

## 研究报告



## 弯曲平脐蠕孢拮抗细菌的筛选、鉴定及拮抗作用

张新杰<sup>1</sup> 刘彦策<sup>1</sup> 钱欣雨<sup>1</sup> 肖生林<sup>1</sup> 于波<sup>1</sup> 董金皋<sup>\*2</sup> 郝志敏<sup>\*1</sup>

1 河北农业大学生命科学学院 河北 保定 071001

2 河北农业大学植物保护学院 河北 保定 071001

**摘要:**【背景】玉米弯曲平脐蠕孢是引起玉米叶斑病的主要病原,严重危害农业生产。利用细菌防治弯曲平脐蠕孢是目前研究的热点。【目的】筛选对玉米弯曲平脐蠕孢有高拮抗性的菌株,对其进行鉴定并探究其拮抗机制。【方法】采用平板对峙法,从玉米田地地表下土壤分离获得 22 株细菌,再经过复筛得到一株对玉米弯曲平脐蠕孢具有较高拮抗活性的菌株 L-14。【结果】筛选发现,菌株 L-14 对层出镰孢(*Fusarium proliferatum*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、大斑凸脐蠕孢(*Exserohilum turcicum*)、弯曲平脐蠕孢(*Bipolaris papendorfii*)和灰霉病菌(*Botrytis cinerea*) 5 种植物病原真菌均有抑制作用,是一株广谱拮抗作用的生防菌株。通过对该菌株进行形态观察、16S rRNA 基因序列分析以及生理生化特性检测,鉴定其为枯草芽孢杆菌。对菌株 L-14 的抗菌机制进行研究,发现该菌发酵液的蛋白粗提物对弯曲平脐蠕孢气生菌丝形态无影响,但可致基内菌丝畸变,对弯曲平脐蠕孢分生孢子萌发有抑制作用。【结论】筛选的拮抗菌在防治植物病害上具有广谱性及较高的拮抗活性,能有效防治玉米叶斑病。

**关键词:** 弯曲平脐蠕孢, 分离, 筛选, 鉴定, 枯草芽孢杆菌, 拮抗作用

Isolation, identification and characterization of an antagonistic bacterium against *Bipolaris papendorfii*ZHANG Xin-Jie<sup>1</sup> LIU Yan-Ce<sup>1</sup> QIAN Xin-Yu<sup>1</sup> XIAO Sheng-Lin<sup>1</sup> YU Bo<sup>1</sup>  
DONG Jin-Gao<sup>\*2</sup> HAO Zhi-Min<sup>\*1</sup>

1 College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China

2 College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China

**Abstract:** [Background] *Bipolaris papendorfii* is the main fungal pathogen of Curvularia leaf spot, and harmful to agricultural production. At present, the use of bacteria to control *B. papendorfii* becomes research focus in this field. [Objective] To screen the strains with high antagonistic activity against *B. papendorfii*, and identify the antagonistic mechanism. [Methods] Twenty-two bacterial strains were

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFD0200607-02); China Agriculture Research System (CARS-02)

**\*Corresponding authors:** DONG Jin-Gao: Tel: 86-312-7521823; E-mail: dongjingao@126.com  
HAO Zhi-Min: 86-312-7528590; E-mail: haozhimin@hebau.edu.cn

**Received:** 01-03-2020; **Accepted:** 24-04-2020; **Published online:** 21-05-2020

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFD0200607-02); 国家现代玉米产业体系(CARS-02)

**\*通信作者:** 董金皋: Tel: 0312-7521823; E-mail: dongjingao@126.com

郝志敏: Tel: 0312-7528590; E-mail: haozhimin@hebau.edu.cn

**收稿日期:** 2020-03-01; **接受日期:** 2020-04-24; **网络首发日期:** 2020-05-21

isolated from the soil under the surface of corn field by the method of plate confrontation. One strain L-14 with high antagonistic activity to *B. papendorffii* was obtained by repeated screening. **[Results]** Strain L-14 with the highest antagonism was obtained by using the plate diffusion method. After morphological observation, 16S rRNA gene sequence analysis, physiological and biochemical characteristics detection, the strain was finally identified as *Bacillus subtilis*. Moreover, the strain is a wide-spectrum antagonistic biocontrol strain with inhibitory effects on *Fusarium proliferatum*, *Fusarium graminearum*, *Exserohilum turcicum*, *Bipolaris papendorffii* and *Botrytis cinerea*. Then, we studied the antibacterial mechanism of strain L-14 and obtained that the fermentation crude protein extracts had no effect on the morphology of the aerial hyphae of *B. papendorffii* but can cause the mycelial aberration, and had an inhibitory effect on spore germination. **[Conclusion]** The antagonistic bacterium *B. subtilis* obtained in this study has broad spectrum and high antagonistic activity in the control of plant diseases, and can effectively control *Curvularia* leaf spot.

**Keywords:** *Bipolaris papendorffii*, Isolation, Screening, Identification, *Bacillus subtilis*, Antagonism

植物病害是降低农业生产能力的主要因素之一<sup>[1]</sup>。平脐蠕孢属(*Bipolaris*)真菌能引起许多禾本科植物的严重病害,导致叶斑、根腐、穗腐、种子变色、霉变等,造成巨大的经济损失;除引起植物病害外,其个别种类能够引起人或动物的病害<sup>[2-3]</sup>。弯曲平脐蠕孢是平脐蠕孢属真菌的一种,主要引起玉米弯孢叶斑病<sup>[4]</sup>。

作为世界三大谷类作物之一,玉米(*Zea mays* L.)在世界农业生产中占有举足轻重的作用,可以粮饲兼用。玉米是我国三大粮食品种之一,在玉米生产中,病虫害等多种因素严重制约着玉米的产量和品质。玉米病害已成为我国玉米种植业减产、减收的最主要问题,严重影响着玉米的产量<sup>[5]</sup>。玉米弯孢叶斑病是近年来发生在我国玉米生产上的一种新型病害<sup>[6]</sup>。该病发生在玉米成株期,主要危害叶片,有时也危害叶鞘和苞叶<sup>[7]</sup>,是突发性病害,蔓延迅速,严重时叶部病斑密集成片,重病地块病株率及病叶率高达 50%,已成为我国玉米产区的重要病害之一<sup>[8-9]</sup>。17 世纪 70-80 年代我国出现有关玉米弯孢叶斑病的描述性记载,1956 年国外出现该病发生的报道<sup>[10]</sup>。20 世纪 90 年代以来,玉米弯孢叶斑病先后在辽宁、河南、河北、山东等多省暴发流行,造成严重玉米产量损失<sup>[11]</sup>。作为引起玉米弯孢叶斑病的主要病原,弯曲平脐蠕孢的防治迫在眉睫<sup>[12]</sup>。

由于化学杀菌剂引起的植物病原真菌耐药性增强,以及农药残留产生的环境污染等问题,农业病害的生物防治逐渐成为国内外研究的热点<sup>[13-16]</sup>。细菌由于种类多、分布广、繁殖速度快、易于人工培养扩繁、对植物的微生态比较适宜、既能防病又能促进植物生长等特点,成为生物防治的理想工具<sup>[17-18]</sup>。

目前成功应用于植物病害防治的生防细菌主要来自芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*);此外,沙雷氏菌属(*Serratia*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)和巴氏杆菌属(*Pasteuria*)也常用作生防菌<sup>[17,19-20]</sup>。例如,芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) A13 菌系表现出对多种植物病原菌的抑菌效果,并且促进燕麦、胡萝卜和花生高效增产;芽孢杆菌 Rb2 和 Rb6 菌液浸种处理,对小麦苗期纹枯病表现出较高防效,其代谢产物浸种防效可达 70%<sup>[18]</sup>。枯草芽孢杆菌 B916 发酵液对水稻纹枯病的防效可高达 80%<sup>[21]</sup>。生防细菌在防治植物病害、提高农业产量方面获得了显著成就。

本研究从玉米田地表下土壤分离获得 22 株细菌菌株,通过平板对峙法从中筛选出一株对玉米弯孢叶斑病具有较高拮抗活性的菌株 L-14,并对其抑菌机理进行了初步研究,以期获得该菌株的基本信息,丰富玉米叶斑病的生物防治资源,为新型抗菌药物的研究奠定理论基础,并为其实际

应用提供基础平台。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

弯曲平脐蠕孢(*Bipolaris papendorffii*)、层出镰孢(*Fusarium proliferatum*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、大斑凸脐蠕孢(*Exserohilum turcicum*)均由本实验室保存。

### 1.2 培养基

LB 培养基(g/L): 胰化蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, pH 7.0。1×10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 20 min, 用于后续拮抗细菌的发酵。

PDA 培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 土豆 200.0, 琼脂糖 13.0。1×10<sup>5</sup> Pa 高压灭菌 20 min, 用于弯曲平脐蠕孢的培养。

### 1.3 主要试剂和仪器

基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 2×PCR Mix, 北京擎科生物技术有限公司; 细菌理化性质检测试剂条, 生工生物工程(上海)股份有限公司。PCR 仪、凝胶成像系统, Bio-Rad 公司; 电泳仪 EPS 300, 上海天能科技有限公司; 超净工作台, 北京半导体设备一厂。

### 1.4 菌株的分离

采取稀释法, 将玉米田地地表以下 5–25 cm 处土壤样品(1 g)用无菌水(10 mL)制备土壤稀释液(1 g/10 mL), 分 10 倍浓度梯度涂布于 LB 固体培养基上, 室温培养 2 d。根据菌落形态, 挑取不同类型单菌落在相同培养基平板上进行划线培养并纯化菌株。

### 1.5 弯曲平脐蠕孢拮抗菌株的筛选

根据平板对峙法<sup>[22]</sup>, 将弯曲平脐蠕孢菌盘接种在 PDA 固体培养基中心, 距离菌盘 3 cm 处接种已纯化的细菌, 25 °C 黑暗连续培养 15 d, 观察抑菌效果。

### 1.6 拮抗细菌形态观察及生理生化特性分析

对细菌菌落形态大小、菌落表面光泽、凹凸度、菌落边缘平整性以及透明度进行观察; 通过

结晶紫染色法对菌体及芽孢进行形态学观察。参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[23]</sup>对菌株进行生理生化性质测定。

### 1.7 拮抗细菌 16S rRNA 基因检测

采用 SDS-CTAB 法提取细菌基因组 DNA<sup>[24]</sup>。以细菌基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增菌株的 16S rRNA 基因, 所用引物为 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')。PCR 反应体系(50 μL): 27F (10 μmol/L) 1 μL, 1492R (10 μmol/L) 1 μL, DNA 模板 2 μL, 2×PCR Mix 25 μL, dd H<sub>2</sub>O 21 μL。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 共 34 个循环; 72 °C 15 min, 16 °C 10 min。

PCR 扩增产物经纯化后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。将所测得的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 数据库中, 通过核酸 BLASTn 相似性比对, 通过 MEGA 5.0 软件进行 DNA 多序列同源性分析, 采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育进化树, 确定菌株的分类地位<sup>[25]</sup>。

### 1.8 拮抗细菌生长曲线的测定

挑取单克隆接种于 20 mL/50 mL LB 培养液中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 后获得种子液。将菌株种子液按 2% 的接种量扩大培养至 50 mL/250 mL 基础培养液中, 37 °C、200 r/min 继续振荡培养, 每隔 2 h 取出 2 mL 菌液检测 OD<sub>600</sub> 吸光度。平行设置 3 组试验, 获取数据后绘制菌株的生长曲线。

### 1.9 拮抗细菌对弯曲平脐蠕孢菌丝形态的影响

采用平板对峙法, 25 °C 恒温培养箱内将菌株与弯曲平脐蠕孢对峙培养, 15 d 后分别挑取抑菌圈边缘基内菌丝和气生菌丝进行显微观察。试验设置 3 个重复。

### 1.10 拮抗细菌对弯曲平脐蠕孢孢子萌发的影响

取培养 15 d 的弯曲平脐蠕孢, 向平皿中加入 5.0 mL 的无菌水, 去尖枪头刮取病菌分生孢子制

备孢悬液。取灭菌的凹玻片,加入弯曲平脐蠕孢孢悬液与细菌发酵粗提液以等体积混合制备混合液,以只加弯曲平脐蠕孢孢悬液为对照,25℃ 孵育4 h,观察孢子萌发情况。

### 1.11 拮抗细菌的抗菌谱测定

通过平板对峙法,将筛选得到的14号菌株与直径为8 mm的供试植物病原真菌进行对峙培养,25℃ 恒温孵箱连续培养15 d后观察抑菌效果。每组试验均设置3次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 弯曲平脐蠕孢拮抗细菌的筛选

从土壤中分离到22株细菌,通过平板对峙法检测每株菌对弯曲平脐蠕孢菌(*B. papendorfii*)的拮抗作用,发现菌株L-14对弯曲平脐蠕孢菌具有较明显的抑菌效果(图1)。

### 2.2 拮抗细菌的抗菌谱

利用平板对峙法,发现菌株L-14具有较广的抗菌谱,表现出对层出镰孢(*F. proliferatum*)、大斑凸脐蠕孢(*E. turcicum*)、禾谷镰孢(*F. graminearum*)、弯曲平脐蠕孢菌(*B. papendorfii*)和灰霉病菌(*B. cinerea*)等5种植物病原真菌均有强烈的拮抗作用(图2)。

### 2.3 拮抗细菌的形态观察及生理生化特性分析

#### 2.3.1 形态特征

菌株L-14在LB固体培养基上呈现有光泽的白



图1 弯曲平脐蠕孢菌与拮抗细菌的对峙培养

Figure 1 Screening of antagonistic bacteria against *Bipolaris papendorfii*

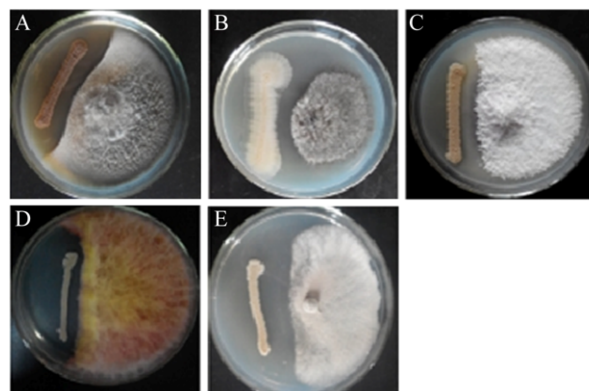


图2 菌株L-14的抗菌谱检测

Figure 2 Detection of antibacterial spectrum of strain L-14

注: A-E: 弯曲平脐蠕孢菌、大斑凸脐蠕孢、层出镰孢、禾谷镰孢、灰霉病菌。

Note: A-E: *Bipolaris papendorfii*, *Exserohilum turcicum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea*.

色菌落,菌落隆起但不明显,表面干燥且边缘不规则(图3)。结晶紫染色表明其菌体呈直杆状,圆形芽孢,芽孢中生。因此,根据菌落形态初步鉴定菌株L-14为芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)。

#### 2.3.2 生理生化特性

参照《常见细菌系统鉴定手册》<sup>[23]</sup>鉴定方法,对菌株L-14进行生理生化鉴定,结果显示该菌株淀粉水解、明胶液化、柠檬酸盐利用、过氧化氢还原酶、V.P.测定等为阳性,与枯草芽孢杆菌具有相同的生理生化特性(表1)。



图3 菌株L-14的菌体形态

Figure 3 Morphological characteristics of strain L-14

表 1 菌株 L-14 的生理生化特性  
Table 1 Physical and biochemical characteristics of strain L-14

测定指标 Index	菌株特性 Characteristics
淀粉水解 Amylohydrolysis	+
明胶液化 Gelatin liquefaction	+
油脂水解 Oilhydrolysis	-
吡啶产生 Indole production	-
柠檬酸盐利用 Usage of citrate	+
过氧化氢还原酶	+
Hydrogen peroxide reductive enzyme	
甲基红 Methyl red	-
V.P.测定 VP reaction	+
纤维素分解 Cellulose decomposing	-
分解葡萄糖 Decomposition of glucose	+
产酸 Acid production	+
产气 Gas production	-

注: +: 阳性; -: 阴性。  
Note: +: Positive; -: Negative.

2.4 菌株 L-14 的 16S rRNA 基因序列分析

将菌株 L-14 的 16S rRNA 基因测序结果提交 GenBank, 获得登录号为 MT131171, 序列长度为 1 417 bp。在 NCBI 数据库中对菌株 16S rRNA 基因序列进行 BLASTn 比对, 比对结果显示菌株 L-14 与编号为 ATCC 6633 的枯草芽孢杆菌序列相似度高达 100%。通过 MEGA 5.0 软件对相近序列构建

系统发育树, 结果显示菌株 L-14 与枯草芽孢杆菌可聚在同一进化分支上(图 4)。综上所述, 通过菌落形态特征、生理生化指标分析以及分子进化分析, 鉴定菌株 L-14 为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)。

2.5 生长曲线的测定

菌株 L-14 的生长曲线分布为: 0-4 h 为延迟期, 4-12 h 为菌体对数生长期, 14-26 h 为稳定期, 26 h 后菌体生长进入衰亡期(图 5)。因此取 10 h 的对数生长期发酵液作为种子液进行发酵试验。

2.6 菌株 L-14 对弯曲平脐蠕孢菌丝形态的影响

实验结果表明, 菌株 L-14 发酵液的蛋白粗提物对弯曲平脐蠕孢气生菌丝形态无明显影响, 但对基内菌丝影响显著。与未处理的基内菌丝作为对照, 菌株 L-14 发酵液的蛋白粗提物处理的基内菌丝细胞膨大, 呈现明显畸变的呈串珠状排列(图 6)。

2.7 菌株 L-14 对弯曲平脐蠕孢孢子萌发的影响

如图 7 所示, 菌株 L-14 发酵液蛋白粗提物能显著抑制弯曲平脐蠕孢分生孢子萌发。将未处理组作为对照, 培养至 20 h, 对照组孢子已萌发, 而菌株 L-14 发酵液蛋白粗提物处理组中的弯曲平脐蠕孢孢子末端仍呈现末端膨大, 出现囊泡状结构, 未正常萌发。

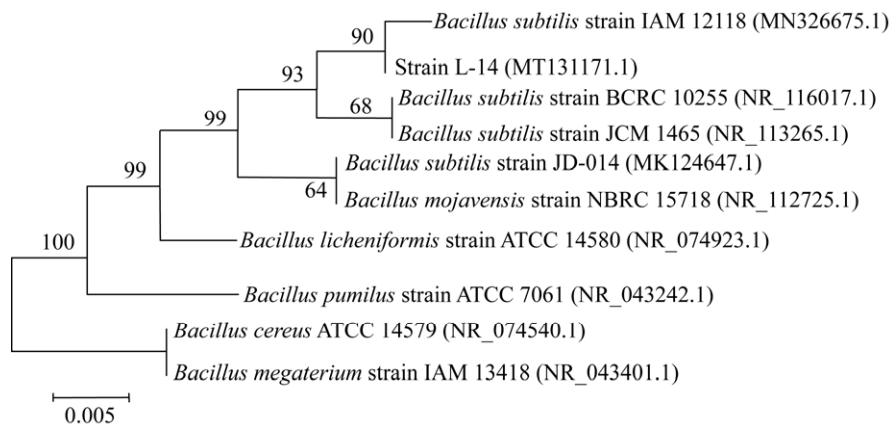


图 4 菌株 L-14 16S rRNA 基因序列系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain L-14

注: 参与比对序列的 GenBank 登录号列于括号中, 分支处标注有自展值, 标尺所示长度为 0.005 核苷酸置换率。

Note: The GenBank accession numbers of aligned sequences are shown in the brackets. The bootstrap values are shown at the node. Bar 0.005 means the nucleotide substitution rate of 0.005.



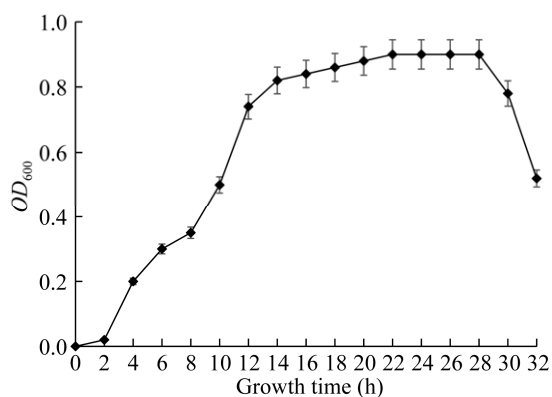
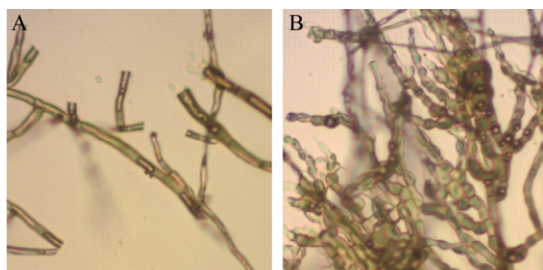


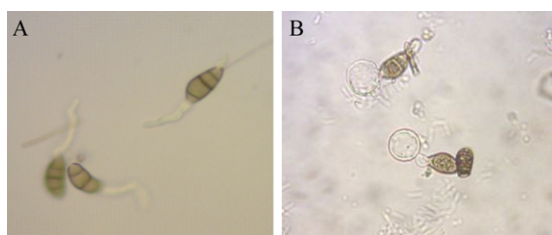
图5 菌株 L-14 的生长曲线

Figure 5 The growth curve of L-14

图6 菌株 L-14 粗蛋白对弯曲平脐蠕孢菌丝形态的影响  
Figure 6 Effects of crude protein of strain L-14 on hyphae of *Bipolaris papendorfii*

注: A: 未处理组作为对照; B: 菌株 L-14 粗蛋白处理弯曲平脐蠕孢菌后。

Note: A: Sample without treatment as control; B: *Bipolaris papendorfii* after treatment with crude protein of strain L-14.

图7 菌株 L-14 发酵粗提物对弯曲平脐蠕孢分生孢子萌发的影响  
Figure 7 Effects of strain L-14 fermentation of crude extracts for the *Bipolaris papendorfii* conidial germination

注: A: 未处理组作为对照; B: 菌株 L-14 发酵粗提物处理弯曲平脐蠕孢菌后。

Note: A: Sample without treatment as control; B: *Bipolaris papendorfii* conidial germination after treatment of strain L-14 fermentation of crude extracts.

### 3 讨论与结论

芽孢杆菌是自然界分布较为广泛的细菌, 不仅存在于土壤、植物根际和体表, 还是常见的植物内生细菌。研究表明, 芽孢细菌不仅可促进植物生长, 其产生的抗菌物质也已成功应用在植物病害防治领域<sup>[26]</sup>。芽孢杆菌对人畜无毒害作用、不污染环境、抗逆性极强, 是目前极有应用前景的一类微生物。分离芽孢细菌拮抗植物病原菌物质并研究其拮抗机制, 对植物病害防控具有重要的应用价值, 而且为抗菌物质信号途径的基因克隆、进一步构建转基因工程菌以及应用菌株的改造奠定基础。

本研究筛选得到的弯曲平脐蠕孢拮抗细菌 L-14 为枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*), 其对层出镰孢(*F. proliferatum*)、玉米大斑病菌(*S. turcica*)、禾谷镰孢(*F. graminearum*)和灰霉病菌(*B. cinerea*)等均具有较好的拮抗活性, 其胞外活性物质可导致弯曲平脐蠕孢菌丝及芽管膨大、畸形。而且, 菌株 L-14 发酵液粗提物能导致弯曲平脐蠕孢的基内菌丝显著畸变, 呈现无功能的串珠状, 分生孢子萌发异常, 阻断其附着胞的发育, 推测菌株 L-14 的分泌物可能通过破坏弯曲平脐蠕孢的细胞壁完整性, 造成其菌丝畸形及芽管无法正常延伸。有研究<sup>[27]</sup>表明, 芽孢杆菌会通过影响真菌细胞壁, 从而破坏其菌丝形态。孔建等<sup>[28]</sup>研究发现, 来自枯草芽孢杆菌 B-903 的抗生素可溶解镰刀菌菌丝细胞壁, 造成菌丝畸形。翟茹环等<sup>[29]</sup>曾报道枯草芽孢杆菌 G8 发酵滤液可使黄瓜菌核病菌菌丝溶解, 造成原生质渗漏, 形成空泡细胞。邢介帅等<sup>[30]</sup>发现枯草芽孢杆菌 T2 所产生的蛋白酶能显著降解棉花枯萎病菌细胞壁蛋白, 产生畸形菌丝。Deleu 等<sup>[31]</sup>研究表明枯草芽孢杆菌所产生的脂肽类抗菌物质能直接作用于病原菌细胞膜, 改变细胞膜的结构, 从而达到抑菌效果。冯俊涛等<sup>[32]</sup>利用枯草酸抑制辣椒疫的研究中发现其作用靶点可能为细胞膜和细胞壁。对于菌株 L-14 的作用机理, 我们将

在进一步的实验中通过更多的生物化学实验及分子生物学方法加以验证。

## REFERENCES

- [1] Chen XR, Nan ZB, Yang CD, et al. Morphological and biological characteristics of three *Bipolaris* species isolated from grasses in Huanxian grassland, Gansu province[J]. Acta Prataclturae Sinica, 2003, 12(6): 86-92 (in Chinese)  
陈秀蓉, 南志标, 杨成德, 等. 3 种牧草根际平脐蠕孢形态和生物学特性[J]. 草业学报, 2003, 12(6): 86-92
- [2] Deng H. Taxonomic studies of the Genus *Bipolaris* Shoemaker (Hyphomycetes) in China[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2002 (in Chinese)  
邓晖. 中国平脐里里蠕孢属(*Bipolaris* Shoemaker)的分类研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2002
- [3] Guo YJ. Phylogenetic analysis of the Genera *Bipolaris* and *Curvularia* in China[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016 (in Chinese)  
郭玉杰. 中国平脐蠕孢属和弯孢属真菌分子系统学研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2016
- [4] Kuan CS, Yew SM, Toh YF, et al. Dissecting the fungal biology of *Bipolaris papendorfii*: from phylogenetic to comparative genomic analysis[J]. DNA Research, 2015, 22(3): 219-232
- [5] Sun Y, Liu B. Current status of biological control of corn diseases in China[J]. Henan Agriculture, 2016(26): 28 (in Chinese)  
孙艳, 刘蓓. 我国玉米病害的生物防治现状[J]. 河南农业, 2016(26): 28
- [6] Li FH, Ye HZ, Wang YT, et al. The research progress of maize curvularia leaf spot disease[J]. Journal of Maize Sciences, 2004, 12(2): 97-101,107 (in Chinese)  
李富华, 叶华智, 王玉涛, 等. 玉米弯孢叶斑病的研究进展[J]. 玉米科学, 2004, 12(2): 97-101,107
- [7] Chang XM, Che ZQ, Gao JY. Research progress on prevent corn major diseases and insect pests using variety resistance[J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010(2): 92-93 (in Chinese)  
常雪梅, 车兆秋, 高俊杨. 利用品种抗性防治玉米主要病虫害的研究进展[J]. 现代农业科技, 2010(2): 92-93
- [8] Ma BC. Functional analysis of *Clg2p*, a Ras protein gene of *Curvularia lunata*[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2014 (in Chinese)  
马炳辰. 玉米弯孢叶斑病菌 Ras 同源蛋白 *Clg2p* 基因的功能研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2014
- [9] Chen J, Yan HH, Gao ZG, et al. Identification techniques for physiological differentiation of *Curvularia lunata* in maize[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2003, 33(2): 121-125 (in Chinese)  
陈捷, 鄢洪海, 高增贵, 等. 玉米弯孢叶斑病菌生理分化及鉴定技术[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 121-125
- [10] Gu YF, Zhang YF, Zhang XP. Isolation and identification of one anti-*Rhizoctonia solani* endophytic bacteria strain from corn and its antagonism and promoting research[J]. Microbiology China, 2008, 35(8): 1240-1245 (in Chinese)  
辜运富, 张云飞, 张小平. 一株抗玉米纹枯病内生细菌的分离鉴定及其抗病促生作用[J]. 微生物学通报, 2008, 35(8): 1240-1245
- [11] Chen MY, Xia YG, Chen WX. Occurrence and control of maize curvularia leaf spot disease[J]. Journal of Henan Agricultural Science, 2000(7): 19-20 (in Chinese)  
陈梅英, 夏瑛光, 陈万先. 玉米弯孢菌叶斑病的发生与防治[J]. 河南农业科学, 2000(7): 19-20
- [12] Guo YJ, Niu YC, Deng H. *Bipolaris* and *Curvularia* species associated with corn leaf spot in northern China[J]. Plant Protection, 2016, 42(5): 39-46 (in Chinese)  
郭玉杰, 牛永春, 邓晖. 我国北方玉米上平脐蠕孢属和弯孢属真菌及其所致叶斑病[J]. 植物保护, 2016, 42(5): 39-46
- [13] Zhao XL, Niu YC, Deng H. A survey of pathogenic fungi on five common gramineous weeds in Henan Province[J]. Plant Protection, 2013, 39(1): 128-132,140 (in Chinese)  
赵杏利, 牛永春, 邓晖. 河南省五种常见禾本科杂草病原真菌种类调查与部分菌株的致病性测定[J]. 植物保护, 2013, 39(1): 128-132,140
- [14] Geng RM, Zhang JP, Yu LQ. Isolation, identification and herbicidal activity of *Bipolaris* sp. and its safety on crops[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2008, 20(6): 446-450 (in Chinese)  
耿锐梅, 张建萍, 余柳青. 稻平脐蠕孢的分离、鉴定及对作物的安全性[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(6): 446-450
- [15] Zhao XL, Hu ZJ, Song P, et al. Pathogenic fungi on *Avena fatua* L. in wheat field of Henan Province[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(15): 166-170 (in Chinese)  
赵杏利, 胡镇杰, 宋鹏, 等. 河南麦田野燕麦病原真菌资源调查及致病性测定[J]. 中国农学通报, 2016, 32(15): 166-170
- [16] Wang GH, Raaijmakers JM. Antibiotics production by bacterial agents and its role in biological control[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2004, 15(6): 1100-1104 (in Chinese)  
王光华, Raaijmakers JM. 生防细菌产生的拮抗物质及其在生物防治中的作用[J]. 应用生态学报, 2004, 15(6): 1100-1104

- [17] Li JZ, Wen CY. Research progress on bacteria for biological control of plant disease[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2015, 44(10): 1-7 (in Chinese)  
李俊州, 文才艺. 植物病害生防细菌研究进展[J]. 河南农业科学, 2015, 44(10): 1-7
- [18] Yang XR, Liu SF, Sun SQ, et al. Research development on preventing soil-borne disease with anti-bacteria[J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2008, 14(4): 38-42 (in Chinese)  
杨秀荣, 刘水芳, 孙淑琴, 等. 生防细菌防治土传病害的研究进展[J]. 天津农业科学, 2008, 14(4): 38-42
- [19] An X. Pesticide-degradation characteristics and degradation mechanism of biocontrol bacteria[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Normal University, 2010 (in Chinese)  
安霞. 生防细菌的农药降解特性及其降解机制的研究[D]. 济南: 山东师范大学硕士学位论文, 2010
- [20] Xu YJ, Liu HL, Liu XJ, et al. Advance in research of the bacteria biological control for plant diseases[J]. Soybean Science & Technology, 2011(5): 18-22,34 (in Chinese)  
许彦君, 刘海龙, 刘新晶, 等. 细菌对植物病害生物防治研究进展[J]. 大豆科技, 2011(5): 18-22,34
- [21] Luo WF. Screening of biocontrol strain to *Rhizoctonia solani* and preliminary research on the mechanisms[D]. Shenyang: Master's Thesis of Shenyang Agricultural University, 2018 (in Chinese)  
罗文芳. 水稻纹枯病生防菌的筛选与作用机制的初步研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文, 2018
- [22] Qiu FB, Li YJ, Zhang XX, et al. Identification and antibiotic activity of endophytic bacterium strain ge21 from ginseng root[J]. Microbiology China, 2010, 37(1): 43-47 (in Chinese)  
邱服斌, 李雁津, 张晓霞, 等. 人参内生细菌 ge21 菌株的鉴定及抑菌活性测定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(1): 43-47
- [23] Dong XZ, Cai MY. Manual of System Identification of Common Bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001 (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
- [24] Kim SB, Yoon JH, Kim HG, et al. A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomonospora* conducted with 16S rRNA gene sequences[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1995, 45(2): 351-356
- [25] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425
- [26] Yao ZS, Chen ZY, Chen ZY, et al. Genetically marking of natural biocontrol bacterium *Bacillus subtilis* strains with green fluorescent protein gene[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2003, 19(5): 551-555 (in Chinese)  
姚震声, 陈中义, 陈志谊, 等. 绿色荧光蛋白基因标记野生型生防枯草芽孢杆菌的研究[J]. 生物工程学报, 2003, 19(5): 551-555
- [27] Qiu YX. Study on screening, identification and effect of efficient antagonistic bacteria against *Botrytis cinerea*[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei Normal University, 2012 (in Chinese)  
仇艳肖. 黄瓜灰霉病高效拮抗菌的筛选鉴定及其作用研究[D]. 石家庄: 河北师范大学硕士学位论文, 2012
- [28] Kong J, Zhao BG, Wang WX, et al. On the inhibitory action of *Bacillus subtilis* B-903 strain's antifungal substance on plant pathogenic fungi[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1995, 25(1): 69-72 (in Chinese)  
孔建, 赵白鸽, 王文夕, 等. 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* (Cohen)) B-903 菌株抗菌物质对植物病原真菌的抑制作用[J]. 植物病理学报, 1995, 25(1): 69-72
- [29] Zhai RH, Shang YK, Liu F, et al. Characteristics and inhibitory action of antifungal protein produced by *Bacillus subtilis* strain G8[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 34(6): 592-596 (in Chinese)  
翟茹环, 尚玉珂, 刘峰, 等. 枯草芽孢杆菌 G8 抗菌蛋白的理化性质和抑菌作用[J]. 植物保护学报, 2007, 34(6): 592-596
- [30] Xing JS, Li R, Zhao L, et al. Purification, characterization and antagonism of an extracellular protease *Bacillus subtilis* strain T2[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2008, 37(4): 377-381 (in Chinese)  
邢介帅, 李然, 赵蕾, 等. 生防芽孢杆菌 T2 胞外蛋白酶的纯化及其抗真菌作用[J]. 植物病理学报, 2008, 37(4): 377-381
- [31] Deleu M, Paquot M, Nylander T. Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes[J]. Biophysical Journal, 2008, 94(7): 2667-2679
- [32] Feng JT, Han LR, Fan RJ, et al. Effects of cuminic acid on the growth and development of *Phytophthora capsici* leonian[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(13): 2628-2635 (in Chinese)  
冯俊涛, 韩立荣, 范瑞娟, 等. 枯茗酸对辣椒疫霉菌生长发育的影响[J]. 中国农业科学, 2012, 45(13): 2628-2635