

枯草芽胞杆菌发酵液对苹果树腐烂病的防治效果

翟世玉^{1,2,3}, 殷 辉^{1,3}, 周建波^{1,3}, 吕 红^{1,3},
常芳娟^{1,3}, 韩巨才², 赵晓军^{1,3*}

(1. 山西省农业科学院植物保护研究所, 太原 030031; 2. 山西农业大学农学院, 太谷 030801;
3. 农业有害生物综合治理山西省重点实验室, 太原 030031)

摘要 为明确来自苹果树上的 1 株生防菌 LF17 对腐烂病菌的抑制作用及其发酵液对腐烂病的防治效果, 采用形态学结合 16S rDNA 和 *gyrA* 基因序列分析对菌株 LF17 进行了鉴定, 并通过滤纸法测定了发酵液对腐烂病菌的抑制率, 利用涂抹发酵液的方法测定了发酵液对腐烂病的防效。结果表明, 菌株 LF17 发酵液对腐烂病菌的抑菌率为 93.80%, 与甲基硫菌灵(94.20%)抑菌率相当, 显著高于噻菌酯(42.60%)、辛菌胺(52.80%)和苯醚甲环唑(81.30%); 离体枝条防治结果表明, 发酵液水剂和膏剂对腐烂病的防效为 78.59%~80.40%, 与甲基硫菌灵(76.93%)相比差异不显著, 与噻菌酯(44.15%)、辛菌胺(68.25%)、苯醚甲环唑(74.45%)相比差异显著; 田间试验表明, 涂有发酵液的伤口愈合面积为 9.37~9.79 cm², 病疤复发率为 3.82%~4.56%, 与其他 4 种药剂相比差异显著。研究表明菌株 LF17 发酵液对腐烂病菌有明显抑制作用, 且可促进伤口的愈合并显著降低腐烂病的复发。

关键词 苹果树腐烂病; 枯草芽胞杆菌; 发酵液; 抑菌率; 防治效果

中图分类号: S 436.611.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018376

Control efficacy of *Bacillus subtilis* fermentation broth against apple *Valsa* canker

ZHAI Shiyu^{1,2,3}, YIN Hui^{1,3}, ZHOU Jianbo^{1,3}, LÜ Hong^{1,3},
CHANG Fangjuan^{1,3}, HAN Jucal², ZHAO Xiaojun^{1,3}

(1. Institute of Plant Protection, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;
2. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;
3. Shanxi Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture, Taiyuan 030031, China)

Abstract The objective is to define the inhibitory effect of a strain LF17 isolated from apple trees and the control efficacy of the fermentation broth against the apple *Valsa* canker. Based on the morphological characteristics, 16S rDNA and *gyrA* sequence analysis, the strain LF17 was defined as *Bacillus subtilis*. The inhibition rate and control efficacy of fermentation broth on *V. mali* was tested by filter paper method and daubing fermentation broth, respectively. The results showed that the inhibition rate of fermentation broth against *V. mali* was 93.80%, which was similar to that of thiophanate-methyl (94.20%), but significantly higher than those of azoxystrobin (42.60%), xinjuna (52.80%) and difenoconazole (81.30%). Control efficacy test on excised twigs showed that the inhibition rate of fermentation broth against apple *Valsa* canker was 78.59%–80.4%, which was no obvious difference with that of thiophanate-methyl (76.93%), but significantly different from those of azoxystrobin (44.15%), xinjuna (68.25%) and difenoconazole (74.45%). Field experiment showed that the healing area of fermentation broth was 9.37–9.79 cm², and the recurrence rate of apple *Valsa* canker was 3.82%–4.56%, which was significantly higher than chemicals. The results indicated that the fermentation broth of LF17 had a significant inhibitory effect on *V. mali*. It can effectively stimulate the wound healing and remarkably reduce the recurrence of apple *Valsa* canker.

Key words apple *Valsa* canker; *Bacillus subtilis*; fermentation broth; inhibition rate; control efficacy

收稿日期: 2018-08-31 修订日期: 2018-10-22

基金项目: 山西省重点研发计划(201603D221013-3); 山西省应用基础研究计划青年基金(201601D202073); 山西省农业科学院优势课题组自选项目(YYS1716)

* 通信作者 E-mail: zhaoxiaojun0218@163.com

苹果树腐烂病(apple *Valsa* canker)是对我国苹果危害范围非常广的毁灭性病害之一,该病由黑腐皮壳属 *Valsa* spp. 真菌引起,导致苹果枝干发病,严重制约着苹果产业的发展^[1-2]。在很长一段时间内,生产上主要依靠化学药剂防治苹果树腐烂病,致使果园生态环境恶化,且出现腐烂病菌的抗药性菌株^[3-4]。现阶段生物防治苹果树腐烂病是国内外学者研究的焦点。

郜佐鹏等^[5]、邓振山等^[6]、徐涛等^[7]、蔡光华等^[8]和王彩霞等^[9]从土壤、苹果树及其他植物中筛选出的放线菌、真菌、细菌 PG-10-8-11v、微嗜酸寡氧单胞菌等对苹果树腐烂病菌有较好的抑制作用。在苹果树腐烂病菌的拮抗菌中,芽胞杆菌是被筛选鉴定较多的类群^[10-12];其中短小芽胞杆菌 *Bacillus pumilus*^[13]、解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*^[14]、枯草芽胞杆菌 *B. subtilis*^[15]对腐烂病菌都有较好的抑制作用。目前,国内外研究者主要侧重芽胞杆菌的筛选鉴定和其对腐烂病菌的抑菌作用^[16-17]。关于枯草芽胞杆菌防治腐烂病的田间研究较少。2015 年,Zhang 等通过田间试验发现解淀粉芽胞杆菌对腐烂病有较好的防控效果^[14]。

生产中有少量商品化的芽胞杆菌生物制剂用于防治腐烂病^[18]。较为成功的产品是以枯草芽胞杆菌(Bs-0728)为主要菌群研发的菌肥木美土里,根施该菌肥可提高苹果树的抗病性、显著降低腐烂病的发病率;使用菌泥治疗腐烂病,其对伤口愈合有良好的促进作用^[19]。枯草芽胞杆菌已经显示出作为腐烂病生防菌的巨大潜力^[20-23]。本研究对菌株 LF17 进行了鉴定,并进行了其对苹果腐烂病菌抑制率测定及对苹果枝条腐烂病的防治效果试验,以期探索该生防菌株对腐烂病的防控效果以及对伤口愈伤组织形成的作用,为腐烂病的生物防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:本研究选取对腐烂病菌抑制效果较好的代表性菌株 LF17 进行系统研究,菌株从山西省苹果产区临汾市苹果园的树枝干上分离获得;苹果树腐烂病菌 *Valsa mali* 菌株编号 YC90,由山西省农业科学院植物保护研究所植物病害研究室保存。

本研究供试培养基、化学药剂及发酵液见表 1。

表 1 供试培养基、化学药剂及发酵液

Table 1 Medium, chemicals and fermentation broth

材料 Material	序号 Serial number	名称 Name	成分 Composition	厂家信息 Manufacturer information
培养基 Medium	—	PDA 培养基	参考张瑾 ^[24]	—
	—	NA 培养基	参考方中达 ^[25]	—
	A	NB 培养基	参考杨华 ^[26]	—
化学药剂 Chemical	B	噻菌酯原药	98.00 %	山东西亚化学工业有限公司
	C	辛菌胺原药	99.99 %	金锦乐化学有限公司
	D	苯醚甲环唑原药	98.00 %	杭州大阳化工有限公司
	E	甲基硫菌灵原药	99.00 %	山东西亚化学工业有限公司
	F	发酵液膏剂	—	—
发酵液 Fermentation broth	G	发酵液	—	—
	H	发酵液水剂	—	—

1.2 方法

1.2.1 拮抗菌的分离及鉴定

采用划线法分离菌株,28℃ 培养 20 h 挑取单菌落。纯化后的菌株 28℃ 培养 3 d,记录菌落形态,4℃ 保存备用。参考王卫雄等利用 16S rDNA^[15]和 *gyrA* 序列结合菌株的形态特征进行鉴定。

1.2.2 芽胞染色

挑取单菌落,涂片经火焰固定后滴加 5%孔雀绿水溶液加热 30~60 s 使其产生蒸汽 4 次,水洗至

无色,0.5%番红水溶液复染 2 min,水洗至无色,待载玻片晾干后油镜镜检^[27]。

1.2.3 发酵液和 4 种化学药剂对腐烂病菌的抑制作用

采用对峙法^[28]筛选获得 1 株拮抗菌 LF17,活化 LF17 后接种于 NB 培养基,150 r/min、28℃ 培养 3 d 获得发酵液,4℃ 保存备用。采用滤纸法^[29]测定发酵液原液的抑菌率,将直径为 1.00 cm 无菌滤纸片放入发酵液和无菌水中浸泡 2 h 后取出,置于无菌超净工作台吹干。在 PDA 培养基平板中间接种

直径为 0.50 cm 的腐烂病菌菌饼,再将浸泡过发酵液的滤纸片放到平板边缘距中心 2.50 cm 处,每皿对称放 4 片,重复 3 次,无菌水处理为对照,于 28℃ 培养,待对照平板长满菌丝后测量菌落直径,计算抑菌率。对峙培养的培养皿中距离腐烂病菌菌饼 0.50 cm 处插入盖玻片,培养 7 d 后观察腐烂病菌菌落、菌丝等的变化。

采用菌丝生长速率法测定 4 种化学药剂对腐烂病菌菌丝生长的影响,含药培养基制备参考周建波等^[30]的方法。置于 28℃ 下培养,以只接种腐烂病菌病原菌的平板为对照,每处理 3 次重复。待对照平板上长满菌丝后测量菌落直径。抑菌率计算方法参考邓振山等^[6]。

$$\text{抑菌率} = \frac{(\text{对照组菌落直径} - \text{处理组菌落直径})}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\%。$$

1.2.4 LF17 发酵液和化学药剂对离体枝条抑菌活性测定

将原发酵液加入吐温 80 制成水剂,吐温 80 的含量为溶液质量的 2%,装瓶备用;将原发酵液每 100 mL 加入 9 g 黄原胶,制成黄原胶含量为 0.6% 的膏剂,装瓶备用。水剂和膏剂中的芽胞含量为 10^8 cfu/mL。

参考臧睿等^[31]的烫伤接种法,选取 2 年生背上枝,截成 120 cm 作为接种材料,端口封蜡、自来水冲洗 2 次后,用 75% 乙醇表面消毒,无菌水冲洗 3 次。用铁钉冒(直径为 0.50 cm)烫伤树皮,每个枝条 5 个烫伤口、相距 20.00 cm,4 个伤口接腐烂病菌,1 个为对照;每个处理接种 3 个枝条。在接种部位上方 1~2 cm 处加一块无菌水浸湿的脱脂棉,用塑料薄膜将其和接种体包扎好。接种后将枝条扦插于含水量约 40% 的无菌细沙中,在温度 25℃、相对湿度约 40% 条件下培养。

待伤口扩展后,挑选病斑扩展长度为 (1.00 ± 0.30) cm 的枝条进行离体枝条腐烂病菌抑菌试验。用小刀在病斑处刻线,深至木质部。纵横交错,距离约 0.50 cm。将伤口刻好线后,用毛笔在烫伤部位涂抹发酵液、发酵液膏剂、发酵液水剂及 4 种化学药剂(厂家推荐剂量),NB 培养基作为对照。处理后的枝条插入含水量约 40% 的无菌细沙中,于 25℃ 保湿培养 10 d,观察记录枝条的发病情况,测量病斑长度,计算防治效果、试验重复 3 次。

防治效果 =

$$\frac{(\text{对照组病斑长度} - \text{处理组病斑长度})}{\text{对照组病斑长度}} \times 100\%。$$

1.2.5 LF17 发酵液和化学药剂对苹果腐烂病的田间防效试验

2016 年的 3 月进行田间防治试验。首先对病组

织进行刮治,刮治时彻底刮除病组织、深至木质部,四周外延 0.50 cm,尽量使刮治伤口纵长、横窄,切面光滑。刮除病组织后,分别涂抹上述配制好的发酵液、发酵液膏剂、发酵液水剂及 4 种化学药剂(厂家推荐剂量)使其完全覆盖刮治后的伤口并外延 1.50 cm,处理后每隔 10 d 再涂 1 次,共 3 次。以 NB 培养基作为对照,每个处理 20 个病疤,3 个月后测量伤口愈合面积,次年 3 月调查病疤复发情况。愈合面积采用坐标纸法^[32],用一张纸在伤口总面积部位外围和内部未愈合部位外围画外围线,然后把两个周线描绘在单个方格为 1 cm^2 的坐标纸上,计算愈合面积。病疤复发率计算参考曹欣然等^[33],公式如下。

$$\text{病疤复发率} = \frac{\text{病疤累计复发病块数}}{\text{调查病疤总块数}} \times 100\%。$$

1.3 数据处理

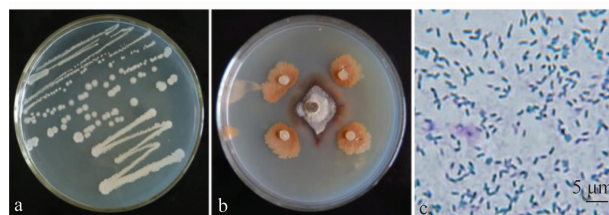
采用 Excel 2003 进行图表数据处理,并采用 SPSS 17.0 软件进行差异显著性分析($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌鉴定

2.1.1 拮抗菌形态学特征

菌株 LF17 在 28℃ 下培养 3 d 可出现明显菌落,其形状不规则、初期白色,后期为黄褐色、中央略突起、不透明、表面粗糙,产芽胞,镜检芽胞呈椭圆形或杆状(图 1)。



a: 培养初期的菌落特征; b: 培养后期的菌落特征; c: 显微形态特征
a: Colony characteristics of strain LF17 in early culture stage; b: Colony characteristics of strain LF17 in late culture; c: Micro-morphology of strain LF17

图 1 菌株 LF17 的形态特征

Fig. 1 Morphological characteristics of isolate LF17

2.1.2 基于 16S rDNA 和 *gyrA* 基因序列系统发育分析

利用 16S rDNA 序列,以 *B. licheniformis* 为外类群构建系统发育树。分离菌株 LF17 和 *B. subtilis* (JQ 361067、KF496886、GU722647 等)以 98% 自展支持率聚为同一个分支(图 2),表明其与 *B. subtilis* 的亲缘关系较近。

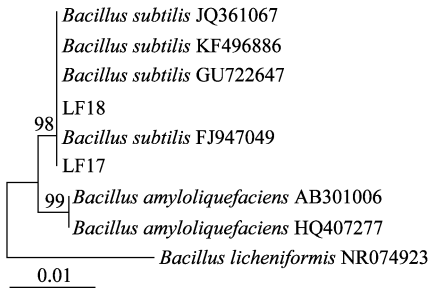


图 2 依据 16S rDNA 序列构建的菌株 LF17 与相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of stain LF17 and related strains based on 16S rDNA sequence

利用 *gyrA* 基因序列,以 *B. licheniformis* 为外类群构建系统发育树。分离菌株 LF17 和 *B. subtilis*(JX 977128、JX 977131、JX 977130 等)以 100% 自展支持率聚为同一个分支(图 3),表明其与 *B. subtilis* 的亲缘关系较近。结合形态学特征、16S rDNA 和 *gyrA* 基因序列分析结果,将菌株 LF17 鉴定为 *B. subtilis*。

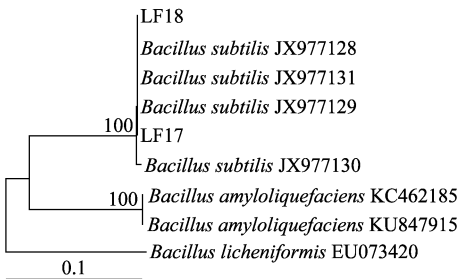


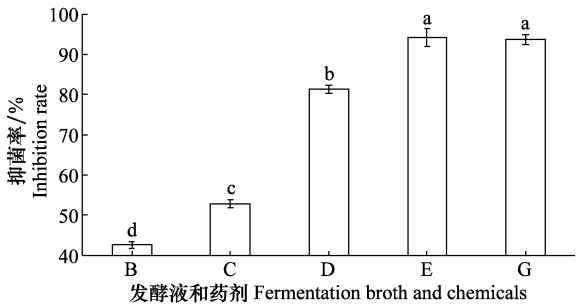
图 3 依据 *gyrA* 序列构建的菌株 LF17 与相关菌株的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree of stain LF17 and related strains based on *gyrA* sequence

2.2 发酵液与 4 种化学药剂的抑菌效果及对腐烂病菌菌丝形态的影响

供试 4 种化学药剂对腐烂病菌(菌株 YC90)的抑菌率范围为 42.60%~94.20%,其中苯醚甲环唑和甲基硫菌灵的抑菌率较高,分别为 81.30%和 94.20%、二者差异显著;噻菌酯和辛菌胺抑菌率较低,二者差异显著;菌株 LF17 发酵液的抑菌率为 93.80%,和甲基硫菌灵对腐烂病菌的抑菌率相当、二者差异不显著,发酵液与噻菌酯、辛菌胺、苯醚甲环唑 3 种药剂相比差异显著(图 4)。

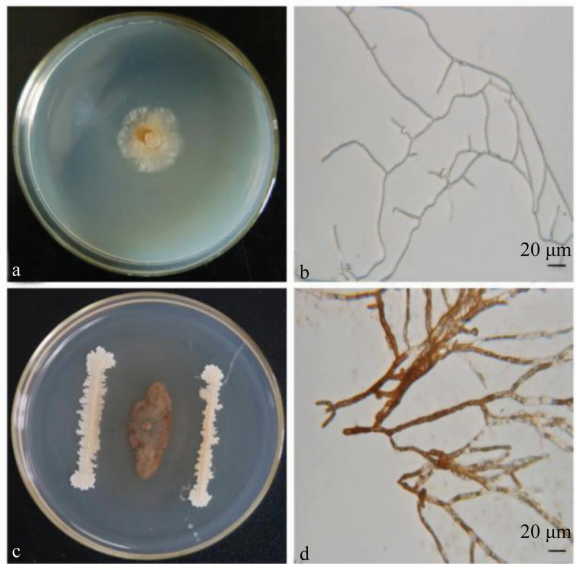
腐烂病菌与菌株 LF17 对峙培养 7 d 后,相比对照腐烂病菌落呈深褐色;菌丝为褐色、顶端膨大、粗细不均匀、分支增多,部分菌丝细胞质外渗(图 5)。



发酵液和药剂 Fermentation broth and chemicals
B: 噻菌酯; C: 辛菌胺; D: 苯醚甲环唑; E: 甲基硫菌灵; G: 发酵液
B: azoxystrobin; C: xinjunan; D: difenoconazole; E: thiophanate-methyl; G: Fermentation broth

图 4 发酵液及 4 种化学药剂对腐烂病菌抑制效果

Fig. 4 Inhibitory effect of fermentation broth and chemicals on *Valsa mali*



a: 腐烂病菌的菌落; b: 腐烂病菌的菌丝; c: 对峙培养后的菌落; d: 被抑制的腐烂病菌菌丝

a: Colony of *V. mali*; b: Mycelium of *V. mali*; c: Colony after the confront culture; d: The inhibited hyphae of *V. mali*

图 5 菌株 LF17 对苹果树腐烂病菌的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effect of strain LF17 on *Valsa mali*

2.3 LF17 发酵液和化学药剂对离体枝条的防治效果

供试 4 种化学药剂对腐烂病防治效果为 44.15%~76.93%、病疤平均长度范围为 2.23~5.40 cm,其中苯醚甲环唑和甲基硫菌灵对腐烂病的防效较好,分别为 74.45%和 76.93%、二者差异不显著;噻菌酯和辛菌胺防效较低,二者差异显著。

发酵液和辛菌胺对腐烂病病疤的防效分别为 71.76%和 68.25%,二者差异显著;发酵液膏剂、水剂对腐烂病的防治效果最好,分别为 78.59%和 80.04%,二者差异不显著,与甲基硫菌灵相比差异不显著,与其他 3 种药剂相比差异均显著,病疤平均长度分别为 2.07 cm 和 1.93 cm,二者差异不显著,与甲基硫

菌灵相比差异不显著,与其他 3 种药剂相比差异均显著(图 6)。

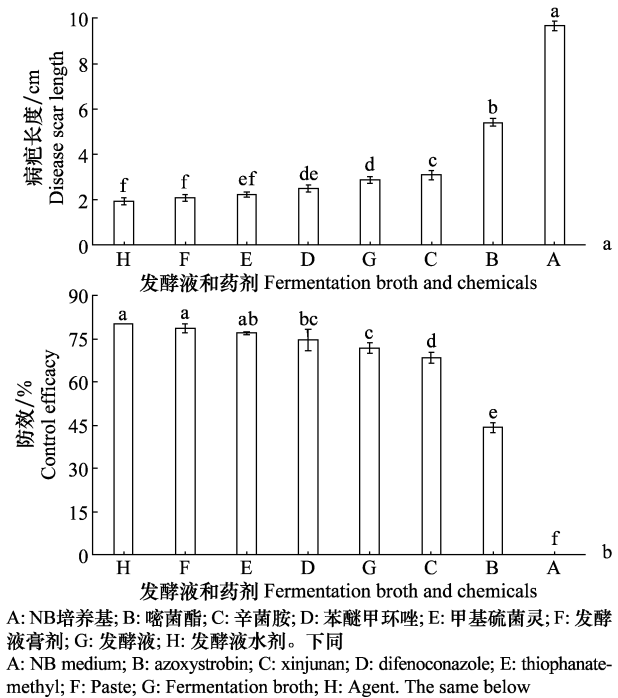


图 6 发酵液和化学药剂在苹果离体枝条上对腐烂病的防效

Fig. 6 Control efficacy of fermentation broth and chemicals on excised apple twigs inoculated with *Valsa mali*

2.4 LF17 发酵液和化学药剂对苹果腐烂病的田间防治效果

使用 4 种化学药剂后腐烂病复发率为 8.83%~27.92%、病疤愈合面积为 4.96~6.63 cm²,其中

甲基硫菌灵防治腐烂病后复发率为 8.83%,显著低于其他 3 种药剂处理的复发率;啞菌酯和辛菌胺复发率较高,分别为 27.92%和 21.31%,二者差异显著。

发酵液、发酵液膏剂、发酵液水剂防治腐烂病后复发率较低,均在 4.50%以下,显著低于 4 种化学药剂的复发率;涂抹发酵液的伤口愈合面积均在 9.00 cm² 以上,其中涂抹发酵液膏剂的伤口愈合效果最好,达到 9.79 cm²,发酵液和发酵液水剂处理的伤口愈合面积分别为 9.23 cm² 和 9.37 cm²,二者差异不显著(图 7~8)。

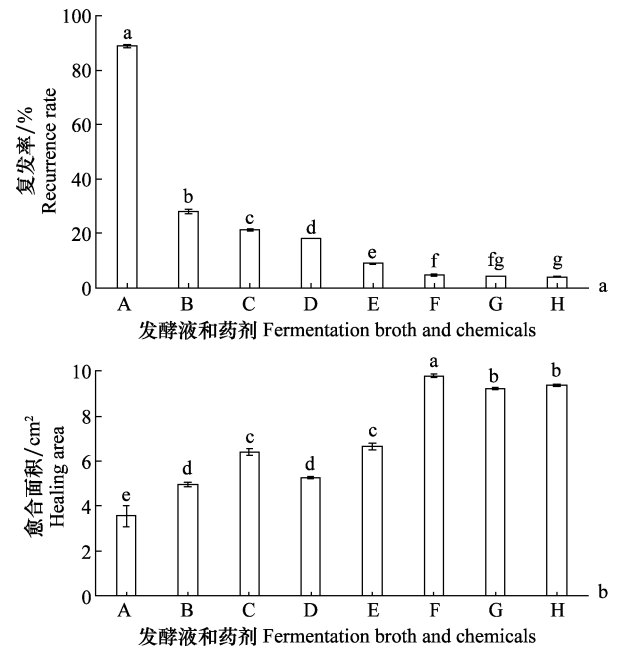


图 7 发酵液田间防治效果

Fig. 7 Field biocontrol effects of fermentation broth



a: NB培养基; b: 啞菌酯; c: 辛菌胺; d: 苯醚甲环唑; e: 甲基硫菌灵; f: 发酵液膏剂; g: 发酵液; h: 发酵液水剂
a: NB medium; b: azoxystrobin; c: xinjunan; d: difenoconazole; e: thiophanate-methyl; f: Paste; g: Fermentation broth; h: Agent

图 8 LF17 发酵液和化学药剂田间防治效果比较

Fig. 8 Comparison of field control effects between LF17 fermentation broth and chemicals

3 结论与讨论

枯草芽胞杆菌天然存在于自然界, 其中很多菌株具有防病及促生作用, 被广泛地开发应用^[34]。本试验筛选、鉴定来自苹果树皮上 1 株对腐烂病菌抑菌率高的枯草芽胞杆菌, 经离体枝条和田间试验表明其发酵液可有效防治苹果树腐烂病。拮抗细菌对真菌的主要作用是抑制分生孢子的萌发和菌丝生长^[35-36], 这也与本研究结果一致。菌株 LF17 发酵液显著抑制腐烂病菌菌丝生长, 效果较好, 可有效防治腐烂病, 具有生防应用意义。

生产中主要采用刮治并涂抹化学药剂防治苹果树腐烂病。本研究供试的 4 种化学药剂在室内均表现出较高的抑菌活性, 然而田间试验发现刮治并涂抹化学药剂后伤口愈合能力差, 长期裸露易滋生病菌, 病疤复发率高。

本试验使用刮治并涂抹生防菌发酵液防治苹果树腐烂病, 表明可促进伤口的愈合并显著降低腐烂病的复发。枯草芽胞杆菌发酵液中含有能促进伤口愈合的物质, 伤口部位被愈伤组织完全封闭, 能有效阻止腐烂病的复发^[36]。通过试验发现, 发酵液的田间防效好于化学药剂。因此, 在果树休眠期采用伤口刮治结合涂抹生防菌剂的方法是理想的防治手段。此外, 因为吐温可使不溶或难溶的液体形成稳定的乳浊液, 所以有助于发酵液渗透到树皮下有效与病原菌接触, 提高防治效果^[37]; 黄原胶起到乳化、稳定、凝胶增稠的作用, 使得发酵液膏剂不容易蒸发, 耐雨水冲洗^[38], 有助于发酵液在伤口处定殖进而抑制腐烂病菌。

参考文献

- [1] 陈策. 苹果树腐烂病发生规律和防治研究[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 9-17.
- [2] 陈策, 李美娜, 史秀琴, 等. 苹果树腐烂病(*Valsa mali* Miyabe et Yamada) 侵染时期研究[J]. 植物病理学报, 1987, 17(2): 65-68.
- [3] 殷辉, 周建波, 张志斌, 等. 山西省苹果树腐烂病菌的种群结构分析[J]. 菌物学报, 2016, 35(12): 1493-1502.
- [4] 曹克强, 国立耘, 李保华, 等. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查[J]. 植物保护, 2009, 35(2): 114-117.
- [5] 邵佐鹏, 柯希望, 韦洁玲, 等. 七株植物内生放线菌对苹果树腐烂病的防治作用[J]. 植物保护学报, 2009, 36(5): 410-416.
- [6] 邓振山, 赵飞龙, 张薇薇, 等. 银杏内生真菌的分离及其对苹果腐烂病病原菌的拮抗作用[J]. 西北植物学报, 2009, 29(3): 608-613.
- [7] 徐涛, 胡同乐, 王亚南, 等. 苹果树皮内生真菌的分离及其对腐烂病的生物防治潜力[J]. 植物保护学报, 2012, 39(4): 327-333.

- [8] 蔡光华, 战峰, 王晓玲, 等. 苹果树腐烂病拮抗内生细菌 PG-10-8-11v 菌株抗菌物质的初步研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2011, 37(6): 946-949.
- [9] 王彩霞, 张清明, 李桂舫, 等. 苹果树腐烂病拮抗细菌菌株 BJ1 的鉴定及其抑菌作用[J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 431-437.
- [10] GAO S, WU H, WANG W, et al. Efficient colonization and harpins mediated enhancement in growth and biocontrol of wilt disease in tomato by *Bacillus subtilis* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2013, 57(6): 526-533.
- [11] CHEN Yun, YAN Fang, CHAI Yunrong, et al. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation [J]. Environmental Microbiology, 2013, 15(3): 848.
- [12] WANG Shuai, WU Huijun, QIAO Junqing, et al. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp. [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(10): 1250-1258.
- [13] 黄海东, 李晚雁, 杨红澎, 等. 龙胆内生菌的分离鉴定及其对苹果腐烂病菌的拮抗作用[J]. 食品工业科技, 2012, 33(6): 215-218.
- [14] ZHANG Junxiang, GU Yanbing, GHI Fumei, et al. *Bacillus amylolique faciens* GB1 can effectively control apple *Valsa* cancer [J]. Biological Control, 2015, 88(1): 1-7.
- [15] 王卫雄, 徐秉良, 薛应钰, 等. 苹果树腐烂病拮抗细菌鉴定及其抑菌作用效果测定[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(10): 1214-1221.
- [16] 李伟, 王金亭. 枯草芽胞杆菌与解磷细菌对苹果园土壤特性及果实品质的影响[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(3): 140-144.
- [17] 牛焕杰, 李辉, 王娜娜, 等. 苹果树腐烂病菌拮抗枯草芽胞杆菌 E1R-j 抗菌蛋白的分离纯化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(9): 135-142.
- [18] FRAVEL D R. Commercialization and implementation of biocontrol [J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 4(3): 337-359.
- [19] 胡清玉, 刘力伟, 刘欣, 等. 木美土里生物菌肥对苹果树腐烂病的防治作用评价[J]. 中国果树, 2015(4): 52-55.
- [20] COMPANT S, DUFFY B J, CLEMENT C, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4951-4959.
- [21] LUGTENBERG B, KAMILOVA F. Plant-growth-promoting rhizobacteria [J]. Annual Review of Microbiology, 2009, 63: 541-556.
- [22] 邓振山, 马亚茹, 何园, 等. 苹果树内生菌筛选及其对苹果腐烂病防治效果[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(8): 16-21.
- [23] 吴玉星, 纪明山, 周宗山, 等. 苹果树皮内生细菌 HFn3 的筛选及其对苹果树腐烂病的防治作用[J]. 中国果树, 2013(3): 33-35.
- [24] 张瑾, 张树武, 徐秉良, 等. 长枝木霉菌抑菌谱测定及抑菌作用机理研究[J]. 中国生态农业学报, 2014, 22(6): 661-667.
- [25] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [26] 杨华, 纪明山, 李广旭, 等. 不同发酵条件对苹果轮纹病拮抗细菌生长的影响[J]. 果树学报, 2007, 24(6): 799-802.
- [27] 陈敏. 微生物学实验[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2011.

- [3] 张怡, 马晓萌, 张佩佩, 等. 周口地区油菜白粉病病原的鉴定[J]. 植物保护, 2012, 38(3): 32-35.
- [4] 邵登奎. 油菜抗白粉病鉴定及相关的生理生化特性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2006.
- [5] 李永红, 李建厂, 任军荣, 等. 中国西北地区油菜茎象甲的消长与防治策略[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(4): 509-512.
- [6] 常瑞奇, 赵枢, 徐忠学, 等. 天水市麦积山油菜茎象甲的发生与防治[J]. 甘肃农业科技, 2007(2): 38-39.
- [7] 王凤葵, 王学让, 尚中发. 油菜茎象甲幼虫龄数的测定[J]. 西北农业大学学报, 1990, 18(3): 107-108.
- [8] 王海潮, 李鑫. 油菜茎象甲在汉中地区发生规律及防治初报[J]. 陕西农业科学, 1997(5): 23-25.
- [9] 李元林, 张和平, 谢贤元. 油菜茎象甲生物学特性和危害[J]. 中国油料, 1989, 11(4): 79-80.
- [10] 郑京海, 景福利. 油菜茎象甲的生物学特性及防治研究[J]. 甘肃农业科技, 2000(8): 38-39.
- [11] 王丽慧. 春油菜苗期主要害虫的防治及农药残留研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2010.
- [12] 杨素梅, 贾变桃, 白德刚, 等. 8种杀菌剂对油菜菌核病菌室内生物活性测定[J]. 山西农业大学学报(自然科学版), 2014, 34(1): 17-19.
- [13] 任利平. 咯菌腈等不同杀菌剂防治油菜菌核病试验初报[J]. 青海农林科技, 2009(2): 5-7.
- [14] 董晓亮, 杨博慧, 李海平, 等. 吡虫啉拌种对油菜生长及苗期害虫黄宽条跳甲的影响[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2017, 38(2): 7-12.
- [15] 孙玉萍, 张跃. 35%噻虫嗪悬浮种衣剂防治油菜黄曲跳甲药效试验[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(20): 62-63.
- [16] 农业部农药检定所. 农药田间药效试验准则(一): GB/T 1798022-2000 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2000.
- [17] 张建芬, 来有鹏. 不同农药对油菜跳甲和茎象甲的防治效果[J]. 北方园艺, 2012(1): 142-143.
- [18] 闵祥芬, 李圣. 70%噻虫嗪种子处理可分散粉剂不同药种比拌种对油菜生长指标的影响[J]. 中国农药, 2017(8): 69-71.
- [19] 黄亮. 吡虫啉种衣剂包衣处理对油菜种子萌发及苗期害虫发生的影响研究[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2016.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 231 页)

- [28] 贾凤安, 陈亮, 陈立, 等. 大棚甜瓜三种主要真菌病害拮抗细菌的筛选与鉴定[J]. 植物保护学报, 2010, 37(6): 505-510.
- [29] 黄霄, 陈波, 周登博, 等. 菌株 BM-24 的分离鉴定及对香蕉枯萎病菌的抑菌活性[J]. 植物保护学报, 2013, 40(2): 121-127.
- [30] 周建波, 任璐, 殷辉, 等. 苹果树腐烂病菌对甲基硫菌灵、苯醚甲环唑和啉菌酯的敏感性及其交互抗性[J]. 农药, 2016, 55(11): 854-858.
- [31] 臧睿, 黄丽丽, 康振生, 等. 陕西苹果树腐烂病菌 (*Cytospora* spp.) 不同分离株的生物学特性及致病性研究[J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 343-351.
- [32] 乔国彪. 青霉素防治苹果树腐烂病机理的研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2007.
- [33] 曹欣然, 邹宗峰, 田明英. 寡雄腐霉防治苹果树腐烂病试验[J]. 烟台果树, 2015(2): 12-14.
- [34] 乔俊卿, 罗德旭, 彭彪, 等. 枯草芽胞杆菌 PTS-394 可湿性粉剂对辣椒根际及根际微生态影响[J]. 中国生物防治学报, 2018, 34(2): 287-293.
- [35] 尹宝重, 刘博燕, 刘盼, 等. 苹果树皮内生菌对苹果树腐烂病的防治效果[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 84-86.
- [36] 胡小加, 江木兰, 刘胜毅, 等. 枯草芽胞杆菌在油菜根茎叶的定殖动态和生防作用研究[J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(1): 061-064.
- [37] 胡江冰, 孙洁, 钱坤, 等. 表面活性剂吐温-80 用量对硬质闭孔型三聚氰胺泡沫的影响[J]. 功能材料, 2017, 48(8): 8058-8062.
- [38] 黄振东, 占红木. 农用矿物油的应用之二 矿物油的作用机理及药效特点[J]. 江西农业, 2014(10): 71.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 241 页)

- [8] JAKUBSKI A W. A critical revision of the families Margarodidae and Termitococcidae (Hemiptera: Coccoidea) [M]. London: Trustees of the British museum (Natural history), 1965: 57-81.
- [9] 侯璋德, 孙元峰, 张异, 等. 新黑地珠蚧为害花生的初步研究[J]. 河南农业大学学报, 1985(1): 58-61.
- [10] VON DOHLEN C D, MORAN N A. Molecular phylogeny of the Homoptera: a paraphyletic taxon [J]. Journal of Molecular Evolution, 1995, 41: 211-223.
- [11] BELSHAW R, QUICKE D L J. A molecular phylogeny of the Aphidiinae (Hymenoptera: Braconidae) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1997, 7: 281-293.
- [12] DIETRICH C H, RAKITOV R A, HOLMES J L, et al. Phylogeny of the major lineages of Membracoidea (Insecta: Hemiptera: Cicadomorpha) based on 28S rDNA sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 18: 293-305.
- [13] CHO S, MITCHELL A, REGIER J C, et al. A highly conserved nuclear gene for low-level phylogenetics: elongation factor 1- α recovers morphology-based tree for heliothine moths [J]. Molecular Biology and Evolution, 1995, 12: 650-656.
- [14] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [15] YANG Ziheng. Estimating the pattern of nucleotide substitution [J]. Journal of Molecular Evolution, 1994, 39(1): 105-111.
- [16] 马铁山, 郝改莲, 赵香云, 等. 濮阳地区花生新黑地珠蚧生物学特性及化学防治方法[J]. 中国植保导刊, 2008, 28(3): 18-20.

(责任编辑: 杨明丽)