



甘蔗鞭黑粉菌拮抗菌鉴定及特性研究

李楠¹, 孙大智¹, 王紫薇², 曹晶晶³, 汪志琴³, 赵盼^{3,4}, 仲乃琴^{1,3,4*}

1 宁夏大学 农学院, 宁夏 银川 750021

2 山西农业大学 植物保护学院, 山西 晋中 030600

3 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

4 内蒙古自治区马铃薯产业融合发展企业重点实验室, 内蒙古 呼伦贝尔 021000

李楠, 孙大智, 王紫薇, 曹晶晶, 汪志琴, 赵盼, 仲乃琴. 甘蔗鞭黑粉菌拮抗菌鉴定及特性研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3685-3701.

LI Nan, SUN Dazhi, WANG Ziwei, CAO Jingjing, WANG Zhiqin, ZHAO Pan, ZHONG Naiqin. Identification and characterization of sugarcane *Sporisorium scitamineum* antagonists[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3685-3701.

摘要: 由甘蔗鞭黑粉菌(*Sporisorium scitamineum*)引起的黑穗病是造成糖料蔗减产的主要病害, 筛选环境适应性强、抑菌效果好的拮抗菌是实现该病害有效防控的重要措施。【目的】从蔗田土壤样品中分离鉴定甘蔗鞭黑粉菌拮抗菌株, 为高效防控甘蔗黑穗病提供优质生防菌资源。【方法】采用平板对峙法分离筛选拮抗菌株, 通过形态学观察、生理生化试验及 16S rRNA 基因序列分析确定其分类地位, 盆栽及田间小区试验相结合, 验证菌株对甘蔗黑穗病的防控效果。【结果】获得 3 株具有明显拮抗效果的细菌, 经鉴定 GB-3、GH16-3 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), GH16-8 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*), 抑菌圈直径分别为(30.00±1.07) mm、(44.00±1.21) mm 和(18.00±0.89) mm, 抑菌率分别为 16.12%、31.92%和 5.91%; 对黑穗病盆栽防效分别为 74.33%、76.57%、69.07%, 田间防效分别为 20.08%、55.59%、50.08%。3 株菌均具有一定的溶磷能力, 可耐受极端盐碱环境, 对多种植物病原细菌和真菌具有较好的抑制效果, 产吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)产量分别为 2.12、1.30 和 1.22 mg/L, 施用后甘蔗株高分别提高 28.25%、17.09%和 23.31%。【结论】GH16-3 菌株的环境适应性强, 促生效果明显, 对甘蔗黑穗病防效较好, 具有潜在的应用价值。

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA0450000); 植物基因组学国家重点实验室项目(SKLP2016A-40); 内蒙古自治区关键技术攻关计划(2021GG0300)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDA0450000), the State Key Laboratory of Plant Genomics Program (SKLP2016A-40), and the Key Technologies Research and Development Program of Inner Mongolia Autonomous Region (2021GG0300).

*Corresponding author. E-mail: nqzhong@im.ac.cn

Received: 2024-03-19; Accepted: 2024-06-03; Published online: 2024-06-14

关键词：甘蔗黑穗病；鞭黑粉菌；拮抗菌；防控效果

Identification and characterization of sugarcane *Sporisorium scitamineum* antagonists

LI Nan¹, SUN Dazhi¹, WANG Ziwei², CAO Jingjing³, WANG Zhiqin³, ZHAO Pan^{3,4}, ZHONG Naiqin^{1,3,4*}

1 School of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

2 College of Plant Protection, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030600, Shanxi, China

3 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

4 Inner Mongolia Autonomous Region Key Laboratory for Integrated Development of Potato Industry, Hulunbuir 021000, Inner Mongolia, China

Abstract: Sugarcane smut caused by *Sporisorium scitamineum* is one of the major diseases affecting the development of China's sugar industry, and biocontrol is currently the most efficient and safe means, which necessitates the screening of antagonists with strong environmental adaptability and inhibitory effects. **[Objective]** To isolate and identify the strains with good antagonistic effects against *S. scitamineum* from soil and provide high-quality biocontrol strain resources for the efficient prevention and control of sugarcane smut. **[Methods]** The antagonists were isolated by the plate confrontation assay, and their taxonomic status was determined by morphological observation, physiological and biochemical tests, and 16S rRNA gene sequencing. The pot and field experiments were conducted to study the inhibition effects of the antagonists on sugarcane smut. **[Results]** Three strains of bacteria with significant antagonistic effects were obtained. Strains GB-3 and GH16-3 were identified as *Bacillus velezensis* and GH16-8 as *B. amyloliquefaciens*, with the inhibition zone diameters of (30.00±1.07), (44.00±1.21), and (18.00±0.89) mm and the inhibition rates of 16.12%, 31.92%, and 5.91%, respectively. The inhibition effects of the three strains against sugarcane smut were 74.33%, 76.57%, and 69.07% in pots and 20.08%, 55.59%, and 50.08% in fields, respectively. All the three strains had phosphorus-solubilizing ability, tolerance to extreme salt-alkaline environments, and inhibitory effects on a variety of phytopathogenic bacteria and fungi, with the indole-3-acetic acid (IAA) yields of 2.12, 1.30, and 1.22 mg/L, respectively. The application of the three strains increased the sugarcane plant height by 28.25%, 17.09%, and 23.31%, respectively. **[Conclusion]** Strain GH16-3 has strong environmental adaptability, growth-promoting effect, and prevention effect against sugarcane smut, demonstrating a promising application prospect.

Keywords: sugarcane smut; *Sporisorium scitamineum*; antagonist; inhibition effects

甘蔗是世界上第一大糖料作物和第二大生物能源作物^[1], 占据了全球糖类供应的 80% 以及乙醇供应的 40%, 主要分布在气候温暖的热带和亚热带地带^[2]。我国甘蔗种植面积约 $1.8 \times 10^6 \text{ hm}^2$ ^[3], 仅次于巴西和印度, 主要种植区域包括广西中南部、广东西部、云南西南部和海南北部, 其中广西壮族自治区甘蔗产量约占全国生产总量的 60%^[4]。甘蔗是禾本科宿根作物, 通常 3–5 年宿根连作, 这种种植方式导致多种病原菌在植株体内或土壤中积累, 严重影响其产量与品质^[5]。由甘蔗鞭黑粉菌(*Sporisorium scitamineum*)引起的黑穗病危害十分严重, 新植蔗发病率约 50%, 宿根蔗产量损失达 52%–73%^[6], 糖分通常下降 0.5–1.0%。病株茎叶细长、叶色淡绿、分蘖增多^[7], 蔗梢出现向下卷曲的黑色鞭状物, 病鞭表面银白色薄膜破裂后散出大量黑色冬孢子^[8], 孢子在甘蔗种芽、宿根及土壤中越冬, 传播途径广^[9], 生理小种多, 极难防控。

选育和推广抗病品种是目前防治甘蔗黑穗病的主要方法^[10]。王泽平等^[11]以‘粤 91-976’为母本、‘粤 84-3’和‘ROC25’为父本进行有性杂交, 选育出抗鞭黑粉菌混合生理小种的‘桂糖 41 号’; 经艳等^[12]以‘新台糖 1 号’和‘桂糖 92-66’分别为母本和父本, 选育出抗病品种‘桂糖 44 号’。然而, 我国甘蔗遗传资源十分匮乏, 限制了抗病品种的选育进程。目前生产上推广的品种数量不足 20 种, 甚至 20 世纪 70 年代由中国台湾选育的新台糖系列品种还占据甘蔗种植总面积的 50% 左右。Chen 等^[13]采用花生、黄豆、甘薯等作物与甘蔗轮作, 鞭黑粉菌的厚垣孢子活性降低, 但由于管理方式复杂、受土地资源限制, 这一模式难以大面积推广。朱桂宁等^[14]采用苯醚甲环唑药泥浸泡种茎, 黑穗病危害程度降低 55.55%; 用苯醚甲环唑·啞菌酯悬浮剂喷淋蔗

桩, 对宿根蔗黑穗病防效达 85.83%。然而上述药剂降解速度慢, 易在水体和土壤中积累, 对人畜健康存在潜在影响。

微生物菌剂具有成本低、对环境友好等优势, 已广泛应用于多种作物的病虫害防控, 也越来越受到甘蔗研究人员的重视。Jayakumar 等^[15]从甘蔗中分离获得的 8 株内生细菌, 对鞭黑粉菌的抑制率大于 30%; Tegene 等^[16]从甘蔗根际土壤中筛选的 12 株木霉菌, 对鞭黑粉菌的抑制率达 90% 以上; 张旭娜^[17]从甘蔗芽中分离筛选的拉氏根瘤菌 D3 和解淀粉芽孢杆菌 ZC2-4, 应用于盆栽试验后黑穗病发病率较对照分别降低了 11.77% 和 23.53%。因此, 筛选环境适应性强、易在土壤中定殖的高效菌株对于研制可规模化应用的复合功能菌剂具有重要意义。

本研究针对甘蔗黑穗病危害重、防控难、生防菌种资源缺乏等关键问题, 采集发病较重的蔗田土壤, 从中分离和筛选对甘蔗鞭黑粉菌具有较好抑制效果的细菌, 通过形态学观察、生理生化特性分析, 结合 16S rRNA 基因序列测定, 确定菌株分类地位; 研究菌株对环境 pH、NaCl 含量及甘蔗常用化学农药的耐受性, 并以广西主栽的糖料蔗品种为参试植物, 采用盆栽试验和田间小区试验相结合的方法, 验证菌株对黑穗病的防控效果, 分析其解磷、促生功能, 以期获得具有较好应用前景的候选菌株。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子 Ss17 和 Ss18 及其冬孢子均由广西农业科学院甘蔗研究所保存和惠赠^[18]; 其他供试菌株来源于中国科学院微生物研究所中国普通微生物菌种保藏管理中心与北京博迈德基因技术有限公司(表 1)。

表 1 供试菌株来源

Table 1 Source of strains

Strains name	Origins
<i>Erwinia amylovora</i>	CGMCC (China General Microbiological Culture Collection Center) No. 1.7275
<i>Streptomyces scabies</i>	CGMCC No. 4.1765
<i>Verticillium dahliae</i>	CGMCC No. 3.12834
<i>Alternaria solani</i>	CGMCC No. 3.2888
<i>Fusarium oxysporum</i>	CGMCC No. 3.3758
<i>Rhizoctonia solani</i>	CGMCC No. 3.1496
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Beijing Biomed Technology Co., Ltd.

API 50CHB G+芽孢杆菌鉴定试剂盒购自北京冬歌博业生物科技有限公司。

培养基参考赵永龙等^[19]的方法配制, LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 去离子水定容至 1.0 L, pH 调整至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min; PDA 固体培养基(g/L): 马铃薯块茎 200.0 g 切碎, 沸水煮 20 min, 用 4 层纱布过滤除渣, 葡萄糖 20.0, 琼脂 15.0, 去离子水定容至 1.0 L, 调 pH 至 7.0, 113 °C 灭菌 20 min; King 氏培养基(g/L): 蛋白胨 20.0, MgSO₄·7H₂O 1.5, K₂HPO₄ 1.7, 色氨酸 0.1, 丙三醇 15.0 mL/L, 去离子水定容至 1.0 L, 调 pH 至 7.0, 121 °C 灭菌 20 min; PKO 培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, (NH₄)₂SO₄ 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.1, MgSO₄·H₂O 0.03, FeSO₄ 0.03, Ca₃(PO₄)₂ 5.0, NaCl 0.3, KCl 0.3, 酵母提取物 0.5, 琼脂 20.0, 用去离子水定容至 1.0 L, 调 pH 至 7.0, 113 °C 灭菌 20 min。

比色液: 将 20 mL 0.025 mol/L 的 FeCl₃ 缓缓加入 30 mL 浓硫酸中, 搅拌均匀。

1.2 拮抗菌的分离和筛选

从广西壮族自治区田东县(广西农业科学院甘蔗研究所叮当基地)黑穗病危害较重的蔗田采集土壤样品。取 1 g 土样置于装有 10 mL 无菌水的三角瓶中, 充分振荡后静置 5–10 min, 取 1 mL 上清液依次稀释至 10⁻²、10⁻³ 和 10⁻⁴, 吸取 100 μL 悬浮液分别涂布于 LB 固体培养基上, 28 °C 培养 24 h 后, 挑选形态各异单菌落进行纯化备用。

将 Ss17 和 Ss18 单倍体菌株分别涂布于 PDA 固体培养基上, 28 °C 恒温培养 24 h 后, 分别挑取单菌落于 PDA 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养 24 h, 分别吸取 Ss17 和 Ss18 的单倍体菌株培养液, 1:1 混合后均匀涂布于 PDA 固体培养基上, 在平板中央接种 6 μL 待试细菌培养液, 28 °C 培养 7 d 后测量抑菌圈直径, 计算抑菌率。

1.3 拮抗菌的鉴定

1.3.1 拮抗菌形态学观察

挑选对甘蔗鞭黑粉菌具有明显抑制效果的细菌, 将其培养液均匀涂布于 LB 固体培养基上, 37 °C 培养 24 h, 采用扫描电子显微镜观察菌体形态。

将适量的待测菌液涂抹在载玻片上, 待其自然干燥后, 用酒精灯进行轻微加热。随后, 使用草酸铵结晶紫进行 1–2 min 的染色处理, 无菌水快速冲洗 30 s。染色后, 将载玻片置于碘液中 1 min, 再使用 95% 乙醇溶液进行 1 min 的脱色处理。最后, 用番红染色液复染 2 min, 无菌水冲洗 30 s, 干燥后镜检^[19]。

1.3.2 菌株生理生化特性测定

将待测菌株接种于 API 50CHB 培养基, 再分别滴至各实验条的管部加石蜡密封, 28 °C、200 r/min 培养 24 h 和 48 h。依据 API 50CHB G+ 芽孢杆菌鉴定试剂盒(北京冬歌博业生物科技有限公司)说明书判读测试结果。

1.3.3 菌株分子生物学鉴定

将待测菌株接种于 LB 液体培养基, 28 °C、200 r/min 培养 24 h 后, 吸取 600 μL 至 1 mL 离心管内, 与细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3')、1492R (5'-CTACGGCTACCTTGTACGA-3')和 *gyrB* 基因片段引物 LF (5'-GCCTTGTCGACCACTCTTGA-3')、LR (5'-AATGGCAGTCAGCCCTTCTC-3')同时送往北京博迈德基因技术有限公司进行测序, 结果在 NCBI 上进行比对, 采用 MEGA 7 软件构建系统发育树。核酸序列上传至国家微生物科学数据中心(NMDC, <http://nmdc.cn>)。

1.4 拮抗菌的生物学特性分析

1.4.1 菌株耐盐碱特性

将待测菌株分别接种于 pH 值为 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0、11.0, NaCl 浓度为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.1 g/L 的 LB 液体培养基中, 37 °C、200 r/min 振荡培养 12 h 后测定 OD_{600} 值, 分析菌株耐盐碱特性^[20]。

1.4.2 菌株对常用化学药剂的敏感性

参考茹素龙等、赵永龙等的研究方法, 以噻虫啉、多菌灵、噻虫嗪、甲基硫菌灵、波尔多液、代森锰锌、吡虫啉、百菌灵、异菌脲等 9 种甘蔗常用化学农药为供试药剂, 并依据产品说明书推荐的溶液浓度进行稀释。将直径 8 mm 的无菌滤纸片在上述药剂中浸泡 1 min^[19-21], 分别置于涂有待试菌株的培养基上, 以无菌水为对照, 37 °C 恒温培养 12 h, 观察抑菌效果。

1.4.3 菌株广谱抑菌效果

分别吸取 100 μL 解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)、根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、疮痂链霉菌(*Streptomyces scabies*)的培养液, 均匀涂布于 LB 固体培养基上, 将 6 μL 待试菌株培养液滴于其上, 28 °C 培养 7 d 后观察拮抗菌对病原细菌的抑制效果。

在 PDA 培养基中央接种尖孢镰孢菌

(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、茄链格孢菌(*Alternaria solani*)和大丽枝菌(*Verticillium dahliae*), 在其两侧间隔 1 cm 处分别接种 6 μL 待试菌株培养液, 28 °C 培养 4 d 后观察其对病原真菌的抑制效果。

1.4.4 菌株解磷促生特性

接种菌株于 PKO 固体培养基上, 28 °C 培养 7 d 后, 观察其溶磷效果。

吸取 100 μL 待试菌株培养液, 接种于 King 氏液体培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 48 h 后, 4 °C、4 000 r/min 离心 5 min 收集上清, 用 Salkowski 比色法对菌液中的吲哚乙酸(indole-3-acetic acid, IAA)含量进行测定, 参照李振东等^[22]的方法绘制标准曲线, 并测算细菌培养液中 IAA 的浓度。

1.5 脂肽类抗生素合成酶相关基因分析

将甘蔗鞭黑粉菌冬孢子悬浮液均匀涂布于 PDA 培养基上, 然后分别吸取 6 μL 伊枯草菌素(iturin)、丰原素(fengycin)和表面活性素(surfactin)的标准试剂滴于培养基中央, 观察其抑菌效果。

以细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]提取出的待试菌株总 DNA 为模板, 参照文献^[23-27]的方法, 扩增伊枯草菌素关键合成酶基因。引物为 ituAF (5'-ATGTATACCAAGTCAATTCC-3')和 ituAR (5'-GATCCGAA GCTGACAATA-3')。PCR 反应体系(25 μL): 2×*Taq* PCR Master Mix (12.5 μL), 上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 6.5 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 5 min, 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。

1.6 甘蔗黑穗病防控试验

1.6.1 盆栽试验

挑取待试细菌的单菌落, 接种于 LB 液体

培养基中, 37 °C、200 r/min 培养 12 h 后, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min, 沉淀用 ddH₂O 重悬, 调整孢子数至 1×10⁷ CFU/mL。

采集甘蔗黑穗病鞭, 自然风干后刮下孢子粉, 制备孢子数为 5×10⁶ CFU/mL 的鞭黑粉菌悬液^[28]。

将‘桂糖 60’脱毒试管苗移栽于营养土培养 60 d (pH 5.5–6.0, 总磷 0.77 g/kg, 全氮 0.76 g/kg, 全钾 2.17 g/kg, 有机质 29.70 g/kg), 选取大小一致的幼苗浸泡于鞭黑粉菌悬液 1 h, 取出后遮阴干燥 30 min, 再置于拮抗菌悬液中浸泡 30 min, 然后种植于长 64 cm、宽为 40 cm 的花盆中, 每盆 10 株, 以清水处理为 CK1、鞭黑粉菌悬液处理为 CK2, 试验设置 3 次重复。生长期间不施肥, 每周浇水 1 次, 每次 4 L, 培养 90 d 后统计叶绿素相对含量(soil and plant analyzer development, SPAD)、株高、茎径, 120 d 后统计发病率。

1.6.2 田间试验

大田试验在广西壮族自治区广西农业科学院甘蔗研究所丁当试验基地进行, 试验地土壤全氮 0.93 g/kg, 全磷 0.202 g/kg, 全钾 0.31 g/kg, 水解氮 78.30 mg/kg, 有效磷 44.00 mg/kg, 速效钾 77.00 mg/kg, 有机质 15.10 g/kg, pH 4.3。参试品种为‘柳城 05-136’。试验于 2023 年 4 月 25 日开始, 采用完全随机区组设计, 行距 1.2 m, 小区周围种植 2.4 m 保护行。CK 组全生育期只浇

水, 处理组除浇水外还浇施一次拮抗菌(孢子数 1×10⁷ CFU/mL), 试验设置 3 次重复。120 d 后参考朱桂宁^[29]的方法, 统计黑穗病发病率和防治效果, 如公式(1–2)所示。

$$\text{发病率} = \text{发病丛数} / \text{出苗丛数} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{防治效果} = (\text{对照发病率} - \text{菌剂处理发病率}) / \text{对照发病率} \times 100\% \quad (2)$$

1.7 数据处理

运用 Excel 和 Origin 2022 软件完成相关数据的处理, 通过 MEGA 7 软件构建菌株系统发育树。

2 结果与分析

2.1 甘蔗鞭黑粉菌拮抗菌的分离和筛选

从蔗田土壤样品中初步筛选出 55 株抑制甘蔗鞭黑粉菌生长的细菌, 复筛出拮抗效果最佳的 3 株菌作为目标菌株, 将其命名为 GB-3、GH16-3 和 GH16-8, 抑菌圈直径分别为(30.00±1.07)、(44.00±1.21)和(18.00±0.89) mm (图 1), 抑菌率分别为 16.12%、31.92%和 5.91%。

2.2 甘蔗鞭黑粉菌拮抗菌的鉴定

2.2.1 菌株形态学观察

如图 2 所示, 菌株 GB-3、GH16-3 和 GH16-8 的菌落均呈圆形, 乳白色, 质地黏稠, 其中 GB-3 和 GH16-3 表面光滑, GH16-8 表面粗糙、边缘不整齐。菌体均为杆状、革兰氏染色呈阳性。

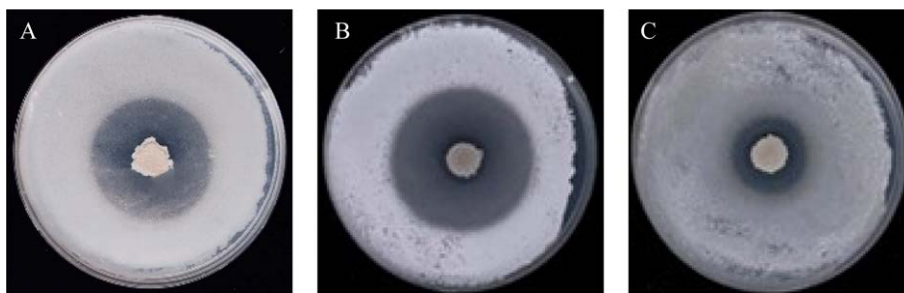


图 1 不同菌株对甘蔗鞭黑粉菌的抑制效果

Figure 1 Inhibitory effects of different bacterial strains against *Sporisorium scitamineum*. A: GB-3. B: GH16-3. C: GH16-8.

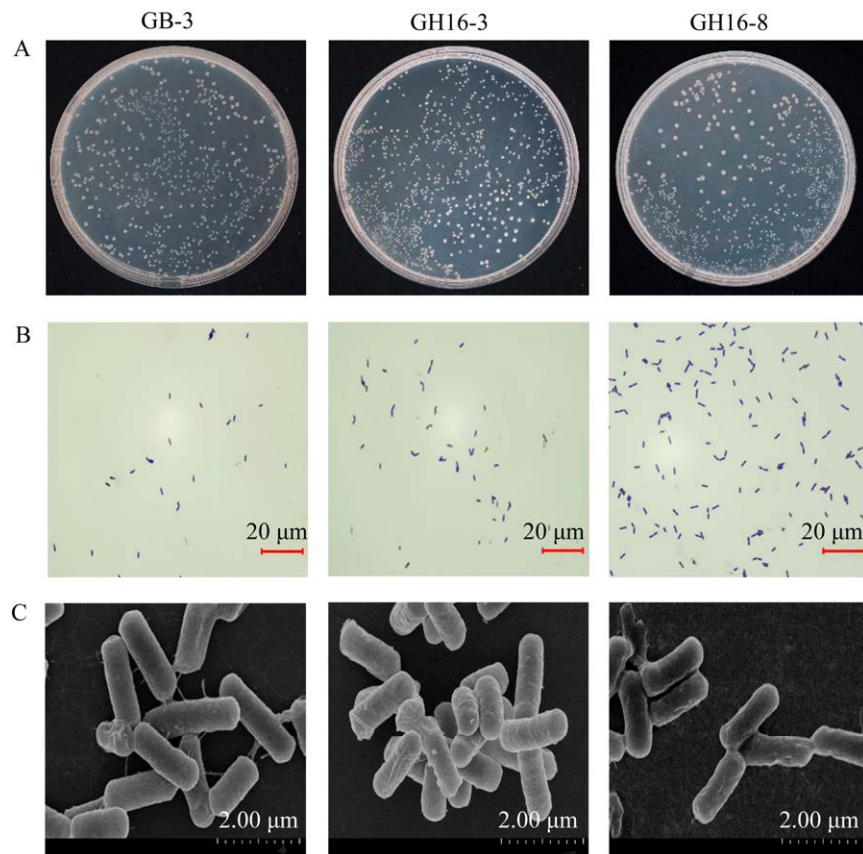


图 2 菌株形态特征

Figure 2 Morphological characteristics of bacterial strains. A: Colonies. B: Gram stain. C: Morphology.

2.2.2 菌株生理生化特性

如表 2 所示, 菌株 GB-3、GH16-3 和 GH16-8 均可利用丙三醇、山梨醇、淀粉等作为唯一碳源, 代谢产物可降解苦杏仁苷; 不能利用赤藻糖醇、葡萄糖酸钾。其中, GB-3 和 GH16-3 可利用乳糖、甲基 α -D-糖苷和 D-棉子糖, 不能利用松三糖; GH16-8 可利用葡萄糖、甘露醇, 但不能分解鼠李糖和松二糖。API 50CHB G+芽孢杆菌鉴定试剂盒鉴定结果显示, 3 株待测菌株均为芽孢杆菌, API 50CHB 鉴定系统分析表明, GB-3 和 GH16-3 为贝莱斯芽孢杆菌, 鉴定率分别为 87.6%和 89.9%; GH16-8 为解淀粉芽孢杆菌, 鉴定率为 76.3%。

2.2.3 基于 16S rRNA 和 *gyrB* 基因序列的分子生物学鉴定

如图 3 所示, 将 PCR 扩增获得的 16S rRNA

基因序列在 NCBI 中进行比对, GB-3 和 GH16-3 分别与贝莱斯芽孢杆菌的一致性达到 99.7%以上, GH16-8 与解淀粉芽孢杆菌的一致性达到 98.4%以上, GB-3、GH16-3 与贝莱斯芽孢杆菌 OL468452 聚类到同一个分支, 自展值达 95%; GH16-8 与解淀粉芽孢杆菌 OM320204 在同一分支, 自展值达 89%。扩增目标菌株的 *gyrB* 基因片段, 运用 MEGA 7 软件构建系统发育树, 结果如图 4 所示, GB-3、GH16-3 与贝莱斯芽孢杆菌 CP055160 在同一分支, 自展值达 92%; GH16-8 与解淀粉芽孢杆菌 OK509815 在同一分支, 自展值达 94%; 结合形态学观察和生理生化特性, 鉴定 GB-3 和 GH16-3 为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*), GH16-8 为解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)。

表 2 菌株 GB-3、GH16-3 和 GH16-8 的生理生化特性

Table 2 Physiological and biochemical properties of GB-3, GH16-3, and GH16-8

Test items	Results			Test items	Results		
	GB-3	GH16-3	GH16-8		GB-3	GH16-3	GH16-8
Negative control	-	-	-	Esculin ferric citrate	+	+	+
Glycerol	+	+	+	Salicin	-	-	+
Erythritol	-	-	-	Cellobiose	+	+	+
D-arabinose	-	-	-	D-maltose	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	D-lactose	+	+	-
D-ribose	+	+	+	D-disaccharide	+	+	-
D-xylose	+	+	+	D-sucrose	+	+	-
L-xylose	-	-	-	D-trehalose dihydrate	-	-	+
D-ribitol	-	-	-	Synanthrin	-	-	+
Hydroquinone O-β-D-glucopyranoside	-	-	-	Melezitose	-	-	+
D-galactose	-	-	-	D-raffinose	+	+	-
D-glucose	+	+	+	Amylum	+	+	+
D-fructose	+	+	+	Glycogen	+	+	+
D-mannose	+	+	+	Xylitol	-	-	+
L-sorbose	-	-	-	D-gentiobiose	-	-	+
L-rhamnose	+	+	-	D-toulon sugar	+	+	+
D-mannitol	+	+	+	D-fucose	+	-	+
Sorbitol	+	+	+	L-fucose	+	-	+
Methyl-α-D-glucopyranoside	+	+	+	L-arabitol	+	-	+
N-acetyl glucosamine	-	+	-	Potassium gluconate	-	-	-
Nitrosides	+	-	+	2-keto-potassium gluconate	-	-	-
Arbutin	-	-	+	5-keto-potassium gluconate	+	-	+

+: Positive; -: Negative.

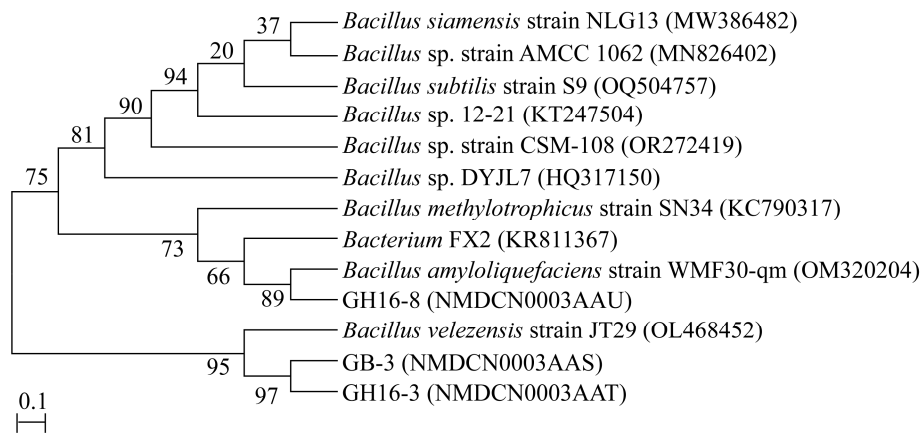


图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequences. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The bootstrap values are shown at the node; The scale bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide position.

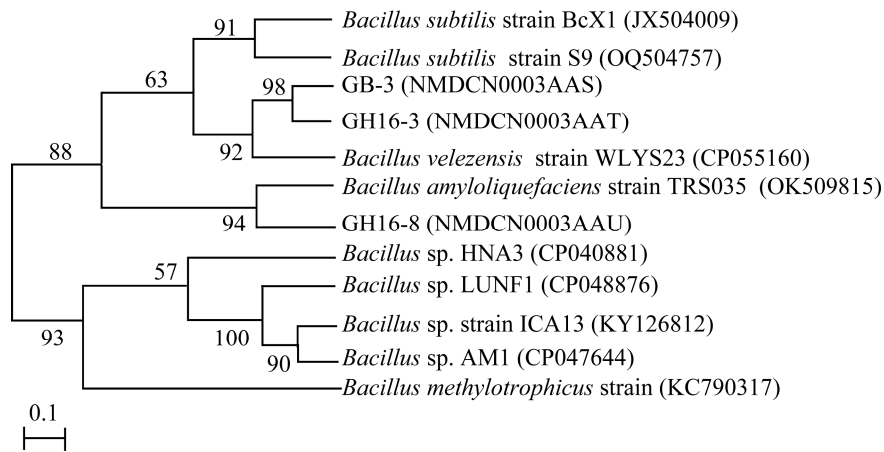


图 4 基于 *gyrB* 基因序列构建的系统发育树

Figure 4 Phylogenetic tree constructed based on *gyrB* gene sequences. Numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The bootstrap values are shown at the node; The scale bar indicates 0.1 substitutions per nucleotide position.

2.3 拮抗菌的生物学特性

2.3.1 菌株的促生长特性

将 3 株目标菌在 King 氏液体培养基中培养 48 h, 4 °C、4 000 r/min 离心 5 min 后将上清液与比色液进行混合, 观察到混合液均呈现粉红色, 表明 GB-3、GH16-3 和 GH16-8 的代谢产物中均含有 IAA。3 株菌的 IAA 产量分别为 2.12、1.30 和 1.22 mg/L (表 3)。

用目标菌液浇施甘蔗幼苗, 90 d 后对甘蔗的叶绿素相对含量、株高、茎径进行了测量统计。如图 5 所示, 3 株菌处理的植株长势均显著优于对照, 其中 GB-3 处理组的 SPAD 值、株高、茎径分别较对照(CK1)增加了 21.44%、

28.25%和 16.38%; GH16-3 处理组分别较对照(CK1)增加了 23.17%、17.09%和 19.40%; GH16-8 分别较对照(CK1)增加了 10.25%、23.31%和 11.77%。

2.3.2 菌株的解磷效果

如图 6 所示, 将 3 株菌在 KPO 培养基上培养 7 d 后发现, 菌落周围均出现半透明状的解磷圈, 表明 3 株菌均具有较好的溶磷能力, 其中 GH16-3 的溶磷能力最强, 生长速度最快, 菌落直径明显大于其他 2 株菌。

2.3.3 菌株的耐盐碱特性

将 3 株菌分别接种于 NaCl 含量 0.1–1.1 g/L、pH 1.0–11.0 的 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 12 h 后观察发现(图 7), 3 株菌在对极端盐碱环境的耐受性测试中均显示出了良好的适应性, 在 0.1–0.5 g/L 的 NaCl 浓度范围内可正常生长, 在 0.7–0.9 g/L 的 NaCl 浓度范围内生长状况良好, 最高耐受 NaCl 浓度为 1.1 g/L; 在 pH 值为 5.0–7.0 的环境中均可正常生长, GB-3 和 GH16-3 在 pH 9.0 的环境下可较好生长, 3 株菌均可耐受 pH 11.0 的极端高碱环境。

表 3 菌株的 IAA 产量

Table 3 IAA production of strains

Strains	OD_{530}	Yield of IAA (mg/L)
GB-3	0.178	2.12
GH16-3	0.168	1.30
GH16-8	0.167	1.22

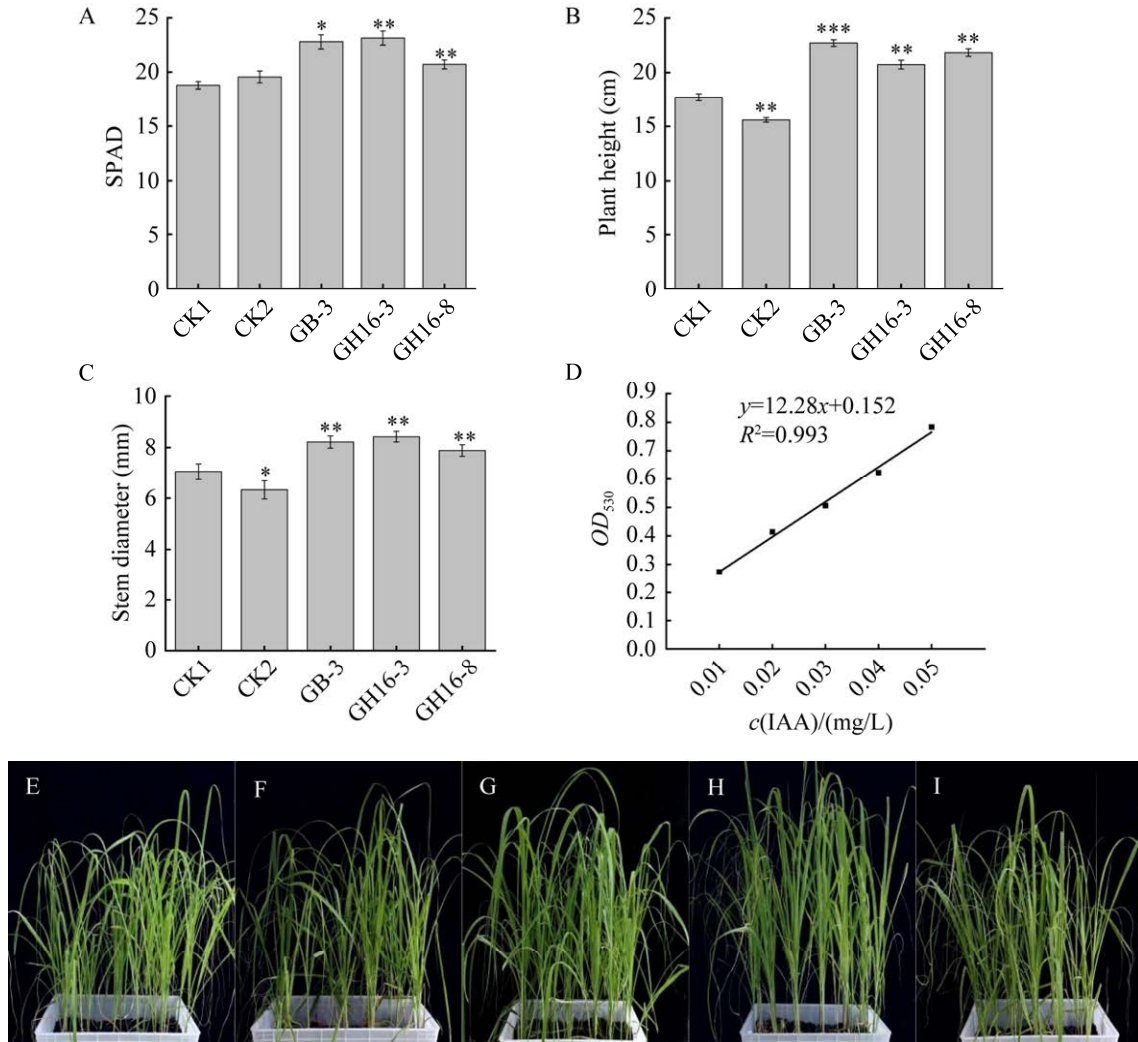


图 5 菌株的促生长效果

Figure 5 Statistics of pot plant growth promotion effect. A–C are SPAD, plant height, and stem diameter, respectively results of pot experiment. D is the IAA standard curve. E–I were clear water treatment group (CK1), *S. scitamineum* treatment group (CK2), *S. scitamineum* and GB-3 co-treatment group, *S. scitamineum* and GH16-3 co-treatment group, and *S. scitamineum* and GH16-8 co-treatment group, respectively. *** $P < 0.001$, indicating extremely significant differences; ** $P < 0.01$, indicating highly significant differences; * $P < 0.05$, indicating significant differences.

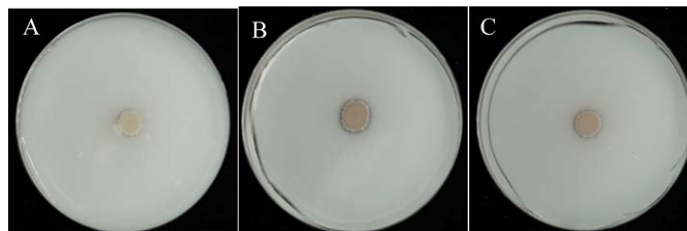


图 6 拮抗菌的溶磷效果

Figure 6 Phosphorus solubilising effect of antagonistic bacteria. A–C: Inhibition zone of GB-3, GH16-3, and GH16-8.

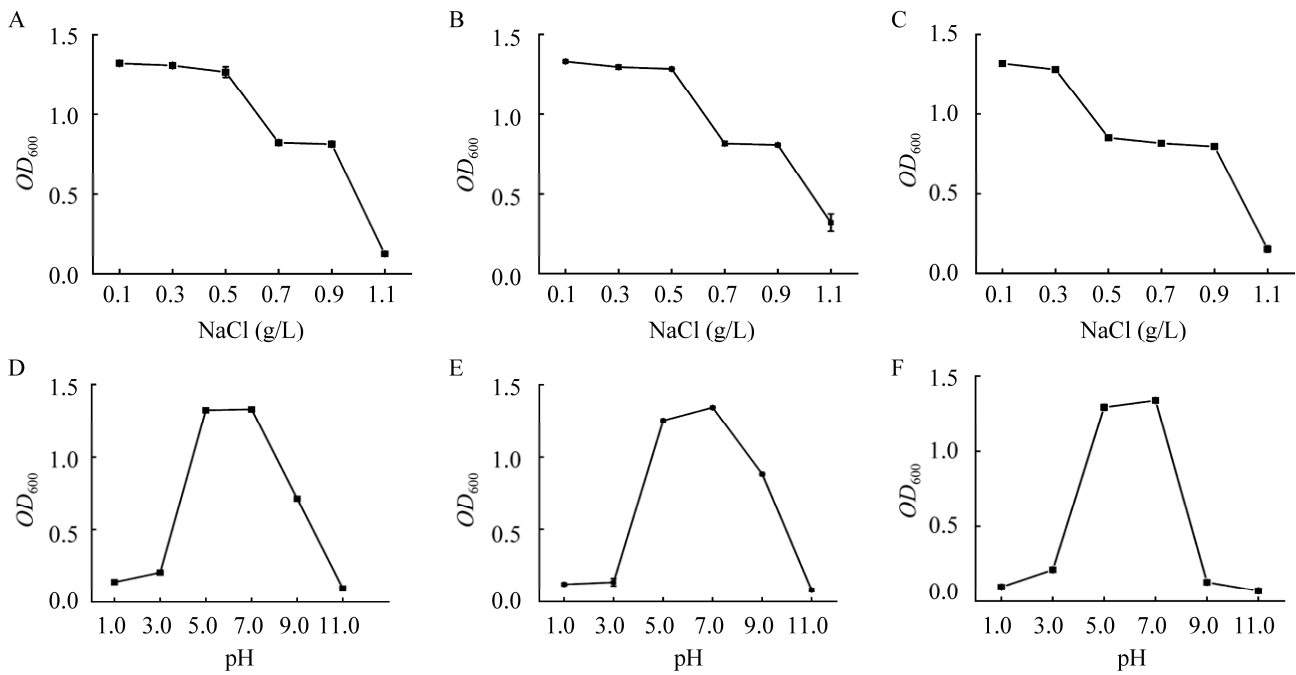


图 7 拮抗菌耐盐碱效果

Figure 7 Resistance effect of antagonistic bacteria to salt and alkali. A–C: NaCl resistance test of GB-3, GH16-3, and GH16-8. D–F: pH resistance test of GB-3, GH16-3, and GH16-8.

2.3.4 菌株对甘蔗常用化学农药的敏感性

施用于土壤或在生长季节喷施的化学农药会影响生防菌的活性和功能。本研究测定了目标菌株对甘蔗生产中常用化学农药的敏感性, 结果如表 4 所示。无菌水处理的 3 株菌均可正

常生长, 表明滤纸片无污染。3 株菌均可耐受吡虫啉、多菌灵和甲基硫菌灵; 波尔多液、代森锰锌和百菌灵对 3 株菌均有明显抑制作用; GH16-3 对异菌脲敏感, GH16-8 对噻虫胺、噻虫嗪敏感。

表 4 化学农药对菌株 GB-3, GH16-3 和 GH16-8 的影响

Table 4 Effect of chemical pesticides against GB-3, GH16-3, and GH16-8

Fungicide	Producer	Concentration (mg/L)	Resistance		
			GB-3	GH16-3	GH16-8
H ₂ O			+	+	+
0.5% Clothianidin	Jining Runwu Biotechnology Co., Ltd.	300.0	+	+	-
50% Carbendazim	Sichuan Runer Technology Co., Ltd.	100.0	+	+	+
30% Thiamethoxam	Hebei Guanlong Agriculture Co., Ltd.	150.0	+	+	-
70% Thiophanate-Methyl	Shanghai Hulian Bio-Pharmaceutical Co., Ltd.	700.0	+	+	+
80% Bordeaux liquid	Sunnong Biotechnology (Shanghai) Co., Ltd.	200.0	-	-	-
80% Mancozeb	Sichuan Guoguang Agrochemical Co., Ltd.	320.0	-	-	-
10% Imidacloprid	Shandong Binong Star Biological Technology Co., Ltd.	200.0	+	+	+
75% Chlorothalonil	Shandong Binong Star Biological Technology Co., Ltd.	300.0	-	-	-
50% Iprodione	Shandong Libang Agrochemical Co., Ltd.	25.0	+	-	+

+: Fungicides do not affect antagonist growth; -: Fungicides inhibit antagonist growth.

2.3.5 菌株的广谱抗病特性

为深入探索拮抗菌株的生防潜力,本研究采用平板对峙法测试了其对多种植物病原菌的拮抗效果,结果如图 8 (病原细菌)和图 9 (病原真菌)所示。3 株菌对解淀粉欧文氏菌(*E. amylovora*)、根癌农杆菌(*A. tumefaciens*)、疮痂链霉菌(*S. scabies*)等病原细菌,以及尖孢镰孢菌(*F. oxysporum*)、立枯丝核菌(*R. solani*)、茄链格

孢菌(*A. solani*)和大丽轮枝菌(*V. dahliae*)等病原真菌均具有一定的拮抗效果,广谱抗病潜力大,产业化应用前景良好。

2.4 脂肽类抗生素合成酶相关基因片段扩增

如图 10 所示,在伊枯草菌素(iturin)周围,甘蔗鞭黑粉菌菌丝不能正常生长,而丰原素(fengycin)和表面活性素(surfactin)对甘蔗鞭黑粉菌无抑制效果。分别以菌株 GB-3、GH16-3 和

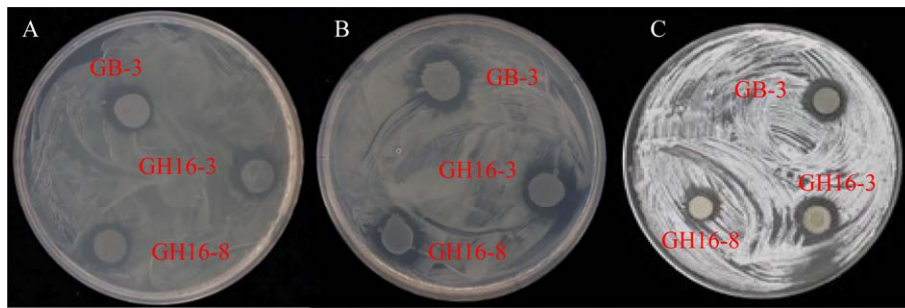


图 8 菌株对病原细菌的抑制效果

Figure 8 Inhibitory effect of strains on pathogenic bacteria. A: *Erwinia amylovora*. B: *Agrobacterium tumefaciens*. C: *Streptomyces scabies*.

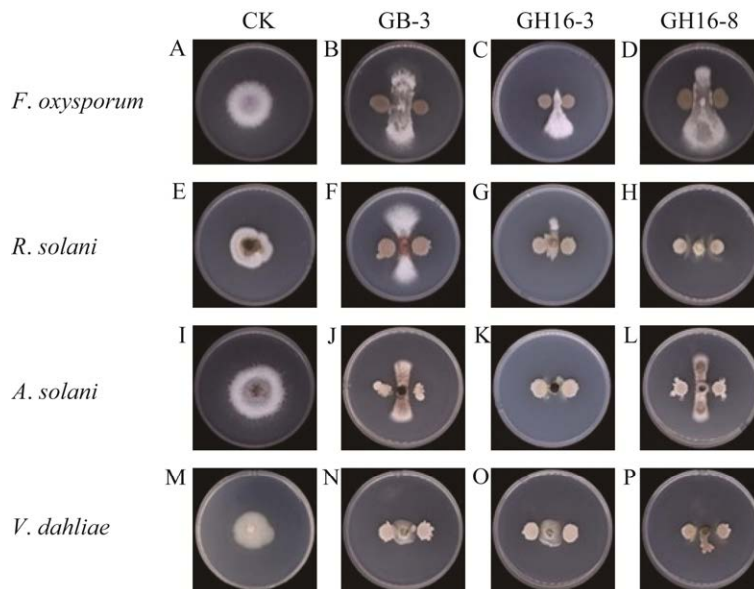


图 9 菌株对病原真菌的抑制效果

Figure 9 Inhibitory effect of strains on pathogenic fungi. A–D: *Fusarium oxysporum*. E–H: *Rhizoctonia solani*. I–L: *Alternaria solani*. M–P: *Verticillium dahliae*.

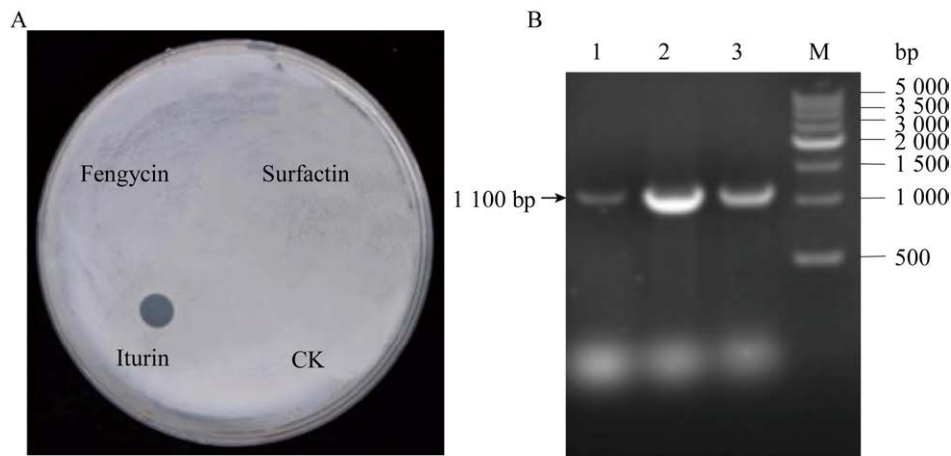


图 10 脂肽类抗生素对鞭黑粉菌的抑制效果

Figure 10 Bacteriostatic effect of lipopeptide antibiotics on *Sporisorium scitamineum*. A: Results of plate confrontation between fengycin, surfactin, iturin, and sterile water with *S. scitamineum*, respectively. B: Electrophoretic results of amplification of *ituA* gene by three strains of antagonistic bacteria. Lanes 1–3 are GB-3, GH16-3, GH16-8 in order; M is 500 bp DNA Ladder.

GH16-8 基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出 1 100 bp 的目的条带, 与伊枯草菌素关键合成酶 *ituA* 基因片段大小一致, 将 PCR 产物测序结果在 NCBI 上比对, 发现其序列均与解淀粉芽孢杆菌 LL3 (CP002634) 中的伊枯草菌素合成酶 *ituA* 基因高度同源, 序列相似度达到 98% 以上, 初步判断 3 株菌均可通过产生伊枯草菌素实现对鞭黑粉菌的抑制作用, 这一结果与张桂英等的研究一致^[27]。

2.5 拮抗菌对甘蔗黑穗病的防控效果

2.5.1 盆栽防病试验

为了进一步验证拮抗菌对甘蔗黑穗病的防控效果, 本研究选用黑穗病高感品种‘桂糖 60’作为参试植物, 在温室盆栽条件下人为接种甘蔗鞭黑粉菌和拮抗菌。发病情况统计结果如图 11 所示, 3 株菌对甘蔗黑穗病均有较好的控制效果, 其中水处理组 CK1 均未发病; 鞭黑粉菌处理组 CK2 发病率为 44.81%; 拮抗菌 GB-3、GH16-3、GH16-8 与病原菌共处理组发病率分别

为 11.51%、10.37% 和 14.07%, 显著低于 CK2, 防效分别达 74.33%、76.57% 和 69.07%。

2.5.2 田间试验

为了验证盆栽试验结果的准确性, 选择广西百色田东县黑穗病高发蔗田, 以‘柳城 05-136’作为参试品种, 进行大田随机区组试验, 进一步观察菌株的抑病功能。统计结果如图 12 所示, 3 个参试菌株对甘蔗黑穗病均有较好的防控效果, 其中, 水处理组 CK 的平均发病率为 43.53%, 拮抗菌处理组发病率显著低于 CK, GB-3 处理组发病率为 34.79%, 防效为 20.08%; GH16-3 处理组发病率为 19.33%, 防效为 55.59%; GH16-8 处理组发病率为 21.73%, 防效为 50.08%。

3 讨论与结论

甘蔗鞭黑粉菌广泛分布于空气、土壤等蔗田环境, 厚垣孢子生命力强, 极易传播^[30], 引发的黑穗病难以控制。以菌治菌是突破其防控瓶颈

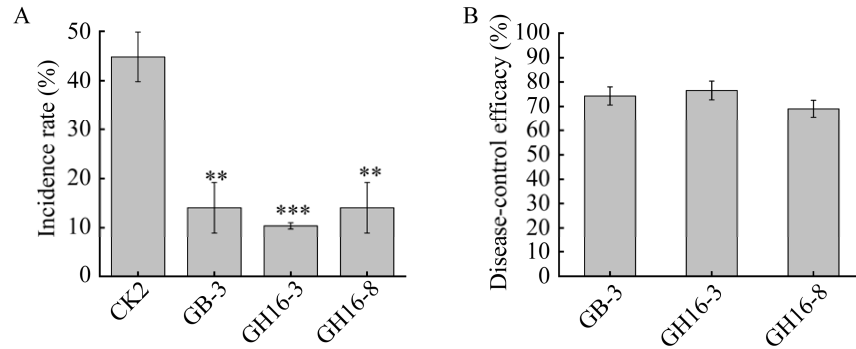


图 11 盆栽试验结果

Figure 11 Results of pot experiment. A and B are morbidity and efficacy statistics, respectively. *** $P < 0.001$, indicating extremely significant differences; ** $P < 0.01$, indicating highly significant differences.

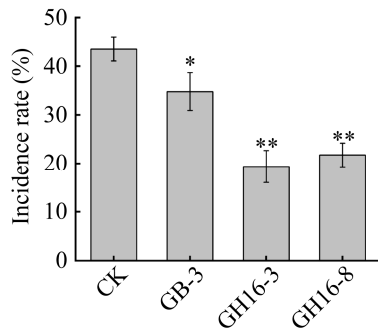


图 12 田间小区试验结果

Figure 12 Results of field plot experiment. ** $P < 0.01$, indicating highly significant differences; * $P < 0.05$, indicating significant differences.

的重要途径。研究显示在不同生态的土壤环境中,微生物群落结构存在极大差异^[31],病原菌生长繁殖及危害程度大相径庭,拮抗菌的抑菌效果也完全不同^[32]。大多数拮抗菌环境适应性较差,在极端盐碱以及化肥农药大量富集的土壤环境中难以定殖^[33],无论是 Jayakumar 等分离的内生细菌,还是 Tegene 等筛选的拮抗真菌,目前均处于平板对峙和盆栽试验阶段,田间试验中表现较好的菌剂鲜有报道^[15-16]。国内登记的 567 类有效菌种,应用率尚不足 30%^[34],在甘蔗生产中得以应用的更少。因此,筛选可耐受极端环境的生防菌株是提高黑穗病防控效果的重要措施。本研究分离鉴定的贝莱斯芽孢杆菌 GB-3、GH16-3 以及解淀粉芽孢杆菌 GH16-8,不仅可以

在 pH 5.0–9.0、NaCl 浓度 1%–5% 的环境中正常生长,对于甲基硫菌灵等甘蔗生产中常用化学农药表现不敏感,还可高效抑制甘蔗鞭黑粉菌以及致病性链霉菌、大丽轮枝菌等其他农作物的重要土传病害病原菌,在大田试验中显示出较好的防病促生效果。

甘蔗是光合能力最强的 C₄ 作物,养分需求量大,氮磷钾用量比例为 1:0.21:1.25^[35]。在实际生产中,人们常以养分平衡型复合肥投入为主,磷素比例过高, P₂O₅ 含量甚至高达 465–513 kg/hm²,而每生产 1 t 甘蔗仅需 P₂O₅ 0.45–0.51 kg^[36]。不合理施肥导致过量的磷素与土壤胶体中的钙、铝、铁等离子结合形成难溶性磷酸盐而逐年富集于土壤。Cao 等最新研究发现,磷素在土壤中大量沉积不仅诱发致病性链霉菌的快速繁殖,也显著降低了拮抗菌的丰度和拮抗功能;而具有解磷功能的拮抗菌防病效果更佳^[37]。尽管解磷细菌在植物营养和自然界磷循环中起着重要作用,但关于拮抗菌解磷能力对土传病害防控效果增益方面的报道依然很少。因此,筛选和研究解磷细菌对甘蔗黑穗病的防控效果十分必要。

鞭黑粉菌的厚垣孢子可在适宜的环境条件下萌发形成菌丝侵入蔗芽,并向生长点蔓延,通过传播媒介,厚垣孢子附着在蔗茎的侧生芽上,进而对甘蔗的侧枝或分蘖造成危害。甘蔗表皮坚

硬光滑且蜡质丰富,茎叶喷施的药剂难以渗透到植株内部,化学防控效率低下^[38]。生防菌可定殖于蔗田土壤,有效抑制病原菌菌丝生长及孢子萌发,从而降低其侵染植物的几率,因此,以菌治菌是一种防控甘蔗黑穗病极具潜力的措施。芽孢杆菌是农业生产中常用的益生菌,可通过形成内生孢子,在恶劣的土壤环境中长期存活,并通过产生脂肽类抗生素、几丁质酶和蛋白酶等次生代谢物,抑制植物病原菌的生长。依据微生物肥料质量安全评价通用准则^[39],解淀粉芽孢杆菌和贝莱斯芽孢杆菌均对环境友好,可免作毒理学试验、直接应用于农业生产。本研究鉴定的3株拮抗菌,代谢产物中均检测到伊枯草菌素,可在偏酸性土壤环境中有效抑制鞭黑粉菌孢子的生长和繁殖,从而降低黑穗病的危害程度。其中表现较好的贝莱斯芽孢杆菌 GH16-3,盆栽防效达76.57%,田间防效达55.59%,具有良好的产业化前景。

参考文献

- [1] SCHENCK S, PEAR HM, LIU Z. Genetic variation of *Ustilago scitaminea* pathotypes in Hawaii evaluated by host range and AFLP markers[J]. *Sugarcane International*, 2005, 23: 15-19.
- [2] 李杨瑞. 现代甘蔗学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
LI YR. Modern Sugarcane Science[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010 (in Chinese).
- [3] 刘晓雪, 邬志军, 周靖昀. 2021/22 年榨季国内外食糖市场回顾与 2022/23 年榨季展望[J]. *甘蔗糖业*, 2022, 51(4): 54-65.
LIU XX, WU ZJ, ZHOU JY. Review of domestic and international sugar markets in the 2021/22 crushing season and outlook for the 2022/23 crushing season[J]. *Sugar Cane & Sugar Industry*, 2022, 51(4): 54-65 (in Chinese).
- [4] LI XY, SUN HD, ROTT PC, WANG JD, HUANG MT, ZHANG QQ, GAO SJ. Molecular identification and prevalence of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* causing red stripe of sugarcane in China[J]. *Plant Pathology*, 2018, 67(4): 929-937.
- [5] 孟建玉, 张慧丽, 林岭虹, 黄宏阳, 高三基. 甘蔗白条病及其致病菌 *Xanthomonas albilineans* 研究进展[J]. *植物保护学报*, 2019, 46(2): 257-265.
MENG JY, ZHANG HL, LIN LH, HUANG HY, GAO SJ. Research advances in sugarcane leaf scald disease and its causal agent *Xanthomonas albilineans*[J]. *Journal of Plant Protection*, 2019, 46(2): 257-265 (in Chinese).
- [6] 王长秘, 李婕, 张荣跃, 王晓燕, 单红丽, 仓晓燕, 尹炯, 罗志明, 黄应昆. 甘蔗黑穗病研究进展[J]. *中国糖料*, 2021, 43(2): 65-70.
WANG CM, LI J, ZHANG RY, WANG XY, SHAN HL, CANG XY, YIN J, LUO ZM, HUANG YK. Research progress of sugarcane smut disease[J]. *Sugar Crops of China*, 2021, 43(2): 65-70 (in Chinese).
- [7] LING H, FU XQ, HUANG N, ZHONG ZF, SU WH, LIN WX, CUI HT, QUE YX. A sugarcane smut fungus effector simulates the host endogenous elicitor peptide to suppress plant immunity[J]. *The New Phytologist*, 2022, 233(2): 919-933.
- [8] 吴伟怀, 谢祖健, 贺春萍, 郑肖兰, 李锐, 郑服丛. 甘蔗黑穗病菌冬孢子生物学特性及杀菌剂对其萌发的影响[J]. *热带作物学报*, 2009, 30(11): 1674-1678.
WU WH, XIE ZJ, HE CP, ZHENG XL, LI R, ZHENG FC. Biological characteristics of teliospores of *Ustilago scitaminea* and virulence of 2 fungicides against them indoor[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2009, 30(11): 1674-1678 (in Chinese).
- [9] CROFT BJ, BRAITHWAITE KS. Management of an incursion of sugarcane smut in Australia[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2006, 35(2): 113-122.
- [10] 卢文洁, 李文凤, 黄应昆. 甘蔗黑穗病发生及防治研究进展[J]. *中国糖料*, 2008(3): 64-66.
LU WJ, LI WF, HUANG YK. Research advances on sugarcane Smut disease occurrence and control[J]. *Sugar Crops of China*, 2008(3): 64-66 (in Chinese).
- [11] 王泽平, 徐林, 段维兴, 邓展云, 张革民, 王伦旺, 刘晓静, 韦金菊, 刘海斌. 甘蔗优良新品种桂糖 41 号选育与特性研究[J]. *中国糖料*, 2015, 37(2): 4-6.
WANG ZP, XU L, DUAN WX, DENG ZY, ZHANG GM, WANG LW, LIU XJ, WEI JJ, LIU HB. Study on breeding and characteristics of new sugarcane variety Guitang 41[J]. *Sugar Crops of China*, 2015, 37(2): 4-6 (in Chinese).
- [12] 经艳, 王伦旺, 唐仕云, 谭芳, 李翔, 杨荣仲, 黄海荣, 邓宇驰, 李杨瑞. 甘蔗新品种桂糖 44 号的选育及高产栽培技术[J]. *亚热带农业研究*, 2015, 11(4): 230-235.
JING Y, WANG LW, TANG SY, TAN F, LI X, YANG RZ, HUANG HR, DENG YC, LI YR. Selection and breeding of new sugarcane variety Gui Sugar 44 and

- high-yield cultivation technology[J]. *Subtropical Agricultural Research*, 2015, 11(4): 230-235 (in Chinese).
- [13] CHEN RK, YUAN ZN. Sugarcane production and research in China[J]. *International Sugar Journal*, 2010, 112(1340): 452-457.
- [14] 朱桂宁, 林珊宇, 贤小勇, 颜梅新, 黄福新, 秦碧霞. 5种杀菌剂对甘蔗黑穗病的防控试验[J]. *南方农业学报*, 2014, 45(8): 1393-1397.
- ZHU GN, LIN SY, XIAN XY, YAN MX, HUANG FX, QIN BX. Field control test of 5 fungicides to sugarcane smut[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2014, 45(8): 1393-1397 (in Chinese).
- [15] JAYAKUMAR V, RAMESH SUNDAR A, VISWANATHAN R. Biological suppression of sugarcane smut with endophytic bacteria[J]. *Sugar Tech*, 2019, 21(4): 653-660.
- [16] TEGENE S, DEJENE M, TEREFE H, TEGEGN G, TENA E, AYALEW A. Evaluation of native *Trichoderma* isolates for the management of sugarcane smut (*Ustilago scitaminea*) in sugar plantations of Ethiopia[J]. *Cogent Food & Agriculture*, 2021, 7(1): 1872853-1872875.
- [17] 张旭娜. 两株甘蔗内生细菌对甘蔗鞭黑粉菌的作用研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院硕士学位论文, 2020.
- ZHANG XN. Effects of two sugarcane endophytic bacteria on *Sporisorium scitamineum*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2020 (in Chinese).
- [18] YAN MX, ZHU GN, LIN SY, XIAN XY, CHANG CQ, XI PG, SHEN WK, HUANG WH, CAI EP, JIANG ZD, DENG YZ, ZHANG LH. The mating-type locus b of the sugarcane smut *Sporisorium scitamineum* is essential for mating, filamentous growth and pathogenicity[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2016, 86: 1-8.
- [19] 赵永龙, 赵盼, 曹晶晶, 汪志琴, 刘璐, 仲乃琴. 疣痂链霉菌拮抗菌定向筛选及其功能评价[J]. *微生物学报*, 2022, 62(7): 2624-2641.
- ZHAO YL, ZHAO P, CAO JJ, WANG ZQ, LIU L, ZHONG NQ. Targeted screening and functional evaluation of the bacterial antagonists to *Streptomyces scabies*[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2624-2641 (in Chinese).
- [20] 曹晶晶, 熊桐梓, 钞亚鹏, 赵盼, 汪志琴, 仲乃琴. 极耐盐碱固氮菌的分离鉴定及固氮特性研究[J]. *微生物学报*, 2021, 61(11): 3483-3495.
- CAO JJ, XIONG MZ, CHAO YP, ZHAO P, WANG ZQ, ZHONG NQ. Isolation and identification of extremely salt-tolerant azotobacter and its nitrogen-fixing characteristics[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(11): 3483-3495 (in Chinese).
- [21] 茹素龙, 赵永龙, 王紫薇, 曹晶晶, 汪志琴, 赵盼, 仲乃琴. 产胞外多糖菌株的分离鉴定及其功能研究[J]. *微生物学报*, 2023, 63(11): 4315-4329.
- RU SL, ZHAO YL, WANG ZW, CAO JJ, WANG ZQ, ZHAO P, ZHONG NQ. Isolation, identification, and functional characterization of exopolysaccharide-producing strains[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(11): 4315-4329 (in Chinese).
- [22] 李振东, 陈秀蓉, 李鹏, 满百膺. 珠芽蓼内生菌 Z5 产 IAA 和抑菌能力测定及其鉴定[J]. *草业学报*, 2010, 19(2): 61-68.
- LI ZD, CHEN XR, LI P, MAN BY. Identification of *Polygonum viviparum* endophytic bacteria Z5 and determination of the capacity to secrete IAA and antagonistic capacity towards pathogenic fungi[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2010, 19(2): 61-68 (in Chinese).
- [23] 高学文, 姚仕义, Huong Pham, Joachim Vater, 王金生. 枯草芽孢杆菌 B2 菌株产生的抑菌活性物质分析[J]. *中国生物防治*, 2003, 19(4): 175-179.
- GAO XW, YAO SY, Huong Pham, Joachim Vater, WANG JS. Inhibitive substance produced by *Bacillus subtilis* B2 strain[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2003, 19(4): 175-179 (in Chinese).
- [24] 王皓楠, 靳鹏飞, 刘文波, 林春花, 缪卫国, 郑服丛. 解淀粉芽孢杆菌 HAB-6 抑菌活性成分的分析[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(3): 452-458.
- WANG HN, JIN PF, LIU WB, LIN CH, MIAO WG, ZHENG FC. Characterization of the active substances of *Bacillus amyloliquefaciens* HAB-6[J]. *Journal of Plant Protection*, 2016, 43(3): 452-458 (in Chinese).
- [25] 钱常娣, 李宝庆, 赵添, 郭庆港, 鹿秀云, 李社增, 马平. 枯草芽孢杆菌 BAB-1 脂肽类化合物的分离及稳定性分析[J]. *中国农业科学*, 2009, 41(2): 196-202.
- QIAN CD, LI BQ, ZHAO T, GUO QG, LU XY, LI SZ, MA P. Isolation and stability analysis of lipopeptides from *Bacillus subtilis* BAB-1[J]. *Chinese Agricultural Science*, 2009, 41(2): 196-202 (in Chinese).
- [26] STEIN T, BORCHERT S, CONRAD B, FEESCHE J, HOFEMEISTER B, HOFEMEISTER J, ENTIAN KD. Two different lantibiotic-like peptides originate from the ericin gene cluster of *Bacillus subtilis* A1/3[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(6): 1703-1711.
- [27] 张桂英. 甘蔗黑穗病拮抗细菌的分离筛选鉴定及拮抗机制的研究[D]. 南宁: 广西大学硕士学位论文, 2002.
- ZHANG GY. Isolation screening and identification of antagonistic bacteria against *Ustilago scitaminea*

- sydow and studies on their antagonistic mechanisms[D]. Nanning: Master's Thesis of Guangxi University, 2002 (in Chinese).
- [28] 黄家雍, 何红, 闭少玲, 张革民, 梁丽琼. 抗黑穗病甘蔗优良品系的筛选[J]. 广西蔗糖, 2001(1): 6-8.
HUANG JY, HE H, BI SL, ZHANG GM, LIANG LQ. Screening of excellent sugarcane lines with smut resistance[J]. Guangxi Sugar Industry, 2001(1): 6-8 (in Chinese).
- [29] 朱桂宁. 甘蔗鞭黑粉菌有性配合与致病相关基因分离及功能鉴定[D]. 广州: 华南农业大学博士学位论文, 2019.
ZHU GN. Isolation and functional identification of the genes associated with mating and pathogenicity of *Sporisorium scitamineum*[D]. Guangzhou: Doctoral Dissertation of South China Agricultural University, 2019 (in Chinese).
- [30] 谢光杰, 段振峰, 王震, 余卓新, 邢永秀, 李杨瑞. 甘蔗黑穗病拮抗细菌的促生长特性及其防治效果研究[J]. 南方农业学报, 2021, 52(11): 3013-3021.
XIE GJ, DUAN ZF, WANG Z, YU ZX, XING YX, LI YR. Plant growth-promoting characteristics and control effect of antagonistic bacteria against sugarcane smut[J]. Journal of Southern Agriculture, 2021, 52(11): 3013-3021 (in Chinese).
- [31] 熊惘梓, 钞亚鹏, 赵盼, 宋双伟, 石莹莹, 莫乘宝, 仲乃琴. 不同生境马铃薯根际土壤细菌多样性分析[J]. 微生物学报, 2020, 60(11): 2434-2449.
XIONG MZ, CHAO YP, ZHAO P, SONG SW, SHI YY, MO E, ZHONG NQ. Comparison of bacterial diversity in rhizosphere soil of potato in different habitats[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(11): 2434-2449 (in Chinese).
- [32] 莫柳莹. 不同环境条件下水稻土硝酸盐还原过程及其功能微生物特征[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2017.
MO LY. The characteristics of nitrate reduction process and the related function microbes in paddy soils under different environmental conditions[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [33] FRAVEL DR. Commercialization and implementation of biocontrol[J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 43: 337-359.
- [34] 李华. 农业农村部负责的肥料产品登记管理现状分析[J]. 中国土壤与肥料, 2022(12): 213-217.
LI H. Analysis on status of registration and management of fertilizer products in charge by the Ministry of Agriculture and Rural Affairs[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2022(12): 213-217 (in Chinese).
- [35] 李双霖. 水田甘蔗配施氮磷钾的研究[J]. 甘蔗糖业, 1983(11): 16-20.
LI SL. Study on combined application of nitrogen, phosphorus and potassium to sugarcane in paddy field[J]. Sugarcane and Canesugar, 1983(11): 16-20 (in Chinese).
- [36] 尚怀国, 李莉, 王克健, 谭宏伟, 兰宗宝, 杨本鹏, 彭李顺, 冷杨. 甘蔗生产化肥农药减施增效技术研究进展[J]. 西南农业学报, 2020, 33(1): 211-216.
SHANG HG, LI L, WANG KJ, TAN HW, LAN ZB, YANG BP, PENG LS, LENG Y. Research progress on chemical fertilizer and pesticide application reduction and efficiency enhancement technologies of sugarcane production[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2020, 33(1): 211-216 (in Chinese).
- [37] CAO JJ, WANG ZQ, WU JH, ZHAO P, LI CC, LI XB, LIU L, ZHAO YL, ZHONG NQ. Phosphorus accumulation aggravates potato common scab and to be controlled by phosphorus-solubilizing bacteria[J]. Science Bulletin, 2023, 68(20): 2316-2320.
- [38] WANG Z, YU ZX, SOLANKI MK, YANG LT, XING YX, DONG DF, LI YR. Diversity of sugarcane root-associated endophytic *Bacillus* and their activities in enhancing plant growth[J]. Journal of Applied Microbiology, 2020, 128(3): 814-827.
- [39] 国家市场监督管理总局, 全国肥料和土壤调理剂标准化技术委员会. 微生物肥料质量安全评价通用准则: GB/T 41728—2022[S]. 北京: 中国标准出版社, 2022.
State Administration for Market Regulation, National Fertilizer and Soil Conditioner Standardization Technical Committee. General guidelines for quality and safety evaluation of microbial fertilizer: GB/T 41728—2022[S]. Beijing: Standards Press of China, 2022 (in Chinese).