

海洋生境贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 的 鉴定及抑真菌活性

杨 可, 郑柯斌, 黄晓慧, 袁 静, 陈 杰*

(浙江农林大学 浙江省绿色农药 2011 协同创新中心, 浙江 临安 311300)

摘 要: 为研究海洋生境芽孢杆菌 TCS001 的分类地位和抑菌活性, 通过形态和生理生化特征观察, 并结合 *gyrA* 序列同源性分析对菌株进行了鉴定; 通过平板对峙培养法测定了菌株 TCS001 对多种植物病原真菌的抑菌谱; 采用菌丝生长速率法和凹玻片法, 测定了不同浓度 TCS001 菌株发酵滤液对靶标菌黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 菌丝生长和孢子萌发的影响。结果显示: 该菌株为贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis*, 其对 6 种供试病原菌均有一定的抑制效果, 其中对黄瓜灰霉病菌的抑制率最高, 达 87.66%。不同稀释倍数下, TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉病菌均有一定的抑制作用, 其中, 稀释 5 倍时对菌丝生长和孢子萌发的抑制率最高, 分别为 96.24% 和 98.05%, 稀释 20 倍时抑制率也均达 90% 以上。形态学观察发现, TCS001 发酵滤液可导致黄瓜灰霉病菌孢子萌发芽管中间或顶端膨大畸形。研究表明, 海洋生境贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 极具开发为微生物农药的潜能。

关键词: 生防菌株; 海洋生境芽孢杆菌; 贝莱斯芽孢杆菌; 促旋酶 A 亚单位基因; 发酵滤液; 黄瓜灰霉病菌; 抑菌活性

中图分类号: S482.92; TQ450.21

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2018)03-0333-07

Identification and antifungal activity of marine *Bacillus velezensis* strain TCS001

YANG Ke, ZHENG Kebin, HUANG Xiaohui, YUAN Jing, CHEN Jie*

(Collaborative Innovation Center of Green Pesticide, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China)

Abstract: To study the taxonomic category and antifungal activity of the marine *Bacillus* sp. strain TCS001, the strain TCS001 as *Bacillus velezensis* based on the morphological, physiological and biochemical characteristics as well as analyzation of the sequence of *gyrA* was identified. The antifungal spectrum of strain TCS001 was determined by the dural culture method. The effects of strain TCS001 fermentation filtrate on the mycelial growth and spore germination of the target fungus, *Botrytis cinerea*, were also investigated using the mycelial growth rate method and the concave slide method. The results showed that the strain TCS001 had obvious antifungal activity against six pathogenic fungi, especially *B. cinerea*, the inhibition rates of which was 87.66%. Several different dilutions of

收稿日期: 2018-02-06; 录用日期: 2018-03-26.

基金项目: “十三五”国家重点研发计划 (2017YFD0200507).

作者简介: 杨可, 女, 硕士研究生, E-mail: qg.yang@qq.com; *陈杰, 通信作者 (Author for correspondence), 女, 博士, 研究员, 主要从事农药学研究, E-mail: gina1965@163.com

fermentation filtrate exhibited significant inhibition efficacy against *B. cinerea* mycelial growth and spore germination. Five times diluted fermentation filtrate generated the highest mycelial growth and spore germination inhibition rates of 96.24% and 98.05%, respectively. The inhibition efficacy against mycelial growth and spore germination was still over 90% when the fermentation filtrate was diluted by 20 folds. Strain TCS001 fermentation filtrate could alter *B. cinerea* spore germination, such as expansion and deformation, according to the morphological observation. This study provided a solid evidence that *B. velezensis* strain TCS001 is a very promising bioagent for controlling plant fungal diseases.

Keywords: biocontrol strains; marine *Bacillus* sp.; *Bacillus velezensis*; *gyrA*; fermentation filtrate; *Botrytis cinerea*; antifungal activity

海洋生物是人类新型药物和功能食品的重要来源,为适应其特殊的生存环境(高盐、高压、缺氧、光照弱等),它们在生长和代谢过程中会产生大量具有特殊化学结构、生理活性及功能的物质^[1]。海洋细菌是海洋微生物中的优势类群,具有产生新型生物活性物质的巨大潜力,已成为药物筛选的重要来源之一,是目前研究的热点领域^[2]。贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis* 是一种新型生防细菌,是 2005 年由西班牙学者 Ruiz-García 等^[3]在西班牙南部马赫拉加发现并命名的芽孢杆菌新种,2008 年被确定为解淀粉芽孢杆菌的后期异型体^[4]。作为一种新型生防细菌,已有研究表明其对多种植物病原菌有强抑制作用,但是前期研究者所用的贝莱斯芽孢杆菌均来自土壤、植物组织或动物粪便等陆生环境^[5-8],目前尚未见对来自海洋生境贝莱斯芽孢杆菌生防活性的相关研究报道。而结合海洋的特殊环境,推测海洋生境的贝莱斯芽孢杆菌有可能表现出更大的开发潜能。因此,笔者针对分离自中国渤海海域的 TCS001 菌株进行了菌种鉴定及其抑菌活性研究,旨在发掘出具有强抑菌活性的生防菌株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株

待测拮抗菌株:海洋细菌 TCS001 由本实验室分离自中国渤海海泥,已对其进行低盐驯化与诱变育种,菌株保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC),保藏号为 CGMCC No. 8921。

供试植物病原真菌由本实验室保存,分别

为:黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、黄瓜蔓枯病菌 *Ascochyta citrullina*、黄瓜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、黄瓜褐斑病菌 *Corynespora cassiicola*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 及香蕉叶斑病菌 *Pseudocercospora musae*。

1.1.2 培养基 NA 培养基用于 TCS001 菌株的分离活化;NB (pH = 8.0) 培养基用于 TCS001 菌株发酵培养;种子培养基(胰蛋白胨 7 g, 酵母粉 2 g, 葡萄糖 2 g, NaCl 6 g, KCl 0.06 g, MgCl₂·6H₂O 0.5 g, 用蒸馏水定容至 1 000 mL, pH = 7.0) 用于 TCS001 菌株种子液培养;PDA 培养基用于植物病原真菌的培养。

1.2 TCS001 菌株的鉴定

1.2.1 菌株形态及生理生化特征鉴定 通过革兰氏染色和芽孢染色进行形态特征观察^[9]。生理生化特征测定参照《常见细菌系统鉴定手册》^[10]进行。

1.2.2 菌株分子鉴定 利用上海生工 DNA 快速提取试剂盒进行 TCS001 菌株基因组 DNA 的提取^[11],以促旋酶 (*gyrase*) A 亚单位基因 (*gyrA*) 引物[F: (5'-CAGTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3') 和 R: (5'-CAAGGTAATGCTCCA GGCATTGCT-3')] ^[12] 对菌株的基因组进行扩增。反应体系:模板 DNA 1 μL, 10 μmol/L 引物 F 和引物 R 各 1 μL, 2 × Taq Master Mix 12.5 μL。反应条件:95 °C 5 min; 94 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环;72 °C 10 min^[13]。经纯化后将 *gyrA* 序列扩增产物送上海生工生物工程股份有限公司测序。

根据基因测序结果,采用 BLAST 搜索程序从 GenBank 数据库中调出同源性高的相关菌株的基因序列,利用 MEGA 7.0 软件进行序列多重比对后,采用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树,

以确定菌株 TCS001 的分类地位。

1.3 TCS001 菌株抑菌谱测定及液体发酵

采用平板对峙培养法^[14]测定 TCS001 菌株对 6 种供试病原菌的抑制作用, 在 PDA 平板中心接入直径为 7 mm、生长旺盛的病原菌菌饼, 菌丝面朝下, 在距培养皿中央 2 cm 处以对角线方式接种 4 个 TCS001 菌落, 以不接种 TCS001 菌株的培养皿为对照。每处理设 4 个重复, 于 25℃ 暗培养, 待对照组病原菌直径长到培养皿直径的 3/4 时, 采用十字交叉法测量病原菌菌落直径, 并按 (1) 式计算抑制率, 利用 SPSS 22.0 软件对抑制率进行单因素方差分析。

抑制率/% =
$$\frac{\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径} - 7} \times 100$$
 (1)

无菌条件下, 用接种环取一环在 NA 培养基上活化培养 3 d 的 TCS001 菌株, 接种于装有 150 mL 种子培养液的 250 mL 锥形瓶中, 于 27℃、140 r/min 条件下振荡培养 20 h 至对数增长期, 形成种子液。按 4% 的接种量取 4 mL 上述种子液接种于 100 mL NB 培养液中, 于 27℃、160 r/min 条件下振荡培养 36 h, 即得 TCS001 菌悬液。

1.4 TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉病菌的影响

1.4.1 对黄瓜灰霉病菌孢子萌发的影响 将 1.3 节中的 TCS001 菌悬液于 4℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min, 取上清液经 22 μm 的微孔滤膜过滤 3 次, 即得发酵滤液^[15], 备用。采用凹玻片法^[16]观察发酵滤液对黄瓜灰霉病菌孢子萌发的影响。将在 PDA 培养基中培养 8 d 的黄瓜灰霉病菌制成孢子悬浮液, 利用无菌水调节其浓度为 2 × 10⁵ 个/mL。将 TCS001 发酵滤液按 5、10、20、40、80 和 160 倍的稀释比例, 分别与孢子悬浮液等体积混匀。各处理取 60 μL 滴加在凹玻片上, 每处理设 5 个重复, 置于培养皿中, 25℃ 下恒温保湿、暗培养 15 h 后, 在光学显微镜下观察各试验组孢子形态以及萌发数量, 计算孢子萌发抑制率, 并利用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析。

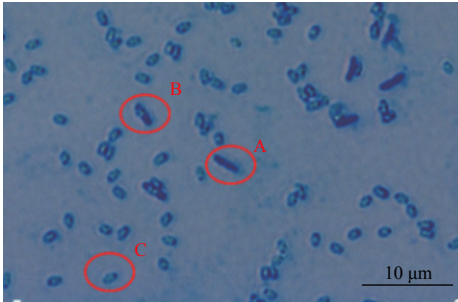
1.4.2 对黄瓜灰霉病菌菌丝生长的影响 采用菌丝生长速率法^[17]测定不同浓度发酵滤液对黄瓜灰霉病菌菌丝生长的抑制作用。将发酵滤液与 PDA 培养基混合, 使发酵滤液分别稀释 5、10、20、40、80 和 160 倍, 以加入等体积无菌水的 PDA 培养基为对照, 每处理设 5 个重复, 于 25℃ 恒温培

养 72 h 后采用十字交叉法测量菌落直径, 计算抑菌率, 并利用 SPSS 22.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 TCS001 鉴定结果

2.1.1 培养性状及形态特征 在 NA 培养基上生长后, TCS001 单菌落形态呈近圆形, 浅黄色, 不透明; 培养初期菌落表面光滑, 边缘整齐, 后期表面有褶皱, 边缘略不整齐, 中间有凸起, 四周呈云雾状扩散。经革兰氏染色表明: TCS001 菌株为革兰氏阳性, 杆状 (图 1), 菌体长 3.1~6.0 μm, 宽约 0.6 μm (图 1-A), 芽孢呈椭圆形, 近端生, 孢囊稍膨大 (图 1-B), 长 1.2~2.0 μm, 宽约 0.7 μm (图 1-C)。



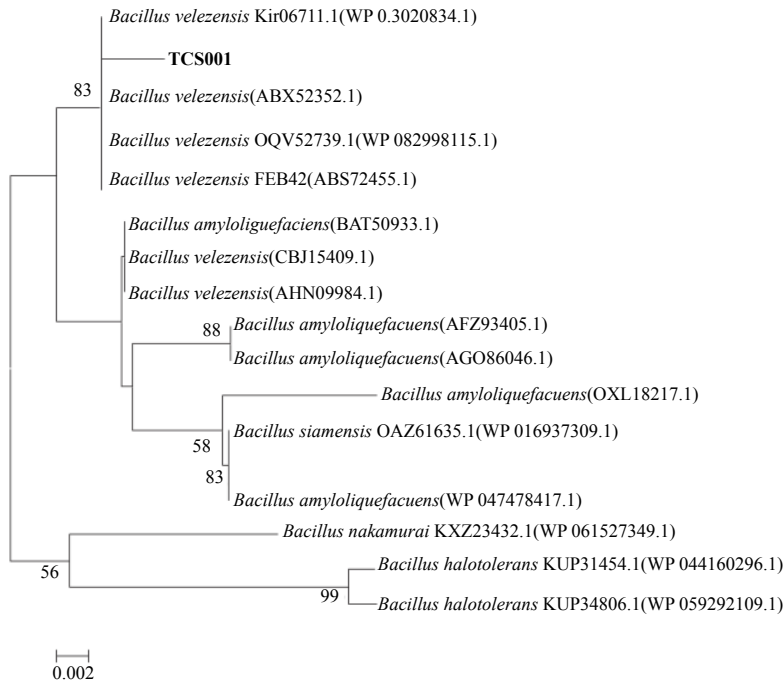
A: TCS001 未形成芽孢时的细胞形态; B: TCS001 产生芽孢后的形态; C: TCS001 游离的芽孢形态。
A: Cell morphology of strain TCS001 without spore; B: Cell morphology of strain TCS001 with spore; C: Spore morphology of strain TCS001.

图 1 TCS001 在光学显微镜下的形态 (100 ×)

Fig. 1 Morphology of strain TCS001 under an optical microscope (100 ×)

2.1.2 生理生化特征 生理生化试验表明, TCS001 菌株能分解利用葡萄糖、乳糖、蔗糖、果糖、甘露醇和麦芽糖, 可水解淀粉和明胶, 能利用葡萄糖产酸, 其氧化酶反应、V-P 反应、硝酸盐还原反应和接触酶反应均呈阳性, 甲基红试验和 H₂S 反应呈阴性。根据 TCS001 菌株的培养性状、形态及生理生化特征, 初步鉴定其为芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 细菌^[9-10]。

2.1.3 分子鉴定 提取菌株 TCS001 的基因组 DNA, 电泳检测得其大小超过 10 kb。扩增得到 *gyrA* 基因, 测序后的基因序列片段长度为 971 bp, 与 Rooney 等^[12]公布的 741~939 bp 长度范围结果相符。将该基因序列进行 BLAST 分析, 根据 *gyrA* 基因序列比对结果构建系统发育树 (图 2), 从中可看出, 菌株 TCS001 的序列与 4 株 *B.*



注：分支处的数值为 Bootstrap 法重复 1 000 次评估得到的各节点支持率，标尺 0.002 为进化距离。

Note: Numbers at nodes indicating Bootstrap values for each node out of 1 000 bootstrap replications; Scale 0.002 meaning evolutionary distance.

图 2 基于 *gyrA* 基因序列构建的拮抗细菌 TCS001 与相关细菌的邻接法系统发育树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree based on *gyrA* gene sequences of antagonistic bacterium TCS001 and related bacteria

velezensis 的序列位于系统发育树的同一分支。同源性比对数据和系统发育树位置进一步证明了菌株 TCS001 为贝莱斯芽孢杆菌 *Bacillus velezensis*。

2.2 TCS001 菌株对植物病原真菌的抑制作用

平板对峙培养法测定结果 (表 1, 图 3) 表明：

表 1 贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 对供试植物病原真菌的抑制作用 (n = 4)

Table 1 Inhibition rate of *B. velezensis* strain TCS001 against different fungal phytopathogens (n = 4)

病原菌 Pathogen	抑制率 Inhibition rate/%
黄瓜灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	87.66 ± 0.87 a
香蕉叶斑病菌 <i>P. musae</i>	72.53 ± 2.93 b
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i>	71.40 ± 2.32 b
黄瓜蔓枯病菌 <i>A. citrullina</i>	69.48 ± 3.12 c
黄瓜褐斑病菌 <i>C. cassiicola</i>	58.52 ± 0.10 d
黄瓜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	57.62 ± 1.97 d

注：表中数据为平均值 ± 标准差，同列数据后不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异显著。

Note: Data in the table are mean ± SD. The different lowercase letters in the same column indicated significant difference at the level of $P < 0.05$ (by Duncan's new multiple range test).

TCS001 菌株对 6 种供试植物病原真菌均表现出良好的抑制效果 ($P < 0.05$)，抑制率为 57.62%~87.66%，其中对黄瓜灰霉病菌的抑制效果最强，对黄瓜菌核病菌的抑制效果最弱。

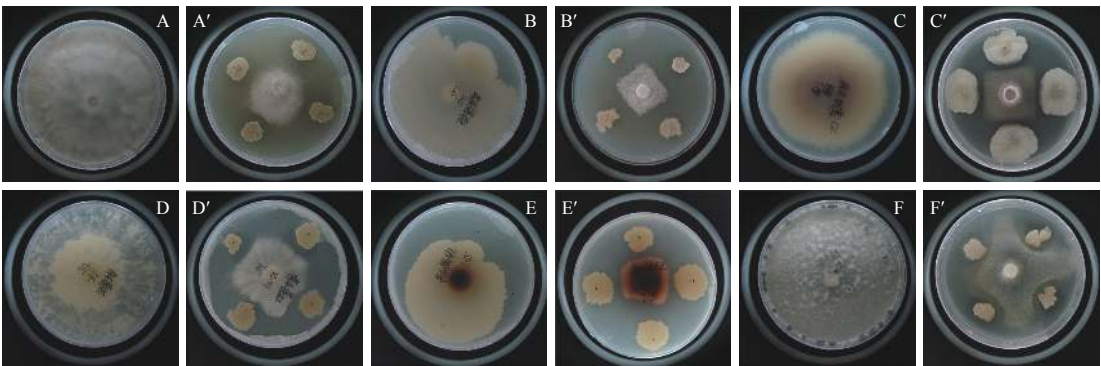
2.3 TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉病菌孢子萌发和菌丝生长的影响

2.3.1 对孢子萌发的影响 不同稀释倍数下，TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉病菌孢子萌发的抑制率存在显著差异 ($P < 0.05$)，随发酵滤液稀释倍数增大，抑制效果逐渐下降 (表 2)。

显微观察发现，对照组孢子萌发较好，芽管较长，粗细均匀 (图 4-A)；发酵滤液处理组孢子萌发出出现不同程度畸形，主要表现为 4 种形态：芽管中间膨大 (图 4-B)；芽管顶端膨大 (图 4-C)；芽管整体膨大 (图 4-D)；芽管膨大且出现异常分枝 (图 4-E)。

2.3.2 对菌丝生长的影响 不同稀释倍数下，TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉病菌菌丝生长的抑制率也存在显著差异 ($P < 0.05$)，随发酵滤液稀释倍数增大，抑制效果逐渐下降 (表 2)。

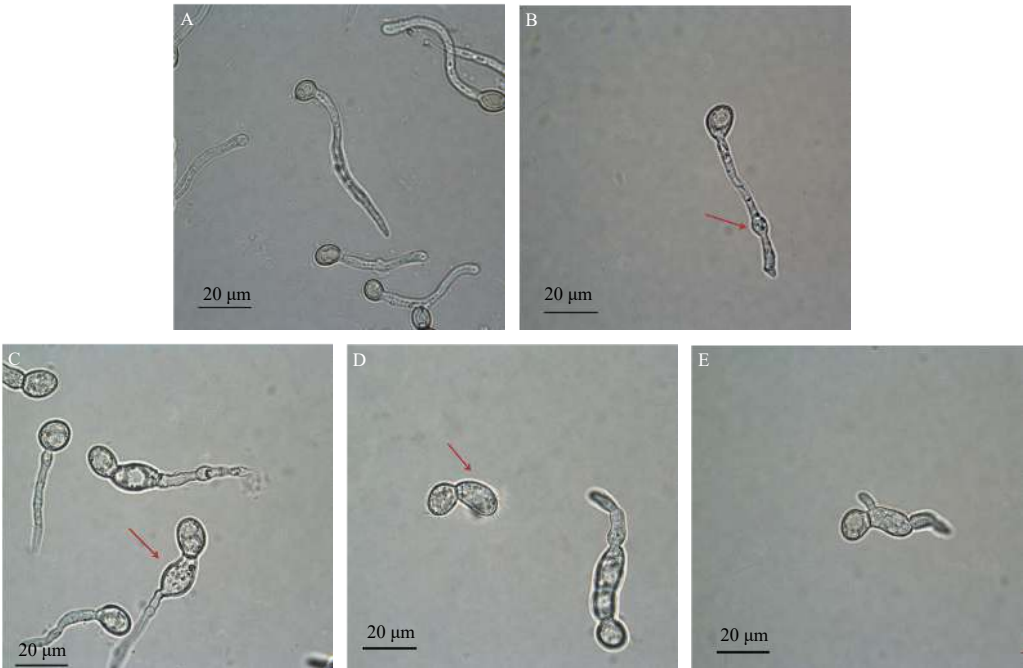
研究显示，当 TCS001 发酵滤液稀释倍数 ≤ 20 时，其对黄瓜灰霉病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制率均大于 90%，说明 TCS001 发酵液中含有活性明显的抑菌物质，具有明显的生防菌剂开发潜力。



A: 黄瓜灰霉病菌; B: 香蕉叶斑病菌; C: 棉花枯萎病菌; D: 黄瓜蔓枯病菌; E: 黄瓜褐斑病菌; F: 黄瓜菌核病菌。
其中 A、B、C、D、E、F 为对照组; A'、B'、C'、D'、E'、F' 为试验组。
A: *B. cinerea*; B: *P. musae*; C: *F. oxysporum*; D: *A. citrullina*; E: *C. cassiicola*; F: *S. sclerotiorum*.
A, B, C, D, E and F are the control group; A', B', C', D', E' and F' are the treatment group.

图 3 贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 对供试植物病原真菌的抑制效果

Fig. 3 Antagonistic effect of *B. velezensis* strain TCS001 against different fungal phytopathogens



A: 对照; B、C、D、E: 处理组 (箭头表示膨大处)。
A: Control group; B, C, D, E: Treatment groups (arrows denote expansion).

图 4 贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉病菌孢子萌发的影响

Fig. 4 Effects of strain TCS001 fermentation filtrate on spore germination of *B. cinerea* pathogen

3 小结与讨论

本研究对从中国渤海海泥中分离得到的菌株 TCS001 进行了形态特征观察、生理生化性质鉴定及 *gyrA* 序列分析, 确定该菌株为贝莱斯芽孢杆菌 *B. velezensis*。已有研究发现, 贝莱斯芽孢杆菌对棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* Kleb、白菜黑斑病致病菌芸薹链格孢 *Alternaria brassicae*、番茄灰霉病致病菌灰葡萄孢 *B. cinerea* Pers、腐霉属 (*Pythium* spp.)、丝核菌属 (*Rhizoctonia*

spp.)、链格孢属 (*Alternaria* spp.)、镰刀菌属 (*Fusarium* spp.)、疫霉属 (*Phytophthora* spp.) 和黑腐菌属 (*Thielaviopsis* spp.) 等植物病害均有一定的抑制活性^[18-20]。还有研究者将贝莱斯芽孢杆菌直接作为生物制剂应用于真菌病害的防治。本研究所用的贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 也表现出了良好的广谱抗菌活性, 对黄瓜灰霉病菌、香蕉叶斑病菌及棉花枯萎病菌等 6 种供试植物病原真菌均有显著的抑菌效果, 抑制率均在 57% 以上。

目前关于贝莱斯芽孢杆菌的研究主要集中于

表 2 贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 发酵滤液对黄瓜灰霉病菌孢子萌发及菌丝生长的抑制效果 (n = 5)

Table 2 Inhibitory effect of strain TCS001 fermentation filtrate on spore germination and mycelial growth of *B. cinerea* pathogen (n = 5)

发酵滤液稀释倍数 Dilution ratio of fermentation filtrate	抑制率 Inhibition rate/%	
	孢子萌发 Spore germination	菌丝生长 Mycelial growth
稀释 5 倍 Diluted by 5 times	98.05 ± 2.67 a	96.24 ± 0.86 a
稀释 10 倍 Diluted by 10 times	93.48 ± 1.25 a	93.44 ± 2.21 a
稀释 20 倍 Diluted by 20 times	92.85 ± 4.35 a	91.63 ± 0.72 a
稀释 40 倍 Diluted by 40 times	80.13 ± 7.83 b	80.46 ± 2.49 b
稀释 80 倍 Diluted by 80 times	65.04 ± 2.80 c	60.85 ± 2.31 c
稀释 160 倍 Diluted by 160 times	29.72 ± 0.87 d	56.73 ± 4.97 c

注：表中数据为平均值 ± 标准差，同列数据后不同小写字母表示在 P < 0.05 水平差异显著。

Note: Data in the table are mean ± SD, the different small letters after the same column figures indicated significant difference at the level of P < 0.05 (by Duncan’s new multiple range test).

对其活菌活性的研究上，而对其代谢产物的研究较少。但如果考虑将其制成活菌制剂，则要求菌株本身具有较强的加工和贮存耐受性，很多生防菌株往往难以实现这一点。因此，从生防菌株代谢物中开发新的抗真菌药物已引起人们的重视，成为研发的新热点^[21]。本研究将 TCS001 菌株发酵液通过离心及过滤进行初步分离，进一步探索了该发酵滤液的抑菌作用，结果证明 TCS001 发酵液中含有活性明显的抑菌物质，且通过离心及过滤措施可有效富集该活性物质，从而提高其对供试靶标菌的抑菌活性。

综上所述，贝莱斯芽孢杆菌 TCS001 菌株在植物病原真菌的生物防治方面具有一定的潜在开发利用价值，有望通过进一步分离纯化其发酵滤液，得到高活性的抗真菌药物。笔者后续将进一步对 TCS001 活体菌株的田间防治效果以及该菌所产生的具体抗真菌代谢活性物质等进行研究。

致谢 (Acknowledgement): 衷心感谢沈阳农业大学纪明山教授团队对本课题的指导与支持！

参考文献 (Reference):

[1] LIU Y, ZHENG H, ZHAN G H, et al. Establishment of an efficient

transformation protocol and its application in marine-derived *Bacillus* strain[J]. *Sci China Life Sci*, 2014, 57(6): 627-635.

[2] 孙晓磊, 闫培生, 王凯, 等. 深海细菌及其活性物质防控植物病原真菌的研究进展[J]. *生物技术进展*, 2015, 5(3): 176-184.

SUN X L, YAN P S, WANG K, et al. Progress of deep-sea bacteria and its bioactive compounds on prevention of plant pathogenic fungi[J]. *Curr Biotechnol*, 2015, 5(3): 176-184.

[3] RUIZ-GARCÍA C, BÉJAR V, MARTÍNEZ-CHECA F, et al. *Bacillus velezensis* sp. nov., a surfactant-producing bacterium isolated from the river Vélez in Málaga, southern Spain[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, 55(1): 191-195.

[4] WANG L T, LEE F L, TAI C J, et al. *Bacillus velezensis* is a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2008, 58(3): 671-675.

[5] KANJANAMANEESATHIAN M, WIWATTANAPATAPEE R, ROTNIAM W, et al. Application of a suspension concentrate formulation of *Bacillus velezensis* to control root rot of hydroponically-grown vegetables[J]. *N Z Plant Prot*, 2013, 66: 229-234.

[6] 连彩, 郭晓军, 朱宝成, 等. 兰花枯萎病拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. *华北农学报*, 2012, 27(2): 222-225.

LIAN C, GUO X J, ZHU B C, et al. Screening and identification of antagonistic bacterium against *Colletotrichum wilt*[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2012, 27(2): 222-225.

[7] LIM S M, YOON M Y, CHOI G J, et al. Diffusible and volatile antifungal compounds produced by an antagonistic *Bacillus velezensis* G341 against various phytopathogenic fungi[J]. *Plant Pathol J*, 2017, 33(5): 488-498.

[8] CHEN L. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* LM2303, a biocontrol strain isolated from the dung of wild yak inhabited Qinghai-Tibet plateau[J]. *J Biotechnol*, 2017, 251: 124-127.

[9] 宫燕伟, 王佳宁, 梁晨, 等. 蓝莓枝枯病拮抗细菌 HMQAU140045 的鉴定和抑真菌活性[J]. *农药学学报*, 2017, 19(2): 195-202.

GONG Y W, WANG J N, LIANG C, et al. Identification and antifungal activity of antagonistic bacterium HMQAU140045 against *blueberry twig blight*[J]. *Chin J Pestic Sci*, 2017, 19(2): 195-202.

[10] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 349-388.

DONG X Z, CAI M Y. Manual of systematic methods of determinative bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 349-388.

[11] 陶天申, 杨瑞馥, 东秀珠. 原核生物系统学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.

TAO T S, YANG R F, DONG X Z. Systematics of prokaryotes (conciseness)[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2007.

[12] ROONEY A P, PRICE N P J, EHRHARDT C, et al. Phylogeny and molecular taxonomy of the *Bacillus subtilis* species complex and description of *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* subsp. nov.[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2009, 59(10): 2429-2436.

[13] 喻国辉, 牛春艳, 陈远凤, 等. 利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基

因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定[J]. 中国生物防治, 2010, 26(2): 160-166.

YU G H, NIU C Y, CHEN Y F, et al. Use of 16S rDNA, *gyrA* and *gyrB* gene sequence to identify a biocontrol *Bacillus* sp. strain R31[J]. Chin Biol Control, 2010, 26(2): 160-166.

[14] 赵玉玲, 董奉鑫, 李素俭, 等. 生防菌 Act12 铁载体合成酶 *Ser* 基因的功能[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 79-85.

ZHAO Y L, DONG F X, LI S J, et al. Functional analysis of *Ser* gene from biological bacterium Act12[J]. Microbiol China, 2017, 44(1): 79-85.

[15] 纪明山, 王毅婧. 地衣芽孢杆菌生防菌株 SDYT-79 发酵条件优化[J]. 沈阳农业大学学报, 2011, 42(2): 164-169.

JI M S, WANG Y J. Optimizing fermentation condition for the antagonistic *Bacillus licheniformis* SDYT-79 strain[J]. Shenyang Agric Univ, 2011, 42(2): 164-169.

[16] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 146-155.

FANG Z D. Methodology on plant pathology research[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 146-155.

[17] 杨胜清, 张帆, 马贵龙. 贝莱斯芽孢杆菌 S6 拮抗物质分离纯化及抑菌机理[J]. 农药, 2017, 56(9): 645-648.

YANG S Q, ZHANG F, MA G L. Purification and inhibitive mechanism of antagonist substances from *Bacillus velezensis* S6 strain[J]. Agrochemicals, 2017, 56(9): 645-648.

[18] 杜淑涛, 李术娜, 朱宝成. 白菜黑斑病拮抗细菌 *Bacillus velezensis* DL-59 的筛选鉴定及田间防效实验[J]. 河北农业大学学报, 2010, 33(6): 51-56.

DU S T, LI S N, ZHU B C. Screening and identification of antagonistic strain DL-59 of *Bacillus velezensis* against *Alternaria brassicae* and biocontrol efficiency[J]. J Agric Univ Hebei, 2010, 33(6): 51-56.

[19] 王伟, 李术娜, 李红亚, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌的筛选与 X-75 菌株鉴定[J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 307-312.

WANG W, LI S N, LI H Y, et al. Screening of antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea* and identification of strain X-75[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2010, 37(2): 307-312.

[20] GAO Z F, ZHANG B J, LIU H P, et al. Identification of endophytic *Bacillus velezensis* ZSY-1 strain and antifungal activity of its volatile compounds against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*[J]. Biol Control, 2017, 105: 27-39.

[21] 束长龙, 曹蓓蓓, 袁善奎, 等. 微生物农药管理现状与展望[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 297-303.

SHU C L, CAO B B, YUAN S K, et al. The present situation and prospect of microbial pesticide management[J]. Chin J Biol Control, 2017, 33(3): 297-303.

(责任编辑: 唐 静)