

研究报告

一株番茄青枯病菌拮抗细菌的筛选、发酵条件优化及田间小区防效

黄慧婧¹, 高香辉¹, 陈舒¹, 靳智晓¹, 朱丽娜², 罗坤^{*1}

1 湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128

2 金华市婺城区经济特产站, 浙江 金华 321000

黄慧婧, 高香辉, 陈舒, 靳智晓, 朱丽娜, 罗坤. 一株番茄青枯病菌拮抗细菌的筛选、发酵条件优化及田间小区防效[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 606-619

Huang Huijing, Gao Xianghui, Chen Shu, Jin Zhixiao, Zhu Lina, Luo Kun. Screening, fermentation condition optimization, and field control effect evaluation of an antagonistic bacterium against *Ralstonia solanacearum*[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 606-619

摘要:【背景】番茄青枯病是由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种土传细菌性病害, 该病原菌严重影响番茄的生产。【目的】筛选番茄青枯病的生防细菌, 并将其用于病害防治。【方法】采用抑菌圈法、琼脂扩散法从湖南衡阳青枯病发病田的健康番茄根际土壤筛选对青枯劳尔氏菌具有较强拮抗能力的菌株, 通过形态学观察、生理生化试验、16S rRNA 基因和 *gyrA* 基因测序分析确定其分类地位; 以单因素试验和正交试验对发酵条件进行优化; 通过田间小区试验初探其防效。【结果】筛选的菌株 TR-1 被初步鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*); 菌株 TR-1 最佳培养基配方(g/L): 可溶性淀粉 20.0, 大豆蛋白胨 10.0, 磷酸氢二钾 5.0; 最佳发酵条件: pH 6.0–7.0, 温度 30–33 °C, 摇床转速 160 r/min, 发酵时长 48 h, 优化后 TR-1 无菌发酵上清液对青枯菌抑菌圈直径达 2.95 cm, 约为优化前的 2 倍; 其田间小区防效为 60.30%。【结论】通过对菌株 TR-1 发酵条件进行优化可大大提升其发酵液抑菌效果, 而且菌株 TR-1 在田间小区试验中对番茄青枯病防效优良, 具有生防潜力。

关键词: 贝莱斯芽孢杆菌; 番茄青枯病; 拮抗菌; 发酵条件优化; 生物防治

基金项目: 金华市科技计划(2020-2-007)

Supported by: Jinhua Science and Technology Project (2020-2-007)

*Corresponding author: E-mail: luokun08@126.com

Received: 2021-07-15; Accepted: 2021-09-17; Published online: 2021-10-26

Screening, fermentation condition optimization, and field control effect evaluation of an antagonistic bacterium against *Ralstonia solanacearum*

HUANG Huijing¹, GAO Xianghui¹, CHEN Shu¹, JIN Zhixiao¹, ZHU Lina², LUO Kun^{*1}

1 College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 Jinhua Wucheng District Economic and Special Products Station, Jinhua 321000, Zhejiang, China

Abstract: [Background] Tomato bacterial wilt is a soil-borne bacterial disease caused by *Ralstonia solanacearum*, which severely restricts the production of tomato. [Objective] To screen out an antagonistic bacterium and apply it to biocontrol of tomato bacterial wilt. [Methods] We used the inhibition zone method and agar diffusion method to screen the bacterial strains with strong antagonistic effect against *R. solanacearum* from the rhizosphere soil of healthy tomato plants in a field with bacterial wilt in Hengyang, Hunan. The strain was identified by the observation of morphological characteristics, physiological and biochemical tests, and sequence analysis of 16S rRNA gene and *gyrA* gene. The fermentation conditions were optimized by single factor test and orthogonal test. The control effect was investigated by field experiment. [Results] Strain TR-1 with a significant antagonistic effect against *R. solanacearum* was screened out and preliminarily identified as *Bacillus velezensis*. The optimized medium for TR-1 was composed of 20.0 g/L soluble starch, 10.0 g/L soybean peptone, and 5.0 g/L K₂HPO₄. The optimum fermentation conditions: pH 6.0–7.0, 30–33 °C, 160 r/min, and 48 h. The inhibition zone of the sterile fermentation supernatant of TR-1 cultured under the optimized conditions against *R. solanacearum* showed a diameter of 2.95 cm, which was about twice the size before. TR-1 showed the control effect of 60.30% in the field experiment. [Conclusion] The optimization of fermentation conditions greatly improves the inhibition effect of TR-1 fermentation broth. The strain has a good control effect on tomato bacterial wilt in the field experiment and demonstrates the potential to be applied in the biocontrol of this disease.

Keywords: *Bacillus velezensis*; tomato bacterial wilt; antagonistic bacteria; optimization of fermentation conditions; biocontrol

番茄青枯病是对番茄危害最严重的病害之一^[1],是由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种土传细菌病害^[2],常在雨后、高温环境下大规模发病。目前,施用化学杀菌剂是防治青枯病的主要方式^[3],但化学防治对青枯病的防效并不理想^[4],而且长时间施用化学杀菌剂带来环境污染、有害残留、病原菌抗性弊端,致使研究人员对青枯病的防治向更为环保长效的生物防治领域发展^[5],其中拮抗菌的

应用是一种十分常见且切实可行的生防措施。植物病原菌的拮抗微生物因具有竞争作用、抗生作用、重寄生作用、诱导植物系统抗性等疾病机理,在植物病害生物防治领域具有丰富的应用价值^[6]。已报道的青枯劳尔氏菌的拮抗菌存在于芽孢杆菌属(*Bacillus*)^[7]、假单胞菌属(*Pseudomonas*)^[8]、链霉菌属(*Streptomyces*)^[9]、木霉属(*Trichoderma*)^[10]等多个属。在应用拮抗菌进行植物病害生物防治时,拮抗菌的定殖常

常决定着最终防效^[11]。发酵条件优化实验可探索一个较为适宜的培养条件,使拮抗菌生长旺盛,有利于其定殖并发挥作用,同时能大大提升发酵液中抗菌代谢物的浓度,有利于提升防效。

湖南省是番茄青枯病的常发地。本实验从湖南衡阳一块青枯病高发田中的健康番茄植株根际土壤筛得一株对青枯劳尔氏菌有明显拮抗作用的菌株 TR-1,通过形态学观察、生理生化试验、16S rRNA 基因与 *gyrA* 基因序列分析确定其分类地位;以单因素试验与正交试验对其发酵条件进行优化,并通过田间小区实验验证其防效,以期为青枯病的防控提供生防策略,并为其后续投入到更广的生防试验中奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

湖南省衡阳市青枯病发病田一株健康番茄根际土壤。

青枯劳尔氏菌 RS04 菌株来源于湖南农业大学耘园实验田中发病番茄根际土壤,在 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride, TTC)平板分离筛选,以青枯菌特异性引物 *pehA*#3/6 (5'-CAGCAGA ACCCGCGCCTGATCCAG-3'/5'-ATCGGACTTG ATGCGCAGGCCGTT-3')进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25 μ L): 2 \times EasyTaq PCR SuperMix 12.5 μ L, *pehA*#3/6 引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件^[12]: 96 $^{\circ}$ C 1 min; 96 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 2 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 70 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 33 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。将 PCR 产物测序比对,同时将菌悬液对健康番茄植株进行灌根,已确定其致病力。

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母

浸粉 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0; LB 琼脂培养基: 在 LB 液体培养基配方的基础上加琼脂 15.0 g/L; NB (nutrient broth, NB)培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 牛肉膏 3.0, 葡萄糖 2.5, NaCl 5.0, pH 7.0; NA (nutrient agar, NA)培养基: 在 NB 培养基配方的基础上加琼脂 15.0 g/L。

氯化钠、牛肉膏、蛋白胨、葡萄糖等试剂,国药化学试剂有限公司。恒温培养箱,上海森信实验仪器有限公司;超净工作台,苏州净化设备有限公司;恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司;PCR 仪,Applied Biosystems 公司。

1.2 拮抗菌的分离与筛选

1.2.1 细菌菌株的分离

称取 5 g 番茄根际土壤置于 200 mL 烧杯,以无菌水定容至 200 mL,充分搅拌,静置至土壤颗粒沉于烧杯底部,取上清液以无菌水进行梯度稀释,将 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释液涂布于 LB 平板,28 $^{\circ}$ C 培养 2 d 后将所得单菌落划线纯化。

1.2.2 拮抗细菌的初筛

以抑菌圈法进行初筛。将分离纯化后的各菌株均以 30 $^{\circ}$ C、160 r/min 摇床富集 48 h,调菌液 OD_{600} 为 2.0。取 50 μ L 菌液涂布于 LB 琼脂培养基,28 $^{\circ}$ C 培养 2 d,待菌落长满整个平板后以打孔器切成直径 8 mm 的菌饼。将青枯菌接种至 LB 液体培养基,30 $^{\circ}$ C、160 r/min 摇床培养 48 h,调菌液 OD_{600} 为 2.0。将 LB 琼脂培养基加热溶解,待其冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右时,每 150 mL 培养基加入 1 mL 青枯菌菌液,充分摇匀后倒平板(培养皿直径 9 cm)。将各菌株的菌饼倒置接于混有青枯菌的 LB 平板,28 $^{\circ}$ C 培养 2-3 d 后观察各菌株对青枯菌抑菌圈产生情况。

1.2.3 拮抗细菌的复筛

以琼脂扩散法对初筛中拮抗效果好的菌株

进行复筛。将初筛效果较好的拮抗菌接种于 LB 液体培养基, 以 30 °C、160 r/min 发酵 48 h, 将发酵液以 8 000 r/min 离心 5 min, 取上清液通过 0.22 μm 滤膜 2 次后获得无菌发酵上清液。将充分混匀青枯菌的 LB 平板以直径 8 mm 打孔, 向每个孔内注入 300 μL 无菌发酵上清液, 28 °C 培养 2–3 d 后观察抑菌圈产生情况, 测量抑菌圈直径^[13]。

1.3 拮抗菌 TR-1 菌株的鉴定

1.3.1 形态学观察与生理生化鉴定

形态学观察与生理生化实验参照《常见细菌系统鉴定手册》^[14]和《伯杰细菌鉴定手册》^[15]进行: 将复筛所得拮抗效果最佳的菌株 TR-1 在 LB 平板上划线, 以 28 °C 培养 48 h 后观察菌落颜色、大小、形态特征, 通过扫描电镜对菌体形态特征进行观察; 生理生化鉴定包括接触酶反应、厌氧生长、明胶水解、淀粉水解、不同碳源利用等实验。

1.3.2 16S rRNA 基因与 *gyrA* 基因序列测定

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 TR-1 的基因组 DNA 作为模板。以细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCT CAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTTA CGACTT-3'), 以及 *gyrA* 基因引物 42F (5'-CA GTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3') 和 1066R (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3') 进行 PCR 扩增^[16]。PCR 反应体系(25 μL): DNA 模板 1 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, 2×*EasyTaq* PCR SuperMix 12.5 μL, ddH₂O 9.5 μL。16S rRNA 基因的 PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 30 个循环; 72 °C 10 min^[17]。*gyrA* 基因的 PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 10 min^[18]。将 PCR 产物送至擎科生物科技有限公司测序, 在 NCBI

进行 BLAST 比对, 使用 MEGA X 软件中 neighbor-joining 法构建系统发育树, 将 bootstrap 数值设为 1 000。

1.4 TR-1 发酵条件优化^[19-21]

1.4.1 培养基成分优化

碳源优化: 碳源分别设为 1% 的蔗糖、乳糖、葡萄糖、甘油、可溶性淀粉, 其他因素保持一致。将 TR-1 菌株发酵液(*OD*₆₀₀ 为 2.0)以 2% 接种量接种至 50 mL 各碳源培养基中(100 mL 锥形瓶), 30 °C、160 r/min 培养 48 h 后测发酵液 *OD*₆₀₀ 值, 以琼脂扩散法测无菌发酵上清液对青枯菌的抑菌活性, 每个处理设 3 个重复。

氮源优化: 氮源分别设为 1% 的大豆蛋白胨、胰蛋白胨、硫酸铵、硝酸铵、蛋白胨, 其他因素保持一致, 实验方法同上。

无机盐优化: 无机盐分别设为 1% 的 K₂HPO₄、NaH₂PO₄、MgSO₄、CaCO₃、NaCl, 其他因素保持一致, 实验方法同上。

正交试验: 根据最佳碳源、氮源、无机盐筛选结果, 设计三因素四水平正交试验确定培养基成分的最佳配比。

1.4.2 发酵条件优化

以优化后的培养基配方进行发酵条件优化试验, 以单因素试验对发酵液初始酸碱度(pH 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0)、摇床转速(130、160、190、220、250 r/min)、培养温度(24、27、30、33、36、39 °C)、发酵时长(24、48、72、96、120 h)进行优化, 每个处理设 3 个重复。通过测发酵液 *OD*₆₀₀ 值与无菌发酵上清液对青枯菌的抑菌活性确定最佳发酵条件。

1.5 TR-1 菌株对番茄青枯病的田间小区防效

在湖南农业大学耘园实验田青枯病发病严重区域进行试验(此前已对实验田番茄青枯病病情进行调查, 所选各小区在番茄移栽 50 d 内发病率均达到 75.0%–81.7%, 病情指数均达到

54.17–60.42。所有番茄苗在 8–12 叶期移栽至田间, 移栽前一周以 10^7 CFU/mL 青枯菌菌液对每个小区按 5 L/m^2 进行灌溉。TR-1 菌株在最佳条件下进行发酵, 移栽 1 周后进行以下 4 种灌根处理(200 mL/株): (1) 无菌水; (2) TR-1 菌液(10^7 CFU/mL); (3) TR-1 菌液(10^8 CFU/mL); (4) 噻森铜 400 mg/L (田间推荐剂量)。每个处理 3 个小区, 每个小区约 12 m^2 (60 株)。第 1 次处理间隔 1 周后重复处理, 28 d 后统计番茄各级病株数, 并计算病情指数与防效。

番茄青枯病病情分级参考 Wu 等的分级标准^[22]: 0 级: 无症状; 1 级: 1%–25%萎焉; 2 级: 26%–50%萎焉; 3 级: 51%–75%萎焉; 4 级: 76%–100%萎焉。发病率(%)=发病株数/调查总株数 $\times 100$; 病情指数= $\sum(\text{各级病株数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高级代表值}) \times 100$; 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 $\times 100$ ^[23]。

1.6 数据处理

以 Microsoft Excel 2010 和 SPSS 23.0 软件对数据进行处理, 以 SigmaPlot 10.0 软件作图分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌分离筛选结果

经过分离与筛选, 共获得对青枯菌有拮抗作用的细菌 6 株, 其中菌株 TR-1 的拮抗效果最好, 在 LB 培养基上对青枯菌抑菌直径达 4.65 cm (图 1), 其无菌发酵上清液对青枯菌抑菌圈直径为 1.50 cm (图 2)。

2.2 TR-1 菌株的鉴定

2.2.1 形态学与生理生化特征

在 LB 培养基划线以 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后, 所得 TR-1 单菌落直径呈 1–3 mm, 菌落呈乳白色, 有黏性, 不透明, 边缘不规则, 表面光滑 (图 3A); 培养 48 h 后菌落表面变粗糙, 并形成

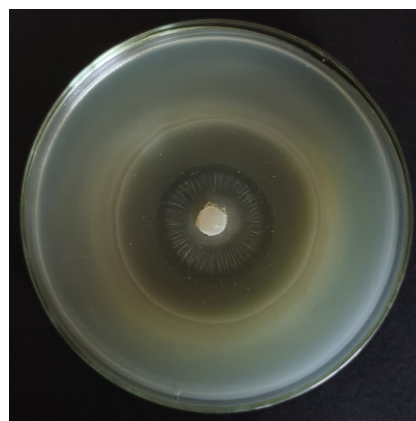


图 1 菌株 TR-1 对青枯菌的平板抑菌效果
Figure 1 Inhibition effect of strain TR-1 on *Ralstonia solanacearum*.

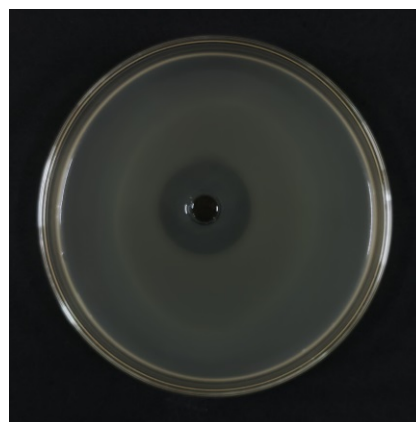


图 2 菌株 TR-1 无菌发酵上清液对青枯菌抑菌效果
Figure 2 Inhibition effect of sterile fermentation supernatant of strain TR-1 on *Ralstonia solanacearum*.

褶皱(图 3B)。扫描电镜显示其菌体呈杆状, 大小为 $(0.50\text{--}0.71) \mu\text{m} \times (1.00\text{--}2.69) \mu\text{m}$ (图 4)。

经过一系列生理生化实验显示(表 1), 菌株 TR-1 革兰氏染色阳性, 为需氧菌, 硝酸盐还原、接触酶试验、氧化酶试验均为阳性, 甲基红试验呈阴性, 能水解淀粉、明胶, 可耐受 pH 5.0 的酸性环境和 10% NaCl, 在 $3 \text{ }^\circ\text{C}$ 环境无法生长, 可利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、甘油等多种碳源。

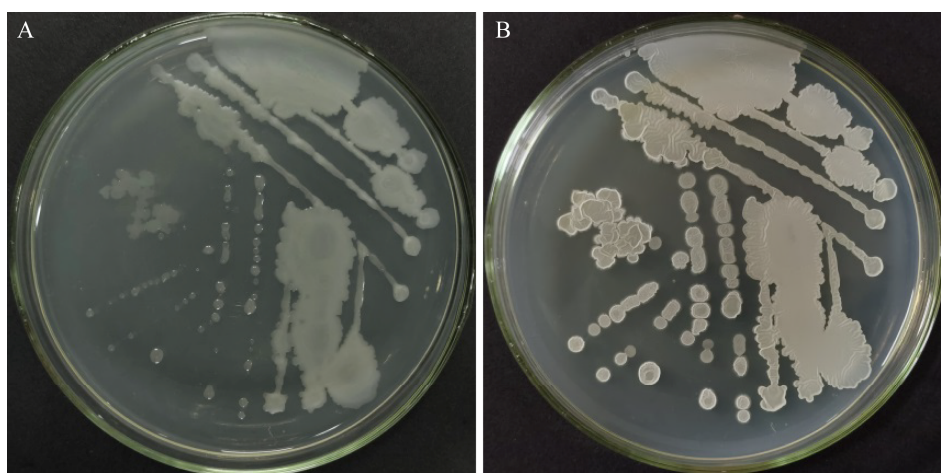


图3 菌株 TR-1 菌落形态特征 A: 培养 24 h 的 TR-1 菌落形态; B: 培养 48 h 的 TR-1 菌落形态

Figure 3 Colony form of strain TR-1. A: The colony form of strain TR-1 cultured for 24 h; B: The colony form of strain TR-1 cultured for 48 h.

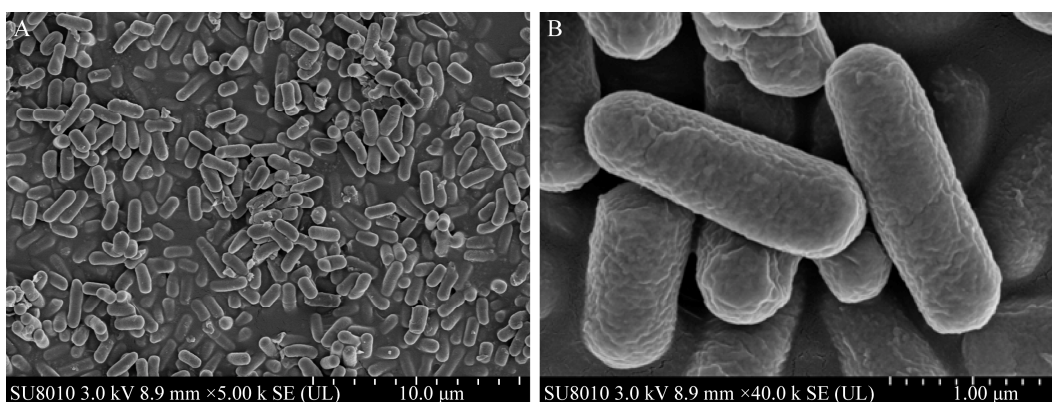


图4 菌株 TR-1 扫描电镜下的菌体形态 放大倍数为 5 000 (A)和 40 000 (B)

Figure 4 Individual form of strain TR-1 under scanning electron microscope. The magnification were 5 000 (A) and 40 000 (B).

2.2.2 菌株 TR-1 16S rRNA 基因与 *gyrA* 基因序列分析

根据测序结果可知,菌株 TR-1 的 16S rRNA 基因和 *gyrA* 基因序列的 PCR 产物长度分别为 1 448 bp 和 950 bp, 提交至 GenBank 获得登录号分别为 MW716262 和 MW716261。在 NCBI 数据库中 BLAST 比对结果显示, 菌株 TR-1 与 *Bacillus velezensis* Nt4-36 (HQ831422)、*Bacillus subtilis* OPP31 (JQ308571)、*Bacillus*

amyloliquefaciens GKT04 (KY328743)、*Bacillus tequilensis* strain L10 (JN700126)等多种芽孢杆菌属菌株的 16S rRNA 基因相似性高达 99.86%, 构建系统发育树分析, 结果显示菌株 TR-1 与贝莱斯芽孢杆菌处于同一分支上(图 5)。进一步对菌株 TR-1 的 *gyrA* 基因序列进行分析并构建系统发育树, 结果显示菌株 TR-1 与 *Bacillus velezensis* strain D747 (MK608730)处于同一分支上(图 6)。根据序列比对分析、形态学与生理生化鉴定结

表 1 菌株 TR-1 的生理生化试验

Table 1 Physiological and biochemical tests of strain TR-1

| Items | <i>B. velezensis</i> ^[24-25] | TR-1 |
|------------------------|---|------|
| Gram stain | + | + |
| Anaerobic growth test | - | - |
| Nitrate reduction | + | + |
| Catalase test | + | + |
| Oxidase test | + | + |
| Methyl red test | - | - |
| Starch hydrolysis | + | + |
| Gelatin hydrolysis | + | + |
| pH 5.0 | + | + |
| Temperature (3 °C) | - | - |
| 10% NaCl | + | + |
| Utilization of citrate | + | + |
| Glucose | + | + |
| Sucrose | + | + |
| Lactose | + | + |
| Glycerol | + | + |
| L-arabitol | + | + |
| Mannitol | + | + |

注: +: 阳性; -: 阴性

Note: +: Positive; -: Negative.

果, 初步确定菌株 TR-1 为贝莱斯芽孢杆菌 (*Bacillus velezensis*)。

2.3 菌株 TR-1 发酵条件优化

2.3.1 最佳碳源、氮源、无机盐的筛选

在 5 种碳源条件下菌株 TR-1 均能产生对青枯菌具有抑制作用的代谢产物, 而且在以可溶性淀粉为碳源时 OD_{600} 平均值达到最大, 无菌发酵上清液对青枯菌的抑菌圈直径也显著大于其他 4 组, 因此选择可溶性淀粉为最佳碳源(图 7)。

在以蛋白胨、大豆蛋白胨、胰蛋白胨为氮源时菌株 TR-1 能产生抑制青枯菌的代谢产物, 而在硫酸铵、硝酸铵 2 种无机氮源条件下的无菌发酵上清液对青枯菌已无明显抑制作用。以大豆蛋白胨、胰蛋白胨为氮源时发酵液 OD_{600} 值差异无显著性, 而以大豆蛋白胨为氮源时无菌发酵上清液对青枯菌的抑菌圈直径达到最大, 因此选大豆蛋白胨为最佳氮源(图 8)。

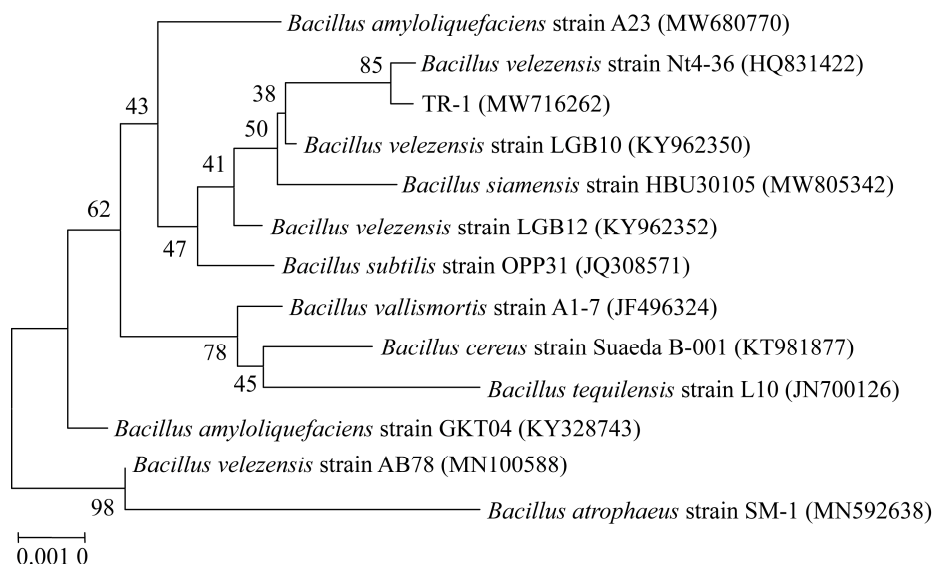


图 5 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 TR-1 系统发育树 括号内为 GenBank 登录号; 分支点上数字代表自展值; 标尺 0.001 0 代表核苷酸置换率

Figure 5 Phylogenetic tree of strain TR-1 based on 16S rRNA gene sequence. The serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers. The numbers on the nodes show bootstrap values. The scale bar represents 0.001 0 substitutions per nucleotide position.

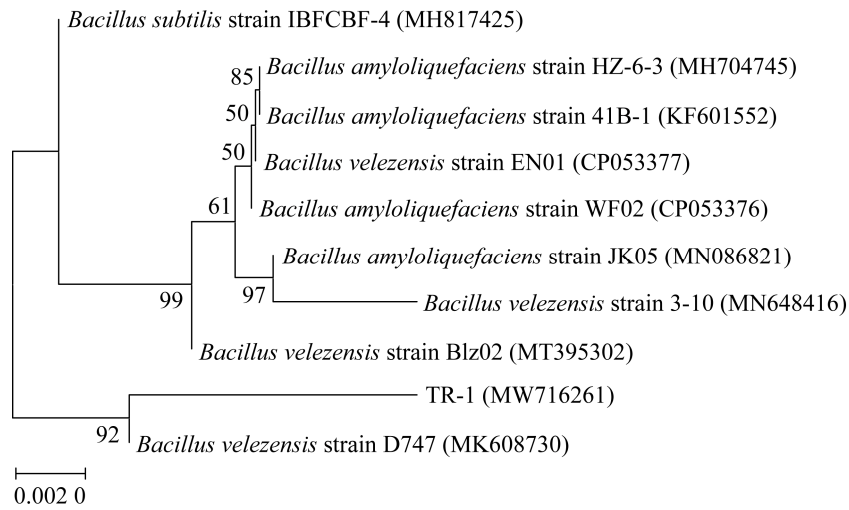


图 6 基于 *gyrA* 基因序列构建的菌株 TR-1 系统发育树 括号内序号为 GenBank 登录号; 分支点上数字代表自展值; 标尺 0.002 0 代表核苷酸置换率

Figure 6 Phylogenetic tree of strain TR-1 based on *gyrA* gene sequence. The serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers. The numbers on the nodes show bootstrap values. The scale bar represents 0.002 0 substitutions per nucleotide position.

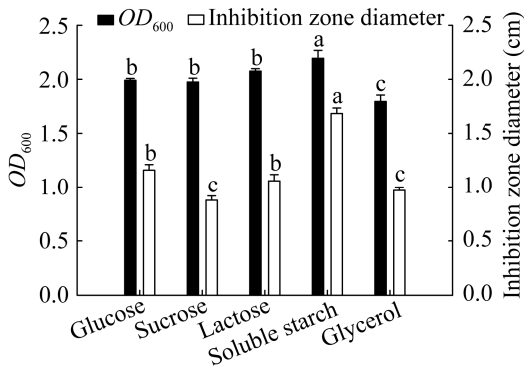


图 7 不同碳源对菌株 TR-1 生长量及发酵上清液抑菌活性的影响 不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著(下同)

Figure 7 Effects of different carbon sources on the growth of strain TR-1 and the inhibition activity of fermentation supernatant. Different lowercase letters represent significant differences at $P < 0.05$ level (the same below).

在硫酸镁、磷酸二氢钠、氯化钠、磷酸氢二钾、碳酸钙这 5 种无机盐的条件下, 菌株 TR-1 的 OD_{600} 值均高于 2.0, 但在以硫酸镁为无机盐的条件下菌株 TR-1 无菌发酵上清液对青枯菌

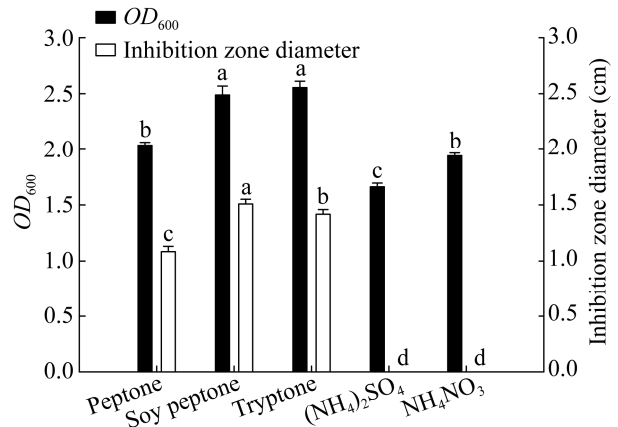


图 8 不同氮源对菌株 TR-1 生长量及发酵上清液抑菌活性的影响

Figure 8 Effects of different nitrogen sources on the growth of strain TR-1 and the inhibition activity of fermentation supernatant.

无明显抑制作用。分析其他 4 组无菌发酵上清液对青枯菌的抑菌圈直径可知, 当以 K_2HPO_4 为无机盐时菌株 TR-1 代谢产物对青枯菌的抑制作用最明显, 因此选择 K_2HPO_4 为最佳无机盐(图 9)。

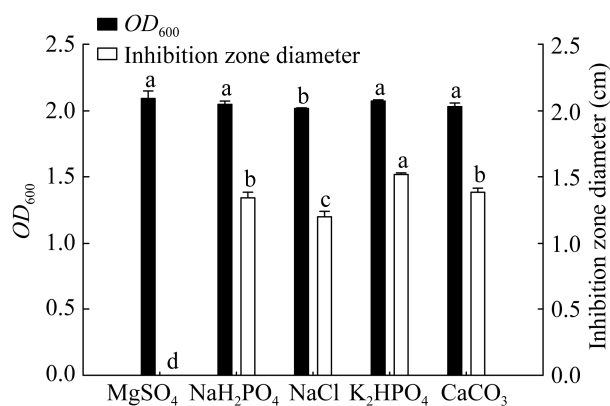


图 9 不同无机盐对菌株 TR-1 生长量及发酵上清液抑菌活性的影响

Figure 9 Effects of different inorganic salts on the growth of strain TR-1 and the inhibition activity of fermentation supernatant.

表 2 正交试验结果

Table 2 Results of orthogonal test

| Code | Soluble starch (%) <i>A</i> | Soybean peptone (%) <i>B</i> | K ₂ HPO ₄ (%) <i>C</i> | Blank <i>D</i> | Blank <i>E</i> | Inhibitory diameter (cm) |
|---------------------|--|---------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|--------------------------|
| 1 | 1 (0.25) | 1 (0.25) | 1 (0.25) | 1 | 1 | 1.067 |
| 2 | 1 (0.25) | 2 (0.5) | 2 (0.5) | 2 | 2 | 1.483 |
| 3 | 1 (0.25) | 3 (1) | 3 (1) | 3 | 3 | 1.558 |
| 4 | 1 (0.25) | 4 (2) | 4 (2) | 4 | 4 | 1.242 |
| 5 | 2 (0.5) | 1 (0.25) | 2 (0.5) | 3 | 4 | 1.800 |
| 6 | 2 (0.5) | 2 (0.5) | 1 (0.25) | 4 | 3 | 2.025 |
| 7 | 2 (0.5) | 3 (1) | 4 (2) | 1 | 2 | 1.850 |
| 8 | 2 (0.5) | 4 (2) | 3 (1) | 2 | 1 | 1.475 |
| 9 | 3 (1) | 1 (0.25) | 3 (1) | 4 | 2 | 2.067 |
| 10 | 3 (1) | 2 (0.5) | 4 (2) | 3 | 1 | 2.050 |
| 11 | 3 (1) | 3 (1) | 1 (0.25) | 2 | 4 | 2.442 |
| 12 | 3 (1) | 4 (2) | 2 (0.5) | 1 | 3 | 1.908 |
| 13 | 4 (2) | 1 (0.25) | 4 (2) | 2 | 3 | 1.983 |
| 14 | 4 (2) | 2 (0.5) | 3 (1) | 1 | 4 | 2.358 |
| 15 | 4 (2) | 3 (1) | 2 (0.5) | 4 | 1 | 2.900 |
| 16 | 4 (2) | 4 (2) | 1 (0.25) | 3 | 2 | 2.008 |
| <i>K</i> 1 | 5.350 | 6.917 | 7.542 | 7.183 | 7.492 | |
| <i>K</i> 2 | 7.150 | 7.916 | 8.091 | 7.383 | 7.408 | |
| <i>K</i> 3 | 8.467 | 8.750 | 7.458 | 7.416 | 7.474 | |
| <i>K</i> 4 | 9.249 | 6.633 | 7.125 | 8.234 | 7.842 | |
| <i>k</i> 1 | 1.338 | 1.729 | 1.886 | 1.796 | 1.873 | |
| <i>k</i> 2 | 1.788 | 1.979 | 2.023 | 1.846 | 1.852 | |
| <i>k</i> 3 | 2.117 | 2.188 | 1.865 | 1.854 | 1.869 | |
| <i>k</i> 4 | 2.312 | 1.658 | 1.781 | 2.059 | 1.961 | |
| <i>R</i> | 0.974 | 0.530 | 0.242 | 0.263 | 0.109 | |
| Order of importance | <i>A</i> > <i>B</i> > <i>D</i> > <i>C</i> > <i>E</i> | | | | | — |
| Optimal levels | <i>A</i> ₄ | <i>B</i> ₃ | <i>C</i> ₂ | <i>D</i> ₄ | <i>E</i> ₄ | |

2.3.2 正交试验确定最佳培养基成分组合

根据单因素试验所得最佳碳源(可溶性淀粉)、最佳氮源(大豆蛋白胨)、最佳无机盐(K₂HPO₄)设计三因素四水平正交试验确定各组分最佳配比。由于在最佳碳源、氮源、无机盐条件下菌株 TR-1 发酵 48 h 的发酵液 OD₆₀₀ 值都较好,所以正交试验仅以无菌发酵上清液对青枯菌的抑菌圈直径为指标。正交试验结果(表 2)显示,可溶性淀粉(*A*)、大豆蛋白胨(*B*)、K₂HPO₄ (*C*)的最佳浓度组合为 *A*₄ (2%)、*B*₃ (1%)、*C*₂ (0.5%); 不同浓度的以上 3 种因素影响菌株 TR-1 发酵液对青枯菌抑制作用的主次顺序为:可溶性淀粉(*A*)>大豆蛋白胨(*B*)>K₂HPO₄ (*C*)。

2.3.3 初始 pH 值、温度和摇床转速的优化

在初始 pH 5.0–9.0 时菌株 TR-1 均可较好地生长, 而且均能产生一定量的抑菌活性物质。在初始 pH 10.0 时菌株 TR-1 的生长受到严重抑制, 已无法正常生长。在初始 pH 6.0 和 pH 7.0 时菌株 TR-1 的 48 h 发酵液的 OD_{600} 值与无菌发酵上清液对青枯菌抑菌圈的直径均达到最大, 因此选择 pH 6.0–7.0 为最佳初始 pH 值(图 10)。

在温度为 24–39 °C 之间时, 菌株 TR-1 发酵 48 h 的 OD_{600} 值均大于 2.0, 而且随温度升高呈缓慢上升趋势; 但去菌发酵液上清液的抑菌活性在发酵温度为 30 °C 和 33 °C 时达到最大, 在 36 °C 和 39 °C 已无明显的抑菌圈产生, 综合分析选择 30–33 °C 为最佳发酵温度(图 11)。

在摇床转速为 100–220 r/min 之间时, 菌株 TR-1 的 48 h 发酵液 OD_{600} 值呈明显上升趋势, 但去菌发酵上清液仅在 130–190 r/min 处理中具有对青枯菌的抑制作用, 而且抑菌圈在转速为 160 r/min 时达到最大, 综合分析后选择最佳摇床转速为 160 r/min (图 12)。

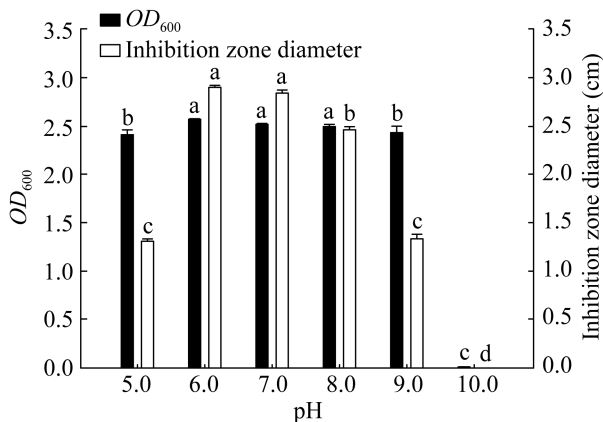


图 10 不同初始 pH 对菌株 TR-1 生长量及发酵上清液抑菌活性影响

Figure 10 Effects of different initial pH values on the growth of strain TR-1 and the inhibition activity of fermentation supernatant.

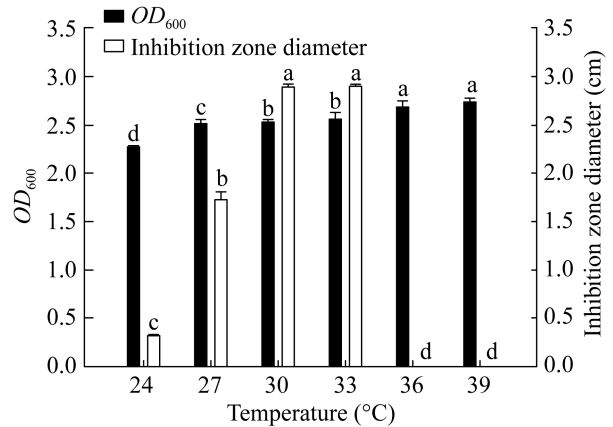


图 11 不同温度对菌株 TR-1 生长量及发酵上清液抑菌活性影响

Figure 11 Effects of different temperatures on the growth of strain TR-1 and the inhibition activity of fermentation supernatant.

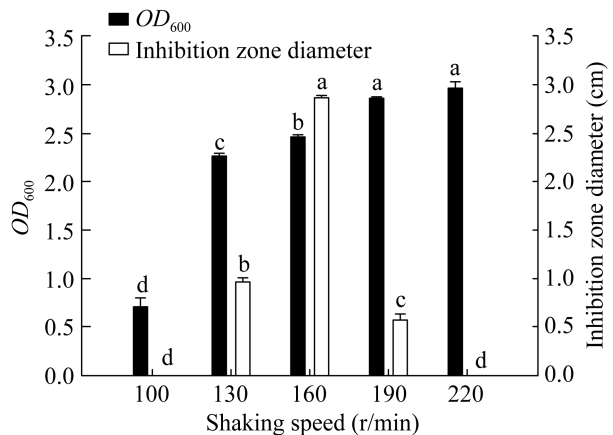


图 12 不同转速对菌株 TR-1 生长量及发酵上清液抑菌活性影响

Figure 12 Effects of different shaking speeds on the growth of strain TR-1 and the inhibition activity of fermentation supernatant.

在发酵时长为 24–120 h 之间时, 菌株 TR-1 发酵液的 OD_{600} 首先呈上升趋势, 在 72 h 达到最大, 后略有下降但总体趋于稳定。无菌发酵上清液对青枯菌的抑菌圈直径在发酵时长为 48 h 时达到最大, 后逐渐减小, 推测菌株 TR-1 所产生的抗菌代谢产物可能存在易降解或易挥发物

质。综合分析可知最佳发酵时长为 48 h (图 13)。

将菌株 TR-1 以优化后的条件进行摇床培养, 无菌发酵上清液对青枯菌的抑菌圈直径达 2.95 cm (图 14), 约为优化前抑菌圈直径大小的 2 倍。

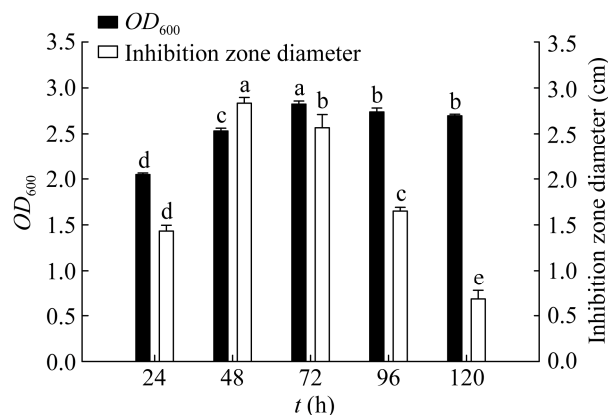


图 13 不同发酵时长对菌株 TR-1 生长量及发酵上清液抑菌活性的影响

Figure 13 Effects of different fermentation durations on the growth of strain TR-1 and the inhibition activity of fermentation supernatant.

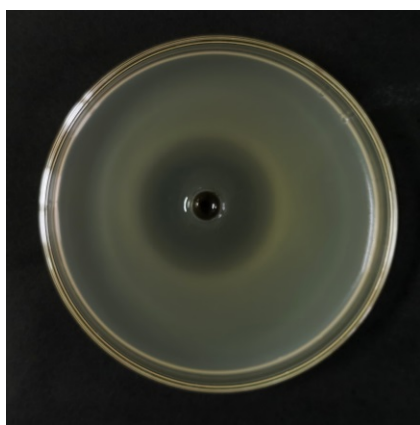


图 14 优化发酵条件后菌株 TR-1 无菌发酵上清液对青枯菌的抑菌效果

Figure 14 Inhibition effect of sterile fermentation supernatant of strain TR-1 on *Ralstonia solanacearum* after optimizing fermentation conditions.

2.4 菌株 TR-1 对番茄青枯病的田间小区防效

由田间小区试验可以看出, 10^8 CFU/mL 浓度的 TR-1 菌液较 10^7 CFU/mL 浓度对番茄青枯病具有更好的预防效果。各组灌根处理后, 以无菌水灌根的对照组开始陆续发病, 特别是在雨后高温环境下病株数骤增, 截至统计时发病率高达 78.05%, 病情指数为 56.32, 有些病株甚至已整株枯萎死亡; 10^8 CFU/mL 浓度的 TR-1 菌液灌根组番茄发病率为 32.78%, 病情指数为 22.36, 明显低于对照组 (表 3)。菌株 TR-1 (10^8 CFU/mL) 在本次田间小区试验对番茄青枯病的防效为 60.3%, 虽略低于噻森铜杀菌剂的防效, 但依然具有较好的生防价值。

3 讨论与结论

芽孢杆菌是一类具有强抗逆性的细菌, 其中多个菌种对各类植物病原物具有抑制作用。枯草芽孢杆菌近缘种群中大部分菌种具有极高的 16S rRNA 基因相似性, 因此 16S rRNA 基因测序不适于该菌群的种间区分; 此时, 一些相较于 16S rRNA 基因变异速率更快的保守基因片段 (如 *gyrA*、*gyrB*、*rpoD* 基因等) 可更好地进行区分^[15]。贝莱斯芽孢杆菌是枯草芽孢杆菌近缘种群解淀粉芽孢杆菌组中一个较新的菌种^[26],

表 3 菌株 TR-1 对番茄青枯病的田间小区防效
Table 3 Control effect of strain TR-1 on tomato bacterial wilt in field plot experiment

| Treatments | Morbidities (%) | Disease indexes | Control effects (%) |
|-----------------------|-----------------|-----------------|---------------------|
| Sterile water | 78.05±1.71a | 56.32±0.94a | - |
| TR-1 (10^7 CFU/mL) | 42.22±3.07b | 28.82±0.94b | 48.83±1.66c |
| TR-1 (10^8 CFU/mL) | 32.78±1.42c | 22.36±1.20c | 60.30±2.12b |
| Saisentong (400 mg/L) | 25.28±1.57d | 15.76±1.13d | 72.01±2.01a |

注: -: 无防效

Note: -: No control effect.

已有研究表明其具有植物保护生物防治的价值: 李苗苗等通过对峙试验证明贝莱斯芽孢杆菌 GY1 菌株对棉花立枯病、番茄晚疫病等多种真菌病原菌都有抑制作用^[27]; Liu 等通过对贝莱斯芽孢杆菌 HC6 菌株所产代谢产物进行研究, 发现其产生的 3 种脂肽对曲霉属、镰刀菌属、李斯特菌属等多类植物病原菌有抑制作用^[28]。抗生素作用是芽孢杆菌常见的一种拮抗机制^[29], 芽孢杆菌产生的抑菌代谢产物是其具有抗生素作用的核心因素。发酵条件优化试验能更好地挖掘并展现拮抗菌的抗生素作用, 一方面可提高生防菌浓度, 另一方面能使其产生更多抗菌代谢产物, 从而提升防效。

本实验对筛选到的生防贝莱斯芽孢杆菌进行发酵条件优化试验, 在最优发酵条件下其无菌发酵液对青枯劳尔氏菌抑菌圈直径可达 2.95 cm, 直径大小约为优化前的 2 倍, 可见其明显的抗生素作用。通过本实验可以得出, 拮抗菌发酵上清液抑菌活性与发酵液菌体密度并不一定呈正相关, 即最适生长条件不一定是最佳发酵条件, 也可能与其所产生抑菌活性物质的挥发性、降解性有关。在田间小区试验中, 菌株 TR-1 对番茄青枯病这一毁灭性土传病害防效明显, 为其田间防治青枯病的进一步应用提供了理论依据。生防菌防效常受自然环境影响, 据文献报道, 强降雨容易造成植物病原菌拮抗微生物的流失并降低其代谢物活性^[30]。本田间小区试验在雨季进行, 在经常大量降雨的情况下菌株 TR-1 依然具有较好的防效, 可见强降雨对其田间应用影响较小, 适用于湖南等春夏多雨地区。然而其 60.3% 的防效还有提升空间, 或可通过增大施菌浓度来实现更高防效。此外, 一些研究表明, 一些生防菌可与低剂量杀菌剂复配来提升防效^[31], 而且在生物相容性测定试验中, 菌株 TR-1 表现出对青枯立克、噻森铜、噻唑锌、

柠檬酸铜·有机络氨铜等多种杀菌剂具有天然耐药性; 并且 TR-1 能在番茄根部较好地定殖, 以 10^8 CFU/mL 的 100 mL 菌液灌根一次 50 d 内在番茄根内定殖量不低于 2.4×10^4 CFU/g。在后续的生防试验中可将其与低剂量杀菌剂复合施用, 进一步挖掘其生防价值, 在环境友好的基础上实现更高的防效。

REFERENCES

- [1] Ho TH, Chuang CY, Zheng JL, Chen HH, Liang YS, Huang TP, Lin YH. *Bacillus amyloliquefaciens* strain PMB05 intensifies plant immune responses to confer resistance against bacterial wilt of tomato[J]. *Phytopathology*, 2020, 110(12): 1877-1885
- [2] Deng XH, Zhang N, Shen ZZ, Zhu CZ, Li R, Salles JF, Shen QR. *Rhizosphere* bacteria assembly derived from fumigation and organic amendment triggers the direct and indirect suppression of tomato bacterial wilt disease[J]. *Applied Soil Ecology*, 2020, 147: 103364
- [3] Malek M, Tomoki N, Hiroyuki K, Haruhisa S, Masafumi S. Biocontrol potential of *Ralstonia* sp. TCR112 and *Mitsuaria* sp. TWR114 against tomato bacterial wilt[J]. *Applied Soil Ecology*, 2018, 128: 71-80
- [4] Deberdt P, Davezies I, Coranson-Beaudu R, Jestin A. Efficacy of leaf oil from *Pimenta racemosa* var. *racemosa* in controlling bacterial wilt of tomato[J]. *Plant Disease*, 2018, 102: 124-131
- [5] Le KD, Kim J, Yu NH, Kim B, Lee CW, Kim JC. Biological control of tomato bacterial wilt, kimchi cabbage soft rot, and red pepper bacterial leaf spot using *Paenibacillus elgii* JCK-5075[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 775
- [6] Chowdhury SP, Hartmann A, Gao X, Borriss R. Biocontrol mechanism by root-associated *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42: a review[J]. *Front Microbiol*, 2015, 6: 780
- [7] Fu HZ, Marian M, Enomoto T, Hieno A, Ina H, Suga H, Shimizu M. Biocontrol of tomato bacterial wilt by foliar spray application of a novel strain of endophytic *Bacillus* sp.[J]. *Microbes Environ*, 2020, 35(4): ME20078
- [8] Raza W, Ling N, Liu DY, Wei Z, Huang QW, Shen QR. Volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* WR-1 restrict the growth and virulence traits of *Ralstonia solanacearum*[J]. *Microbiol Research*, 2016, 192: 103-113

- [9] 李威, 肖熙鸥, 李可, 高晓敏, 吕玲玲. 娄彻氏链霉菌 XL-6 的抑菌活性及对茄子幼苗的防病促生效应[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(4): 531-536
Li W, Xiao XO, Li K, Gao XM, Lv LL. The antibiotic activity of fermentation broth produced from *Streptomyces rochei* XL-6 and its influence on bacterial wilt control and plant growth in eggplant seedling[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017, 33(4): 531-536 (in Chinese)
- [10] Liu Y, Khan RAA. Biological control of bacterial wilt in tomato through the metabolites produced by the biocontrol fungus, *Trichoderma harzianum*[J]. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 2021, 31(1): 5
- [11] 姚锦爱, 黄鹏, 侯翔宇, 余德亿. 海洋细菌解淀粉芽胞杆菌 BA-3 在兰花的定殖及对根际微生态的影响[J]. 中国生物防治学报, 2019, 35(6): 915-921
Yao JA, Huang P, Hou XY, Yu DY. Colonization dynamics marine bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* BA-3 and its impact on the microbial community of cymbidium rhizosphere[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2019, 35(6): 915-921 (in Chinese)
- [12] 郑雪芳, 朱育菁, 车建美, 陈燕萍, 蓝江林, 王阶平, 刘波. 青枯雷尔氏菌 Tn5 转座子无致病力突变株在番茄根部的定殖特性[J]. 植物保护学报, 2021, 48(2): 314-321
Zheng XF, Zhu YJ, Che JM, Chen YP, Lan JL, Wang JP, Liu B. Colonization characteristics of *Ralstonia solanacearum* avirulent mutants yielded by Tn5 transposon in the tomato root[J]. Journal of Plant Protection, 2021, 48(2): 314-321 (in Chinese)
- [13] 周向平, 舒翠华, 滕凯, 甘在德, 肖启明, 陈武, 李小慧, 刘天波. 内生解淀粉芽胞杆菌 Xe01 的鉴定及其发酵条件优化[J]. 中国烟草科学, 2020, 41(6): 58-67
Zhou XP, Shu CH, Teng K, Gan ZD, Xiao QM, Chen W, Li XH, Liu TB. Identification and fermentation optimization of antagonistic *Bacillus amyloliquefaciens* Xe01[J]. Chinese Tobacco Science, 2020, 41(6): 58-67 (in Chinese)
- [14] 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
Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification Manual[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
- [15] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 中国科学院微生物研究所, 译. 8 版. 北京: 科学出版社, 1984: 729-758
Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, trans. 8th ed. Beijing: Science Press, 1984: 729-758 (in Chinese)
- [16] 曹凤明, 杨小红, 马鸣超, 陈慧君, 沈德龙, 李俊. 枯草芽孢杆菌近缘种群鉴定方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(5): 968-974
Cao FM, Yang XH, Ma MC, Chen HJ, Shen DL, Li J. Advances in the identification of *Bacillus subtilis* and closely related species[J]. Microbiology China, 2014, 41(5): 968-974 (in Chinese)
- [17] 鲍文英. 一株木质纤维素降解菌的筛选及其全基因组分析[D]. 南京: 南京农业大学硕士学位论文, 2016
Bao WY. Screening and genomic analysis of a lignocellulose degrading bacterium[D]. Nanjing: Master's Thesis of Nanjing Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- [18] 杜鹏程, 刘海洋, 张军高, 李进, 周小云, 刘梦丽, 雷斌, 郭庆元. 棉花苗期根腐类病害生防细菌的筛选与鉴定[J]. 新疆农业科学, 2020, 57(4): 686-693
Du PC, Liu HY, Zhang JG, Li J, Zhou XY, Liu ML, Lei B, Guo QY. Screening and identification of biocontrol bacteria against cotton root rot diseases at seedling stage[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2020, 57(4): 686-693 (in Chinese)
- [19] 王彦, 牛世全, 郑豆豆, 周璇, 朱学泰, 孔维宝, 韩建山, 张爱梅. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1062-1073
Wang Y, Niu SQ, Zheng DD, Zhou X, Zhu XT, Kong WB, Han JS, Zhang AM. Screening, identification and optimization of fermentation conditions of an antagonistic actinomycetes to cucumber *Fusarium* wilt[J]. Microbiology China, 2019, 46(5): 1062-1073 (in Chinese)
- [20] 徐志周, 王明元, 杜锦鹏, 刘建福, 欧树文, 秦紫艺, 杨可然. 一株香蕉枯萎病拮抗菌 HQB-1 的分离鉴定及其发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2019, 46(7): 1611-1618
Zhou ZZ, Wang MY, Du JP, Liu JF, Ou SW, Qin ZY, Yang KR. Isolation, identification and fermentation optimization of an antagonistic bacterial strain HQB-1 against banana wilt disease[J]. Microbiology China, 2019, 46(7): 1611-1618 (in Chinese)
- [21] 赖家豪, 宋水林, 刘冰. 柑桔炭疽病生防内生细菌的筛选、鉴定及摇瓶发酵条件优化[J]. 中国南方果树, 2020, 49(6): 11-16, 19
Lai JH, Song SL, Liu B. Screening, identification and optimization of fermentation conditions for shaking flask culture of endophytic bacterial strain GN222 with the potential of control citrus anthracnose[J]. South China Fruits, 2020, 49(6): 11-16, 19 (in Chinese)

- [22] Wu K, Su S, Fang ZY, Yuan SF, Wang LL, Shen B, Shen QR. Competitive use of root exudates by *Bacillus amyloliquefaciens* with *Ralstonia solanacearum* decreases the pathogenic population density and effectively controls tomato bacterial wilt[J]. *Scientia Horticulturae*, 2017, 218: 132-138
- [23] Peng D, Luo K, Jiang HD, Deng YN, Bai LY, Zhou XM. Combined use of *Bacillus subtilis* strain B-001 and bactericide for the control of tomato bacterial wilt[J]. *Pest Management Science*, 2017, 73(6): 1253-1257
- [24] 申永瑞, 向君亮, 王佳琦, 刘爽, 李章雷, 刘权, 殷奎德. 疮痂链霉菌拮抗菌株 BU396 的分离鉴定与抗菌性质分析[J]. *微生物学通报*, 2019, 46(10): 2601-2611
- Shen YR, Xiang JL, Wang JQ, Liu S, Li ZL, Liu Q, Yin KD. Isolation, identification and antimicrobial properties of a biocontrol strain BU396 against *Streptomyces scabies*[J]. *Microbiology China*, 2019, 46(10): 2601-2611 (in Chinese)
- [25] 冯江鹏, 邱莉萍, 梁秀燕, 陈碧秀, 夏海洋, 彭春龙, 钟永军. 草莓胶孢炭疽菌拮抗细菌贝莱斯芽孢杆菌 JK3 的鉴定及其抗菌活性[J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(5): 831-839
- Feng JP, Qiu LP, Liang XY, Chen BX, Xia HY, Peng CL, Zhong YJ. Identification of antagonistic bacteria *Bacillus velezensis* JK3 against anthracnose of strawberry and its antipathogenic activity[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2020, 32(5): 831-839 (in Chinese)
- [26] Fan B, Blom J, Klenk HP, Borriss R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an “operational group *B. amyloliquefaciens*” within the *B. subtilis* species complex.[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 22
- [27] 李苗苗, 张家韬, 崔传斌, 孙光军, 王东坤, 崔志燕, 高强, 冯超, 王凤龙, 陈德鑫, 等. 三株芽孢杆菌的生防特性研究[J]. *中国烟草科学*, 2020, 41(4): 80-89
- Li MM, Zhang JT, Cui CB, Sun GJ, Wang DK, Cui ZY, Gao Q, Feng C, Wang FL, Chen DX, et al. Study on biocontrol characteristics of three *Bacillus* strains[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2020, 41(4): 80-89 (in Chinese)
- [28] Liu Y, Teng K, Wang T, Dong E, Zhang M, Tao Y, Zhong J. Antimicrobial *Bacillus velezensis* HC6: production of three kinds of lipopeptides and biocontrol potential in maize[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2020, 128: 242-254
- [29] 刘亚苓, 于营, 雷慧霞, 崔丽丽, 张新静, 吴健勇, 郭靖. 植物病害生防因子的作用机制及应用进展[J]. *中国植保导刊*, 2019, 39(3): 23-28
- Liu YL, Yu Y, Lei HX, Cui LL, Zhang XJ, Wu JY, Guo J. Research progress on mechanism of bio-control factors for plant diseases and its application[J]. *China Plant Protection*, 2019, 39(3): 23-28 (in Chinese)
- [30] Annelein M, Wietse B. Strategies to maintain natural biocontrol of soil-borne crop diseases during severe drought and rainfall events[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2279
- [31] Ji XX, Li JJ, Meng Z, Zhang SA, Dong B, Qiao K. Synergistic effect of combined application of a new fungicide fluopimomide with a biocontrol agent *Bacillus methylotrophicus* TA-1 for management of gray mold in tomato[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(8): 1991-1997