

研究报告

烟草疫霉生防放线菌的分离鉴定、功能探究及培养条件优化

程康, 何勇, 李迪, 闵艳艳, 许淑雅, 卢云亮, 齐永霞, 陈方新*

安徽农业大学 植物保护学院 作物有害生物综合治理安徽省重点实验室 植物病虫害生物学与绿色防控
安徽普通高校重点实验室, 安徽 合肥 230036

程康, 何勇, 李迪, 闵艳艳, 许淑雅, 卢云亮, 齐永霞, 陈方新. 烟草疫霉生防放线菌的分离鉴定、功能探究及培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2025, 52(5): 2172-2188.

CHENG Kang, HE Yong, LI Di, MIN Yanyan, XU Shuya, LU Yunliang, QI Yongxia, CHEN Fangxin. Isolation, identification, functional investigation, and culture condition optimization of biocontrol actinomycetes against *Phytophthora nicotianae*[J]. Microbiology China, 2025, 52(5): 2172-2188.

摘要:【背景】烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)是引起烟草黑胫病的重要病原菌,严重影响烟草种植业的生产 and 经济效益。采用病原菌的拮抗微生物进行生物防治,是一种控制植物病害的有效途径。【目的】从不同作物的根际土壤环境中分离具有拮抗烟草疫霉活性的放线菌,评价其生物防治效果和促生能力,并对其培养条件进行优化。【方法】采取稀释涂布平板法从作物根际土壤样本中分离放线菌,结合形态学分析、生理生化检测和 16S rRNA 基因序列比对分析对菌株进行鉴定;通过菌丝生长抑制、离体叶片和室内盆栽等试验进一步探索放线菌对烟草疫霉的拮抗作用。使用铬天青(chrome azurol sulphonate, CAS)平板检测法、产蛋白酶和烟草种子萌发等试验对菌株进行促生能力的测定;利用单因素试验优化发酵工艺。【结果】分离得到一株既对烟草疫霉产生拮抗作用又具有促生作用的菌株 FK-15,经菌落形态和碱基序列比对分析,鉴定菌株 FK-15 为苍黄拟无枝酸菌(*Amycolatopsis lurida*),对烟草疫霉的抑制率达到 80.37%,室内盆栽防治效果为 61.55%。同时,有嗜铁和产蛋白酶能力,利用该菌株制备的发酵液处理烟草种子后,胚根长度增加 53.12%,胚芽长度增加 51.20%,活力指数增加 73.09%,促生能力显著提升;培养条件优化后菌株生长量增加 132.48%,抑菌率增加 198.80%。【结论】本研究从不同土壤环境中分离出一株具有强拮抗烟草疫霉能力的促生放线菌 FK-15。进一步优化其培养条件,有望在实际应用中发挥作用。

关键词: 根际放线菌; 苍黄拟无枝酸菌; 拮抗作用; 促生作用; 培养条件优化

资助项目: 中国烟草总公司重点研发项目(110202202014)

This work was supported by the Major Research and Development Program of China National Tobacco Corporation (110202202014).

*Corresponding author. E-mail: superpowercfxa163.com

Received: 2024-08-16; Accepted: 2024-11-04; Published online: 2024-11-21

Isolation, identification, functional investigation, and culture condition optimization of biocontrol actinomycetes against *Phytophthora nicotianae*

CHENG Kang, HE Yong, LI Di, MIN Yanyan, XU Shuya, LU Yunliang, QI Yongxia, CHEN Fangxin*

Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops of Anhui Province, Key Laboratory of Biology and Sustainable Management of Plant Diseases and Pests of Anhui Higher Education Institutes, School of Plant Protection, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

Abstract: [Background] *Phytophthora nicotianae* is a key pathogen causing tobacco black shank, severely impacting the cultivation and economic benefits of tobacco. Using antagonistic microorganisms for biocontrol is an effective approach of managing plant diseases. [Objective] To isolate actinomycetes with antagonistic activity against *P. nicotianae* from the rhizosphere soil of various crops, evaluate their biocontrol and plant growth-promoting effects, and optimize their culture conditions. [Methods] Actinomycetes were isolated from crop rhizosphere soil samples by the dilution-plate method and identified by morphological observation, physiological and biochemical tests, and 16S rRNA gene sequence comparison. The antagonistic effects of the isolates against *P. nicotianae* were evaluated by the mycelial growth inhibition assay, detached leaf assay, and indoor pot experiments. The plant growth-promoting effects of the strains were assessed by CAS plate culture, protease production, and tobacco seed germination tests. The culture conditions of the strains were optimized by single factor experiments. [Results] A strain, FK-15, exhibiting both antagonistic activity against *P. nicotianae* and tobacco growth-promoting effects, was isolated and identified as *Amycolatopsis lurida*. It showed an inhibition rate of 80.37% against *P. nicotianae* and the indoor control efficacy of 61.55%. Additionally, it demonstrated the abilities of producing siderophores and proteases. Treatment of tobacco seeds with the fermentation broth of FK-15 increased the radicle length, plumule length, and vigor index by 53.12%, 51.20%, and 73.09%, respectively, which indicated significant plant growth-promoting effects. After optimization of the culture conditions, the biomass and inhibition rate of the strain increased by 132.48% and 198.80%, respectively. [Conclusion] This study isolated a plant growth-promoting actinomycete strain FK-15 with strong antagonistic activity against *P. nicotianae* from different soil environments. Further optimization of its culture conditions may enable its practical application.

Keywords: rhizospheric actinomycetes; *Amycolatopsis lurida*; antagonistic effect; plant growth-promoting effect; optimization of culture conditions

烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)引起的烟草黑胫病, 广泛分布且危害严重。该病主要侵袭烟株的根茎部, 随后蔓延至茎髓, 导致茎节逐渐变黑坏死, 严重时可致整株枯死, 对烟草产业构成重大威胁^[1]。其影响范围跨越全国

乃至全球, 广泛侵扰烟草种植领域, 造成巨大的经济损失, 破坏生态环境的稳定与平衡, 对可持续发展构成严峻考验^[2]。

目前, 烟草黑胫病防治困难, 主要策略包括采用抗性品种、轮作等农业措施, 并搭配化

学药剂进行防治^[3]。由于高抗性烟草品种稀缺,并且其抗性随环境与病原菌协同进化逐渐减弱或消失,面对黑胫病的大范围暴发,化学防治手段显得尤为重要,但其缺点也不容忽视。病原菌长时间受到化学农药的影响容易产生抗性,进而增加了防治成本和难度。当前,一种更加环保与可持续的病害管理策略正逐渐兴起,即利用有益微生物或植物自身产生的独特代谢产物来实施生物防治。这种方法有望减少对化学药剂的依赖,构建一个更加绿色的农业生态系统,标志着向绿色农业转型的重要一步^[4]。韩瑞华等^[5]通过使用甲霜灵与玫瑰黄链霉菌(*Streptomyces roseoflavus*) LN33 按比例制成复配剂对烟草疫霉盆栽防治效果达到 86.96%,可将化学农药的使用量缩减一半。何明川等^[6]研究发现,分离得到的一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) MC4-2 对烟草疫霉具有较好的拮抗效果,抑制率可达到 64.04%,盆栽试验中测定防治效果可达 63.86%。章舸等^[7]将健康烟草根际土壤中分离得到的放线菌(*Actinomycetes*) H-3 用于防治烟草黑胫病,田间防效达到 70.42%。刘鹤等^[8]分离出一株淀粉酶产色链霉菌(*Streptomyces diastatochromogenes*),在菌丝生长抑制试验中发现其发酵液产物对黑胫病菌的 EC_{50} 达到 40.74 $\mu\text{g/mL}$,有望为烟草黑胫病的防治提供新思路。

本试验以作物根际土壤中分离得到的放线菌作为供试菌株,根据形态学、生理生化特性和分子生物学确定菌株分类地位。通过抑菌谱测定、菌丝抑制和室内盆栽等试验探索供试菌株的生防效果。探究该菌株的嗜铁和产蛋白酶等促生能力及其对烟草种子萌发的影响。同时,采用单因素试验确定菌株生长的适宜条件,为放线菌在植物病害防控领域的应用提供材料基础。

1 材料与方法

1.1 样品

分别在安徽省合肥市、阜阳市、亳州市和

六安市多种农作物田地中采集作物根际土壤,使用五点取样法,间距约 10 m,在距离表面土 5–10 cm 处收集土样,放置于无菌自封袋,室温保存。

烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、烟草根腐病菌(*Fusarium equiseti*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、拟轮枝镰孢(*Fusarium verticillioides*)、苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)、番茄枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*),由安徽农业大学植物保护学院植物病理实验室提供。

本氏烟(*Nicotiana benthamiana*),由安徽农业大学植物保护学院植物病理实验室提供。

1.2 培养基

高氏 1 号培养基、高氏 1 号培养液和马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基参考文献[9]配制,铬天青(chrome azurol sulphonate, CAS)培养基参考文献[10]配制, LB 培养基、酵母蔗糖蛋白胨(yeast sucrose peptone, YSP)培养基和营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基参考文献[11]配制,牛肉膏蛋白胨酵母(beef peptone yeast, BPY)培养基参考文献[12]配制,酵母葡萄糖牛肉浸粉(nutrient yeast dextrose, NYD)培养基参考文献[13]配制,蛋白酶检测培养基参考文献[14]配制。营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基:蛋白胨 10 g,牛肉浸粉 3 g, NaCl 5 g, 纯水 1 L。

1.3 主要试剂和仪器

25%甲霜灵可湿性粉剂,江苏宝灵化工股份有限公司。

立式压力蒸汽灭菌器,上海博迅实业有限公司;微量高速离心机,长沙平凡仪器仪表有限公司;恒温培养振荡器,上海智城分析仪器制造有限公司。

1.4 放线菌的分离

采用稀释涂布平板法^[15]将采自不同作物根

际土样分别制成浓度为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 的土壤悬浮液, 均匀涂布于高氏 1 号培养基平板上, 待菌落长出后, 根据菌株的生长性状进行初步筛选, 并采用划线法纯化。

1.5 放线菌的鉴定

1.5.1 革兰氏染色

挑取活化的菌株置于载玻片, 参考谭啸等^[16]方法进行革兰氏染色, 40 倍显微镜下观察染色情况。

1.5.2 部分生理生化特性测定

参考文献[17]对从土壤中分离得到的供试菌株 FK-15 进行过氧化氢酶反应试验、V-P 试验、产氨试验、甲基红试验、淀粉水解试验、纤维素酶检测试验、吲哚反应试验、柠檬酸盐试验、荧光色素试验和脂酶试验, 从而为其种属关系的确定提供依据。

1.5.3 分子生物学鉴定

参考周双清等^[18]方法提取放线菌的 DNA。16S rRNA 基因扩增引物为 27F (5'-AGAGTTTG ATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGCTA CCTTGTTACGACTT-3')。PCR 反应体系(50 μ L): 2 $\times$ Rapid Taq Master Mix 25 μ L, 27F (10 μ mol/L) 2 μ L, 1492R (10 μ mol/L) 2 μ L, 模板 DNA (80 ng/ μ L) 5 μ L, ddH₂O 16 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物送至擎科生物技术有限公司测序。将公司测得的 16S rRNA 基因序列于 NCBI 官方网站中进行同源性比较, 并利用 MEGA 7.0 软件采用 neighbor-joining 法构建其系统发育树。

1.6 放线菌的拮抗作用

1.6.1 放线菌对烟草疫霉菌丝生长的影响

将分离得到的菌株 FK-15 在高氏 1 号培养基上 25 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后, 采用平板对峙法, 取烟草疫霉菌饼(5 mm)放置于 PDA 平板(90 mm)中央, 将菌株 FK-15 菌饼分别接入两侧距离 PDA 平板中央约 25 mm 处, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d, 显微镜

下观察对峙培养处烟草疫霉菌丝生长状态。

1.6.2 放线菌对植物病原菌的抑菌谱测定

分别将 1.1 中的植物病原菌与菌株 FK-15 对峙培养, 并根据公式(1)计算抑制率。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照组菌落生长直径} - \text{处理组菌落生长直径}}{\text{对照组菌落生长直径} - \text{菌饼直径}} \times 100 \quad (1)$$

1.6.3 放线菌处理液的抗菌活性

菌株发酵液的制备: 将菌株 FK-15 接入高氏 1 号培养液中, 28 $^{\circ}$ C、180 r/min 培养 3 d。

无菌上清液的制备: 将菌株发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min, 留上清液, 用 0.22 μ m 的细菌过滤器过滤。

菌悬液的制备: 将菌株发酵液于 12 000 r/min 离心 10 min, 去上清液, 加入无菌水重悬并振荡混匀。

药剂制备: 将 25% 甲霜灵可湿性粉剂与无菌水混合制成浓度为 0.05、0.1、0.2、0.4 和 0.8 μ g/mL 的药剂。

将上述 4 种处理液按 1:10 的比例添加至 PDA 培养基中, 采用平板对峙法于添加不同组分的 PDA 培养基上测定所得处理液对病原菌的影响, 试验设置 3 次重复。以无菌高氏 1 号培养液的平板作为阴性对照, 不同浓度药剂的平板作为阳性对照, 待阴性对照组菌丝长满整个平板后, 采用十字交叉法测定各个平板病原菌菌落直径, 并根据公式(2)计算菌丝生长抑制率。

$$\text{菌丝生长抑制率(\%)} = \frac{\text{阴性对照组菌落生长直径} - \text{处理组菌落生长直径}}{\text{阴性对照组菌落生长直径}} \times 100 \quad (2)$$

1.6.4 离体叶片试验

挑选大小相似的 5 周龄本氏烟叶片, 将病原菌饼接种于叶片正面和背面的主叶脉两侧, 在接种点滴加 60 μ L 放线菌发酵液作为处理组, 在接种点滴加等体积无菌水的叶片作为

对照组, 25 °C 黑暗保湿, 分别在接种后 0、24、48 和 72 h 观察接种点病斑扩展情况。

1.6.5 室内盆栽试验

待烟苗长出 10 片叶子, 株高约 15 cm 时, 挑选生长形态相似的健康烟株, 以无菌高氏 1 号液体培养基为阴性对照, 甲霜灵药剂为阳性对照。采用灌根的方式施加菌株 FK-15 发酵液、阴性对照处理液和阳性对照处理液, 3 d 后接种烟草疫霉游动孢子。其中, 发酵液 OD_{600} 值设为 1, 30 mL/株, 甲霜灵药剂浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$, 游动孢子的制备参照陈方新等^[19]方法, 浓度为 1×10^6 CFU/mL, 每株按 50 mL 的比例接种至烟苗茎基部。接种后 30 d 调查病株数和严重度, 烟草疫霉病情分级参照文献^[20]。病情指数和防治效果按公式(3)和(4)计算。

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{病级数} \times \text{该病级植株数})}{(\text{最大病级数} \times \text{植株总数})} \quad (3)$$

$$\text{防治效果}(\%) = \frac{\text{对照组病情指数} - \text{处理组病情指数}}{\text{对照组病情指数}} \times 100 \quad (4)$$

1.7 放线菌的促生作用

1.7.1 嗜铁能力的测定

将菌株 FK-15 菌饼置于 CAS 培养基中 28 °C 培养 7 d。若菌饼周围出现黄色晕圈则证明该菌株可以产生铁载体, 判断菌株嗜铁能力。

1.7.2 产蛋白酶能力的测定

将菌株 FK-15 菌饼置于蛋白酶检测培养基中, 28 °C 培养 7 d。具有产蛋白酶能力的菌饼周围会出现透明圈, 判断菌株产蛋白酶能力。

1.7.3 放线菌对烟草种子萌发的影响

按照 1.6.3 方法制备菌株发酵液, 以无菌高氏 1 号液体培养基为对照组, 每个处理重复 3 次, 每个重复 30 粒烟草种子。挑选大小均匀、饱满、无伤的烟草种子, 用 30% NaClO 溶液消毒 30 min^[21], 无菌水反复冲洗, 菌株发酵液中浸泡 2 h。选择底部的种子, 无菌滤纸吸干种子表面溶液后放置于铺有 3 层湿润无菌滤纸的培养皿中, 在 25 °C、75% 相对湿度的温室中进行萌

发试验。每天定时开盖通气 2 次, 10 min/次, 为保证滤纸湿润, 根据实际情况及时补充无菌水。

烟草种子萌发标准以胚根突破种皮、出现露白为准, 萌发时间从浸种算起。按照朱丹瑞等^[22]方法测定并计算种子发芽势、发芽率和活力指数。

1.8 放线菌培养条件优化

1.8.1 生长曲线的测定

将高氏 1 号培养基上纯化培养的菌株 FK-15 接种至 LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 培养, 设置 5 组重复, 每隔 4 h 取样, 测定其 600 nm 处的吸光值, 根据所得数据绘制菌株的生长曲线。

1.8.2 单因素试验

分别在 LB、NB、YSP、NYD 和 BPY 液体培养基中加入 1% 培养 24 h 的菌株 FK-15 的菌液, 28 °C、180 r/min 培养, 培养时长根据 1.8.1 试验得出的结论, 测定 OD_{600} 值。同时, 测定其无菌上清液的抗菌活性, 测定方法参照 1.6.3, 从而确定基础培养基。

筛选碳源: 分别以蔗糖、葡萄糖、甘露醇、可溶性淀粉和玉米粉作为基础培养基组分中的碳源。

筛选氮源: 分别以蛋白胨、胰蛋白胨、黄豆饼粉、硫酸铵和牛肉浸粉作为基础培养基组分中的氮源。

在确定碳源和氮源后, 改变培养基装液量 (20、40、60、80 和 100 mL)、菌株种子液添加量 (1%、2%、3%、4% 和 5%) 和培养基初始 pH (6.0、6.5、7.0、7.5 和 8.0), 测定不同培养条件对菌株 FK-15 生长量和抗菌活性的影响^[23]。

2 结果与分析

2.1 菌株 FK-15 的分离及形态学鉴定结果

采用稀释涂布平板法分离, 划线法纯化, 观察形态特征, 初筛得到 21 株放线菌。采用平板对峙法及测定菌株促生能力等试验, 复筛得

到 4 株放线菌。综合筛选结果, 菌株 FK-15 对烟草疫霉的拮抗能力最强, 同时具备促生能力, 确定使用菌株 FK-15 进行后续试验。如图 1A–1C 所示, 其菌落白色, 形成致密的白色菌丝, 干粉状, 边缘不规则, 由图 1D 可知在 PDA 培养基上菌落呈淡黄色。如图 1E 所示, 在显微镜下观察, 孢子丝连接成链状, 有分支, 表面光滑。如图 1F 所示, 革兰氏染色结果为阳性。

2.2 菌株 FK-15 的生理生化特性结果

生理生化特性测定结果见表 1, 菌株 FK-15 阳性反应分别为柠檬酸盐、纤维素酶、吡啶反应和脂酶反应, 阴性反应分别为过氧化氢酶、甲基红试验、产氨试验、VP 试验、淀粉水解和荧光色素试验, 与参考文献[24]中的描述一致, 初步判断该菌株属于假诺卡氏菌科 (*Pseudonocardiaceae*)。

2.3 菌株 FK-15 的分子生物学鉴定结果

将菌株 FK-15 的 16S rRNA 基因序列在 NCBI 进行 BLAST 同源比对, 选取模式菌种构建系统发育树。该菌株与苍黄拟无枝酸菌 (*Amycolatopsis lurida*) SBU14 同聚一支, 其相似性为 99%, 结合菌株形态特征, 鉴定菌株 FK-15 为苍黄拟无枝酸菌(图 2)。将该基因序列提交至 GenBank 数据库, 登录号为 PQ127769。

2.4 菌株 FK-15 的拮抗作用

2.4.1 菌株 FK-15 对烟草疫霉菌丝生长的影响

基于平板对峙试验, 发现菌株 FK-15 对烟草疫霉菌丝生长具有明显抑制作用。在显微镜下观察发现, 正常生长的菌丝表面光滑、透明(图 3A)。在对峙培养处烟草疫霉菌丝发生畸形、缠绕和不规则弯曲, 菌丝分枝头部膨大(图 3B、3C)。

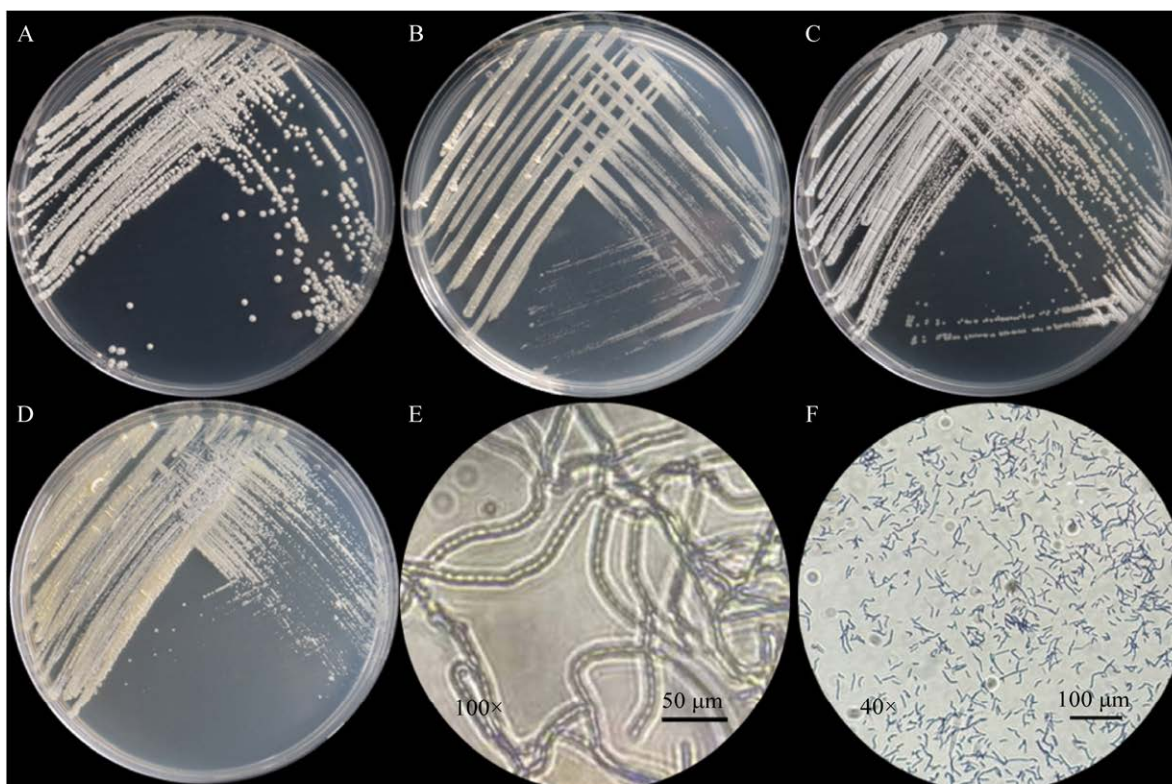


图 1 菌株 FK-15 的形态 A: 高氏 1 号培养基; B: NA 培养基; C: LB 培养基; D: PDA 培养基; E: 显微镜下的菌落形态; F: 革兰氏染色。

Figure 1 Morphology of strain FK-15. A: Gao's No. 1 medium; B: NA medium; C: LB medium; D: PDA medium; E: Colony morphology under microscope; F: Gram staining.

表 1 菌株 FK-15 生理生化特性测定结果

Table 1 Results of physiological and biochemical characteristics of strain FK-15

Item	Result
过氧化氢酶 Catalase	—
甲基红试验 Methyl red test	—
产氨试验 Ammonia production	—
VP test	—
淀粉水解 Starch hydrolyzed	—
柠檬酸盐 Citrate	+
纤维素酶 Cellulase	+
吡啉反应 Indole reaction	+
脂酶反应 Lipase reaction	+
荧光色素试验 Fluorescent pigment	—

+: 阳性反应; -: 阴性反应。

+: Positive reaction; -: Negative reaction.

2.4.2 菌株 FK-15 对植物病原菌的抑菌谱测定结果

采用平板对峙试验测定菌株 FK-15 对烟草黑胫病菌、烟草根腐病菌和小麦赤霉病菌等多种植物病原菌的拮抗能力,图 4 结果表明,菌株 FK-15 对全部供试病原菌均产生拮抗反应。由

表 2 可知,菌株 FK-15 表现出显著的抑菌广谱性,同时对烟草黑胫病菌的拮抗率高达 80.37%。

2.4.3 菌株 FK-15 的抗菌活性

4 种处理液之间呈现不同程度的抑制效果。从低到高设置 5 组阳性处理,根据图 5A–5E 显示,随着药剂浓度的增大,菌落直径逐渐减小,菌丝生长抑制率提高。由图 5G–5I 和表 3 可知,菌株 FK-15 的发酵液和菌悬液对烟草疫霉菌丝的生长有显著的抑制作用,抑制率分别为 53.92% 和 46.67%,显著高于抑制率为 1.68%、28.43% 和 40.51% 的甲霜灵药剂处理。无菌上清液具有一定程度的抑制效果,抑制率为 20.00%。综合试验结果,对烟草疫霉产生抑制作用的有效成分主要为菌株 FK-15 的菌体,代谢产物发挥的作用有限。

2.4.4 菌株 FK-15 代谢产物对烟草疫霉的抑菌效果

通过烟草离体叶片与烟草疫霉的互作体系,放线菌的代谢产物可以显著降低烟草疫霉对植物的侵染,表现为菌丝生长减缓,病斑变

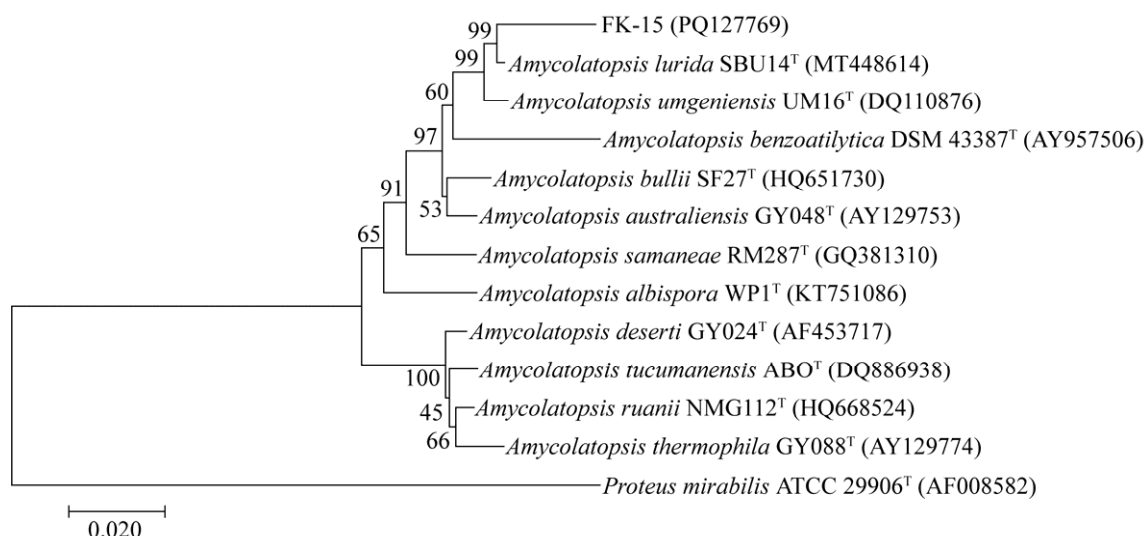


图 2 基于 16S rRNA 基因序列构建的菌株 FK-15 的系统发育树 括号中序号为 GenBank 登录号; T 表示模式菌株; 分支处数值表示基于 1 000 次重采样数据的 bootstrap 值; 标尺 0.020 表示进化距离。

Figure 2 Phylogenetic tree of strain FK-15 based on the 16S rRNA gene sequence. The serial number in brackets is the GenBank accession number; T stands for model strain; The value at the branch represents the bootstrap value based on 1 000 resampling data sets; Scale 0.020 represents nucleotide divergence.

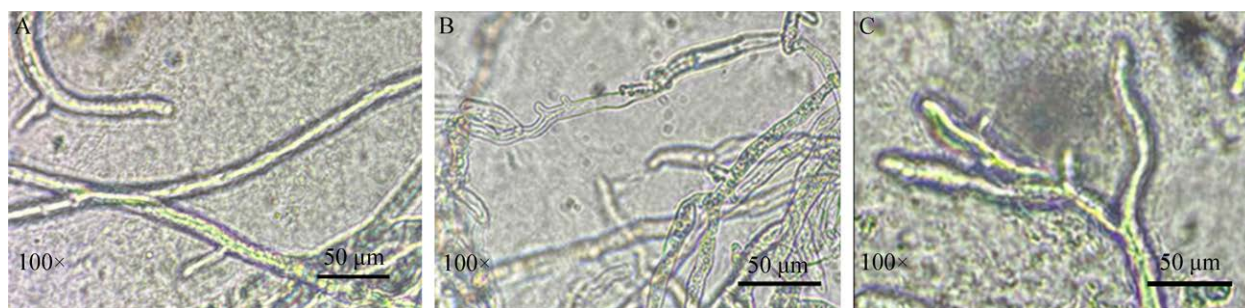


图3 菌株FK-15对烟草疫霉菌丝生长的影响 A: 正常状态烟草疫霉菌丝; B-C: 受菌株FK-15抑制的烟草疫霉菌丝。

Figure 3 Effect of strain FK-15 on the growth of *P. nicotianae* filaments. A shows Normal *P. nicotianae* filaments, and B-C shows strain FK-15 inhibited *P. nicotianae* filaments.

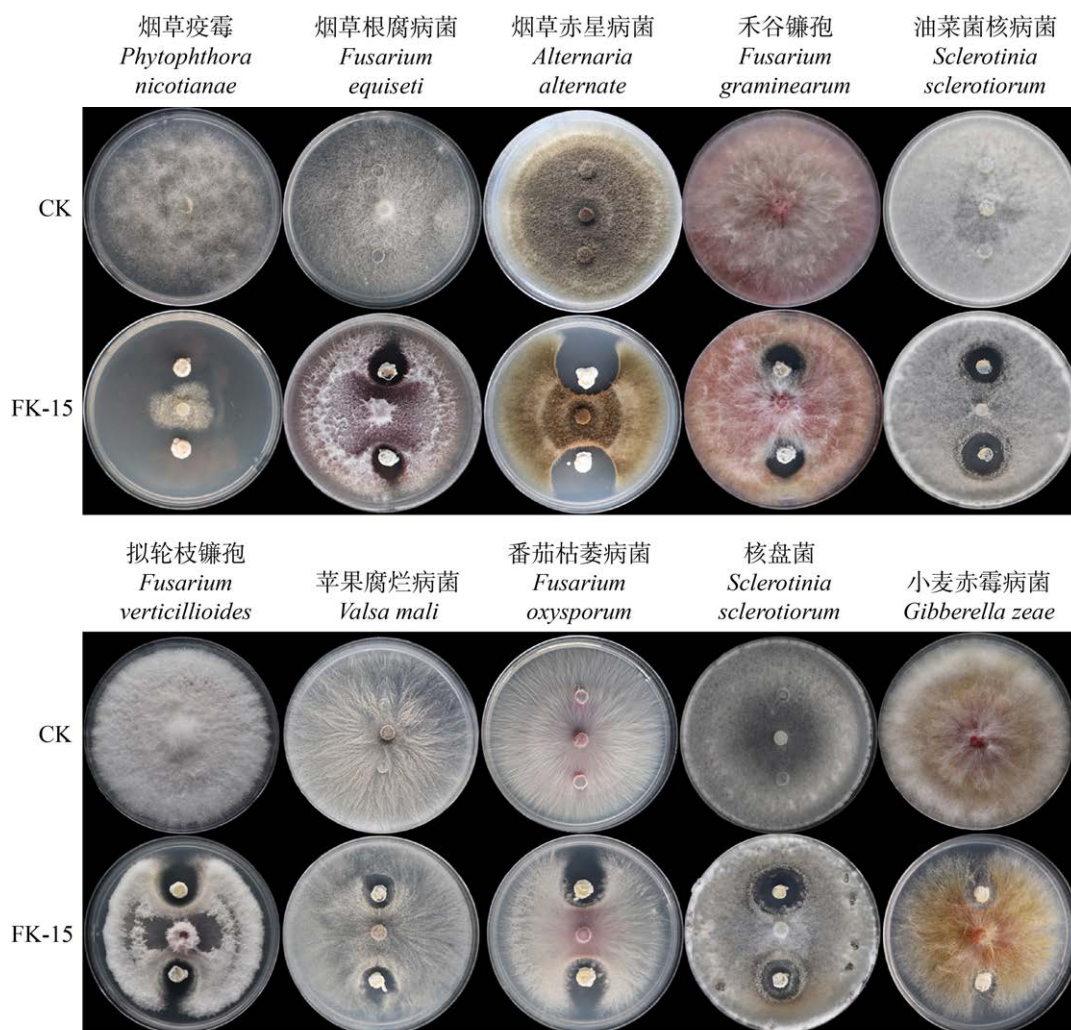


图4 菌株FK-15拮抗病原微生物效果图 CK为对照组; FK-15为处理组。

Figure 4 Effect diagram of strain FK-15 antagonizing pathogenic fungi. CK is the control check, and FK-15 is the treatment group.

表 2 菌株 FK-15 对植物病原菌的抑制作用
Table 2 Inhibitory effect of strain FK-15 against plant pathogens

供试植物病原菌 Plant pathogens for testing	对照组菌落直径 Control colony diameter (mm)	菌落直径 Colony diameter (mm)	抑制率 Inhibition rate (%)
烟草疫霉 <i>Phytophthora nicotianae</i>	85.0	21.0	80.37±0.77a
烟草根腐病菌 <i>Fusarium equiseti</i>	85.0	28.0	71.37±1.15d
烟草赤星病菌 <i>Alternaria alternate</i>	85.0	23.0	77.44±0.83b
禾谷镰孢 <i>Fusarium graminearum</i>	85.0	30.0	68.57±1.13e
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	85.0	29.0	70.27±0.87de
拟轮枝镰孢 <i>Fusarium verticillioides</i>	85.0	28.0	71.43±1.75d
苹果树腐烂病菌 <i>Valsa mali</i>	85.0	28.0	71.38±1.27d
番茄枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	85.0	23.0	77.67±1.22b
核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	85.0	26.0	73.67±0.97c
小麦赤霉病菌 <i>Gibberella zeae</i>	85.0	30.0	68.83±0.61e

不同小写字母表示差异显著。
Different lowercase letters indicate significant differences.

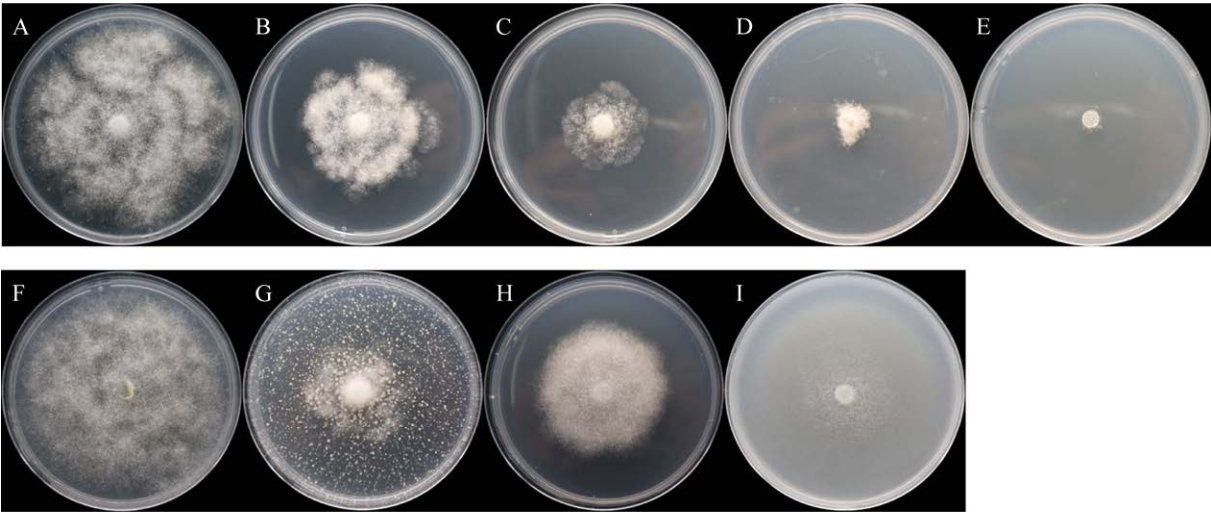


图 5 菌株 FK-15 处理液对烟草疫霉的抑制作用 A–E: 阳性对照(甲霜灵 0.05、0.1、0.2、0.4 和 0.8 µg/mL); F: 阴性对照; G: 发酵液; H: 无菌上清液; I: 菌悬液。
Figure 5 Inhibitory effect of strain FK-15 treatment solution on *P. nicotianae*. A–E: The positive control (metalaxyl 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 µg/mL); F: The negative control; G: The fermentation broth; H: The sterile supernatant; I: The bacterial suspension.

小, 在降低病原菌致病的同时, 降低了植物发病程度。如图 6 所示, 烟草叶片左侧滴加菌株 FK-15 发酵液与对照组相比, 表现为病斑直径小, 叶片形态完整。以上结果表明, 菌株 FK-15 发酵液显著地抑制了烟草疫霉对叶片的侵染。

右侧对照组表现为叶片卷缩, 表面出现伤口, 溃烂, 叶片组织遭到破坏。

2.4.5 室内盆栽防治效果

由图 7 可知, 与对照组相比, 放线菌发酵液对烟草黑胫病具有显著的防治效果。其中施

表 3 菌株 FK-15 处理液对烟草疫霉菌丝生长的抑制率
Table 3 Inhibition rate of strain FK-15 treatment solution on the growth of *P. nicotianae*

处理 Treatment	菌落直径 Colony diameter (mm)	菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition rate (%)
CK	85.0	—
甲霜灵 Metalaxyl (0.05 μg/mL)	83.5	1.68±1.18h
甲霜灵 Metalaxyl (0.1 μg/mL)	60.5	28.43±0.41f
甲霜灵 Metalaxyl (0.2 μg/mL)	50.4	40.51±0.18e
甲霜灵 Metalaxyl (0.4 μg/mL)	20.2	76.12±0.89b
甲霜灵 Metalaxyl (0.8 μg/mL)	10.8	87.61±0.36a
发酵液 Fermentation broth	39.2	53.92±2.45c
无菌上清液 Sterile supernatant	68.0	20.00±0.59g
菌悬液 Bacterial suspension	45.3	46.67±2.37d

不同小写字母表示差异显著。
Different lowercase letters indicate significant differences.

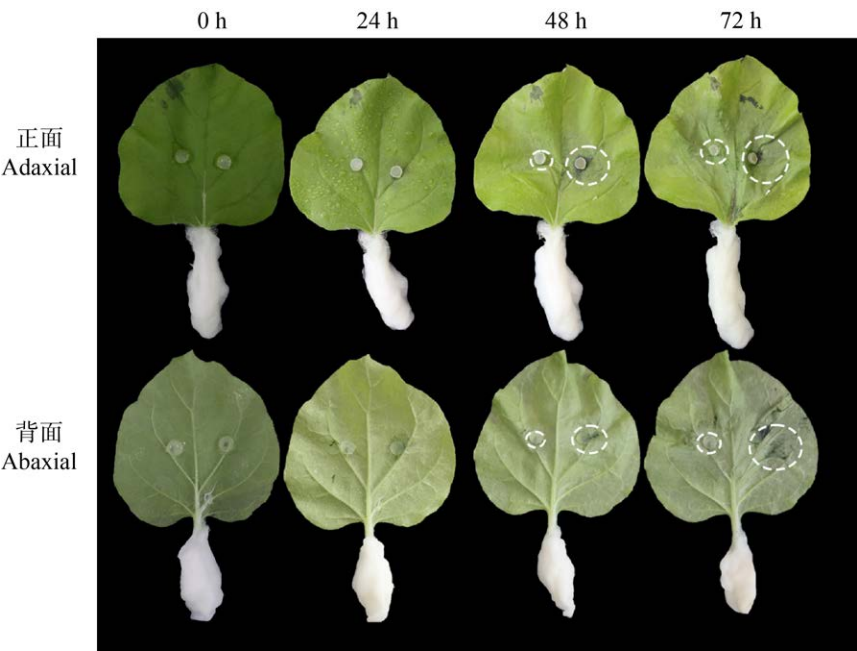


图 6 菌株 FK-15 发酵液对烟草疫霉的抑制作用 叶片左侧为烟草疫霉孢子悬液加菌株 FK-15 发酵液，右侧为烟草疫霉孢子悬液加无菌水。
Figure 6 Inhibition of fermentation broth of FK-15 strain on *P. nicotianae*. The left side of the leaf is treated with *P. nicotianae* spore suspension and FK-15 strain fermentation broth, while the right side is treated with *P. nicotianae* spore suspension and sterile water.

加菌株 FK-15 发酵液的烟草植株整体发病情况轻，植株挺拔，叶片翠绿，发病叶片占整株叶片比例低，抗病能力强。未施加放线菌发酵液的处理组发病情况严重，整株叶片萎蔫、黄化、植株矮小。按照王革等^[25]方法，对烟草植株进行病情测定和抗病性能的研究，结果发现，施

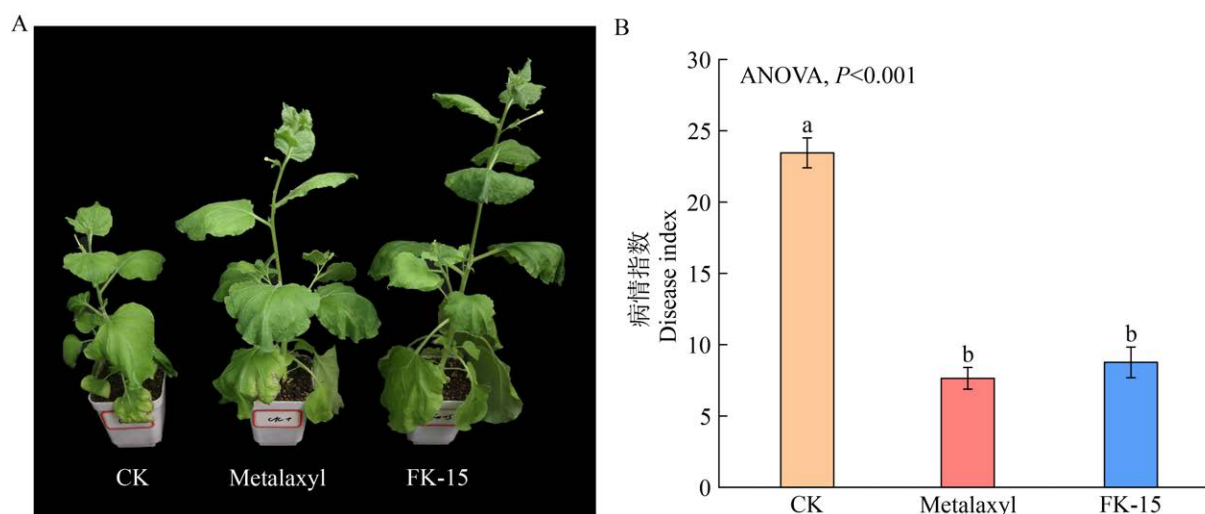


图 7 菌株 FK-15 对烟草黑胫病的防治效果 A: 盆栽效果; B: 病情指数对比结果。不同小写字母表示差异显著。

Figure 7 Prevention and treatment effect of strain FK-15 on tobacco black shank. A: Potted effect; B: Disease index comparison. Different lowercase letters indicate significant differences.

加了菌株 FK-15 发酵液的烟草植株病情指数和防治效果分别为 8.76 和 61.55%, 阴性处理的烟草植株病情指数为 23.45, 甲霜灵阳性处理的烟草植株病情指数和防治效果分别为 7.64 和 67.60%, 该菌株对烟草黑胫病的防治效果接近阳性对照, 病情指数显著低于阴性对照, 在防治烟草黑胫病领域展现出卓越的应用潜力。

2.5 菌株 FK-15 的促生作用

2.5.1 促生能力检测结果

具备促生能力的作物根际细菌可通过产铁载体和植物激素等方式促进植物的生长。由图 8 可知, 在 CAS 培养基平板上, 菌株 FK-15 周围产生明显的黄色晕圈, 表明具有嗜铁能力。在产蛋白酶检测培养基中, 菌株 FK-15 周围出现透明圈, 说明其具备产蛋白酶能力。

2.5.2 菌株 FK-15 对烟草种子萌发的影响

为了进一步研究菌株 FK-15 的促生作用, 在对烟草种子处理 12 d 后, 与对照组相比, 各方面指标均有一定提升。由图 9 和表 4 可知, 经菌株 FK-15 处理后的种子胚根长度、胚芽长度和活力指数得到提升。烟草种子发芽率增加 13.16%,

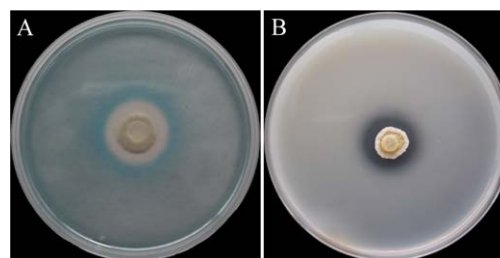


图 8 菌株 FK-15 的促生作用 A: 嗜铁能力; B: 产蛋白酶能力。

Figure 8 Growth promoting effect of strain FK-15. A: The effect chart of strain FK-15 producing iron carrier; B: The effect of strain FK-15 proteinase production capacity.

发芽势增加 8.86%, 胚根长度增加 53.12%, 胚芽长度增加 51.20%, 活力指数增加 73.09%。

2.6 菌株 FK-15 的培养条件优化

2.6.1 生长曲线测定结果

将菌落接入 LB 培养基中, 每隔 4 h 在 600 nm 处测量其吸光值, 由图 10 可知, 菌株 FK-15 在 8 h 开始快速增长, 52 h 到达峰值, 之后略有降低, 最终趋于平稳。因此, 选择生长曲线峰值 52 h 作为该菌株最佳培养时长。

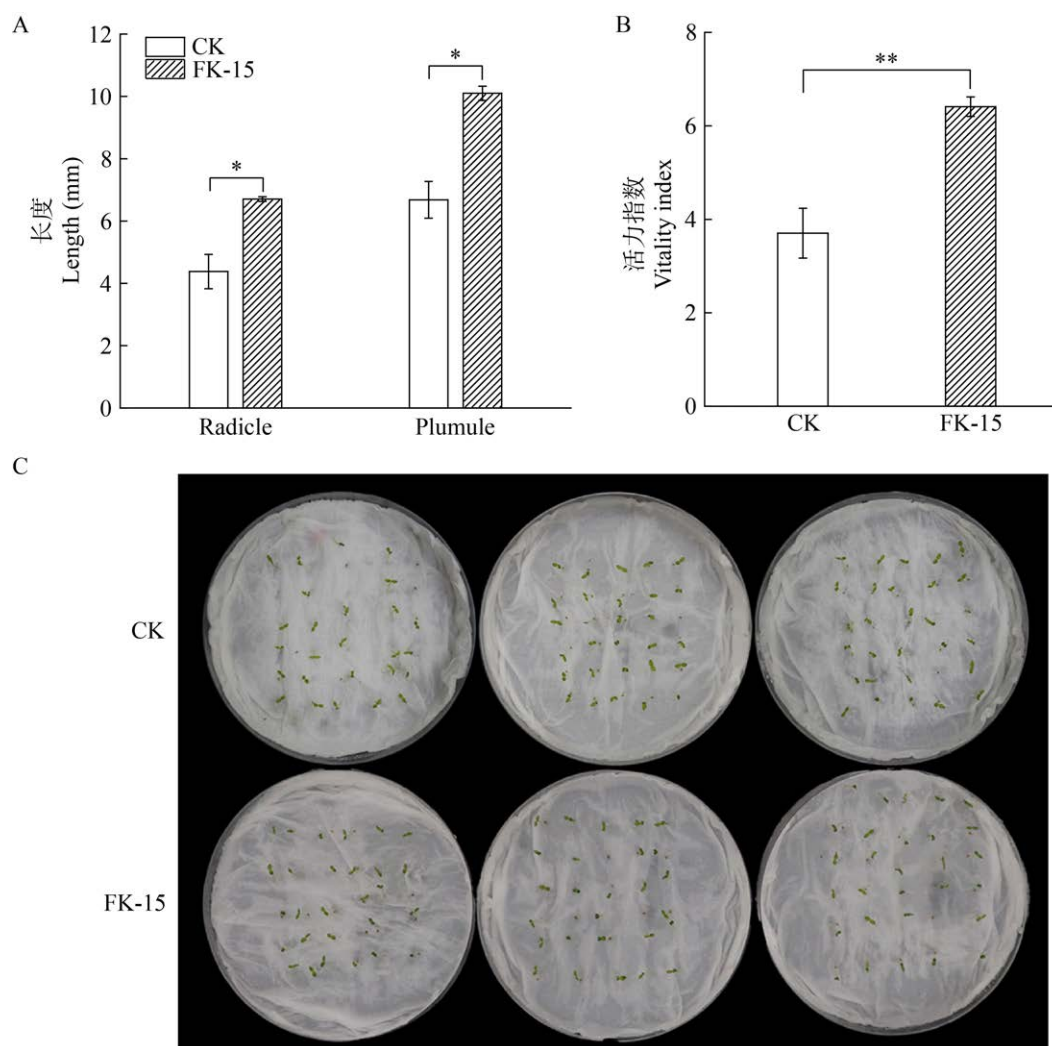


图9 菌株FK-15处理烟草种子发芽情况 A: 胚根和胚芽长度变化情况(*: $P<0.05$); B: 种子萌发的活力指数结果(**: $P<0.01$); C: 烟草种子发芽情况。

Figure 9 Germination of tobacco seeds treated with strain FK-15. A is the variation of radicle and Plumule length (*: $P<0.05$), B is the result of seed germination vitality index (**: $P<0.01$), and C is the germination of tobacco seeds.

表4 菌株FK-15对烟草种子萌发的影响

Table 4 The effect of strain FK-15 on *Nicotiana tabacum* seed germination

指标 Index	处理 Treatment	
	CK	FK-15
发芽率 Germination rate (%)	84.44±1.93	95.56±1.93
发芽势 Germinative force (%)	87.78±1.92	95.56±1.93
胚根长度 Radicle length (mm)	4.38±0.55	6.71±0.08
胚芽长度 Plumule length (mm)	6.68±0.59	10.10±0.23
活力指数 Vitality index	3.70±0.53	6.41±0.21

2.6.2 单因素试验结果

为了避免在发酵后期因菌体老化或代谢产物积累导致抗生素产量的迅速下降,本研究通过调控影响放线菌生命周期的参数,延长抗生素的产生阶段,从而促进抗生素的有效合成。结合2.6.1结果确定菌株FK-15的最佳培养时长,通过改变培养基种类、培养基碳源、培养基氮源、培养基中菌体接种量、培养基装液量和培养基初始pH,进行单因素试验。由图11A-11F

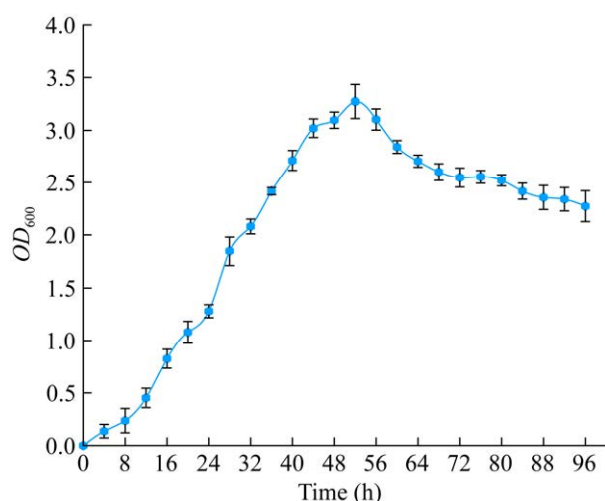


图 10 菌株 FK-15 的生长曲线

Figure 10 The growth curve of strain FK-15.

可知,与其他处理相比,菌株 FK-15 在 YSP 培养基中最适宜生长, OD_{600} 值和抑菌率最高,分别为 3.52 和 26.33%,可作为基础培养基。当碳源为蔗糖,氮源为黄豆饼粉,接种量为 2%,装液量 80 mL, pH 7.5 时,该菌株的 OD_{600} 值和抑菌率显著高于其他处理,较优化前菌株生长量增加 132.48%,抑菌率增加 198.80%。随着培养条件的优化,菌体环境朝着促进菌体生存与繁殖,抑菌物质大量合成的方向发展,为进一步开发其成为具备生产应用价值的产品奠定了基础。

3 讨论

作物根际土壤蕴含丰富的放线菌,是重要的生防微生物来源^[26]。施玉萍等^[27]从橡胶树根际土壤分离出的放线菌对多种病原物均产生拮抗反应,展现出优异的拮抗广谱性。通过研究放线菌对烟草疫霉菌丝生长的影响、对植物病原菌的拮抗能力、抗菌活性以及放线菌、烟草疫霉与烟草植株三者之间的互作体系等试验,结果发现,放线菌对植物病原菌具有显著的拮抗作用^[28],引起烟草疫霉等植物病原菌生长迟缓,菌丝畸形,扩展困难等现象^[29],从而防治病害。其中,菌株 FK-15 在平板对峙试验中,

对烟草疫霉的拮抗能力高达 80.37%,菌株发酵液的抗菌活性达到 53.92%,对烟草疫霉菌丝的生长表现出显著的抑制作用,在烟草离体叶片和盆栽防效试验中,相比对照组,叶片病斑小,形态完整,烟草植株病情指数和防治效果分别为 8.76 和 61.55%,说明该菌株的发酵液具备减缓病原物侵染、降低植株患病的能力,与 Li 等^[30]发现放线菌降低植株发病率和病情指数的结论相符。放线菌在植物病害防控领域展现出广阔的应用潜力与前景,具备进一步开发利用的价值。

同时,近年来,我国在根际促生菌领域取得了显著的研究进展^[31],促进了高效、环保型肥料的研究与应用。Xie 等^[32]研究发现,在阿塔卡马沙漠中分离得到的放线菌具有产生铁载体、溶解磷酸盐和提高植株耐旱性的促生能力。本实验从作物根际土壤中分离得到菌株 FK-15,其具备嗜铁和产蛋白酶的特性,与王炫栋等^[33]从杨梅园根际土壤中分离得到的放线菌具备产生铁载体等促生特性一致。在烟草种子萌发实验中,与对照组相比,胚根长度增加 53.12%,胚芽长度增加 51.20%,活力指数增加 73.09%。综合试验结果可知,根际放线菌具有开发成生物肥料的潜力。

菌体老化、发酵环境恶化以及关键合成要素的匮乏共同构成了放线菌产物继续合成的多重不利因素^[34]。在菌株的发酵过程中,其生长量受到多种外界因素的微妙调控,其中培养基种类,菌液的初始添加量、培养基的装液量以及培养基的初始 pH 值等条件扮演着至关重要的角色。Sudhakar 等^[35]发现,综合菌株培育条件,在初始 pH 7.0 的培养基中检测到生物活性代谢物的最大产量。李文科等^[36]报道的放线菌菌株 DB-3-04 在以黄豆饼粉为氮源时,最有利于提升抗生素产量。为了优化菌株的生长环境,本实验设计了一系列单因素试验,确定了菌株 FK-15 优化后的培养基和发酵条件为(g/L):黄豆饼粉 10 g,酵母提取物 5 g,蔗糖 20 g,接

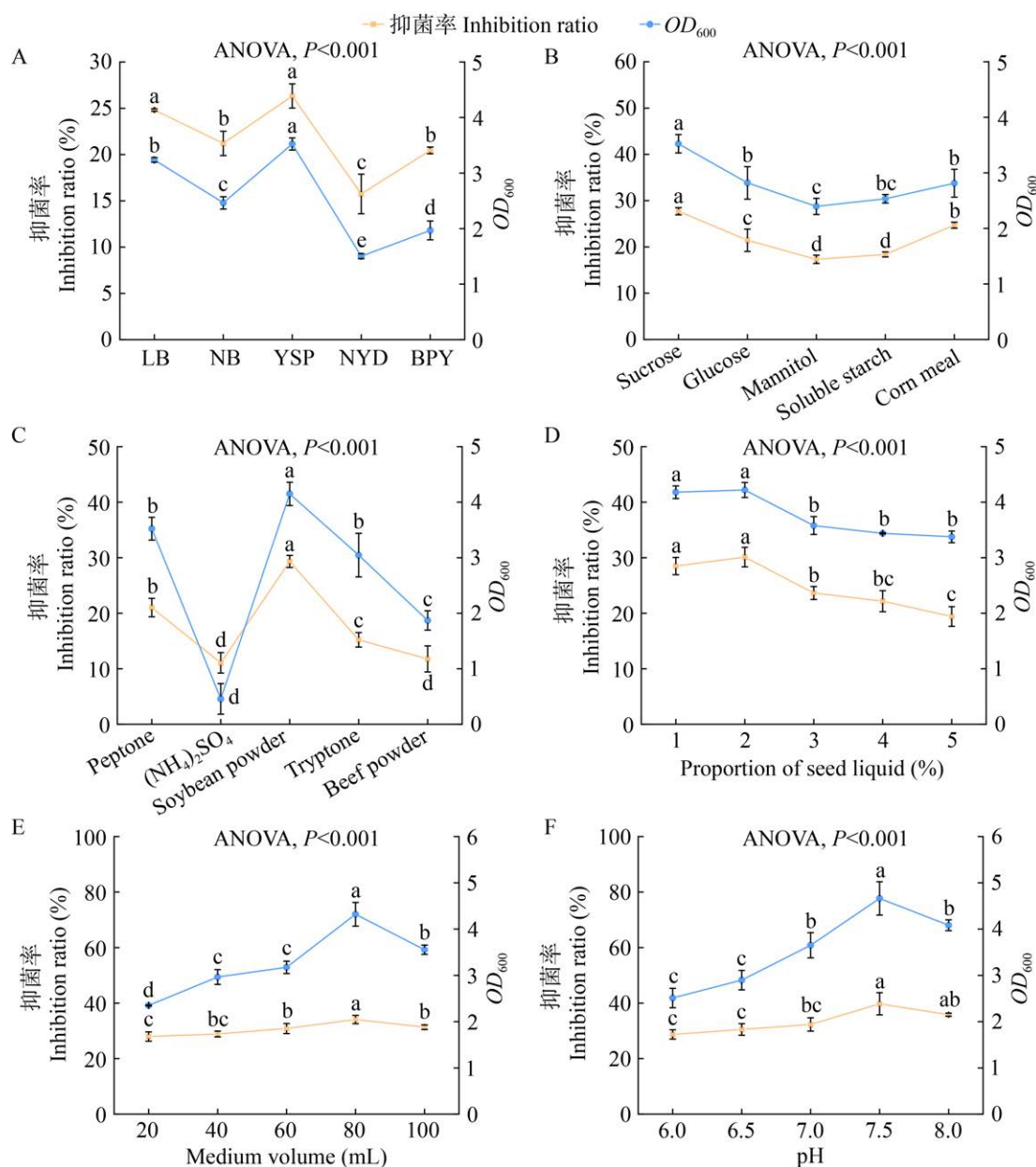


图 11 菌株 FK-15 单因素优化 A: 不同培养基对菌株 FK-15 生长量及抑菌率的影响; B: 不同碳源对菌株 FK-15 生长量及抑菌率的影响; C: 不同氮源对菌株 FK-15 生长量及抑菌率的影响; D: 不同接种量对菌株 FK-15 生长量及抑菌率的影响; E: 不同装液量对菌株 FK-15 生长量及抑菌率的影响; F: 不同 pH 对菌株 FK-15 生长量及抑菌率的影响。不同小写字母表示差异显著。

Figure 11 Single factor optimization of strain FK-15. A: The effect of different culture media on the growth and antibacterial rate of strain FK-15; B: The effect of different carbon sources on the growth and antibacterial rate of FK-15; C: The effect of different nitrogen sources on the growth and antibacterial rate of FK-15; D: The effect of different inoculum sizes on the growth and antibacterial rate of strain FK-15; E: The effect of different liquid volumes on the growth and antibacterial rate of strain FK-15; F: The effect of different pH levels on the growth and antibacterial rate of strain FK-15. Different lowercase letters indicate significant differences.

种量 2%，装液量 80 mL，培养基初始 pH 7.5，较优化前菌株生长量增加 132.48%，抑菌率增加 198.80%。

通过不断调整与优化，期望找到最适合该菌株生长的条件组合，从而显著提升其生长量，促进抑菌物质合成，为后续的应用奠定基础。

4 结论

本研究从作物根际土壤中分离获得一株对烟草疫霉具有强拮抗作用的放线菌 FK-15，经鉴定为苍黄拟无枝酸菌(*Amycolatopsis lurida*)。该菌株表现出抑菌广谱性，能有效抑制病原物侵染并降低植株患病率，显示出在防治烟草黑胫病方面的开发潜力。此外，菌株 FK-15 具有嗜铁、产蛋白酶和促进烟草种子萌发的能力，为生物肥料的制备提供理论依据。通过对培养条件的优化，确定其最适培养条件为(g/L)：黄豆饼粉 10 g，酵母提取物 5 g，蔗糖 20 g，接种量 2%，装液量 80 mL，培养基初始 pH 7.5。

作者贡献声明

程康：设计实验流程、参与实验、数据收集与分析、撰写文章和制作图表；何勇：选择、改进研究方法与部分数据分析；李迪：参与实验及部分数据收集；闵艳艳：提出研究方法 with 图表制作；许淑雅：收集部分数据；卢云亮：收集部分数据；齐永霞：项目管理、修改文章；陈方新：确定研究主题、参与实验指导、修改文章。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] 张潜, 袁歆瑜, 郭鑫, 邵嘉朱, 廖鑫琳, 宋振, 王嘉琦, 蒋冬花. 链霉菌 Sa-21 对烟草黑胫病的防效及抑菌作用研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(6): 1608-1618.
ZHANG Q, YUAN XY, GUO X, SHAO JZ, LIAO XL, SONG Z, WANG JQ, JIANG DH. Study on the antibacterial action and control effect of *Streptomyces* sa-21 against *Phytophthora nicotianae*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2022, 38(6): 1608-1618 (in Chinese).
- [2] GUO DS, YUAN CH, LUO YY, CHEN YH, LU MH, CHEN GC, REN GW, CUI CB, ZHANG JT, AN DR. Biocontrol of tobacco black shank disease (*Phytophthora nicotianae*) by *Bacillus velezensis* Ba168[J]. Pesticide Biochemistry and Physiology, 2020, 165: 104523.
- [3] 黄婷, 向立刚, 庄文颖, 曾昭清, 余知和. 拮抗烟草疫霉的枝穗霉菌株筛选[J]. 微生物学通报, 2022, 49(9): 3860-3872.
HUANG T, XIANG LG, ZHUANG WY, ZENG ZQ, YU ZH. Screening of *Clostridium* strains against *Phytophthora nicotianae*[J]. Microbiology China, 2022, 49(9): 3860-3872 (in Chinese).
- [4] HE AL, SUN JN, WANG XH, ZOU LW, FU B, CHEN J. Reprogrammed endophytic microbial community in maize stalk induced by *Trichoderma asperellum* biocontrol agent against *Fusarium* diseases and mycotoxin accumulation[J]. Fungal Biology, 2019, 123(6): 448-455.
- [5] 韩瑞华, 江凯, 康业斌. 玫瑰黄链霉菌联合杀菌剂对烟草疫霉的防治效果[J]. 中国生物防治学报, 2024, 40(3): 710-716.
HAN RH, JIANG K, KANG YB. Control effect of *Streptomyces roseoflavus* and fungicides on *Phytophthora nicotianae*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2024, 40(3): 710-716 (in Chinese).
- [6] 何明川, 曾舒泉, 王志江, 詹筱国, 柯昌磊, 李微杰, 张忠, 吴国星, 谢永辉. 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.
HE MC, ZENG SQ, WANG XJ, ZHAN YG, KE CL, LI WJ, ZHANG Z, WU GX, XIE YH. Identification, fermentation condition optimization and control effect of an antagonistic strain MC4-2 against *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*[J]. Microbiology China, 2021, 48(12): 4636-4648 (in Chinese).
- [7] 章舸, 彭玉龙, 苟剑渝, 何楷, 李章海, 汪章勋, 齐永霞. 烟草疫霉拮抗放线菌的生防潜力评价[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(3): 667-675.
ZHANG G, PENG YL, GOU JY, HE K, LI ZH, WANG ZX, QI YX. Evaluation of biocontrol potential of the antagonistic actinomycetes against *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae*[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(3): 667-675 (in Chinese).
- [8] 刘鹤, 单宇航, 邱睿, 李淑君, 张崇, 吴元华, 安梦楠. 基于非靶向代谢组学的烟草镰刀菌根腐病和黑胫病拮抗链霉菌及其代谢产物的鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(4): 875-884.
LIU H, SHAN YH, QIU R, LI SJ, ZHANG C, WU YH, AN MN. Identification of *Streptomyces* and its metabolites antagonizing *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora parasitica* in tobacco based on non-target metabolomics[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(4): 875-884 (in Chinese).
- [9] 宋振, 温丽慧, 胡佳燕, 吴芷玥, 章雨君, 沈之涵, 蒋冬花. 生防放线菌 Sc-7 的分离、鉴定、抑菌活性及其对水稻的促生作用[J]. 农药学报, 2024, 26(3): 492-503.
SONG Z, WEN LH, HU JY, WU ZY, ZHANG YJ,

- SHEN ZH, JIANG DH. Isolation, identification, bacteriostatic activity of the biocontrol *Actinomycete* Sc-7 and its growth-promoting effect on rice[J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2024, 26(3): 492-503 (in Chinese).
- [10] MACAGNAN D, Da S ROMEIRO R, POMELLA AWV, DESOUZA JT. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora* (ex *Crinipellis*) perniciosus by phylloplane actinomycetes[J]. Biological Control, 2008, 47(3): 309-314.
- [11] 吴志美, 兰明先, 高熹, 李梦月, 袁远, 郭子俊, 殷兴华, 吴国星. 除草活性成团泛菌 ZLSY20 菌株发酵条件的优化[J]. 南方农业学报, 2019, 50(9): 1990-1997.
- WU ZM, LAN MX, GAO X, LI MY, YUAN Y, GUO ZJ, YIN XH, WU GX. Screening of fermentation conditions for herbicidal activity of *Pantoea agglomerans* strain ZLSY20[J]. Journal of Southern Agriculture, 2019, 50(9): 1990-1997 (in Chinese).
- [12] 孟晓琴, 吴文惠, 周喻, 付强, 郭锐华, 包斌. 发酵罐发酵腐皮镰刀菌株产生 HMG-CoA 还原酶抑制剂的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(3): 359-365.
- MENG XQ, WU WH, ZHOU Y, FU Q, GUO RH, BAO B. Production of *Fusarium solani* strains by fermentation tank and its inhibition effect on HMG-CoA reductase[J]. Natural Product Research and Development, 2016, 28(3): 359-365 (in Chinese).
- [13] 于德水, 高娃, 沙长青, 张淑梅, 高继国. 生防工程菌株 BS-17A 稳定性与抑菌活性初步研究[J]. 生物技术, 2011, 21(3): 88-90.
- YU DS, GAO W, SHA CQ, ZHANG SM, GAO JG. Preliminary studies on stability and antifungal activity of biocontrol engineered strains BS-17A[J]. Biotechnology, 2011, 21(3): 88-90 (in Chinese).
- [14] ZHAO XB, NI YX, ZHAO H, LIU XT, HE BP, SHI BB, MA Q, LIU HY. Plant growth-promoting ability and control efficacy of *Penicillium aurantiogriseum* 44M-3 against sesame *Fusarium* wilt disease[J]. Biocontrol Science and Technology, 2021, 31(12): 1314-1329.
- [15] 安德荣, 慕小倩, 刘翠娟, 赵文军, 张勤福, 马驰. 土壤拮抗放线菌的分离和筛选[J]. 微生物学杂志, 2002, 22(5): 1-3.
- AN DR, MU XQ, LIU CJ, ZHAO WJ, ZHANG QF, MA C. Isolation and screening of antagonistic *Actinomyces* from soil[J]. Journal of Microbiology, 2002, 22(5): 1-3 (in Chinese).
- [16] 谭啸, 章熙东. 革兰氏染色法观察与区分细菌[J]. 生物学教学, 2019, 44(7): 71-72.
- TAN X, ZHANG XD. Observation and differentiation of bacteria by Gram staining method[J]. Biology Teaching, 2019, 44(7): 71-72 (in Chinese).
- [17] 关统伟, 张小平, GUPTA RS, 高贝乐, 唐蜀见, 张玉琴, 秦盛, 刘松青, 陈祥贵, 赵珂, 袁永俊, 杨玲玲, 张芸娇. 放线菌系统分类技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2016: 74-81.
- UAN TW, ZHANG XP, GUPTA RS, GAO BL, TANG SJ, ZHANG YQ, QIN S, LIU SQ, CHEN XG, ZHAO K, YUAN YJ, YANG LL, ZHANG YJ. Classification Technology of Actinomycetes[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2016: 74-81 (in Chinese).
- [18] 周双清, 黄小龙, 黄东益, 胡新文, 陈吉良. Chelex-100 快速提取放线菌 DNA 作为 PCR 扩增模板[J]. 生物技术通报, 2010, 26(2): 123-125.
- ZHOU SQ, HUANG XL, HUANG DY, HU XW, CHEN JL. A rapid method for extracting DNA from actinomycetes by chelex-100[J]. Biotechnology Bulletin, 2010, 26(2): 123-125 (in Chinese).
- [19] 陈方新, 齐永霞, 高智谋, 潘月敏, 曹君, 徐仁玉. 诱导疫霉菌产生游动孢子囊液培养基的研制[J]. 植物保护, 2005, 31(2): 34-37.
- CHEN FX, QI YX, GAO ZM, PAN YM, CAO J, XU RY. On new liquid media for inducing sporangia of *Phytophthora* spp.[J]. Plant Protection, 2005, 31(2): 34-37 (in Chinese).
- [20] 国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 烟草病虫害分级及调查方法: GB/T 23222—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. Grade and investigation method of tobacco diseases and insect pests: GB/T 23222—2008[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese).
- [21] 鲁黎明, 安影. 不同消毒剂对烟草种子消毒效果及萌发的影响[J]. 种子, 2012, 31(4): 93-95.
- LU LM, AN Y. Effects of different disinfectant on sterilization effect and germination of tobacco seeds[J]. Seed, 2012, 31(4): 93-95 (in Chinese).
- [22] 朱丹瑞, 左应萍, 魏嘉好, 田静, 陈明珠, 彭丽娟, 刘国琴. 浅色戈卢别夫氏菌对烟草种子萌发及幼苗生长的影响[J]. 山地农业生物学报, 2024, 43(3): 1-8.
- ZHU DR, ZUO YP, WEI JY, TIAN J, CHEN MZ, PENG LJ, LIU GQ. Effects of golubev light on tobacco seed germination and seedling growth[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2024, 43(3): 1-8 (in Chinese).
- [23] 何勇, 许淑雅, 胡贤君, 卢云亮, 刘幸, 梁倩文, 齐永霞, 陈方新. 白术中一株植物促生细菌的分离鉴定及培养条件优化[J]. 微生物学通报, 2023, 50(9): 3983-3996.
- HE Y, XU SY, HU XJ, LU YL, LIU X, LIANG QW, QI YX, CHEN FX. A plant growth-promoting bacterium in *Atractylodes macrocephala* Koidz: isolation, identification, and optimization of culture conditions[J]. Microbiology China, 2023, 50(9): 3983-3996 (in Chinese).
- [24] SUBATHRA DEVI C, MERLYN KEZIAH S, JEMIMAH NAIN S, MOHANASRINIVASAN V. Actinomycetes: Microbiology to Systems Biology[M]//Actinobacteria. Singapore: Springer Nature Singapore, 2022: 1-35.
- [25] 王革, 李梅云, 段玉琪, 李松, 马永凯, 王颖琦, 朱维明, 李振国, 李天飞. 木霉菌对烟草黑胫病菌的拮抗机制及其生物防治研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2001, 23(3): 222-226.
- WANG G, LI MY, DUAN YQ, LI S, MA YK, WANG YQ, ZHU WM, LI ZG, LI TF. Study on the antagonistic mechanism of *Trichoderma* sp. for *Phytophthora nicotianae* and its biocontrol effect[J]. Journal of Yunnan University (Natural Sciences Edition), 2001, 23(3): 222-226 (in Chinese).
- [26] 曹毅, 陆宁, 陈兴江, 郭玉双, 夏海乾, 商胜华. 烟草根际放线菌的分离及酶活性和功能基因检测[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(2): 19-23.

- CAO Y, LU N, CHEN XJ, GUO YS, XIA HQ, SHANG SH. Enzyme activity and functional genes detection of actinomycetes isolated from tobacco rhizosphere[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2014, 45(2): 19-23 (in Chinese).
- [27] 施玉萍, 刘一贤, 李岚岚, 戴利铭, 蔡志英. 橡胶树白粉病拮抗放线菌的筛选及田间防效评价[J]. 植物保护, 2024, 50(4): 347-355.
- SHI YP, LIU YX, LI LL, DAI LM, CAI ZY. Screening of antagonistic actinomycetes against powdery mildew disease of rubber tree and its field efficacy[J]. Plant Protection, 2024, 50(4): 347-355 (in Chinese).
- [28] 王亚月, 贾方方, 李俊营, 许跃奇, 阎海涛, 何晓冰, 刘冬梅, 常栋. 烟草黑胫病拮抗菌的筛选鉴定与防病促生作用研究[J]. 中国烟草科学, 2022, 43(6): 60-67, 75.
- WANG YY, JIA FF, LI JY, XU YQ, YAN HT, HE XB, LIU DM, CHANG D. Screening, identification of a bacterial strain against tobacco black shank and its growth-promoting effects[J]. Chinese Tobacco Science, 2022, 43(6): 60-67, 75 (in Chinese).
- [29] 刘金丽, 卢丹, 姚佳, 陈雨, 陈崇艺, 朱露露, 柴春月. 广谱拮抗放线菌 S5-1 的鉴定、发酵工艺优化及发酵粗提物抑菌活性评价[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2905-2921.
- LIU JL, LU D, YAO J, CHEN Y, CHEN CY, ZHU LL, CHAI CY. Identification, Optimization of fermentation process of an antagonistic actinomycete S5-1 and evaluation of antibacterial activity of the fermented crude extract[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2905-2921 (in Chinese).
- [30] LI W, XIAO XO, LI K, GAO XM, LV LL. The antibiotic activity of fermentation broth produced from *Streptomyces rochei* XL-6 and its influence on bacterial wilt control and plant growth in eggplant seedling[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2017, 33(4): 531-536.
- [31] 张昊鑫, 王中华, 牛兵, 郭慷, 刘璐, 姜瑛, 张仕祥. 产 IAA 兼具溶磷解钾高效促生菌的筛选、鉴定及其广谱性应用[J]. 生物技术通报, 2022, 38(5): 100-111.
- ZHANG HX, WANG ZH, NIU B, GUO K, LIU L, JIANG Y, ZHANG SX. Screening, identification and broad-spectrum application of efficient IAA-producing bacteria dissolving phosphorus and potassium[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(5): 100-111 (in Chinese).
- [32] XIE FY, ANDREWS B, ASENJO JA, GOODFELLOW M, PATHOM-AREE W. Atacama desert actinomycetes: taxonomic analysis, drought tolerance and plant growth promoting potential[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2024, 40(9): 283.
- [33] 王炫栋, 宋振, 兰赫婷, 江樱姿, 齐文杰, 刘晓阳, 蒋冬花. 杨梅园土壤优势放线菌的分离及其防病促生功能[J]. 中国农业科学, 2023, 56(2): 275-286.
- WANG XD, SONG Z, LAN HT, JIANG YZ, QI WJ, LIU XY, JIANG DH. Isolation of Dominant Actinomycetes from Soil of Waxberry Orchards and Its Disease Prevention and Growth-Promotion Function[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 56(2): 275-286 (in Chinese).
- [34] 刘翠娟, 段琦梅, 安德荣. 抗真菌拮抗放线菌的筛选及摇床发酵条件的优化[J]. 微生物学杂志, 2004, 24(4): 12-14.
- LIU CJ, DUAN QM, AN DR. Screening of streptomycetes which inhabit pathogenic fungi and the optimization of fermentation conditions in the shaker[J]. Journal of Microbiology, 2004, 24(4): 12-14 (in Chinese).
- [35] KIRANMAYI MU, SUDHAKAR P, SREENIVASULU K, VIJAYALAKSHMI M. Optimization of culturing conditions for improved production of bioactive metabolites by *Pseudonocardia* sp. VUK-10[J]. Mycobiology, 2011, 39(3): 174-181.
- [36] 李文科, 张仁文, 万传星. 野野村放线菌 DB-3-04 产达巴万星前体 A-40926 B0 发酵培养基优化[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(12): 1353-1361.
- LI WK, ZHANG RW, WAN CX. Optimization of fermentation medium for the production of dalbavancin precursor A-40926 B0 by *Nonomuraea* sp. DB-3-04[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2023, 48(12): 1353-1361 (in Chinese).