试验对生防细菌菌株HMB22922制剂的防治效果进行评价,评价方法同1.2.2。

1.3 数据分析

采用SPSS 18.0软件对试验数据进行统计分析,利用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 苎麻疫霉拮抗细菌的初步筛选

从1 250株作物根围细菌中共筛选到399株对苎麻疫霉有较好拮抗作用的供试菌株,其中抑菌带

大于等于9.0 mm的菌株有40株,抑菌带大于等于10.0 mm的菌株有11株,抑菌率达到80.00%~85.71%(表1),其中菌株HMB22922对苎麻疫霉抑菌率最高,为85.71%,抑菌带宽10.0 mm(图1)。

表1 40株拮抗细菌对苎麻疫霉的抑菌作用

Table 1 Inhibitory effects of 40 antagonistic bacteria against *Phytophthora boehmeriae*

序号 Serial number	菌株 Strain	正常生长半径 (mm) Radius of regular growth	抑制生长半径 (mm) Radius of inhibited growth	抑菌带 (mm) Bacteriostasis belt	抑菌率 (%) Bacteriostasis rate
1	HMB23707	35.0	5.5	12.0	84.29
2	HMB22277	35.0	6.0	11.0	82.86
3	HMB20802	35.0	6.0	11.0	82.86
4	HMB20803	35.0	6.0	11.0	82.86
5	HMB22922	35.0	5.0	10.0	85.71
6	HMB21405	35.0	5.5	10.0	84.29
7	HMB20826	35.0	6.0	10.0	82.86
8	HMB23319	35.0	6.0	10.0	82.86
9	HMB23917	35.0	6.0	10.0	82.86
10	HMB23663	35.0	6.5	10.0	81.43
11	HMB23413	35.0	7.0	10.0	80.00
12	HMB13498	35.0	5.0	9.0	85.71
13	HMB21393	35.0	5.0	9.0	85.71
14	HMB21448	35.0	5.0	9.0	85.71
15	HMB21325	35.0	5.0	9.0	85.71
16	HMB23391	35.0	5.0	9.0	85.71
17	HMB23697	35.0	5.0	9.0	85.71
18	HMB23711	35.0	5.0	9.0	85.71
19	HMB23882	35.0	5.0	9.0	85.71
20	HMB23945	35.0	5.0	9.0	85.71
21	HMB21287	35.0	5.5	9.0	84.29
22	HMB21973	35.0	5.5	9.0	84.29
23	HMB23696	35.0	5.5	9.0	84.29
24	HMB15834	35.0	6.0	9.0	82.86
25	HMB23701	35.0	6.0	9.0	82.86
26	HMB23784	35.0	6.0	9.0	82.86
27	HMB20820	35.0	6.0	9.0	82.86
28	HMB21266	35.0	6.0	9.0	82.86
29	HMB21490	35.0	6.0	9.0	82.86
30	HMB23618	35.0	6.0	9.0	82.86
31	HMB23613	35.0	6.0	9.0	82.86
32	HMB23700	35.0	6.0	9.0	82.86
33	HMB23829	35.0	6.0	9.0	82.86
34	HMB21443	35.0	6.5	9.0	81.43
35	HMB21963	35.0	6.5	9.0	81.43
36	HMB23729	35.0	6.5	9.0	81.43
37	HMB23968	35.0	6.5	9.0	81.43
38	HMB20865	35.0	7.0	9.0	80.00
39	HMB23883	35.0	7.0	9.0	80.00
40	HMB22182	35.0	7.0	9.0	80.00

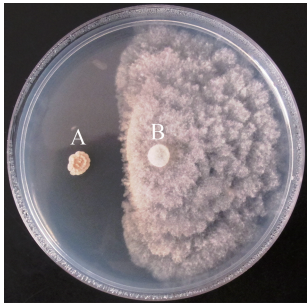


图1 供试细菌菌株HMB22922对苾麻疫霉的抑菌作用
Fig. 1 Inhibitory effects of tested bacterial strain HMB22922 against *Phytophthora boehmeriae*
A: HMB22922菌株; B: 苾麻疫霉。A: HMB22922 strain; B: *Phytophthora boehmeriae*.

2.2 棉铃疫病生防细菌的室内筛选

对初步筛选的11株供试菌株进行室内筛选。人工接种病原菌后,棉铃疫病发病迅速,其中10株供试菌株对棉铃疫病表现一定的防治效果(表2)。接种后5 d时,空白对照的病情指数达到14.38,喷施菌株HMB22922、菌株HMB23917、菌株HMB21405细菌培养液棉铃的病情指数和化学药剂之间差异不显著,但均显著低于空白对照($P<0.05$),防治效果分

别达到73.92%、69.58%、56.54%和70.72%;喷施其它7株菌株细菌培养液棉铃的病情指数与空白对照之间差异不显著。

接种7 d后,空白对照病情指数为46.88,喷施菌株HMB22922、菌株HMB21405、菌株HMB23917细菌培养液棉铃的病情指数和化学对照药剂之间差异仍然不显著,但均显著低于空白对照($P<0.05$),对棉铃疫病的防治效果分别为81.34%、66.67%、64.60%和71.11%;喷施菌株HMB23319、菌株HMB22277、菌株HMB20802和菌株HMB23707细菌培养液棉铃的病情指数显著低于空白对照($P<0.05$),对棉铃疫病的防治效果在34.67%~49.34%之间;喷施菌株HMB20803、菌株HMB20826和菌株HMB23663细菌培养液棉铃的病情指数与空白对照之间差异不显著,对棉铃疫病的防治效果在20.01%~29.34%之间。表明当棉铃疫病发生较轻和较重时,HMB22922菌株、HMB23917菌株和HMB21405菌株细菌培养液对其均有较好的防治效果,优于其它7株供试菌株的细菌培养液,且防治效果与供试的化学药剂相当,其中菌株HMB22922的防治效果最高(表2)。

表2 离体条件下11株生防细菌菌株培养液对棉铃疫病的防治效果
Table 2 Control efficacies of bacterial culture medium of 11 antagonistic bacteria against cotton boll blight *in vitro*

菌株培养液 Bacterial culture medium	接种后 5 d 5 d after inoculation		接种后 7 d 7 d after inoculation	
	病情指数 Disease index	防治效果 (%) Control efficacy	病情指数 Disease index	防治效果 (%) Control efficacy
HMB22922	3.75±1.61 c	73.92	8.75±2.60 e	81.34
HMB21443	14.86±1.64 a	−3.35	45.00±9.07 a	4.01
HMB21405	6.25±2.39 bc	56.54	15.63±5.63 cde	66.67
HMB23917	4.38±1.20 c	69.58	16.60±6.60 cde	64.60
HMB23319	8.75±2.98 abc	39.15	23.75±3.75 bcde	49.34
HMB22277	11.25±3.89 abc	21.77	25.00±5.00 bcd	46.67
HMB20802	13.13±2.13 ab	8.73	30.63±0.63 bc	34.67
HMB23707	8.75±1.61 abc	39.15	30.63±0.63 bc	34.67
HMB20803	10.63±3.29 abc	26.11	33.13±3.13 ab	29.34
HMB20826	10.63±2.13 abc	26.11	35.00±5.00 ab	25.34
HMB23663	13.13±1.20 ab	8.73	37.50±7.50 ab	20.01
三乙磷酸铝 Phosethyl-Al	4.63±0.72 c	70.72	13.54±3.5 de	71.11
空白对照 Control	14.38±3.13 a	−	46.88±6.88 a	−

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicated significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.3 棉铃疫病生防细菌的田间筛选

对室内筛选的3株供试菌株进行田间筛选。在棉铃疫病发病初期(8月16日),化学药剂、菌株HMB22922培养液、菌株HMB21405培养液、菌株HMB23917培养液、空白对照处理的单株烂铃分别为0.51、0.57、0.83、0.86和1.08个,前四者均显著低于空白对照($P<0.05$);菌株HMB22922培养液与化学药剂处理的单株烂铃之间差异不显著,但显著低于其它2株菌株培养液处理;化学药剂、菌株HMB22922培养液、菌株HMB21405培养液和菌株HMB23917培养液处理的防治效果分别为52.78%、47.22%、23.15%和20.37%(表3)。

在棉铃疫病发病中期(8月23日),化学药剂、菌株HMB22922培养液、菌株HMB21405培养液、菌株HMB23917培养液、空白对照处理的单株烂铃分别1.10、0.91、1.80、1.95和2.20个,前四者均显著低于空白对照($P<0.05$);菌株HMB22922培养液与化

学药剂处理的单株烂铃之间差异不显著,但均显著低于其它2个菌株培养液处理($P<0.05$);化学药剂、菌株HMB22922培养液、菌株HMB21405培养液和菌株HMB23917培养液处理的防治效果分别为50.00%、58.64%、18.18%和11.36%(表3)。

在棉铃疫病发病后期(8月30日),化学药剂、菌株HMB22922培养液、菌株HMB21405培养液和菌株HMB23917培养液、空白对照处理的单株烂铃分别为1.90、1.93、3.30、3.42和3.65个,前四者均显著低于空白对照($P<0.05$);菌株HMB22922培养液与化学药剂处理的单株烂铃之间差异不显著,但均显著低于其它2个菌株培养液处理($P<0.05$);化学药剂、菌株HMB22922培养液的防治效果分别为47.95%和47.12%,而其它2个菌株培养液的防治效果均小于9.59%(表3)。表明生防细菌菌株HMB22922培养液能够有效防治棉铃疫病,其防治效果与化学药剂三乙磷酸铝相当且防治效果稳定。

表3 田间试验评价棉铃疫病生防菌的防治效果
Table 3 Control efficacies of antagonistic bacteria against cotton boll blight in field trials

处理 Treatment	8-16		8-23		8-30	
	单株烂铃 Rot bolls per plant	防治效果 (%) Control efficacy	单株烂铃 Rot bolls per plant	防治效果 (%) Control efficacy	单株烂铃 Rot bolls per plant	防治效果 (%) Control efficacy
HMB22922	0.57±0.08 c	47.22	0.91±0.11 c	58.64	1.93±0.15 c	47.12
HMB21405	0.83±0.12 b	23.15	1.80±0.25 b	18.18	3.30±0.32 b	9.59
HMB23917	0.86±0.18 b	20.37	1.95±0.22 b	11.36	3.42±0.31 b	6.30
三乙磷酸铝 Phosethyl-Al	0.51±0.07 c	52.78	1.10±0.10 c	50.00	1.90±0.19 c	47.95
对照 Control	1.08±0.10 a	—	2.20±0.23 a	—	3.65±0.20 a	—

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. Different letters in the same column indicated significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.4 生防细菌菌株HMB22922的分类鉴定

2.4.1 形态特征鉴定

菌株HMB22922在LB固体平板上菌落乳白色,边缘不整齐,表面干燥有褶皱(图2-A);菌株

HMB22922菌体杆状,大小为 $2.37\text{ }\mu\text{m}\times0.76\text{ }\mu\text{m}$ (图2-B);芽胞中生,椭圆形,大小为 $1.67\text{ }\mu\text{m}\times0.78\text{ }\mu\text{m}$ (图2-C)。根据形态特征,将其初步鉴定为芽胞杆菌属。

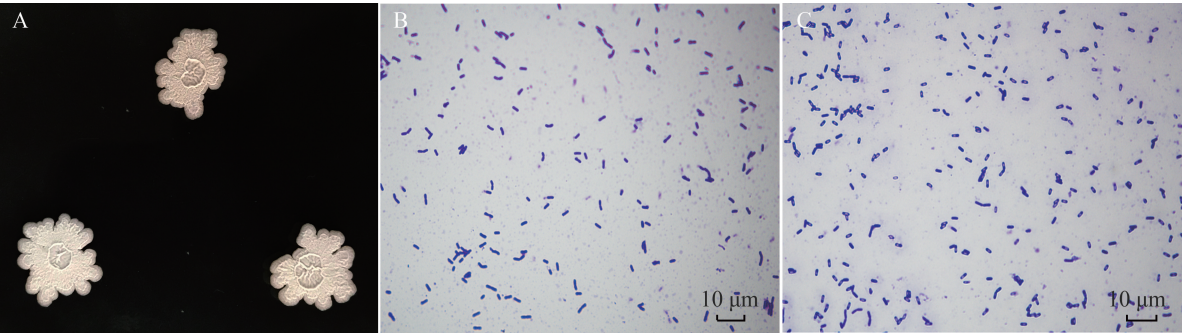


图2 菌株HMB22922的菌落(A)、菌体(B)和芽胞(C)形态特征
Fig. 2 The morphology of colony (A), thallus (B) and spores (C) of bacterial strain HMB22922

2.4.2 16S rDNA序列分析鉴定

将鉴定所得菌株HMB22922的16S rDNA序列(登录号:MH590616.1)在GenBank中进行同源性比较,HMB22922菌株与芽胞杆菌属的16S rDNA同源性达到99%;系统发育树分类结果表明,HMB22922菌株与萎缩芽胞杆菌*B. atrophaeus* 1942(登录号:MF101172.1)聚合到一起(图3),故将其初步鉴定为芽胞杆菌属的萎缩芽胞杆菌。

2.4.3 微生物自动鉴定系统鉴定结果

Biolog自动微生物鉴定结果显示,菌株HMB22922与数据库中萎缩芽胞杆菌的相似值最高,为0.562,属于萎缩芽胞杆菌。

综合形态特征、16S rDNA序列分析以及Biolog微生物自动鉴定系统鉴定的结果,将菌株HMB22922鉴定为萎缩芽胞杆菌。

2.5 生防细菌HMB22922制剂的防治效果

接种病原菌5 d后,菌株HMB22922培养液、菌株HMB22922悬浮剂和空白对照的病情指数分别为3.13、1.88和13.75,前两者差异不显著,但均显著低于空白对照($P<0.05$),菌株HMB22922培养液和悬浮剂的防治效果分别为77.24%和86.33%。接种病原菌7 d和12 d后,空白对照的病情指数分别为46.88和93.13;菌株HMB22922培养液的病情指数分别为18.13和76.25,均显著低于空白对照($P<0.05$),防治效果分别为61.33%和18.13%;菌株HMB22922悬浮剂的病情指数分别为10.00和31.25,均显著低于空白对照和菌株HMB22922培养液处理($P<0.05$),防治效果分别为78.66%和66.44%。表明菌株HMB22922悬浮剂的防治效果优于菌株HMB22922培养液的防治效果(表4)。

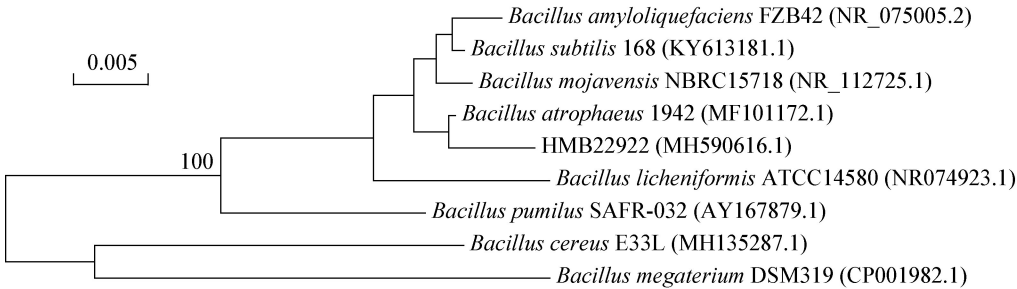


图3 基于16S rDNA序列采用邻接法构建菌株HMB22922与其它萎缩芽胞杆菌菌株的系统发育树
Fig. 3 Neighbor-joining phylogeny of bacterial strain HMB22922 and other *Bacillus atrophaeus* strains based on the 16S rDNA sequences

表4 生防菌HMB22922制剂对棉铃疫病的防治效果

Table 4 Control efficacies of two preparations of bacterial antagonist HMB22922 against cotton boll blight

制剂 Preparation	接种5 d后 5 d after inoculation		接种7 d后 7 d after inoculation		接种12 d后 12 d after inoculation	
	病情指数 Disease index	防治效果(%) Control efficacy	病情指数 Disease index	防治效果(%) Control efficacy	病情指数 Disease index	防治效果(%) Control efficacy
培养液 Culture broth	3.13±0.63 b	77.24	18.13±1.57 b	61.33	76.25±2.98 b	18.13
悬浮剂 Suspension agent	1.88±0.63 b	86.33	10.00±1.02 c	78.66	31.25±1.25 c	66.44
空白对照 Control	13.75±0.72 a	—	46.88±0.63 a	—	93.13±0.63 a	—

表中数据为平均数±标准误。同列不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean ± SE. Different letters in the same column indicated significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

拮抗作用是生防细菌发挥生物防治效果的主要机制之一,通过拮抗活性测定初步筛选生防细菌是目前最普遍的方法(张斌等,2015)。由于棉铃疫病的主要病原菌苾麻疫霉可以离体培养,本研究采用对峙培养法进行棉铃疫病生防细菌的初步筛选,共

获得11株拮抗活性较强的拮抗细菌。然而众多研究表明,离体拮抗活性较强的细菌在田间未必表现出较好的生物防治效果(刘邈洲等,2012),因为有些细菌抑菌物质的产生受培养条件的影响,在PDA培养基上可以产生的抑菌物质,但在棉铃上未必产生或产生的浓度不足以抑制病原菌。另外,防治效果

较好的生防细菌往往是多个生防作用机理综合表现的结果,包括抑菌作用(Kumar et al., 2011)、竞争作用(Yáñez-Mendizábal et al., 2012)以及诱导植物抗病性(Kloepper et al., 2004; Lahlali et al., 2013)等。本研究针对初步筛选的11株拮抗细菌进行了离体防治效果和田间防治效果评价,发现只有拮抗细菌HMB22922在田间表现出较好的防治效果。本研究已明确HMB22922菌株对苾麻疫霉有很好的抑菌作用,该菌株对苾麻疫霉是否产生竞争作用,对棉花植株是否产生诱导抗性作用仍需深入研究。

许多学者应用多种手段对病原菌和生防微生物进行了种属分类鉴定。姚婷等(2017)在形态学特征观察与ITS区rDNA序列分析的基础上,应用Biolog系统将3株葡萄孢属丝状真菌鉴定为灰葡萄孢*Botrytis cinerea*。沈肖玲等(2018)通过对甘薯茎腐病原菌的菌体形态和培养特性观察结合Biolog测定手段发现,该病原菌与达旦提狄克氏菌*Dickeya dadantii*高度一致。杨艺炜等(2018)通过形态特征和生理生化特性观察、Biolog自动微生物鉴定系统鉴定和16S rDNA序列分析,将烟草黑胫病拮抗菌XF10鉴定为假单胞菌属绿针假单胞菌*Pseudomonas chlororaphis*。张丽娟等(2018)通过形态学、分子生物学及Biolog碳源利用试验,将具有修复放射性核素污染能力的土著丝状真菌F54鉴定为镰孢菌属真菌,与尖孢镰孢菌*Fusarium oxysporum*同源性最高。本研究通过形态学观察以及16S rDNA序列比对将田间防治效果最好的生防细菌菌株HMB22922初步鉴定为萎缩芽胞杆菌,但萎缩芽胞杆菌属于枯草芽胞杆菌类细菌,该细菌与枯草芽胞杆菌、解淀粉芽胞杆菌*B. amyloliquefaciens*以及摩加夫芽胞杆菌*B. mojavensis*有较高的遗传相似性,通过16S rDNA序列比对难以准确地鉴定为萎缩芽胞杆菌。因此本研究利用Biolog微生物鉴定系统对菌株HMB22922进行了生理生化鉴定,研究结果表明该菌株的碳代谢特性与萎缩芽胞杆菌具有较高的相似性。综合16S rDNA序列以及Biolog微生物鉴定系统的结果,菌株HMB22922被鉴定为萎缩芽胞杆菌。同时枯草芽胞杆菌及其近源种因能产生脂肽类、蛋白类等多种抑菌活性物质,并且能形成耐逆性强的芽胞而成为开发微生物源农药的重要资源(王璐瑶等, 2017; 赵卫松等, 2018)。本研究结果发现,萎缩芽胞杆菌菌株HMB22922对苾麻疫霉有较强的抑菌活性,后续研究将进一步鉴定菌株HMB22922所产生的抑菌物质种类。

农药悬浮剂具有分散性好、悬浮率高、生物活性高、使用剂量小、耐雨水冲刷、残留低、对人畜低毒、环境友好等特点,而且在生产与使用中无粉尘漂移、不易燃、不易爆,提高了包装、运输和贮藏的安全性(潘立刚等, 2005; 仲苏林, 2010)。目前悬浮剂已被用于生防微生物芽胞杆菌、链霉菌等产品的研制工作。赵晓燕等(2010)研制了苏云金芽胞杆菌*B. thuringiensis* BtR05菌株悬浮剂,并在室内条件下测定了该制剂对南方根结线虫*Meloidogyne incognita*卵孵化的抑制作用,结果表明该制剂对南方根结线虫卵孵化的抑制率随悬浮剂浓度的增大以及处理时间的延长而提高,BtR05悬浮剂稀释25倍液处理2 d和4 d后,对南方根结线虫卵孵化的抑制率分别为85.67%和97.97%。为提高玫瑰黄链霉菌*Streptomyces roseoflavus* Men-myeo-93-63抗菌活性代谢产物roflamycoin对黄瓜白粉病的防治效果,刘亚南等(2018)以roflamycoin为有效成分研制了0.1% roflamycoin悬浮剂,该悬浮剂1 000倍稀释液喷雾处理3次结束后第10天的田间防效达到88.9%,显著高于Men-myeo-93-63发酵液的防效74.24%。本研究结果发现以萎缩芽胞杆菌HMB22922为核心成分的悬浮剂对棉铃疫病的防治效果优于其培养液,悬浮剂中的助剂有利于菌体在棉铃表面的定殖,或者有助于菌株代谢产物对苾麻疫霉起作用。后续将围绕该菌株的发酵工艺,悬浮剂的加工工艺优化以及使用方法等开展研究,进一步提高该菌株的生物防治效果。

参 考 文 献 (References)

- Adesina MF, Lembke A, Costa R, Speksnijder A, Smalla K. 2007. Screening of bacterial isolates from various European soils for *in vitro* antagonistic activity towards *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum*: site-dependent composition and diversity revealed. *Soil Biology and Biochemistry*, 39(11): 2818–2828
- Chang WZ, Zhang YM, Lei ZS. 2009. Comprehensive measures for cotton boll rot in the north of Henan. *China Cotton*, (1): 43 (in Chinese) [常文周, 张月明, 雷忠顺. 2009. 豫北地区棉花烂铃综合防治措施. *中国棉花*, (1): 43]
- Chen FX, Gao ZM, Qi YZ, Ma GS. 2001. On identification and biological characters of the causal organism of cotton boll blight in Anhui. *Journal of Anhui Agricultural University*, 28(3): 227–231 (in Chinese) [陈方新, 高智谋, 齐永震, 马国胜. 2001. 安徽省棉铃疫病菌的鉴定及生物学特性研究. *安徽农业大学学报*, 28(3): 227–231]
- Guo CJ, Luo Z. 1963. Factors affecting the outbreak of the cotton boll rot caused by *Glomerella gossypii* (South) Edg. *Journal of Plant*

- Protection, 2(4): 409–416 (in Chinese) [过崇俭, 罗张. 1963. 棉花烂铃及炭疽病的研究. 植物保护学报, 2(4): 409–416]
- Joint Investigation Group of Cotton Boll Disease. 1986. Investigation on the occurrence of cotton boll disease in China. China Cotton, (1): 42–44 (in Chinese) [棉花铃病联合调查组. 1986. 全国棉花铃病发生近况调查. 中国棉花, (1): 42–44]
- Kim HS, Sang MK, Jeun YC, Hwang BK, Kim KD. 2008. Sequential selection and efficacy of antagonistic rhizobacteria for controlling *Phytophthora* blight of pepper. Crop Protection, 27(3/4/5): 436–443
- Kloepper JW, Ryu CM, Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology, 94(11): 1259–1266
- Kumar KVK, Reddy MS, Kloepper JW, Yellareddygar SKR, Lawrence KS, Zhou XG, Sudini H, Miller ME, Appa RP, Surendranatha Reddy EC, et al. 2011. Plant growth-promoting activities of *Bacillus subtilis* MBI600 (Integral®) and its compatibility with commonly used fungicides in rice sheath blight management. International Journal of Microbiology Research, 3(2): 120–130
- Lahlali R, Peng G, Gossen BD, McGregor L, Yu FQ, Hynes RK, Hwang SF, McDonald MR, Boyetchko SM. 2013. Evidence that the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. Phytopathology, 103(3): 245–254
- Li H, Li GY, Ding SL. 1999. Identification of *Phytophthora* species infecting staple crops in Xinjiang. Acta Phytopathologica Sinica, 29(4): 364–371 (in Chinese) [李晖, 李国英, 丁胜利. 1999. 新疆主要农作物疫霉菌种类鉴定. 植物病理学报, 29(4): 364–371]
- Li SZ, Lu XY, Hao JJ, Zhao M, Nian GZ, Guo QG, Zhang XY, Ma P. 2017. Cotton boll rot occurrence, analysis of varietal resistance and pathogenicity differentiation of the major pathogen. Acta Phytopathologica Sinica, 47(6): 824–831 (in Chinese) [李社增, 鹿秀云, 郝俊杰, 赵鸣, 年冠臻, 郭庆港, 张晓云, 马平. 2017. 棉花烂铃病的发生、品种抗病性及主要病原菌致病力分析. 植物病理学报, 47(6): 824–831]
- Li SZ, Lu XY, Ma P, Gao SG, Liu XZ, Liu G. 2005a. Evaluation of biocontrol potential of a bacterial strain NCD-2 against cotton *Verticillium* wilt in field trials. Acta Phytopathologica Sinica, 35(5): 451–455 (in Chinese) [李社增, 鹿秀云, 马平, 高胜国, 刘杏忠, 刘干. 2005a. 防治棉花黄萎病的生防细菌NCD-2的田间效果评价及其鉴定. 植物病理学报, 35(5): 451–455]
- Li SZ, Lu XY, Zhang J, Gao SG, Ma P. 2005b. Screening and bioassay of antagonistic bacteria against wheat sharp eyespot. Acta Phytopathologica Sinica, 35(6): 95–98 (in Chinese) [李社增, 鹿秀云, 张静, 高胜国, 马平. 2005b. 小麦纹枯病拮抗细菌的筛选. 植物病理学报, 35(6): 95–98]
- Lin L, Jin ZS, Zhang X, Deng S, Wang FL. 2015. Comparison on field efficacies of four kinds of fungicides against cotton boll rot. China Cotton, 42(6): 25–26 (in Chinese) [林玲, 金中时, 张昕, 邓晟, 王凤良. 2015. 4种杀菌剂防治棉花烂铃病田间药效比较. 中国棉花, 42(6): 25–26]
- Liu YN, Han X, Zhen DM, Meng QF, Li YN, Liu DQ, Chi GT. 2018. Preparation of roflamycoin 0.1% SC and its efficacy on cucumber powdery mildew. Agrochemicals, 57(3): 177–180 (in Chinese) [刘亚南, 韩兴, 甄丹妹, 孟庆芳, 李亚宁, 刘大群, 赤国彤. 2018. 0.1% Roflamycoin悬浮剂的研制及其对黄瓜白粉病的防效. 农药, 57(3): 177–180]
- Liu YZ, Chen ZY, Liang XJ, Zhu JH. 2012. Screening, evaluation and identification of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia solanacearum*. Chinese Journal of Biological Control, 28(1): 101–108 (in Chinese) [刘邮洲, 陈志谊, 梁雪杰, 朱剑花. 2012. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定. 中国生物防治学报, 28(1): 101–108]
- Lu XY, Li SZ, Li BQ, Guo QG, Ma P. 2013. Control of cotton boll rot by applying plastic membrane on the soil surface between cotton rows. China Cotton, 40(7): 29–31 (in Chinese) [鹿秀云, 李社增, 李宝庆, 郭庆港, 马平. 2013. 利用行间覆膜技术防治棉花烂铃病. 中国棉花, 40(7): 29–31]
- Lu XY, Zhou HM, Li SZ, Guo QG, Li BQ, Ma P. 2014. Screening and evaluation of 9 kinds of chemical fungicides to control cotton boll blight. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 18(3): 39–42 (in Chinese) [鹿秀云, 周洪妹, 李社增, 郭庆港, 李宝庆, 马平. 2014. 防治棉铃疫病的9种化学杀菌剂筛选与评价. 河北农业科学, 18(3): 39–42]
- Ma L, Ma X, Jia RH, Dong XC, Zhang CH, Zhang WM, Qiu HZ. 2017. Screening and identification of strains antagonistic to potato black scurf and its growth conditions. Journal of Gansu Agricultural University, 52(4): 90–95 (in Chinese) [马龙, 马兴, 贾蕊鸿, 董星辰, 张春红, 张文明, 邱慧珍. 2017. 一株马铃薯黑痣病拮抗菌的筛选鉴定及其生长条件研究. 甘肃农业大学学报, 52(4): 90–95]
- Nayak S, Limsuwan C, Chichurd N, Kühlmann KJ, Pungpang S. 2017. Antimicrobial activity of partially characterized analytes from *Bacillus pumilus* (B2). Aquaculture Research, 48(11): 5606–5613
- Pan LG, Tao LM, Zhang X. 2005. Advances in pesticide formulation of suspension concentrate. Plant Protection, 31(2): 17–20 (in Chinese) [潘立刚, 陶岭梅, 张兴. 2005. 农药悬浮剂研究进展. 植物保护, 31(2): 17–20]
- Shen QY. 1992. Basic research and prevention of cotton diseases. Beijing: Science Press, pp. 179–180 (in Chinese) [沈其益. 1992. 棉花病害基础研究与防治. 北京: 科学出版社, pp. 179–180]
- Shen XL, Lin C, Qian JT, Qiu ZL, Chen JB, Sun C, Yi JP, Lou BG. 2018. Characterization of stem and root rot symptoms of sweet potato and the causal pathogen of the disease. Acta Phytopathologica Sinica, 48(1): 25–34 (in Chinese) [沈肖玲, 林钊, 钱俊婷, 仇智灵, 陈江彬, 孙超, 易建平, 楼兵干. 2018. 甘薯茎腐病症状及其病原鉴定. 植物病理学报, 48(1): 25–34]
- Sun BB, Li W, Wei J, Tian T. 2015. Research Progress in Biocontrol of *Bacillus* spp. Tianjin Agricultural Sciences, 21(12): 102–107 (in Chinese) [孙冰冰, 李伟, 魏军, 田涛. 2015. 生防芽胞杆菌的研究进展. 天津农业科学, 21(12): 102–107]
- Wang LY, Li XD, Duan TF, Yang XY, Liu YF, Chen ZY. 2017. Applica-

- tion technologies and demonstration trials in fields of *Bacillus amyloquelificans* B1619 against tomato *Fusarium* wilt. Chinese Journal of Biological Control, 33(4): 512–518 (in Chinese) [王璐瑶, 李兴东, 段天凤, 杨晓云, 刘永峰, 陈志谊. 2017. 解淀粉芽孢杆菌 B1619 防控设施番茄枯萎病田间使用技术与示范. 中国生物防治学报, 33(4): 512–518]
- Yáñez-Mendizábal V, Zerrouh H, Viñas I, Torres R, Usall J, de Vicente A, Pérez-García A, Teixidó N. 2012. Biological control of peach brown rot (*Monilinia* spp.) by *Bacillus subtilis* CPA-8 is based on production of fengycin-like lipopeptides. European Journal of Plant Pathology, 132(4): 609–619
- Yang CP. 2006. Occurrence reason and control measures of cotton boll disease in North China. China Cotton, (12): 33 (in Chinese) [杨春萍. 2006. 华北地区棉花烂铃病发生原因及综合防治技术. 中国棉花, (12): 33]
- Yang YW, Li YY, Zhang AS, Zhou JY, Li B, Wang J, Chen DX. 2018. Screening and identification of an antagonistic bacterium XF10 against tobacco black shank. Tobacco Science & Technology, 51(4): 20–27 (in Chinese) [杨艺伟, 黎妍妍, 张安盛, 周建云, 李斌, 王静, 陈德鑫. 2018. 烟草黑胫病拮抗菌 XF10 的筛选与鉴定. 烟草科技, 51(4): 20–27]
- Yao T, Chen QW, Zhang Y, Zhang M, He XM, Wang YS. 2017. Analysis of rDNA ITS and carbon metabolic fingerprinting of *Botrytis* Nees isolated from three fruits. Journal of Food Science and Technology, 35(4): 49–55 (in Chinese) [姚婷, 陈其葳, 张燕, 张萌, 何欣萌, 王友升. 2017. 3 株果实采后葡萄孢属真菌 ITS 区 rDNA 序列与碳源代谢指纹图谱分析. 食品科学技术学报, 35(4): 49–55]
- Yi L, Zhang Y, Liao XL, Su P, Chou JW. 2013. Advances in secondary metabolite produced by *Bacillus cereus*. Agrochemicals, 52(3): 162–164 (in Chinese) [易龙, 张亚, 廖晓兰, 苏品, 仇佳伟. 2013. 蜡状芽孢杆菌次生代谢产物的研究进展. 农药, 52(3): 162–164]
- You XC. 2018. Screening of antagonistic bacteria and study of bio-organic fertilizer against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana. Master Thesis. Fuzhou: Huaqiao University (in Chinese) [游晓朝. 2018. 香蕉枯萎病拮抗菌株筛选及生防菌肥研发. 硕士学位论文. 福州: 华侨大学]
- Zhang B, Qiao JQ, Liang XJ, Liu YZ, Chen ZY. 2015. Evaluation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia aolanacearum*. Journal of Plant Protection, 42(3): 353–361 (in Chinese) [张斌, 乔俊卿, 梁雪杰, 刘卹洲, 陈志谊. 2015. 番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗菌的评价. 植物保护学报, 42(3): 353–361]
- Zhang LJ, Wang W, Zhang ZD, Xie YQ, Gu MY, Zhu J, Tang QY, Wang B, Song SQ, Huang W. 2018. Isolation and identification of filamentous fungi F54 and its biosorption and enrichment characteristics of cesium. Journal of Nuclear and Radiochemistry, 40(3): 175–182 (in Chinese) [张丽娟, 王玮, 张志东, 谢玉清, 顾美英, 朱静, 唐琦勇, 王博, 宋素琴, 黄伟. 2018. 丝状真菌 F54 的分离鉴定及其对铯的吸附特性. 核化学与放射化学, 40(3): 175–182]
- Zhao WS, Lu XY, Guo QG, Wang PP, Shang JY, Nian GZ, Zhang XY, Dong LH, Li SZ, Ma P. 2018. A preparation of *Bacillus subtilis* BAB-1 DPC against tomato gray mold. Chinese Journal of Biological Control, 31(1): 99–108 (in Chinese) [赵卫松, 鹿秀云, 郭庆港, 王培培, 商俊燕, 年冠臻, 张晓云, 董丽红, 李社增, 马平. 2018. 防治番茄灰霉病的枯草芽孢杆菌 BAB-1 粉尘剂研制. 中国生物防治学报, 31(1): 99–108]
- Zhao XY, Li JS, Huang YJ, Wang YL, Chen K, Hu JD, Yang HT. 2010. Preparation of BtR05 suspending agent and its effect on egg-hatching of *Meloidogyne incognita*. Chinese Journal of Biological Control, 26(S): 19–23 (in Chinese) [赵晓燕, 李纪顺, 黄玉杰, 王貽莲, 陈凯, 扈进冬, 杨合同. 2010. BtR05 悬浮剂制备及其对南方根结线虫卵孵化的影响. 中国生物防治, 26(S): 19–23]
- Zhong SL. 2010. Development status and prospects of pesticides suspension concentrates (SC) formulation. World Pesticides, 32(3): 47–51, 58 (in Chinese) [钟苏林. 2010. 农药悬浮剂的开发现状和展望. 世界农药, 32(3): 47–51, 58]

(责任编辑: 张俊芳)