

玉米茎基腐病生防菌的筛选及应用

张思奇 孙丽萍 赵同雪 徐澜坤 耿肖兵 李永刚*

(东北农业大学农学院 黑龙江省高校寒地作物品种改良与生理生态重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】拟针对禾谷镰孢进行生防菌的筛选和应用研究, 以期为玉米茎基腐病生防菌剂的研制奠定基础。【方法】通过对峙培养法对玉米茎基腐病的主要致病菌禾谷镰孢进行玉米内生防细菌的筛选, 从玉米主栽品种九单 48 幼苗内部获得一株具有较强抑菌效果的内生生防细菌(简称 48SJ7-1); 基于传统鉴定、16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析, 对 48SJ7-1 进行鉴定; 并通过盆栽试验测定该生防菌株的防效。【结果】菌株 48SJ7-1 经鉴定为甲基营养型芽孢杆菌, GenBank 登录号为 KU377993, 48SJ7-1 盆栽防效为 68.47%, 与对照药剂 2% 戊唑醇悬浮种衣剂差异不显著。【结论】48SJ7-1 对玉米茎基腐病的主要致病菌禾谷镰孢有较好防效, 对玉米生长还有明显的促进作用, 而且表现上无药害发生。

关键词: 玉米茎基腐病, 拮抗菌, 禾谷镰孢, 筛选, 防效

Screening and application of bio-control bacterium against corn stalk rot caused by *Fusarium graminearum*

ZHANG Si-Qi SUN Li-Ping ZHAO Tong-Xue XU Lan-Kun
GENG Xiao-Bing LI Yong-Gang*

(Key Laboratory of Cold Crop Breed Improvement and Physiological Ecology in Heilongjiang Province, Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: [Objective] To study the screening and application antagonisms of *Fusarium graminearum* in order to lay the foundation for use of bio-control agents for corn stalk rot. [Methods] The antagonism of *F. graminearum* were screened from corn endophytic bacteria using the confrontation culture method. A bacterial strain (named as 48SJ7-1) which showed inhibition to *F. graminearum* was obtained. The bacterial strain was identified according to its physiological and biochemical characteristics and a 16S rRNA gene sequence analysis; and its effect on corn stalk rot caused by *F. graminearum* was determined by pot experiment. [Results] Strain 48SJ7-1 was identified as *Bacillus methylotrophicus* (accession No. KU377993). In pot experiments, application of 48SJ7-1 reduced corn stalk rot by 68.47% compared to the non-treated control, and there was no

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFD0201803); Important National Science and Technology Specific Projects (No. 2016YFD0300704)

*Corresponding author: Tel: 86-451-55191064; E-mail: neaulyg@126.com

Received: May 03, 2017; Accepted: August 07, 2017; Published online (www.cnki.net): August 15, 2017

基金项目: 国家重点研发计划项目(No. 2017YFD0201803); 科技部重点专项项目(No. 2016YFD0300704)

*通讯作者: Tel: 86-451-55191064; E-mail: neaulyg@126.com

收稿日期: 2017-05-03; 接受日期: 2017-08-07; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-08-15

statistically significant difference with the 2% tebuconazole FSC treated plants. [Conclusion] *F. graminearum*, the main pathogenic fungi of corn stalk rot, can be effectively controlled by 48SJ7-1. The potting results showed that 48SJ7-1 could promote maize growth and no phytotoxicity was observed.

Keywords: Maize stalk rot, Antagonistic bacteria, *Fusarium graminearum*, Screening, Control effects

玉米茎基腐病是世界性分布的土传病害,我国玉米产区多雨年份玉米茎基腐病发病率最高可达80%以上^[1]。与未发生玉米茎基腐病相比,穗长、行粒数、百粒重显著减少,秃尖显著增长,造成一般减产25%左右,严重减产40%以上,加之穗轴易破碎,影响机械收割质量,严重时降低粮食等级^[2]。玉米茎基腐病多发生在玉米乳熟期,发病部位为根系和茎基部的1-3节。玉米茎基腐病的发病时间越早,发病率越高,危害程度越重,造成的产量损失就越大,已成为严重制约玉米产业发展的病害之一^[3]。

玉米茎基腐病主要在茎部发病,表现为内部组织腐烂、茎秆维管束组织丝状游离和须根系减少^[4]。有关玉米茎基腐病病原的研究不尽相同,在1962年夏锦洪等就报道了玉米茎基腐病是由2种细菌(*Erwinia carotovora* f. sp. *zeae*和*Pseudomonas zeae*)和腐霉菌(*Pythium aphanidermatum*)引起的^[5]。截止目前,引起玉米茎基腐病的主要致病菌分为以下4类:(1)腐霉菌(*Pythium*)是主要病原菌,其中禾生腐霉菌、气囊腐霉菌是常见致病菌^[6];(2)镰刀菌(*Fusarium*)为主要致病菌,以禾谷镰孢(*F. graminearum*)和串珠镰孢(*F. moniliforme*)为主;(3)腐霉菌和镰刀菌交互作用复合侵染^[7-9];(4)腐霉菌与镰刀菌都是主要致病菌。研究表明同一地区不同时间分离的致病菌也不尽相同。本课题组在对黑龙江省玉米茎基腐病分离和鉴定过程中,认为禾谷镰孢为主要致病菌之一。

目前,玉米茎基腐病以化学防治为主,但随着人们环保意识的增强,对食品安全和生命健康等越来越重视,生物防治作为农业可持续发展的新兴技术成为关注的热点。在众多的生防菌应用中,尤其以生防细菌具有种类多、生活周期短、代谢活动快且产物多、繁殖能力高、对病原菌的作用方式多样^[10]、

易人工培养等特点,拮抗细菌及代谢产物在生物防治中都起到了重要作用^[11]。

因此,本论文以玉米茎基腐病主要致病菌禾谷镰孢为目标病原菌进行了玉米内生拮抗细菌的筛选、鉴定及应用的研究,为玉米茎基腐病的生物防治奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

玉米品种:九单57,吉林省吉科种业有限公司。

供试菌株:病原菌株为禾谷镰孢,由本课题组分离保存。玉米内生菌分离的样本来自于东北农业大学香坊实验站玉米田内的健康玉米植株。供试生防菌株(生防菌48SJ7-1)由本实验室分离、鉴定并保存。抑菌谱测定真菌种类:半裸镰孢(*Fusarium semitectum*)、腐霉菌(*Pythium*)、灰梨孢属(*Pyricularia grisea*)、层出镰孢[*F. proliferatum* (Rice)]、腐皮镰孢(*F. solani*)、木贼镰孢(*Fusarium equiseti*)、链格孢菌(*Alternaria alternate*)、马铃薯黑痣病菌(*Rhizoctonia solani* Kühn)、立枯丝核菌(水稻)(*Rhizoctonia solani*)、尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)、禾谷镰孢(*F. graminearum*)、立枯丝核菌(大豆)(*R. solani* Kühn)、葡萄霉菌枝孢属[*Cladosporium cladosporioides* (Rice)]、轮枝镰孢(*Fusarium verticillioides*)。

主要试剂:革兰氏染色的结晶紫染液,厦门海标科技有限公司;番红复染液,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司;卢戈氏碘液,湖北邦盛化工有限公司;95%乙醇溶液,河北康济药械有限公司;V-P试剂,上海一研生物科技有限公司。

供试培养基:LB培养基、PDA培养基、明胶液化培养基、淀粉水解培养基、M.R.试验培养基、糖醇类发酵试验培养基、柠檬酸盐利用试验培养

基、酪朊水解试验牛奶培养基、需氧性测定的培养基、新鲜肉汁培养基的配制参照文献[12]。

主要试剂盒、仪器: 植物的基因组提取试剂盒, 康维生物科技有限公司; 台式恒温振荡器 ZD-85, 上海浦东物理光学仪器厂。

供试对照化学药剂为 2% 戊唑醇悬浮种衣剂, 四川红种子高新农业有限责任公司。600 g 制剂/100 kg 种子, 种子包衣。

1.2 玉米茎基腐病拮抗内生菌的筛选

1.2.1 玉米内生细菌的分离: 采集长势良好的玉米植株, 冲洗干净后取各组织 2 g 用纱布包好, 以下工作在超净台中进行。处理组: 包裹好的材料浸入 75% 酒精 1 min, 转入 0.1% 升汞浸泡 1–2 min 对玉米组织进行表面消毒, 无菌水冲洗 3 次, 待玉米组织表面风干后在灭菌的研钵中加入 3 mL 无菌蒸馏水研磨至匀浆, 倒入 NA 培养基中摇匀, 分装至 3 个无菌培养皿中, 作为 3 个重复。对照组: 包裹好的材料浸入 75% 酒精 1 min, 转入 0.1% 升汞 1–2 min 进行玉米组织表面消毒, 无菌水冲洗 3 次, 待玉米组织表面风干后在灭菌的研钵中加入 2 mL 蒸馏水浸泡 1 min, 将浸液倒入 NA 培养基中摇匀, 分装至 3 个无菌培养皿中, 作为 3 个重复。将上述培养皿 25 °C 避光培养 48 h, 根据菌落的形态及颜色等挑取单菌落, 按常规方法进行分离纯化, 于 4 °C 恒温保存备用。

1.2.2 拮抗菌的筛选: 生防菌株的筛选采用对峙培养法, 将生防细菌在 NA 培养基上 28 °C 活化 48 h 后划线接种在距 PDA 平板中心 3 cm 处, 然后在此 PDA 平板的中央接种经过扩繁的供试的禾谷镰孢菌碟($d=0.7$ cm), 每个处理 3 次重复, 放入恒温箱中 26 °C 培养 6 d 后测量植物病原菌菌丝生长的最长半径与最短半径, 计算其比值。

1.2.3 抗菌谱的测定: 对符合抑菌要求的菌株经盆栽试验确定防效, 将获得的目标菌株采用平板对峙法进行抑菌谱的测定。将玉米茎基腐病菌禾谷镰孢及测定抑菌谱的 14 种植物病原真菌培养活化, 采用平板对峙的方法进行抑菌谱的测定, 具

体方法见 1.2.2。

1.3 玉米茎基腐病拮抗内生菌的鉴定

1.3.1 形态学鉴定: 取拮抗细菌菌悬液, 采用逐级稀释法稀释到 10^{-6} , 取 10 μ L 涂于 NA 平板, 28 °C 恒温培养 3 d, 观察单菌落形态。然后进行革兰氏染色和芽孢染色^[13]。

1.3.2 生理生化鉴定: 以《伯杰细菌鉴定手册》为主, 参照东秀珠、蔡妙英主编的《常见细菌系统鉴定手册》的有关内容, 进行细菌菌落形态、大小、颜色、表面光泽透明度及湿润度等, 以及菌体形态、革兰氏染色、有无芽孢等、菌体大小、排列方式、培养特征、生理生化特征的各项分类鉴定。主要进行接触酶试验、明胶液化试验、硝酸盐还原试验、甲基红(M.R.)试验、乙酰甲基甲醇(V.P.)试验、糖醇类发酵试验、柠檬酸盐利用试验、酪朊水解试验、需氧性测定^[13-14]。

1.3.3 分子鉴定: 分子鉴定采用 16S rRNA 基因扩增方法参考成丽霞等^[15]的方法, 用植物的基因组提取试剂盒提取总 DNA, 扩增产物克隆后送于生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 利用 MEGA 4.0 软件进行系统发育分析, 基因序列于 NCBI 数据库在线比对。

对供试菌株的染色体总 DNA 进行 PCR 扩增。16S rRNA 基因扩增采用通用引物: 16s P3S8 (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 16s P5S15 (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACTT-3')。50 μ L PCR 反应体系为: 2 \times Taq PCR Master Mix (2 \times Blue dye) 25 μ L, 模板 DNA (5 ng/ μ L) 2 μ L, 上下游引物 (10 mmol/ μ L) 各 2 μ L, ddH₂O 19 μ L。PCR 反应条件参照姬广海等^[16], 略有改动: 退火温度由 55 °C 调高至 58 °C; 72 °C 延伸 8 min 改为 10 min。

1.4 48SJ7-1 对玉米茎基腐病盆栽防效的测定

种子处理: 将玉米种子放入 55 °C 的温水中, 不断搅拌至 25 °C, 浸种 10 min, 置于 1% 的次氯酸钠溶液中表面消毒 10 min, 然后用无菌水冲去种子表面残留的次氯酸钠, 在超净工作台上吹干表面水分备用。

生防菌悬浮液的配制：将 48SJ7-1 菌株的种子液以 1% 的接种量接种至 LB 培养基中，250 mL 三角瓶装液 50 mL，30 °C、150 r/min 培养。用血球计数法观测菌液浓度，用无菌水配制成菌液浓度为 1×10^9 CFU/mL。

接种体的准备：将禾谷镰孢在 PDA 平板上重新培养 4 d 后，取直径 5 mm 的菌碟接种到高粱粒培养基中，每个三角瓶中接种 5–7 个菌碟，26 °C 黑暗培养，每天振荡三角瓶 1–2 次，待菌丝长满每个高粱粒的表面，待用。

接种方法：将灭菌土装入 12 cm×12 cm 培养钵中至培养钵的 2/3，接种约 12 粒带菌高粱粒，覆上约 4 mm 厚度的灭菌土，播种玉米，每钵 3 粒种子，再用 2 cm 的灭菌土覆盖在种子表面，以未接种病原菌的植株作对照，每个处理 3 次重复，重复 2 次试验。25 °C 光暗交替(12 h/12 h)培养，定期浇水保持湿润。

盆栽试验共设 5 个处理：处理 1：玉米出土后每株玉米浇 3 mL 的生防菌(48SJ7-1)悬浮液；处理 2：玉米出土后每株玉米浇 5 mL 的生防菌(48SJ7-1)悬浮液；处理 3：玉米出土后每株玉米浇 7 mL 的生防菌(48SJ7-1)悬浮液；处理 4：2% 戊唑酮悬浮种衣剂按 600 g/100 kg 进行玉米拌种；处理 5 (CK)：只接种病原菌。每处理设置 3 个重复，每个处理 60 株，种植 15 d 后调查发病率，隔 15 d 再调查 1 次，每次调查 30 株。

玉米茎基腐病病情分级标准^[17]：0 级，整株无病；1 级，地上部和地下部生长基本正常，根部可见少量病斑，病斑面积占根表总面积 1/4 以下，根群颜色白中有褐；2 级，地上部和地下部生长明显受阻，叶色变淡，株高仅及对照的 3/4，侧根少而短，无须根，病斑连片，病斑面积占根表总面积的 1/4–1/2，根群颜色白、褐相当；3 级，地上部和地下部生长极不正常，地上部可见青枯、黄枯状，株高仅及对照的 1/2，侧根极小，病斑面积占根总面积的 1/2–3/4，根群颜色褐中带白；4 级，发芽但

不出苗，几乎窒息而死，病斑面积占根表总面积的 3/4 以上，根为褐色。

计算公式：防效(%)=[(空白对照区病株率–处理区病株率)/空白对照区发病率]×100；发病率(%)=[(每个病级的植株数×相对级数值)/(调查总植株数×最高级数值)]×100。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌的分离与筛选

从玉米组织内分离纯化得到 200 余株对禾谷镰孢有拮抗作用的内生细菌，根据抑菌最长半径与最短半径比值，选择拮抗效果最强的细菌(比值大于 2)，初步进行了盆栽防效的测定，得到一株生防效果较好的细菌，作为供试生防菌，命名为 48SJ7-1。该生防菌对玉米茎基腐病病原菌禾谷镰孢具有很好的拮抗作用，其最长半径与最短半径比值为 3，且边缘菌丝稀疏。从图 1 中可以看出病原菌禾谷镰孢的菌丝生长明显受到抑制，菌丝生长稀疏，颜色变淡。测定了 48SJ7-1 对 14 种植物病原真菌的抑菌谱，3 次重复试验测量其拮抗最长半径/最短半径平均值的结果见表 1。



图 1 48SJ7-1 对禾谷镰孢菌丝生长的影响

Figure 1 Inhibition effect of antagonistic endophytic bacteria 48SJ7-1 on the mycelial growth of *F. graminearum*

注：接种 5 d 后测定最长半径与最短半径的比值。

Note: Maximum radius and minimum radius of *F. graminearum* were measured five days after inoculating the agar dish with *F. graminearum*.

表 1 内生菌 48SJ7-1 菌对 14 种病原真菌抑菌谱的测定
Table 1 Inhibitory spectrums of antagonistic endophytic bacterium 48SJ7-1 against 14 pathogenic fungi

菌株 Strains	最长半径/最短半径 Maximum/Minimum radius	菌株 Strains	最长半径/最短半径 Maximum/Minimum radius
灰梨孢属 <i>P. grisea</i>	2.23	大豆立枯丝核 <i>R. solani</i>	2.30
半裸镰孢 <i>F. semitectum</i>	2.20	马铃薯黑痣病菌 <i>R. solani</i>	2.38
腐皮镰孢 <i>F. solani</i>	2.39	水稻立枯丝核 <i>R. solani</i>	2.51
腐霉菌 <i>P. pringsheim</i>	2.17	禾谷镰孢 <i>F. graminearum</i>	3.00
葡萄霉菌枝孢属 <i>C. cladosporioides</i>	2.29	层出镰刀 <i>F. proliferatum</i>	1.58
木贼镰孢 <i>F. equiseti</i>	2.73	链格孢菌 <i>A. alternate</i>	2.06
尖镰孢 <i>F. oxysporum</i>	2.19	轮枝镰孢 <i>F. verticillioides</i>	1.92

注: 数值均为 3 次测量的平均值; 其中拮抗最长半径/最短半径>2 为效果好的菌株。

Notes: Above data was the average of 3 times. Results were expressed as better (Maximum/Minimum radius>2).

2.2 抑菌谱的测定

内生菌 48SJ7-1 对 14 种病原真菌抑菌谱的测定结果表明(表 1): 除对层出镰孢(*F. proliferatum*)和轮枝镰孢(*F. verticillioides*)抑菌效果表现较差外, 对其它 12 种病原真菌均表现较好的抑菌效果。

2.3 48SJ7-1 菌株鉴定

2.3.1 48SJ7-1 菌株的传统鉴定: 通过培养和观察发现菌体呈杆状, 芽孢呈椭圆到柱状, 位于菌体中央或稍偏。幼龄菌落为圆形, 表面和边缘均光滑, 呈白色, 培养 2 d 后菌落表面变得干燥, 起皱, 中间突起具有伞状缺口, 呈火山喷发状, 但边缘仍然平整光滑, 菌落颜色仍然为白色, 见图 2。生防细菌 48SJ7-1 的生理生化鉴定结果见表 2。通过这些测定, 与甲基营养型芽孢杆菌基本一致^[14]。

2.3.2 48SJ7-1 的 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析: 16S rRNA 基因特异性引物 PCR 扩增测序后在 BLAST 上比对, 发现该菌株与甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)和解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)的相似性均为 99%。根据核糖体基因 16S 区域在细菌鉴定中的要求, 一致性大于 90%即可视为同一个属。结合生理生化测试结果, 鉴定 48SJ7-1 为甲基营养型芽孢杆菌(*Bacillus methylotrophicus*)。将该序列提交 GenBank, 获得登录号为 KU377993。

2.4 48SJ7-1 盆栽防效的测定

从玉米体内分离得到的内生菌经拮抗作用测定, 具有较好抑菌效果的菌株 48SJ7-1 进行了室内盆栽试验, 结果见表 3。

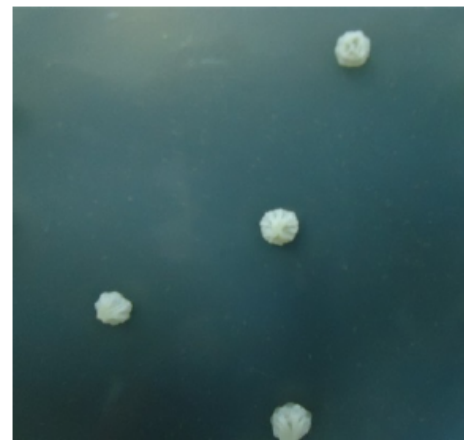


图 2 48SJ7-1 菌落特征

Figure 2 The morphology of 48SJ7-1 colony

表 2 生防细菌 48SJ7-1 的生理生化性质
Table 2 Physiological and biochemical analysis of 48SJ7-1

试验项目 Test items	结果 Results	试验项目 Test items	结果 Results
革兰氏染色 Gram stain	+	V-P 试验 V.P. test	-
接触酶反应 Catalase	+	蔗糖 Sucrose	+
明胶水解 Gelatin liquefaction	+	葡萄糖 Glucose	+
酪蛋白 Casein	+	乳糖 Lactose	+
硝酸盐还原试验 Mannose	+	甘露糖 Mannose	+
需氧性测定 Aerobic	+	M.R. 试验 M.R. test	-
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	柠檬酸盐 Nitrate reduction	-

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive; -: Negative.

表3 48SJ7-1 对玉米茎基腐病的盆栽防效
Table 3 Control efficacy of strain 48SJ7-1 against corn stalk rot in the potting experiments

供试药剂 Tested agents	使用剂量 Application dose	出苗后 15 d		出苗后 30 d	
		After the emergence of 15 d		After the emergence of 30 d	
		发病率 Disease incidence (%)	防效 Control effect (%)	发病率 Disease incidence (%)	防效 Control effect (%)
48SJ7-1 (1×10^9 CFU/mL)	3 mL/株	23.63	34.39±2.62c	24.97	34.40±2.91c
	5 mL/株	13.91	60.95±5.03b	15.58	59.14±1.31b
	7 mL/株	11.02	69.35±1.55ab	12.02	68.47±1.45a
2% 戊唑醇悬浮种衣剂	600 g/100 kg	9.79	72.87±1.66a	10.55	72.28±1.58a
2% Tebuconazole FSC	CK	36.07	—	38.11	—

注：表中数据为“平均值±标准差”。同列数据后标不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 5% 水平差异显著。

Note: The data are “ $\bar{x} \pm s$ ”. Different uppercase letters in the same column show significant difference at 5% level by Duncan smultiple range test.

从表 3 可以看出，通过盆栽试验，接种生防菌 48SJ7-1 后，各处理都能降低玉米茎基腐病发病率，出苗 30 d 后，生防菌 48SJ7-1 (1×10^9 CFU/mL 7 mL) 的防效为 68.47%，与对照药剂 2% 戊唑醇悬浮种衣剂(600 g/100 kg 种子)的防效 72.28% 差异不显著，随着生防菌使用浓度的增加防效也增加。通过对各处理的表观观察，发现该菌对玉米的长势有明显促进作用，且表观上无药害发生。

3 讨论

本实验通过形态学、生理生化以及分子鉴定，确定生防菌 48SJ7-1 为甲基营养型芽孢杆菌。目前，已发现甲基营养型芽孢杆菌对多种病原菌有防治作用。例如：对黄瓜灰霉病防效最高可达 79.8%^[18-19]，对黄瓜炭疽病防效最高可达 73.7%^[20]，对烟草青枯病防效为 70.37%^[21]，对水稻细菌性条斑病防效为 61.8%^[22]，对人参锈腐病防效为 73.63%^[23]，对白菜黑斑病防效为 79.08%^[24]，对番茄青枯病防效为 55.6%^[25]。其中由华北制药集团爱诺有限公司生产的用于防治黄瓜灰霉病的甲基营养型芽孢杆菌 9912 母药和制剂，已于 2015 年 12 月 31 日在我国首获登记^[26]。本研究通过抑菌谱实验证明甲基营养型芽孢杆菌 48SJ7-1 的抑菌范围更广，显示该菌具有作为生防菌的潜力。对比其他同类研究的结果发现，尽管本研究的生防菌剂生防效果显著，但还有待进一步提高，可从菌剂的剂型、使用方法和剂量

等方面尝试改进。

有研究表明，甲基营养型芽孢杆菌抑制真菌的活性物质为酯肽类物质^[26]。酯肽对真菌的菌丝生长和孢子萌发具有不同程度的抑制作用^[27]。相较于化学农药和传统抗生素，脂肽具有对动植物无害、可生物降解及不易产生交叉抗性等优点^[26]。

目前，还未发现甲基营养型芽孢杆菌防治玉米茎基腐病的报道。本研究明确了甲基营养型芽孢杆菌对玉米大斑病的防治作用及效果，并对甲基营养型芽孢杆菌的抑菌范围做了初步的确定，扩大了甲基营养型芽孢杆菌作为生防菌的应用范围，为其下一步的发展提供理论基础。同时，本研究也为玉米大斑病的防治提供了新的思路，应用前景广阔。

当前，本研究仅进行了室内盆栽试验，还需要通过田间试验进一步验证该生防菌剂的防治效果。另外，本研究还未就该生防菌的定殖能力、抑菌机制、胞内外抑菌活性物质及生防菌的发酵条件、生防菌剂的剂型等方面做进一步研究，这也是本研究下一步的研究方向。

参考文献

- [1] Xie FX, Huang QP, Zhao HZ, et al. Maize stalk rot in China[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2005(3): 93-94 (in Chinese)
谢富欣, 黄秋平, 赵花周, 等. 我国玉米茎基腐病研究进展 [J]. 陕西农业科学, 2005(3): 93-94
- [2] Xie LH, Gao H, Chen ML, et al. Effects of maize stalk rot on yield and component factors[J]. Modernizing Agriculture,

- 2016(12): 5-6 (in Chinese)
谢丽华, 高虹, 陈明丽, 等. 玉米茎基腐病对产量及构成因素的影响[J]. 现代化农业, 2016(12): 5-6
- [3] Xie LH, Chen ML, Feng T, et al. Investigation of maize stalk rot occurrence factor in Heilongjiang Province 2014[J]. Modernizing Agriculture, 2015(6): 68-69 (in Chinese)
谢丽华, 陈明丽, 冯涛, 等. 2014 年黑龙江省玉米茎基腐病发生因素调研[J]. 现代化农业, 2015(6): 68-69
- [4] Geng XB. Identification, optimization of fermentation conditions and application of antagonistic bacteria (48SJ7-1) for control of corn stalk rot[D]. Harbin: Master's Thesis of Northeast Agricultural University, 2015 (in Chinese)
耿肖兵. 玉米茎基腐病拮抗菌(48SJ7-1)鉴定、培养条件优化及应用的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士学位论文, 2015
- [5] Xia JH, Fang ZD. Study on pathogen of bacterial stalk rot of maize[J]. Journal of Plant Protection, 1962, 1(1): 1-14 (in Chinese)
夏锦洪, 方中达. 玉米细菌性茎腐病病原菌的研究[J]. 植物保护学报, 1962, 1(1): 1-14
- [6] Cheng YJ, Chen GQ, Xue L, et al. Research advance of maize stalk rot[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(20): 8557-8559,8569 (in Chinese)
程玉静, 陈国清, 薛林, 等. 玉米茎腐病研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013,41(20): 8557-8559,8569
- [7] Xu ZT, Zhang CM. On the causal organism of root and basal stalk rot of corn in Shandong Province[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1985, 15(2): 103-108 (in Chinese)
徐作珽, 张传模. 山东玉米茎基腐病病原菌的初步研究[J]. 植物病理学报, 1985, 15(2): 103-108
- [8] Feng FF, Sun XH, Jiang JC, et al. Study on corn resistance to corn stalk rot and screening of resistance resource[J]. Journal of Maize Sciences, 1995(S1): 55-58 (in Chinese)
冯芬芬, 孙秀华, 姜晶春, 等. 玉米种质对茎腐病的抗病性和抗病资源筛选研究[J]. 玉米科学, 1995(S1): 55-58
- [9] Mei LY, Li MR, Wang Q, et al. Pathogens of Maize stalk rot and control research[A]/Outlook of Plant Protection in 2000s[C]. Beijing: China Science Press, 1998: 4 (in Chinese)
梅丽艳, 李莫然, 王芊, 等. 黑龙江省玉米青枯病病原菌种类及防治研究[A]/植物保护 21 世纪展望——植物保护 21 世纪展望暨第三届全国青年植物保护科技工作者学术研讨会文集[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998: 4
- [10] Huo XQ, Chen JY. Inhibition effect of antagonistic bacteria C23 on pathogens of damping-off and colonization in the rhizosphere of slash pine[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2009, 37(11): 33-36 (in Chinese)
霍宪起, 陈京元. 拮抗菌 C23 对松苗猝倒病原菌的抑制效果及在松苗根际的定殖[J]. 山西农业科学, 2009, 37(11): 33-36
- [11] Li J, Yang Q. Research progress on biocontrol *Bacillus subtilis*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008(1): 106-111,132 (in Chinese)
李晶, 杨谦. 生防枯草芽孢杆菌的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008(1): 106-111,132
- [12] Nan N. Pathogen identification and their sensitivity to bactericides for bacterial diseases on five medicinal plants in Jilin[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2011 (in Chinese)
南楠. 吉林省 5 种药用植物细菌病害的病原鉴定及对药剂的敏感性研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2011
- [13] Dong XZ, Cai MY. Common Bacterial System Identification[M]. Beijing: China Science Press, 2001: 349-398 (in Chinese)
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: 349-398
- [14] Buchanan RE, Gibbons NE. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology[M]. 8th Edition. Beijing: China Science Press, 1984: 729-758 (in Chinese)
Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰细菌鉴定手册[M]. 第 8 版. 中国科学院微生物研究所《伯杰细菌鉴定手册》翻译组. 北京: 科学出版社, 1984: 729-758
- [15] Cheng LX, Peng B, Li TJ, et al. Isolation, identification and characteristics of a bacterium with extensive antifungal activity from a corn leaf spot[J]. Microbiology China, 2009, 36(3): 365-370 (in Chinese)
成丽霞, 彭兵, 李天金, 等. 一株具广谱抗真菌活性细菌菌株的分离鉴定及拮抗物的理化特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(3): 365-370
- [16] Ji GH, Wei LF, Wu YP. Identification and biological characteristics on a novel strain 13-1 from rhizosphere of *Amorphophallus konjac*[J]. Microbiology China, 2009, 36(7): 974-980 (in Chinese)
姬广海, 魏兰芳, 吴亚鹏. 一种新型生防细菌菌株 13-1 鉴定及其生物学特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(7): 974-980
- [17] Jin QM, Lu ZZ, Pan SF, et al. Study on pathogenicities of pathogenic fungi of corn stalk rot in corn seedling stage[J]. Maize Science, 1994, 2(1): 73-75 (in Chinese)
晋齐鸣, 卢宗志, 潘顺法, 等. 玉米茎腐病病原对玉米苗期致病性研究[J]. 玉米科学, 1994, 2(1): 73-75
- [18] Liu LQ, Yang SL, Chen Q, et al. Field efficacy trial of 3 billion/g *Bacillus methylotrophicus* wettable powder control cucumber gray mold[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2014(9): 130,133 (in Chinese)
刘利强, 杨士玲, 陈强, 等. 30 亿个/g 甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂防治黄瓜灰霉病田间药效试验[J]. 现代农业科技, 2014(9): 130,133
- [19] Li XH. Formulation optimization of *Bacillus methylotrophicus* wettable powder[J]. Coal and Chemical Industry, 2015, 38(6): 46-50 (in Chinese)
李学红. 甲基营养型芽孢杆菌可湿性粉剂配方的优化[J]. 煤炭与化工, 2015, 38(6): 46-50
- [20] Xie XW, Dong RL, Shi YX, et al. Screening and inhibition effect of antagonistic bacteria against cucumber anthracnose

- caused by *Colletotrichum orbiculare*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2016, 32(2): 215-220 (in Chinese)
- 谢学文,董瑞利,石延霞,等. 黄瓜炭疽病拮抗细菌的筛选及其抑制效果[J]. 中国生物防治学报, 2016, 32(2): 215-220
- [21] Liu W, Liu P, Shen XY, et al. Screening, identification and antifungal activity of antagonistic *Bacillus* spp. against tobacco bacterial wilt[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2014, 42(2): 123-130 (in Chinese)
- 刘伟,刘鹏,沈小英,等. 烟草青枯病拮抗芽孢杆菌的筛选、鉴定及其抑菌活性初探[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(2): 123-130
- [22] Zhuang C, Li HY. Field efficacy trial of *Bacillus methylotrophicus* control rice bacterial streak[J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2017(5): 105,110 (in Chinese)
- 庄春,李红阳. 甲基营养型芽孢杆菌制剂防治水稻细菌性条斑病田间药效试验[J]. 现代农业科技, 2017(5): 105,110
- [23] Li T. Research on biocontrol function of *Bacillus methylotrophicus* NJ13 against the ginseng rust rot[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 李桐. 甲基营养型芽孢杆菌 NJ13 对人参锈腐病的生防作用研究[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2016
- [24] Wang Q, Li SN, Wang SX, et al. Screening, identification and fermentation conditions optimization of antagonistic bacteria LBC-2 against *Alternaria brassicae* and biocontrol efficiency[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2015, 31(1): 96-105 (in Chinese)
- 王全,李术娜,王树香,等. 白菜黑斑病菌拮抗细菌 LBC-2 的筛选鉴定、发酵条件优化及田间防效[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(1): 96-105
- [25] Xiong HQ. Isolation of antagonistic strains against tomato bacterial wilt and identification of their biological control mechanisms[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China Agricultural University, 2016 (in Chinese)
- 熊汉琴. 番茄青枯病拮抗菌的筛选及其生防机制研究[D]. 广州: 华南农业大学硕士学位论文, 2016
- [26] *Bacillus subtilis* 9912 will be first registered in China[J]. Shandong Pesticide News, 2016(1): 26 (in Chinese)
- 甲基营养型芽孢杆菌 9912 将在我国首获登记[J]. 山东农药信息, 2016(1): 26
- [27] Lü Q, Hu JC, Wang N, et al. Anti-fungal lipopeptides produced by *Bacillus methylotrophicus* SHB114 isolated from South China Sea[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2014, 30(1): 113-120 (in Chinese)
- 吕倩,胡江春,王楠,等. 南海深海甲基营养型芽孢杆菌 SHB114 抗真菌脂肽活性产物的研究[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(1): 113-120