

引用格式:

贾孟媛, 王越洋, 唐培培, 周权, 吴俊林, 王小东, 孙会忠. 烟草黑胫病生防菌的筛选鉴定及其防效[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2023, 49(3): 329–334.

JIA M Y, WANG Y Y, TANG P P, ZHOU Q, WU J L, WANG X D, SUN H Z. Screening and identification of biocontrol bacteria for tobacco black shank disease and evaluation of the control effect[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2023, 49(3): 329–334.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



烟草黑胫病生防菌的筛选鉴定及其防效

贾孟媛¹, 王越洋¹, 唐培培², 周权², 吴俊林², 王小东¹, 孙会忠^{1*}

(1.河南科技大学农学院, 河南 洛阳 471023; 2.河南省烟草公司驻马店市公司, 河南 驻马店 463000)

摘要: 从毒鹅膏菌(*Amanita phalloides*)栖生土壤中分离筛选烟草疫霉(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)拮抗菌株, 通过盆栽试验考察拮抗菌株对烟草黑胫病的防效。结果表明: 从毒鹅膏菌栖生土壤中分离筛选的DE4-5菌株对烟草疫霉的抑菌率达 78.22%; DE4-5 具有广谱抗真菌活性; 依据 DE4-5 的形态和生化特征初步判断为假单胞菌属(*Pseudomonas*), 结合 16S rDNA 保守序列及辅助 *gyrA* 基因片段序列分析, 确定 DE4-5 为亚麻假单胞菌, 定名为 *Pseudomonas lini* DE4-5; 生物活性测定显示, 菌株 DE4-5 具有解磷和解钾能力, 产 IAA、蛋白酶、纤维素酶和脲酶; 盆栽试验结果表明, 菌株 DE4-5 预防组与治疗组的烟草黑胫病发病率分别为 24.79% 和 39.24%, 病情指数分别为 26.31% 和 29.37%, 防效分别达到 69.14% 和 63.98%。

关键词: 毒鹅膏菌; 栖生土壤; 烟草黑胫病; 亚麻假单胞菌; 防效

中图分类号: S435.72

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2023)03-0329-06

Screening and identification of biocontrol bacteria for tobacco black shank disease and evaluation of the control effect

JIA Mengyuan¹, WANG Yueyang¹, TANG Peipei², ZHOU Quan²,
WU Junlin², WANG Xiaodong¹, SUN Huizhong^{1*}

(1.College of Agriculture, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471023, China; 2.Henan Tobacco Company Zhumadian Branch, Zhumadian, Henan 463000, China)

Abstract: From habitat soil of *Amanita phalloides*, isolation and screening of bacteria strains against the *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* were conducted and pot experiment was used to investigate the control effect of the antagonistic bacteria strain against tobacco black shank. The findings demonstrated that, strain DE4-5 showed wide anti-fungi activity, and the inhibition rate of strain DE4-5 on *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* reached 78.22%. Based on morphological and biochemical characteristics, strain DE4-5 was initially determined to be *Pseudomonas*. Combined with the analysis of conserved sequence of 16S rDNA and the sequence of the auxiliary *gyrA* gene, strain DE4-5 was systematically assigned to the *Pseudomonas* flax genus and given the name *Pseudomonas lini* DE4-5. Bioactivity assay showed that strain DE4-5 could degenerate phosphorus and potassium. By resolving phosphorus and potassium, strain DE4-5 was able to produce IAA, protease, cellulase, and urease. Pot experiment showed that the incidence of tobacco black shank in prevention and treatment groups with strain DE4-5 were 24.79% and 39.24%, respectively; the disease index of tobacco black shank in prevention and treatment groups with strain DE4-5 were 26.31% and 29.37%,

收稿日期: 2022-10-24

修回日期: 2023-05-01

基金项目: 河南省科学技术厅农业攻关项目(212102110242); 河南省烟草公司驻马店市公司项目(2022411700270011)

作者简介: 贾孟媛(1998—), 女, 河南孟州人, 硕士研究生, 主要从事微生物资源开发与利用研究, mengyuanzui@163.com; *通信作者, 孙会忠, 博士, 副教授, 主要从事微生物资源开发与利用研究, huizhong66@163.com

respectively; and the control effect in prevention group and treatment group reached 69.14% and 63.98%, respectively.

Keywords: *Amanita phalloides*; habitat soil; tobacco black shank; *Pseudomonas lini*; biocontrol effect

烟草黑胫病的病原为烟草疫霉(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*), 其典型症状是在烟草植株根茎部出现凹陷病斑, 后期变成黑斑^[1-2]。目前防治烟草黑胫病仍然主要依赖化学药剂, 但长期使用后出现的农药残留、环境污染、抗药性增强等弊端成为生产中的新问题^[3-5]。

生物防治被认为是针对化学防治最具潜力的替代技术。陆新莉等^[6]从烟草根际土壤筛选得到芽孢杆菌属菌株 YWGJ07, 其对烟草黑胫病在不同浓度灌根处理的田间防效均优于对照组, 病指防效分别为 38.5%、41.1%和 61.1%。杨艺炜等^[7]从烟草根际土壤筛选得到绿针假单胞菌 XF10, 其对烟草黑胫病菌丝的平均抑制率为 80.73%。常栋等^[8]从烟株茎秆筛选得到亚麻假单胞菌 KY, 对烟草黑胫病的盆栽和大田防效分别为 75.41%和 63.62%。无论是生防菌还是致病病原, 除了存在明显的区域生境下特异的天然协同进化关系, 不同生防菌对同一病原的不同生理小种的拮抗效果也有不同; 因此, 生防菌的实际应用往往存在较强的区域限制。从不同材料、不同生境筛选更加丰富的生防菌资源具有现实意义。野生大型真菌往往具有结构新颖和含独特生物活性化合物的特点, 独特的代谢途径在生物协同进化过程中也会促使栖生土壤中微生物种群的变化^[9]。已有研究表明, 利用大型有毒真菌鳞柄白鹅膏防治杨树烂皮病有显著的效果, 而且经过深层发酵培养可以获得大量廉价易得的原材料^[10]。毒鹅膏菌作为野生大型有毒真菌, 子实体栖生土壤内可能存在特定抑菌菌群。基于此, 笔者对毒鹅膏菌栖生土壤中的细菌进行了分离培养, 通过拮抗试验筛选烟草黑胫病的生防菌株并进行了鉴定, 对拮抗菌进行了烟草黑胫病的盆栽防效试验。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

于河南洛阳天池山区采集野生毒鹅膏菌, 随机选取 8 株, 收集子实体表层土壤, 混匀后装入无菌袋带回实验室。烟草黑胫病病菌(*Phytophthora*

parasitica var. *nicotianae*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、黄瓜灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、小叶黄杨叶斑病菌(*Phyllosticta spinarum*)、小麦茎基腐病菌(*Fusarium pseudograminearum*)保存于河南科技大学微生物资源开发与利用实验室。

1.2 方法

1.2.1 烟草疫霉拮抗菌株的分离纯化与鉴定

1) 毒鹅膏菌栖生土壤细菌的分离和纯化。称取 10 g 野生毒鹅膏菌栖生土壤样品, 装入 90 mL 无菌水的三角瓶中, 室温、160 r/min 振荡 30 min 后, 静置 15 min, 无菌操作将 1 mL 上清液装入含有 9 mL 灭菌蒸馏水试管中。重复操作, 依次制得 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 梯度菌悬液。分别吸取 100 μ L 菌悬液涂布于 NA^[11]平板培养, 设 3 次重复。28 $^{\circ}$ C 培养 3 d, 观察菌落生长情况并挑取特征典型菌落转接 3 次划线纯化, 纯化活体培养物 4 $^{\circ}$ C 保存。

2) 烟草疫霉拮抗菌的筛选及抑菌效果的测定。将纯化的菌株接种到 NB 液体培养基中, 在 26 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 24 h, 按照菌液稀释法调整菌液浓度为 1.5×10^7 cfu/mL。

以烟草疫霉为指示病原菌, 考察分离到的菌株对病原菌的拮抗能力, 筛选出具有生防作用的目标菌株。在无菌条件下, 用 6 mm 的打孔器制作烟草疫霉菌饼, 并转移到新的 PDA^[12]平板的中心, 距菌饼 2.0~2.5 cm 处对称放置 6 mm 牛津杯。向牛津杯内依次加入浓度为 1.5×10^7 cfu/mL 的菌悬液 150 μ L, 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 5 d, 设 3 次重复。观察抑菌圈情况, 统计抑菌圈大小和抑菌率。

3) 烟草疫霉拮抗菌的鉴定。纯化的菌株接种到 NA 培养基上, 在 28 $^{\circ}$ C 下培养 2 d。在形成典型菌落后, 依据《微生物学实验技术》^[13]进行形态学特征以及生理生化指标测量。

采用 TaKaRa MiniBEST Bacteria Genomic DNA Extraction Kit Ver.3.0 提取拮抗菌株基因组 DNA。16S rDNA 扩增引物: 27F(5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3')和 1492R(5'-GGTTACCTTG

TTACGACTT-3')。gyrA 扩增引物: gyrA-F(5'-CA GTCAGGAAATGCGTACGTCCTT-3') 和 gyrA-R (5'-CAAGGTAATGCTCCAGGCATTGCT-3')。PCR 反应程序设置参考陆新莉等^[6]的方法。在 1.5%(质量分数)琼脂糖凝胶上电泳检测 PCR 产物,在 NCBI 上 BLAST 比对克隆测序的序列,优选较高 同源性序列构建 Neighbor-Joining 进化树。

1.2.2 烟草疫霉拮抗菌的功能性特征试验

1) 烟草疫霉拮抗菌的生物活性测定。依照文献[14]的方法,测定拮抗菌株的解磷、解钾的促生特性以及产 IAA、蛋白酶、纤维素酶和脲酶的能力。

2) 烟草疫霉拮抗菌抑制烟草疫霉产孢能力的测定。将拮抗菌株接种到 NB 培养基,28℃、180 r/min 振荡培养 24 h,12 000 r/min 离心 4 min,0.22 μm 滤膜过滤离心上清液,即得发酵液。在燕麦培养基^[15]接入烟草疫霉菌,28℃培养 14 d,待培养皿上覆满孢子,刮取孢子粉,放入无菌的 10 mL 离心管,悬浮于水溶液中。用双层无菌纱布过滤菌丝,制成烟草疫霉孢子悬浮母液。用无菌水将孢子悬浮母液按 10 倍梯度稀释,调整孢子悬浮液浓度至 1×10^8 cfu/mL^[16]。

分别吸取 20 μL 的菌株发酵液与烟草疫霉孢子悬浮液于载玻片上,用枪头吹吸混匀。28℃、避光培养 2、4、8、12 h 后观察并记录萌发情况,认为孢子芽管长度大于孢子短半径为萌发^[17]。重复观察 3 个以上同一视野,随机挑取 100 个孢子计数。

1.2.3 烟草疫霉拮抗菌对烟草黑胫病的盆栽防效 试验

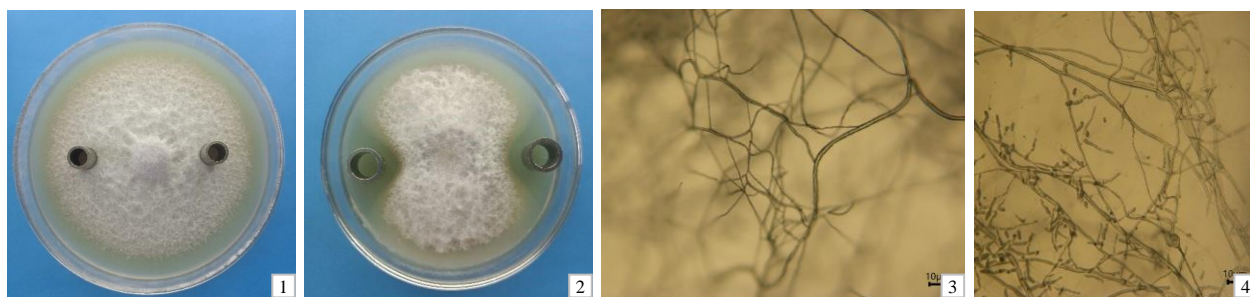
设 4 个处理: T1(阳性对照),灌根接种稀释 600 倍的 30% 甲霜恶霉灵; T2(预防组),在每株烟草根茎部均匀接种 1 mL 1×10^8 cfu/mL 的 DE4-5 发酵液,24 h 后接种 1 mL 1×10^8 cfu/mL 的烟草疫霉孢子悬浮液; T3(治疗组),DE4-5 发酵液与烟草疫霉孢子悬浮液接种顺序相反,其余不变; T4(阴性对照),仅接种烟草疫霉。设 3 次重复,每处理 9 盆。接种 20 d 后,依据文献[18]的方法,统计病株数及发病级数,计算发病率、病情指数和防效。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的抑菌效果和鉴定结果

自毒鹅膏菌栖生土壤样品中共分离得到 57 株菌株,以烟草疫霉为指示菌,筛选出 8 株对烟草疫霉有抑制效果的菌株,其中菌株 DE4-5 的抑制作用最强,抑菌圈直径达 (1.76 ± 0.07) cm(图 1-1、图 1-2),抑菌率为 78.22%。显微镜观察发现,菌株 DE4-5 处理烟草疫霉进行拮抗作用后,烟草疫霉菌丝整体表现为幼嫩菌丝端部膨大、菌丝畸变、节间缩短、断裂现象增多,发育减缓(图 1-3、图 1-4)。

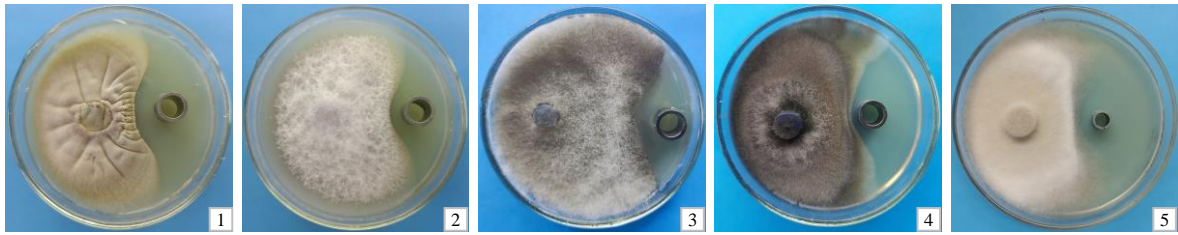
测量 DE4-5 菌株对 5 种植物病原真菌的抑菌圈大小,计算抑菌率,结果菌株 DE4-5 对 4 种病原菌有显著抑制作用(图 2),其中对黄瓜灰霉病菌、番茄灰霉病菌的抑菌率可达到 66% 以上(表 1),表明 DE4-5 菌株具有较好的广谱抑菌活性。



1 对照; 2 DE4-5 菌株拮抗烟草疫霉处理; 3 烟草疫霉菌丝形态; 4 DE4-5 菌株拮抗烟草疫霉的菌丝形态。

图 1 菌株 DE4-5 对烟草疫霉的拮抗活性

Fig. 1 Antagonistic activity of strain DE4-5 against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*



1 黄瓜灰霉病菌; 2 黄瓜枯萎病菌; 3 番茄灰霉病菌; 4 小叶黄杨叶斑病菌; 5 小麦茎基腐病菌。

图 2 菌株 DE4-5 对 5 种植物病原真菌的拮抗作用

Fig. 2 Antagonistic activity of strain DE4-5 against five phytopathogenic fungi

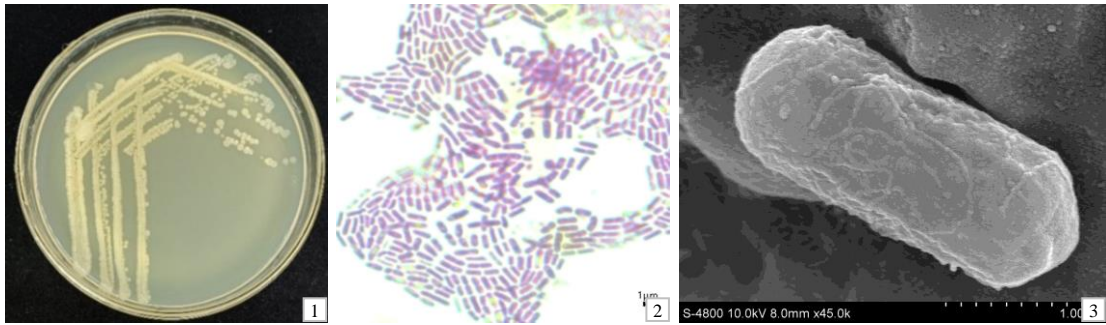
表 1 菌株 DE4-5 对 5 种植物病原真菌的拮抗活性

Table 1 Antagonistic activities of strain DE4-5 against five plant pathogenic fungi

病原菌	抑菌圈直径/cm	抑菌率/%
黄瓜灰霉病菌	(1.49±0.10)a	(66.07±4.32)a
黄瓜枯萎病菌	(0.88±0.10)b	(39.26±4.32)b
番茄灰霉病菌	(1.49±0.07)a	(66.37±3.28)a
小叶黄杨叶斑病菌	(0.26±0.04)c	(11.41±1.68)c
小麦茎基腐病	(0.52±0.04)c	(23.26±1.56)c

同列不同字母表示对病原菌处理间的差异有统计学意义 ($P<5\%$)。

DE4-5 在 NA 平板 28 ℃ 培养 3 d 后, 单菌落表面不光滑、不透明, 为乳白色, 且边缘不规则(图 3-1), 菌落直径为 0.78~2.13 mm, 无芽孢, 大小约为 1.0 μm×3.0 μm, 菌体为杆状, 有鞭毛(图 3-2、图 3-3)。



1 菌落; 2 革兰染色特征; 3 菌体。

图 3 拮抗菌 DE4-5 的形态特征

Fig. 3 Morphological characteristics of strain DE4-5

生化试验结果表明, 菌株 DE4-5 为革兰阴性菌, 氧化酶、葡萄糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖和甘露醇的测定结果均为阳性; 淀粉水解和甲基红测定均呈阴性, 对 NaCl 的耐受程度为 2%~5%, 在 28 ℃ 环境下最适宜生长。这些检测结果与《常见细菌系统鉴定手册》^[19]中亚麻假单胞菌的相似度超过 99%。

以菌株 DE4-5 基因组 DNA 为模板进行 16S rDNA 和 *gyrA* 的 PCR 扩增, 并分别测序, 获得 1 517 和 1 028 bp 序列, 提交至 GenBank, 获得登录号 OP316931 和 OP317576。通过 DE4-5 基因序列的 BLAST 比对发现, OP316931 和 OP317576 与亚麻假单胞菌(*Pseudomonas lini*)对应序列具有超过 99% 相似度的同源性。采用 MEGA 7 分别构建 OP316931 和 OP317576 基于 16S rDNA、*gyrA* 的

育树, 聚类分析显示 DE4-5 的 16S rDNA 和 *gyrA* 序列均与亚麻假单胞菌聚在同一分支(图 4、图 5)。

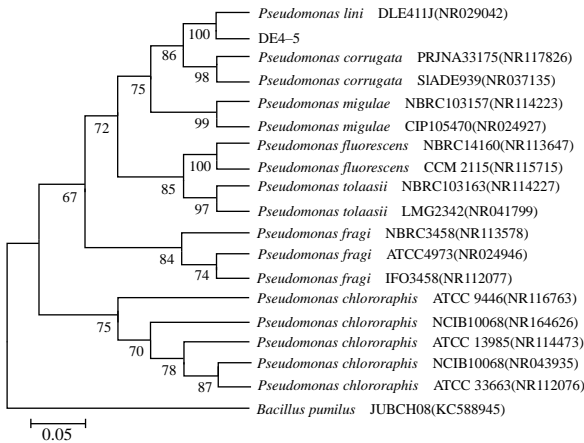


图 4 菌株 DE4-5 16S rDNA 系统发育树

Fig.4 Phylogenetic tree for strain DE4-5 based on 16S rDNA

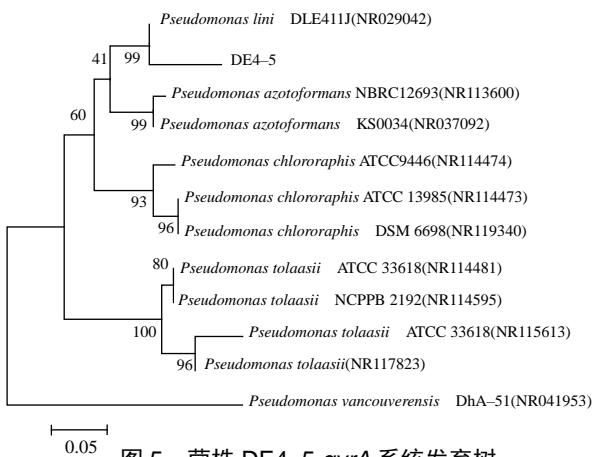


图 5 菌株 DE4-5 *gyrA* 系统发育树
Fig. 5 Phylogenetic tree for strain DE4-5 based on *gyrA*

综合 DE4-5 的形态特征、生化试验结果和基因序列分析结果，鉴定 DE4-5 为亚麻假单胞菌，命名为 *Pseudomonas lini* DE4-5。

2.2 拮抗菌株 DE4-5 的功能性特征

2.2.1 菌株 DE4-5 的生物活性

将 DE4-5 菌株接种到有机磷培养基平板上，培养后产生解磷圈，表明菌株 DE4-5 具有溶解有机磷的能力。将菌株接种到解钾平板培养后，也出现了黄色晕圈，表明菌株 DE4-5 有溶钾能力。菌株 DE4-5 IAA 测定结果显示，加色氨酸的比不加色氨酸的试管颜色加深，表明加入色氨酸促进了菌株 DE4-5 产生 IAA；将菌株 DE4-5 在酪蛋白、纤维素培养基上培养，3 d 后发现菌株生长良好；由于底物水解菌落周围形成 1 个透明圈，尿素培养基上显示菌株 DE4-5 变红。这些结果说明 DE4-5 菌株能分泌蛋白酶、纤维素酶和脲酶。

2.2.2 菌株 DE4-5 对烟草疫霉孢子萌发的抑制效果

孢子萌发试验表明，DE4-5 发酵液能抑制烟草疫霉孢子的萌发，随着时间的增加，对照组的烟草疫霉萌发孢子数量不断增加，12 h 孢子萌发率达到最高，为 94.37%。在 8 h 以内，处理组孢子萌发率缓慢增长，而对照组的孢子数量从 6.2% 快速提高到 74.48%；8 h 以后，处理组孢子萌发率迅速上升，12 h 时达到 16.26%。

2.3 拮抗菌株 DE4-5 对烟草黑胫病的盆栽防效

将烟苗从育苗盘移栽到盆栽种植 30 d，DE4-5 菌株灌根处理后，接种甲霜恶霉灵(T1)的防效为 74.83%；预防组(T2)与治疗组(T3)烟草黑胫病的病情指数均显著低于对照组，DE4-5 菌株处理的预防组和治疗组与甲霜恶霉灵处理组之间的防效没有显著差异；只接种烟草疫霉的对照组表现出严重的烟草黑胫病症状，发病率达 98.15%(表 2)。

烟株经过 30 d 的生长后，接种甲霜恶霉灵(T1)的植株无明显发病状况，预防组(T2)与治疗组(T3)的植株大部分叶片生长正常，根部少量叶片发黄，而只接种烟草疫霉的对照(T4)发病严重(图 6)。

表 2 菌株 DE4-5 对烟草黑胫病的防治效果

Table 2 Effect of strain DE4-5 on the prevention and treatment of tobacco black shank

处理	发病率/%	病情指数	防效/%
T1	(25.35±0.82)c	(20.66±1.17)c	(74.83±1.64)a
T2	(24.79±1.67)c	(26.31±0.86)b	(69.14±1.40)b
T3	(39.24±3.44)b	(29.37±0.86)b	(63.98±0.44)b
CK	(98.15±0.82)a	(82.14±1.78)a	

同列不同字母表示处理间的差异有统计学意义($P<0.05$)。



1 阳性对照(T1); 2 预防组(T2); 3 治疗组(T3); 4 阴性对照 CK。

图 6 菌株 DE4-5 对烟草黑胫病的盆栽防效

Fig. 6 Control effects of strain DE4-5 on tobacco black shank by pot experiment

3 讨论

从毒鹅膏菌子实体表层土壤中分离得到 57 株细菌, 筛选后 DE4-5 菌株对烟草疫霉有较强的拮抗效果; 生化测定结果表明 DE4-5 为革兰阴性菌, 其中氧化酶、葡萄糖、木糖、麦芽糖、乳糖、蔗糖和甘露醇的测定结果均为阳性; 淀粉水解和甲基红测定均呈阴性; 菌株具有解磷、解钾、分泌蛋白酶、纤维素酶及脲酶的能力, 兼具促生特性, 说明从毒鹅膏菌栖生土壤中分离假单胞菌, 丰富了烟草疫霉生防菌的途径和材料来源。

DE4-5 菌株的形态和生理生化特征与文献[20]报道的假单胞菌属特征描述基本吻合, 16S rDNA 和 *gyrA* 序列构建的系统进化树显示菌株 DE4-5 与同源亚麻假单胞菌序列的相似度超过 99%, 故将菌株 DE4-5 命名为 *Pseudomonas lini* DE4-5, 属于假单胞菌属^[21-24]。

假单胞菌属(*Pseudomonas*)在种类和功能方面具有丰富的多样性, 但关于亚麻假单胞菌生物防治的研究, 仅见孙婷婷等^[25]在大葱中分离出拮抗大葱紫斑病的菌株 *P. lini* X85, 以及常栋等从烟草茎秆中分离出的 *P. lini* KY 对烟草黑胫病的生防效果为 63.62%^[8], 没有涉及促生功能。笔者分离得到的 DE4-5 菌株的盆栽防效达到了 69.14%, 生防效果优于 *P. lini* KY。鉴于盆栽防效的测定普遍具有空间局限性, 后续将在大田开展 DE4-5 菌株拮抗烟草黑胫病的试验, 以验证该菌株的防效。

参考文献:

- [1] 赵辉, 王喜英, 刘国权, 等. 烟草黑胫病发生因素及综合防治研究进展[J]. 湖南农业科学, 2020(11): 99-103.
- [2] 张文静, 孙秀朋, 乔永亮, 等. 基于 InceptionV3 的烟草病害识别[J]. 中国烟草学报, 2021, 27(5): 61-70.
- [3] 曾维爱, 周志成, 谭琳, 等. 湖南烟草病虫害绿色防控技术研究现状与应用对策[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(2): 69-73.
- [4] 张豫丹, 马晓寒, 李俊领, 等. 绿原酸对烟草疫霉的抑制作用及对烟草黑胫病的防治效果研究[J]. 作物杂志, 2022(2): 230-236.
- [5] 钭有聪, 张立猛, 焦永鸽, 等. 大蒜与烤烟轮作对烟草黑胫病的防治效果及作用机理初探[J]. 中国烟草学报, 2016, 22(5): 55-62.
- [6] 陆新莉, 雷庭, 邱克刚, 等. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定和防病潜力[J]. 生物学杂志, 2019, 36(5): 52-56.
- [7] 杨艺炜, 黎妍妍, 张安盛, 等. 烟草黑胫病拮抗菌 XF10 的筛选与鉴定[J]. 烟草科技, 2018, 51(4): 20-27.
- [8] 常栋, 顾建国, 贾方方, 等. 烟草黑胫病不同植物源生防菌的筛选及防效测定[J]. 中国烟草学报, 2020, 26(3): 84-90.
- [9] 何培新, 刘伟, 贺新生, 等. 粗柄羊肚菌内生真菌多样性研究[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版), 2014, 29(3): 1-6.
- [10] 冀瑞卿. 鳞柄白鹅膏抑菌成分及其对杨树烂皮病菌抑制机理[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2007.
- [11] 何明川, 王志江, 谢永辉, 等. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2): 428-439.
- [12] 张蒙蒙, 梁俊阳, 王清福, 等. 烟草黑胫病生防细菌的鉴定和防效测定[J]. 河南农业大学学报, 2022, 56(2): 219-227.
- [13] 王万能, 全学军, 肖崇刚. 烟草疫霉的产孢和接种方法研究[J]. 植物保护学报, 2005, 32(1): 18-22.
- [14] 何明川, 曾舒泉, 王志江, 等. 一株烟草疫霉拮抗菌 MC4-2 的鉴定、发酵条件优化及防效测定[J]. 微生物学通报, 2021, 48(12): 4636-4648.
- [15] LEE H H, KIM J S, HOANG Q T N, et al. Root-specific expression of defensin in transgenic tobacco results in enhanced resistance against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2018, 151(3): 811-823.
- [16] 饶清琳, 钱发聪, 张廷金, 等. 哈茨木霉菌 LTR-2 对烟草黑胫病的田间防治效果[J]. 昆明学院学报, 2021, 43(3): 16-19.
- [17] 石若夫, 徐阳, 李大力, 等. 微生物学实验技术[M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2017: 70-77.
- [18] 尹坚, 王振华, 刘天波, 等. 烟草黑胫病拮抗细菌菌群的筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2019, 45(6): 588-593.
- [19] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[K]. 北京: 科学出版社, 2001: 60-65.
- [20] GUO D S, YUAN C H, LUO Y Y, et al. Biocontrol of tobacco black shank disease(*Phytophthora nicotianae*) by *Bacillus velezensis* Ba168[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 165: 104523.
- [21] 徐同伟. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选、鉴定和生防潜力评价[D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
- [22] 李小杰, 李成军, 姚晨斌, 等. 拮抗烟草疫霉菌的木霉菌株筛选鉴定及防病促生作用研究[J]. 中国烟草科学, 2020, 41(3): 65-70.
- [23] 杨应美, 卢灿华, 罗朝旺, 等. 烟草黑胫病生防菌筛选及对根际土壤微生物群落的影响[J]. 西南农业学报, 2022, 35(4): 790-796.
- [24] 曾舒泉, 钮徐融, 魏聪聪, 等. 烟草黑胫病拮抗菌 HZ15 的发酵条件优化[J]. 江西农业学报, 2021, 33(12): 14-20.
- [25] 孙婷婷, 赵松宇, 王新法, 等. 大葱叶际生防细菌筛选及对紫斑病防效研究[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2021, 49(1): 35-40.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维