热带作物学报 2024, 45(10): 2171–2182
Chinese Journal of Tropical Crops

铜绿假单胞菌 PaHNHK01 的鉴定及其对剑麻烟草疫霉的生防效果研究

李　慧[1]，郑肖兰[2**]，侯会霞[1,2*]，吴伟怀[2]，谭施北[2]，罗　磊[2,3]，吴　昊[1,2]，易克贤[1,2,4**]

1. 海南大学热带农林学院，海南海口　570228；2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所/院士团队创新中心/海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室/农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室，海南海口　571101；3. 贵州大学，贵州贵阳　550025；4. 中国热带农业科学院三亚研究院，海南三亚　572025

摘　要：H.11648 因高产的优点成为我国目前主要的剑麻栽培品种，但极易受到烟草疫霉（*Phytophthora nicotianae*）的侵染，生产上防治剑麻斑马纹病主要以农业防治措施为主，抗病育种和化学药剂防治相结合的综合防治策略。但农业防治费时费力，长期化学防治可能会使植物产生抗药性，甚至污染环境，抗病育种难度大且周期长，因此开辟新的防治方法非常重要。为防治剑麻斑马纹病，本研究以烟草疫霉为病原靶标菌，成功分离到 1 株拮抗细菌 PaHNHK01，根据形态学、生理生化特征及分子生物学鉴定确定 PaHNHK01 为假单胞菌属的铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）。对该菌株的抑菌活性和离体叶片防效进行测定，研究结果表明，该菌株具有解有机磷能力、解无机磷能力、固氮能力和产铁能力等，对烟草疫霉菌的抑制率为 89.79%。该菌能够有效抑制烟草疫霉菌的菌丝生长，使病原菌出现产孢能力下降、菌丝膨大畸形、分支增多的现象；在离体叶片防效试验中 PaHNHK01 对剑麻斑马纹病的防治效果达到 88.62%。该菌株的无菌发酵液对病原菌有明显的抑菌效果，其 EC_{50} 值为 20.3679 μL/mL，当 PaHNHK01 粗提物浓度为 80 μg/mL 时，其抑菌率达 89.36%，PaHNHK01 粗提物的 EC_{50} 值为 11.9456 μg/mL。此外，菌株 PaHNHK01 对 12 种不同植物病原菌均有拮抗效果，表明菌株 PaHNHK01 具有良好的生防潜力，有望开发成为生防产品，为植物病害生物防治提供一定的研究基础。

关键词：剑麻斑马纹病；烟草疫霉；铜绿假单胞菌；生物防治

中图分类号：S435.63；S476.1　　**文献标志码：**A

Identification and Biocontrol of *Pseudomonas aeruginosa* PaHNHK01 Against Sisal Zebra Disease

LI Hui[1], ZHENG Xiaolan[2**], HOU Huixia[1,2*], WU Weihuai[2], TAN Shibei[2], LUO Lei[2,3], WU Hao[1,2], YI Kexian [1,2,4**]

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Environment and Plant Protection, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Academician Team Innovation Center / Hainan Key Laboratory of Tropical Agricultural Pest Monitoring and Control / Key Laboratory of Integrated Management of Tropical Crop Pests, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou, Hainan 571101, China; 3. Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China; 4. Sanya Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572025, China

Abstract: Sisal hybrid variety of H.11648 is the main cultivated commercial variety in China. Despite of its ability to

收稿日期　2024-03-08；**修回日期**　2024-04-18

基金项目　国家麻类产业技术体系“剑麻生理与栽培岗位”项目（No. CARS16-E16）；海南省重点研发计划项目（No. ZDYF2024SHFZ043）；海南省科技人才创新项目（No. KJRC2023B18）。

作者简介　李　慧（1998—），女，硕士研究生，研究方向：植物保护；*同等贡献作者：侯会霞（1997—），女，硕士研究生，研究方向：植物保护。**通信作者（Corresponding author）：郑肖兰（ZHENG Xiaolan），E-mail：orchidzh@163.com；易克贤（YI Kexian），E-mail：yikexian@126.com。

produce high fibre yield per unit area, this variety is highly susceptible to diseases. Sisal zebra disease, caused by *Phytophthora nicotianae* is among the diseases of economic importance affecting the variety. Several control measures like the adoption of good agricultural practices, the use of disease resistant variety and the use of chemical control are suggested in sisal zebra disease control. However, none of them seem to be sustainable due to the existing agricultural practices. Most of the existing measures are not only time-consuming but also costly due to labor intensification and high cost of purchasing agricultural chemicals which on another hand can pollute the environment and create resistance to the plants. Developing resistance variety will obviously take long time due to the long life cycle of sisal. It is very important to develop sustainable disease control methods which are environmental friendly to adopt the climate change agenda. The use of microorganisms to control the diseases is of great importance. In this study, an antagonistic strain PaHNHK01 was successfully isolated by using *Phytophthora nicotianae* as the target pathogen. PaHNHK01 was identified as *Pseudomonas aeruginosa* based on morphological, physiological and biochemical characteristics and gene sequence analysis. The antibacterial activity and control effect of PaHNHK01 were measured under *in vitro* condition. The results showed that, PaHNHK01 had the ability of organophosphorus and inorganic phosphorus, nitrogen fixation and iron production. Additionally, PAHNHK01 had the inhibition rate of 89.79% against *P. nicotianae*. The fungus effectively inhibited the mycelial growth of *P. nicotianae*, and the antagonistic pathogens showed decreased sporulation ability, mycelial enlargement deformity and increased branching. The control effect of PaHNHK01 on sisal zebra disease *in vitro* was 88.62%. PaHNHK01 aseptic fermentation liquid had obvious bacteriostatic effect on pathogenic bacteria, and its EC_{50} value was 20.3679 μL/mL. When the concentration of PaHNHK01 crude extract was 80 μg/mL, the antibacterial rate was 89.36%, and the EC_{50} value of PaHNHK01 crude extract was 11.9456 μg/mL. We further observed the antagonistic effects of the strain PaHNHK01 on 13 different plant pathogens, indicating that the strain PaHNHK01 had good biocontrol potential and could be developed as a biocontrol product. The results would provide a strong research basis for the biological control of sisal zebra disease.

Keywords: sisal zebra disease; *Phytophthora nicotianae*; *Pseudomonas aeruginosa*; biological control

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.10.018

剑麻为龙舌兰科龙舌兰属的一种热带麻类经济作物，是世界最常用的一类硬质纤维植物。原产于墨西哥，现广泛分布于多个热带国家和地区[1]。我国从 20 世纪 50 年代初期的小规模种植到 60 年代引种剑麻 H.11648 杂交品种，后逐步发展到当代的剑麻主产地之一，广泛分布在我国华南一带[2]。剑麻叶片纤维丰富，纤维细胞长，细胞壁厚，质地坚韧，因此剑麻有耐磨、耐盐碱、不易腐蚀等特性[3]。其纤维合成的聚合物复合材料具有隔热、轻便且有韧性等优点[4]。因此剑麻纤维广泛用于工业、农业、渔业及国防等领域[5-6]。经研究发现，剑麻中分离的皂苷元、多糖类等化学成分可用于医疗行业，为临床提供用药依据[7-8]。此外，剑麻麻渣还可制造饲料和有机肥[9]、提取皂素等[10-12]，大大提高了剑麻的综合利用程度[13]。

剑麻斑马纹病首次发现于 1961 年，主要的致病菌为烟草疫霉菌[14-17]，剑麻烟草疫霉可侵染整株，大多为先感染叶片，之后向茎、轴延伸，分别引起叶斑、茎腐和轴腐等症状，严重时整株剑麻死亡[18]。剑麻斑马纹病的侵入方式主要是伤口侵入，在田间最主要的侵染方式主要是通过土壤地面径流和雨水传播[19]。目前生产上对斑马纹病的防治还是以预防为主，优先采取农业技术措施防治，化学防治为辅，并结合抗病育种等综合防治措施[20]。但长期使用化学药剂防治不但污染环境、造成农药残留，而且植物自身可能会产生抗药性。因此利用拮抗微生物通过其竞争、抗生、溶菌和诱导等各种作用机制来防治土传病害，从而减缓或预防病原菌侵害的程度，是减轻环境污染、维护生态平衡的一种有效且绿色环保的防治途径[21-22]。

1 材料与方法

1.1 材料

供试生防菌：菌株 PaHNHK01 分离自海南省海口市的胡椒植株上，保存于中国热带农业科学院环境与植物保护研究所。

供试病原菌：烟草疫霉菌（*Phytophthora nicotianae*）保存于中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带粮食与特色作物病害研究组；抑菌谱病原菌参照侯会霞等[23]的病原菌，略有改动，供试病原菌见表 1。

表 1　病原菌基本信息

Tab. 1　Basic information of pathogens

编号 No.	病原菌 Pathogen	来源 Source
1	辣椒疫霉菌（*P. capsica*）	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带粮食与特色作物病害研究组保存
2	大豆疫霉菌（*P. sojae*）	南京农业大学王源超赠送
3	棕榈疫霉菌（*P. palmivora*）	海南大学热带农林学院陈庆河赠送
4	瓜疫霉菌（*P. melonis*）	海南大学热带农林学院陈庆河赠送
5	暹罗刺盘孢菌（*Colletotrichum siamense*）	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带果树病害研究组胡美姣赠送
6	可可毛色二孢菌(*Lasiodiplodia theobromae*)	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带果树病害研究组胡美姣赠送
7	霍尔木兹毛球二孢菌（*L. hormozganensis*）	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带果树病害研究组胡美姣赠送
8	禾谷镰孢菌（*Fusarium graminearum*）	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带粮食与特色作物病害研究组保存
9	尖孢镰刀菌（*F. oxysporum*）	海南省三亚市热带农业科学院孔祥义赠送
10	黑曲霉菌（*Aspergillus niger*）	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带粮食与特色作物病害研究组保存
11	稻瘟病菌（*Magnaporthe oryzae*）	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带粮食与特色作物病害研究组保存
12	拟盘多毛孢菌（*Pestalotiopsis kenyana*）	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带粮食与特色作物病害研究组保存
13	烟草疫霉菌（*Phytophthora nicotianae*）	中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带粮食与特色作物病害研究组保存

1.2　方法

1.2.1　生防菌株的筛选　用五点对峙法[24]筛选生防菌，在 PDA 固体平板中心接入 5 mm 烟草疫霉菌饼，以菌饼为中心，在其上下左右 20 mm 处接入生防菌，以只在中心接入病原菌为对照，每个 3 次重复，于 28 ℃恒温箱中培养 5~8 d，待对照菌落长至平板 2/3 时，测量病原菌菌落直径（cm），计算抑菌率[25]。

1.2.2　生防菌株的鉴定　（1）形态学观察。将生防菌接入 LB 培养基中振荡培养后按梯度稀释并涂布于 LB 平板上，于 28 ℃恒温培养 18~24 h，观察单菌落特征。采用革兰氏染色法[26]测定生防菌株的种类。

（2）生理生化指标测定。参照《常见细菌系统鉴定手册》[27]的方法，对生防菌株 PaHNHK01 的部分生理生化特性进行测定，各个指标测定参照侯会霞等[23]的方法。

（3）分子生物学鉴定。将生防细菌单菌落接种于 LB 液体培养基中 28 ℃、180 r/min 过夜培养，离心收集菌体，用 OMEGA 细菌 DNA 提取试剂盒进行生防细菌 DNA 的提取。所用引物为细菌鉴定通用引物 16S rDNA 和管家基因引物 atpD、gapA 和 rpoA，参照侯会霞等[23]和魏靖宇等[28]的引物序列和反应程序。

将 PCR 反应产物经过 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，选取成像清晰且符合预期条带大小的 PCR 产物送深圳华大基因股份有限公司进行测序。随后利用 NCBI 数据库（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cg）的 GenBank 进行 BLAST 分析，并进行同源序列比对。然后使用 MEGA 11 软件对序列进行分析，对参考序列进行串联拼接，利用邻接法（neighbor-joining, NJ）构建系统发育树，最终确定菌株的分类地位。

1.2.3　生防菌抑菌谱测定　参照 1.2.1 中的方法测定生防菌株 PaHNHK01 对 12 种供试病原菌的抑制效果，观察并计算其抑菌率[29]。

1.2.4　生防菌促生功能测定　采用 Salkowski 比色法测定菌株 PaHNHK01 的产 IAA 能力[30]，以 IAA 标准液 50 μg/mL 处理的 LB 培养基为阳性对照（CK^+），未接菌的 LB 培养基为阴性对照（CK^-）；参照郭海等[31]的方法测定菌株 PaHNHK01 的溶磷能力；采用点接法测定解钾能力[32]；用固氮培养基测定固氮能力；采用 CAS 培养基测定嗜铁素。

1.2.5　生防菌对剑麻叶片的离体防效　选取健康、长势一致的剑麻叶片同时接入烟草疫霉菌和生防菌 PaHNHK01。分别在叶片上、中、下 3 个部位用灭菌后的昆虫针刺伤，参照邱睿等[33]的方法，在刺伤部位菌丝面朝下接种直径为 10 mm 的烟草疫霉菌饼，并喷施 1 mL 浓度为 1×10^8 CFU/mL 的 PaHNHK01 菌悬液；以只接烟草疫霉菌饼为阳性对照（CK^+）；以只喷施 NA 液体培养

基（CK_1^-）和空白 V8 菌饼（CK_2^-）为阴性对照，接种后用无菌脱脂棉和无菌水保湿，观察发病情况并计算防效。

1.2.6 生防菌次生代谢产物对病原菌的影响 （1）铜绿假单胞菌发酵滤液的制备。取 28 ℃振荡培养 48 h 的 PaHNHK01 发酵液，10 000 r/min、4 ℃离心 10 min，弃沉淀，用 0.22 μL 细菌过滤器过滤上清液，重复 2 次，得无菌发酵液[34]。

（2）无菌发酵液抑菌活性的测定。采用含药平板法，将无菌发酵液按不同梯度加入已融好且冷却到 55 ℃左右的 V8 培养基中，充分混匀后倒入培养皿制成固体平板培养基。凝固后将 5 mm 剑麻斑马纹病菌菌饼接种到平板中央，以不加 PaHNHK01 发酵滤液的平板为对照，于 28 ℃恒温培养[34]，观察病原菌菌丝生长情况并按照 1.2.1 的方法计算抑菌率。

（3）PaHNHK01 粗提物提取及其抑菌活性的测定。制备 PaHNHK01 发酵液 4 L，10 000 r/min、4 ℃离心 10 min，保留上清液，用等体积的乙酸乙酯萃取 PaHNHK01 有机相，将萃取的有机相合并，于 42 ℃条件下旋转蒸发，留下物质即 PaHNHK01 粗提物。参照 1.2.6-（2）的方法测定抑菌活性。

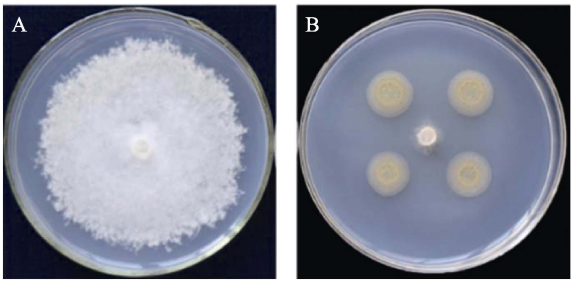
1.3 数据处理

利用 Excel 2019 和 IBM SPSS Statistics 26 软件进行数据统计与分析，采用 Duncan's 新复极差法进行试验数据的差异显著性检验；分子生物学鉴定使用 DNAman 软件进行序列拼接，用 MEGA 11 软件构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 生防菌株的活化与筛选

通过活化筛选获得生防菌株 PaHNHK01，菌株 PaHNHK01 对病原菌丝生长抑制率为 89.79%，PaHNHK01 对烟草疫霉菌菌丝有明显的抑制效果（图 1）。通过光学显微镜对烟草疫霉菌菌丝进行观察，发现对照正常菌丝表面光滑、粗细均匀、生长正常（图 2A），而 PaHNHK01 对峙的烟草疫霉菌出现菌丝体畸形（图 2B）、膨大增粗（图 2C）、分支（图 2D）等现象。



A：正常烟草疫霉；B：受 PaHNHK01 抑制的烟草疫霉。
A: Normal *P. nicotianae*; B: *P. nicotianae* under PaHNHK01 stress.

图 1 PaHNHK01 对烟草疫霉生长的抑制效果
Fig. 1 Inhibition effects of PaHNHK01 on *P. nicotianae* growth

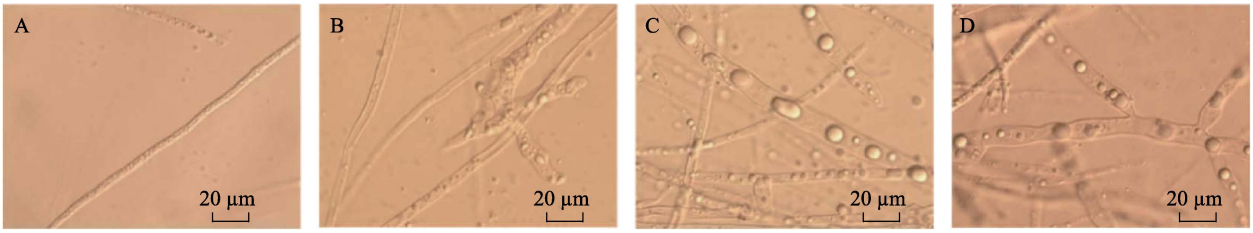


图 2 PaHNHK01 对峙的烟草疫霉菌丝形态
Fig. 2 Mycelium morphology of *P. nicotianae* under PaHNHK01 stress

2.2 生防菌株的鉴定

2.2.1 形态学特征 菌株 PaHNHK01 的菌落在 LB 平板上呈现出不透明的橘黄色菌体，其边缘整齐，表面较光滑（图 3A）。经革兰氏染色后在显微镜下观察发现，PaHNHK01 菌体细胞为杆状，革兰氏染色后呈红色（图 3B），因此 PaHNHK01 为革兰氏阴性细菌。

2.2.2 生理生化鉴定 生理生化测试结果显示，

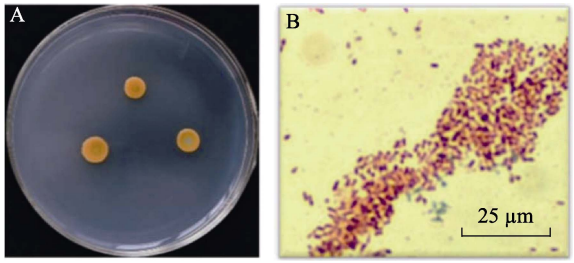


图 3 PaHNHK01 菌落及菌体形态
Fig. 3 PaHNHK01 colonies and mycilia

菌株 PaHNHK01 在氧化酶、接触酶、硝酸盐还原和明胶液化测试中呈阳性反应，在乙酰甲基甲醇、甲基红和淀粉水解测定中呈阴性反应。此外，该菌株能利用葡萄糖、果糖和甘露醇产酸，但不能利用山梨醇和蔗糖产酸。在 NaCl 浓度为 2%~10% 时，该菌株均可生长，但不能利用葡萄糖、蔗糖、山梨醇、果糖和甘露醇产气（表 2）。

2.2.3　分子生物学鉴定　测序结果经过 DNAman 软件拼接处理后，菌株 PaHNHK01 的 16S rDNA 有效序列长度为 1397 bp，atpD、gapA 和 rpoA 有效序列长度分别为 964、931、931 bp。在 NCBI 网站进行 BLAST 序列比对发现，菌株 PaHNHK01 与铜绿假单胞菌的同源性极高。利用 MEGA 11 软件，采用邻接法构建系统发育树，结果显示菌株 PaHNHK01 的 16S rDNA、atpD、gapA、rpoA 序列与铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）聚为一支（图 4、图 5）。综合考虑生防菌的形态

表 2　PaHNHK01 生理生化特性

Tab. 2　Physiological and biochemical identification of PaHNHK01

项目 Item	结果 Reault	项目 Item	结果 Result
氧化酶	+	葡萄糖发酵	+
接触酶	+	蔗糖发酵	–
甲基红（M·R）	–	果糖发酵	+
乙酰甲基甲醇（V-P）	–	山梨醇发酵	–
淀粉水解	–	甘露醇发酵	+
2% NaCl 可生长	+	利用葡萄糖产气	–
5% NaCl 可生长	+	利用蔗糖产气	–
7% NaCl 可生长	+	利用果糖产气	–
10% NaCl 可生长	+	利用山梨醇产气	–
厌氧生长	+	利用甘露醇产气	–
明胶液化	+	硝酸盐还原	+

注：+为阳性反应，–为阴性反应。

Note: + means positive reaction, – means negative reaction.

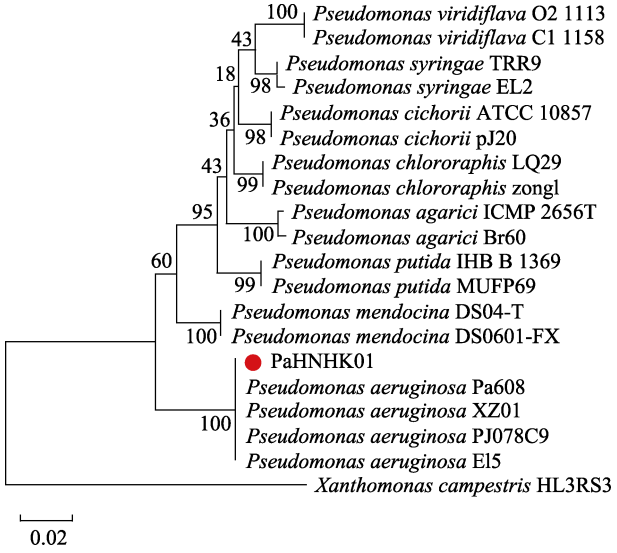


图 4　菌株 PaHNHK01 基于 16S rDNA 基因序列的系统发育进化树

Fig. 4　Phylogenetic evolution tree of strain PaHNHK01 based on 16S rDNA gene sequence

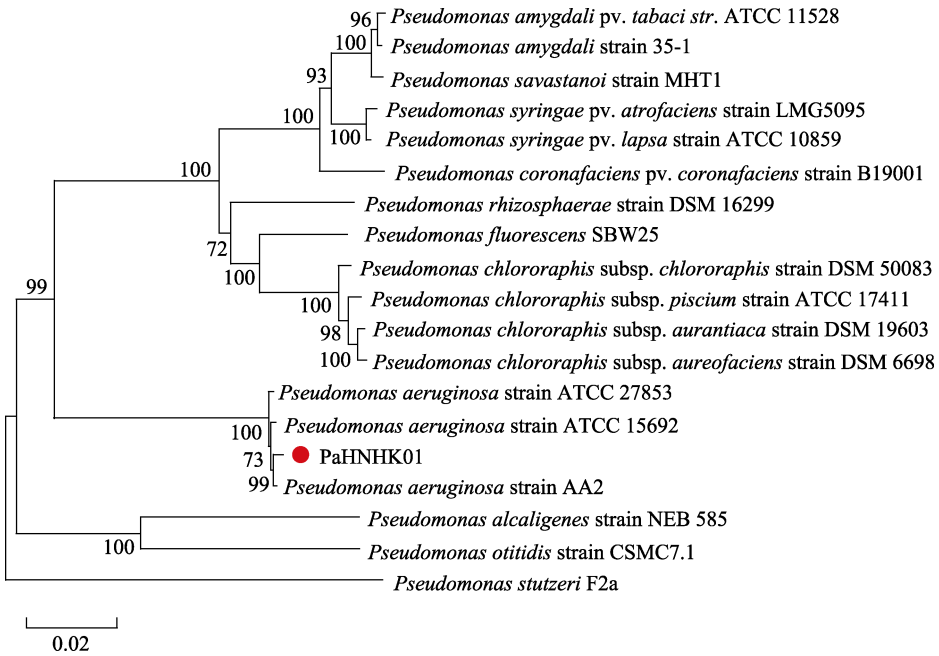


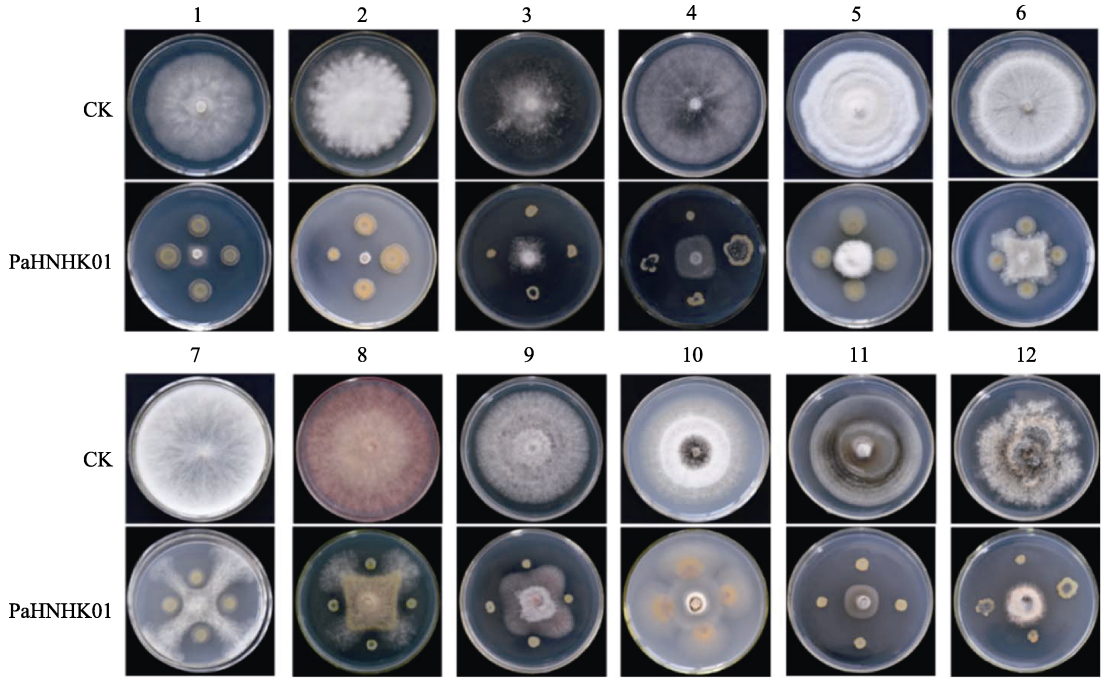
图 5　菌株 PaHNHK01 基于 atpD、gapA 和 rpoA 多基因序列的系统发育进化树

Fig. 5　Phylogenetic evolution tree of strain PaHNHK01 based on atpD, gapA and rpoA polygenic sequence

特征、生理生化特征以及系统发育树分析结果，确认菌株 PaHNHK01 为铜绿假单胞菌。

2.3 生防菌抑菌谱测定

生防菌 PaHNHK01 对 12 种供试病原菌均有不同程度的拮抗效果（图 6，表 3），对 4 种卵菌类病原菌菌丝的抑菌率均在 75%以上，其中 PaHNHK01 对大豆疫霉菌（*P. sojae*）的抑制效果最好，抑菌率为 93.33%，对辣椒疫霉菌（*P. capsica*）、棕榈疫霉菌（*P. palmivora*）、瓜疫霉菌（*P. melonis*）的抑菌率分别为 80.45%、76.67%、75.22%。对 8 种病原真菌的菌丝抑制率均在 55.33%以上，其中 PaHNHK01 对暹罗刺盘孢菌（*C. siamense*）的抑制效果较强，抑制率为 81.33%，对尖孢镰刀菌（*F. oxysporum*）抑制效果较弱，抑菌率为 55.33%。



菌株编号同表 1。
Strain No. is the same as Tab. 1.

图 6 PaHNHK01 对 12 种病原菌的抑制效果
Fig. 6 Inhibitory effect of PaHNHK01 on 12 pathogenic bacteria

表 3 PaHNHK01 对不同病原菌菌丝生长的抑制作用
Tab. 3 Inhibitory effect of PaHNHK01 on mycelial growth of different pathogens

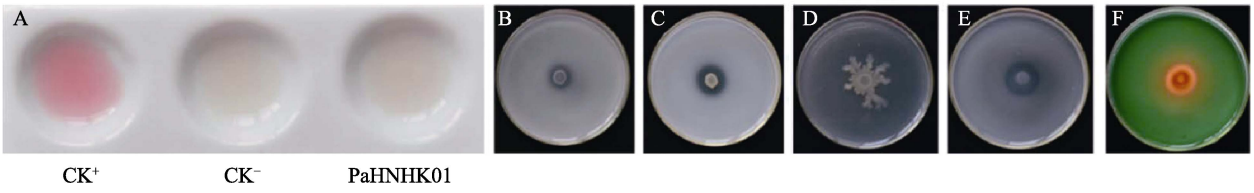
编号 No.	病原菌 Pathogen	抑制率 Inhibition rate/%	编号 No.	病原菌 Pathogen	抑制率 Inhibition rate/%
1	辣椒疫霉菌（*P. capsica*）	80.45±1.18^{bc}	7	霍尔木兹毛球二孢菌（*L. hormozganensis*）	76.45±1.18^{bc}
2	大豆疫霉菌（*P. sojae*）	93.33±0.77^{a}	8	禾谷镰孢菌（*F. graminearum*）	61.11±1.35^{e}
3	棕榈疫霉菌（*P. palmivora*）	76.67±0.38^{bc}	9	尖孢镰刀菌（*F. oxysporum*）	55.33±0.38^{f}
4	瓜疫霉菌（*P. melonis*）	75.22±0.40^{c}	10	黑曲霉菌（*A. niger*）	79.33±0.38^{bc}
5	暹罗刺盘孢菌（*C. siamense*）	81.33±0.77^{b}	11	稻瘟病菌（*M. oryzae*）	77.11±0.59^{bc}
6	可可毛色二孢菌（*L. theobromae*）	80.22±0.59^{bc}	12	拟盘多毛孢菌（*P. kenyana*）	69.78±5.67^{d}

注：同列不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。
Note: Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P<0.05$).

2.4 生防菌促生特性分析

生防菌促生特性结果表明，菌株 PaHNHK01 不具有产植物激素 IAA 能力（图 7A）；在有机磷培养基和无机磷培养基上，菌株 PaHNHK01 的菌落周围均出现透明晕圈（图 7B，图 7C）；但在钾培养基上并未观察到菌落周围产生透明油滴状晕圈（图 7D）；在阿须贝无氮固体培养基上，菌株生长状况良好（图 7E）；在 CAS 固体培养基上

PaHNHK01 的菌落周围则呈现橘黄色晕圈（图 7F）。结果表明，菌株 PaHNHK01 具备解有机磷、解无机磷、固氮和产铁的能力，却不具备解钾的能力。



A：产 IAA 能力测定；B：解有机磷能力测定；C：解无机磷能力测定；D：解钾能力测定；E：固氮能力测定；F：产铁能力测定。
A: Determination of IAA ability; B: Determination of organophosphorus solving ability; C: Determination of inorganic phosphorus solving ability; D: Determination of potassium solving ability; E: Determination of nitrogen fixation ability; F: Determination of iron production ability.

图 7　PaHNHK01 的促生特性

Fig. 7　Growth promotion effect of PaHNHK01

2.5　生防菌对剑麻叶片的离体防效

生防菌 PaHNHK01 对剑麻离体叶片斑马纹病有较好防效，只接种烟草疫霉菌的剑麻叶片发病严重，同时接种 PaHNHK01 和烟草疫霉菌的叶片发病率明显降低，防治效果明显（图 8），PaHNHK01 对剑麻斑马纹病的防效为 88.62%，防治效果较理想。

A: PaHNHK01 + *P. nicotianae;*
B: CK^+ (*P. nicotianae*); C: CK_1^-; D: CK_2^-.

图 8　PaHNHK01 对剑麻叶片的离体防效

Fig. 8　*In vitro* control effect of PaHNHK01 on sisal leaves

2.6　生防菌次生代谢产物对病原菌的影响

2.6.1　无菌发酵液对剑麻烟草疫霉菌的影响　PaHNHK01 无菌发酵液对剑麻斑马纹病菌有明显的抑制效果（图 9）。室内毒力测定结果表明，PaHNHK01 无菌发酵液浓度为 15 μL/mL 时，抑菌率为 39.61%；无菌发酵液浓度为 60 μL/mL 时，抑菌率达 74.89%。PaHNHK01 无菌发酵液的 EC_{50} 值为 20.3679 μL/mL（表 4）。

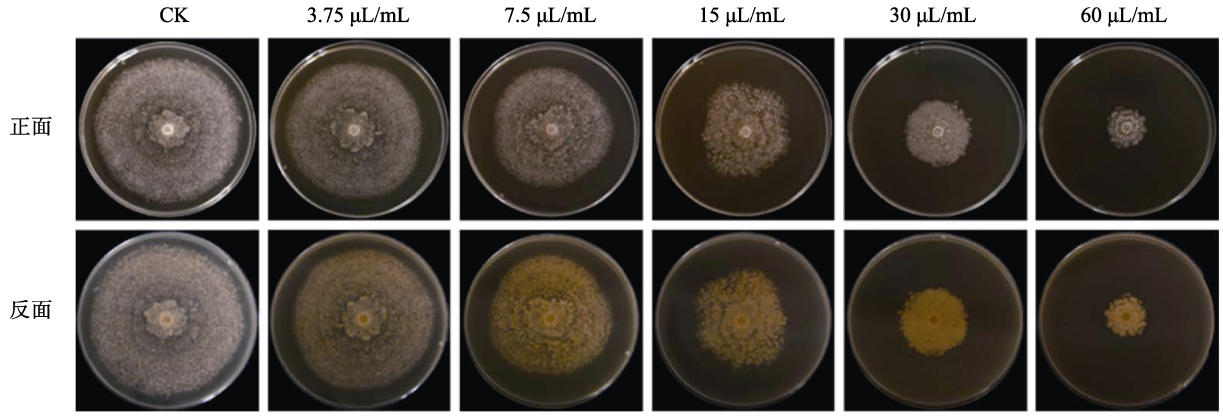


图 9　不同浓度 PaHNHK01 无菌发酵液对烟草疫霉的抑制作用

Fig. 9　Inhibition of different concentrations of PaHNHK01 sterile fermentation broth on *P. nicotianae*

2.6.2　PaHNHK01 粗提物对剑麻烟草疫霉菌的影响　PaHNHK01 粗提物对剑麻斑马纹病菌有明显的抑制效果（图 10）。室内毒力测定结果表明，PaHNHK01 粗提物浓度为在 20 μg/mL 时，抑菌率为 56.07%；粗提物浓度为 80 μg/mL 时，抑菌率达 89.36%。PaHNHK01 粗提物的 EC_{50} 值为

11.9456 μg/mL（表 5）。

3 讨论

H.11648 是我国目前剑麻主要栽培品种，该品种高产但极易受烟草疫霉的侵害[35-36]，目前生产上以预防为主，农业技术措施、化学药剂防治与抗病育种等相结合的综合防治措施[20, 37-38]。生产上常用的化学药剂有敌克松、甲基托布津等[39-40]。抗病育种难度大、周期缓慢，裴超群等[41]选育的龙舌兰杂种 76416 抗病但出麻率低，目前尚无明确的高产和抗病品种来代替 H.11648[42]。而农业防治费时费力，化学防治会对环境产生负面影响，还有农药残留等问题[43]，因此，生物防治可以有效缓解目前面临的这些问题。本研究成功分离出 1 株对剑麻斑马纹病病原菌有抑制作用的细菌，抑制率为 89.79%，通过对该菌的形态学观察、生理生化检测以及分子鉴定，确定菌株 PaHNHK01 为铜绿假单胞菌（*P. aeruginosa*）。

目前常见的生防细菌有芽孢杆菌属的枯草芽孢杆菌[44]、解淀粉芽孢杆菌[45]、多粘类芽孢杆菌[23]等；假单胞菌属的铜绿假单胞菌[46]、恶臭假单胞菌[47]等。生防真菌有深绿木霉[48]、哈茨木霉[49]

表 4 不同浓度 PaHNHK01 无菌发酵液对烟草疫霉的影响

Tab. 4 Effects of different concentrations of sterile fermentation broth PaHNHK01 on *P. nicotianae*

浓度 Concentration/(μL·mL^{-1})	菌落直径 Colony diameter/cm	抑菌率 Antibacterial rate/%	回归方程 Regression equation	R^2	EC_{50} /(μg·mL^{-1})
3.75	68.67±0.58	10.82±0.75	y=1.7181x+2.7511	0.9970	20.3679
7.5	62.50±1.00	18.83±1.30			
15	46.50±1.73	39.61±2.25			
30	33.83±1.04	56.06±1.35			
60	19.33±0.58	74.89±0.74			
CK	77.00±1.00				

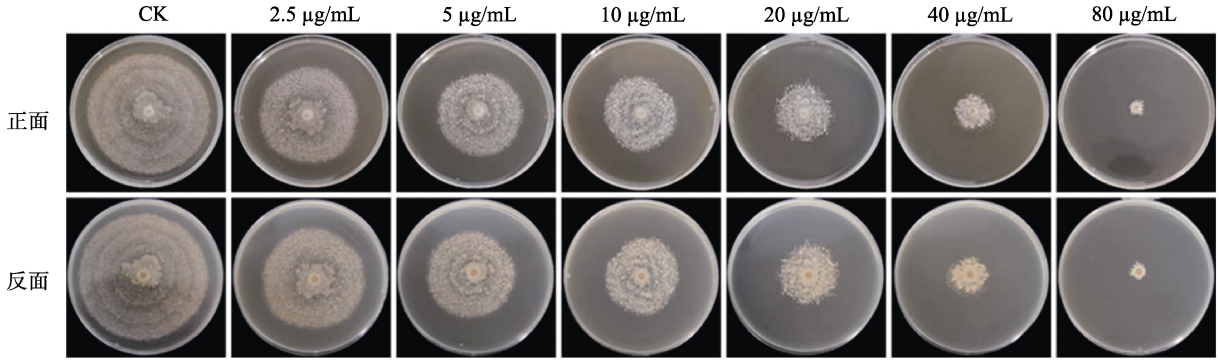


图 10 不同浓度 PaHNHK01 粗提物对烟草疫霉的抑制作用

Fig. 10 Inhibition of different concentrations of PaHNHK01 crude extract on *P. nicotianae*

表 5 不同浓度 PaHNHK01 粗提物对烟草疫霉的影响

Tab. 5 Effects of different concentrations of PaHNHK01 crude extract on *P. nicotianae*

浓度 Concentration/(μg·mL^{-1})	菌落直径 Colony diameter /cm	抑菌率 Antibacterial rate /%	回归方程 Regression equation	R^2	EC_{50} /(μg·mL^{-1})
2.5	57.00±0.29	17.00±0.42	y=1.2965x+3.6034	0.9979	11.9456
5	47.17±0.17	31.31±0.24			
10	40.83±1.01	40.53±1.48			
20	30.17±1.30	56.07±1.90			
40	20.67±0.67	69.36±0.98			
80	7.33±0.33	89.36±0.44			
CK	77.00±1.00				

等。生防放线菌主要有链霉菌[50]等。铜绿假单胞菌次生代谢产物非常丰富，已被鉴定的有 24 种[51]，且对多数植物病原菌有抑制效果。比利时的 ISWANDI 等[52]在 1987 年首次从大麦根部分离到 1 株铜绿假单胞菌 7NSK2，利用其菌悬液处理种子和土壤，对植物有促生效果，还可以使植物根际微生物的种群得到改善。研究表明，铜绿假单胞菌对立枯丝核菌、齐整小核菌、腐皮镰孢、柑橘黄单胞菌和胡萝卜软腐欧文氏菌等均有抑制作用[53]。谯天敏等[54]利用抗生素标记法发现铜绿假单胞菌 ZB27 可以定殖在植株上，对杂交竹梢枯病有较好的防控效果。任小平等[55]研究表明铜绿假单胞菌可作为一种有较好应用前景的新型生物农药。还有研究发现铜绿假单胞菌的抑菌机理是产生一系列化合物，如吩嗪-1-羧酸、藤黄绿脓菌素、3,4-二羟基-N-甲基-4-苯并二氢吡喃酮-丁酰胺等，这些产物对病原菌生长均有较强的抑制效果[56-57]，如铜绿假单胞菌产生的吩嗪-1-羧酸对小麦全蚀病菌、辣椒疫霉、黄瓜炭疽病菌、甜瓜蔓枯病菌和水稻纹枯病菌等病原菌均有较强的抑制作用[58]。本研究中的铜绿假单胞菌 PaHNHK01 具有良好的生防潜力，对烟草疫霉、大豆疫霉、棕榈疫霉等 12 种植物病原，均有良好的抑制效果，表明 PaHNHK01 具有广谱抑菌性。而且 PaHNHK01 具有较强的溶磷、固氮等促生功能。但对铜绿假单胞菌的研究大多报道的是临床医学领域，与临床分离的菌株相比，从根际分离的铜绿假单胞菌毒性较低，但仍有一定毒性[59]，因此运用生防菌的代谢产物来抑制病原菌非常必要。菌株 PaHNHK01 的无菌发酵滤液对剑麻斑马纹病病原菌的抑菌效果显著，其 EC_{50} 值为 20.3679 μL/mL，其粗提物对病原菌的抑制效果更为明显，EC_{50} 值为 11.9456 μg/mL。表明剑麻斑马纹病病原菌的生长受生防菌 PaHNHK01 代谢产物的影响，因此生防菌 PaHNHK01 具有良好的生防潜力，研究结果为剑麻斑马纹病病原菌烟草疫霉的生物防治提供良好的菌种资源。

参考文献

[1] 黎宇, 谢国炎, 熊谷良, 张瑞香, 何宏彬. 世界麻类原料生产与贸易概况[J]. 中国麻业科学, 2006(5): 256-261.
LI Y, XIE G Y, XIONG G L, ZHANG R X, HE H B. World hemp raw material production and trade overview[J]. Plant Fiber Sciences in China, 2006(5): 256-261. (in Chinese)

[2] 陈士伟, 李栋宇. 我国剑麻产业发展现状及展望[J]. 中国热带农业, 2016(3): 10-12, 6.
CHEN S W, LI D Y. Development situation and prospect of sisal industry in China[J]. China Tropical Agriculture, 2016(3): 10-12, 6. (in Chinese)

[3] 朱长风, 廖双泉. 热带植物纤维的特性及其预处理[J]. 热带农业科学, 2007, 27(1): 73-79.
ZHU C F, LIAO S Q. Characteristics and pretreatment of some tropical plant fibers[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2007, 27(1): 73-79. (in Chinese)

[4] 高洪. 剑麻的性能及应用[J]. 山东纺织科技, 2010, 51(3): 44-45.
GAO H. Property and application of sisal[J]. Shandong Textile Science & Technology, 2010, 51(3): 44-45. (in Chinese)

[5] 黄艳. 国内外剑麻产业研究现状与发展趋势[J]. 热带农业科学, 2013, 33(4): 87-90.
HUANG Y. Research status and development trend of sisal industry at home and abroad[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2013, 33(4): 87-90. (in Chinese)

[6] LI Y, MAI Y W, YE L. Sisal fibre and its composites: a review of recent developments[J]. Composites Science and Technology, 2000, 60(11): 2037-2055.

[7] 李燕婧, 周桂芬, 韦善新, 钟正贤. 剑麻皂素药理作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2006(10): 1958-1959.
LI Y J, ZHOU G F, WEI S X, ZHONG Z X. The pharmcological studies of tigogenin[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2006(10): 1958-1959. (in Chinese)

[8] 徐礼燊, 刘爱茹. 皂甙元分析方法的研究 Ⅱ. 剑麻皂甙元薄层比色法[J]. 化学学报, 1977(增刊 1): 239-242.
XU L S, LIU A R. Study on the analytical methods of saponin elements Ⅱ. Thin-layer colorimetric method for sisaloside elements of sisal hemp[J]. Acta Chimica Sinica, 1977(Suppl. 1): 239-242. (in Chinese)

[9] 谢红辉, 黄兑武, 韦艳明, 施国驹, 尹金春, 钟正, 吕辉. 广西剑麻病虫害发生现状及防治对策[J]. 中国热带农业, 2012(5): 47-49.
XIE H H, HUANG D W, WEI Y M, SHI G J, YIN J C, ZHONG Z, LYU H. The present situation and control countermeasures of sisal diseases and insect pests in Guangxi[J]. China Tropical Agriculture, 2012(5): 47-49. (in Chinese)

[10] 鹿志伟, 高建明, 覃海燕, 刘巧莲, 易克贤. 利用剑麻茎酿酒的研究[J]. 广东农业科学, 2015, 42(8): 61-65.
LU Z W, GAO J M, QIN H Y, LIU Q L, YI K X. Research on making wine by sisal stalk fermentation[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2015, 42(8): 61-65. (in Chinese)

[11] 李华锋, 蔺旺梅, 卢瑞, 抗新新, 李祥. 高效液相色谱法测定剑麻皂苷元的含量[J]. 应用化工, 2018, 47(7): 1541-1544.
LI H F, LIN W M, LU R, KANG X X, LI X. Determination of diosgenin in sisal by high performance liquid chromatography[J]. Applied Chemical Industry, 2018, 47(7): 1541-1544.

(in Chinese)

[12] 李祥, 蔺旺梅, 李华锋, 黄尚顺. 剑麻皂苷的萃取与絮凝工艺优化研究[J]. 日用化学工业, 2017, 47(5): 257-262.
LI X, LIN W M, LI H F, HUANG S S. Enrichment of sisal saponin from sisal waste liquor by surfactant solution extraction and flocculation[J]. China Surfactant Detergent & Cosmetics, 2017, 47(5): 257-262. (in Chinese)

[13] 陈叶海. 剑麻在园林绿化中的应用[J]. 云南热作科技, 2000(1): 40-41.
CHEN Y H. Application of sisal in landscaping[J]. Journal of Yunnan Tropical Crops Science & Technology, 2000(1): 40-41. (in Chinese)

[14] 钟恒. 植物学教学中的卵菌分类地位[J]. 植物学通报, 1995(3): 59-61.
ZHONG H. The taxonomic status of Oomycetes in the teaching of botany[J]. Chinese Bulletin of Botany, 1995(3): 59-61. (in Chinese)

[15] 威恩克, 刘国宁. “11648”斑马纹病的传播和防治[J]. 热带作物译丛, 1974(2): 26-27, 41.
WIENK J K, LIU G N. Transmission and control of “11648” zebra mussel disease[J]. World Tropical Agriculture Information, 1974(2): 26-27, 41. (in Chinese)

[16] 张开明. 国外龙舌兰麻斑马纹病的防治研究[J]. 热带作物译丛, 1977(3): 25-30.
ZHANG K M. Research on the control of hemp zebra mottle disease of *Agave americana* in foreign countries[J]. World Tropical Agriculture Information, 1977(3): 25-30. (in Chinese)

[17] 陈锦平, 刘清芬. 龙舌兰麻杂种 11648 斑马纹病的分布及其病原的研究[J]. 热带作物研究, 1980(2): 122-129.
CHEN J P, LIU Q F. Distribution of *Agave* hybrid 11648 zebra mottle disease and its pathogenesis[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 1980(2): 122-129. (in Chinese)

[18] GAO J, LUO P, GUO C, LI J, LIU Q, CHEN H, YI K. AFLP analysis and zebra disease resistance identification of 40 sisal genotypes in China[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39: 6379-6385.

[19] 克林顿, 佩雷格林, 苏茂荣. 剑麻 11648 号杂种的斑马纹复合病[J]. 热带作物译丛, 1964(6): 44-46.
CLINTON P K S, PEREGRINE W T H, SU M R. Zebra mottle complex disease in sisal 11648 hybrids[J]. World Tropical Agriculture Information, 1964(6): 44-46. (in Chinese)

[20] 张燕梅, 赵艳龙, 周文钊. 剑麻斑马纹病研究进展[J]. 热带作物学报, 2016, 37(8): 1627-1633.
ZHANG Y M, ZHAO Y L, ZHOU W Z. Research progress of zebra leaf disease on sisal[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(8): 1627-1633. (in Chinese)

[21] 邢华. 保障绿色农业发展 推行生物防控措施[J]. 现代农业, 2016(1): 73.
XING H. Ensuring green agricultural development and promoting biological control measures[J]. Modern Agriculture, 2016(1): 73. (in Chinese)

[22] 宋芷薇, 田志宏. 细菌在烟草土传病生物防治中的应用研究[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(8): 31-35, 100.
SONG Z W, TIAN Z H. Review of bacterial application in biological control of tobacco soil borne diseases[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2021, 27(8): 31-35, 100. (in Chinese)

[23] 侯会霞, 郑肖兰, 易克贤, 习金根, 李慧, 吴伟怀, 陈河龙. 2 株有效抑制剑麻斑马纹病菌的生防细菌鉴定[J]. 热带作物学报, 2024, 45(1): 205-214.
HOU H X, ZHENG X L, YI K X, XI J G, LI H, WU W H, CHEN H L. Identification of two biocontrol bacteria effectively inhibiting sisal zebra disease[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(1): 205-214. (in Chinese)

[24] 刘新宇, 李大皓, 李佩瑶. 不同培养条件对哈茨木霉菌抑制串珠镰刀菌能力的影响[J]. 安徽农学通报, 2020, 26(10): 82-85.
LIU X Y, LI D H, LI P Y. Effects of different culture conditions on the ability of *Trichoderma harzianum* to inhibit *Fusarium moniliforme*[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(10): 82-85. (in Chinese)

[25] 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.
FANG Z D. Research methods for plant diseases[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998. (in Chinese)

[26] 史忠良. 辣椒青枯病生防菌的分离和鉴定[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(18): 128-129.
SHI Z L. Separation and identification of biocontrol bacteria against pepper bacterial wilt[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2015, 43(18): 128-129. (in Chinese)

[27] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
DONG X Z, CAI M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001. (in Chinese)

[28] 魏靖宇, 韩雨桐, 翟文旭, 卫勇, 李宝通, 刘慧芹. 黄瓜土传病害拮抗细菌的筛选、鉴定及生防特性研究[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(6): 1582-1591.
WEI J Y, HAN Y T, ZHAI W X, WEI Y, LI B T, LIU H Q. Screening, identification and biocontrol characteristics of antagonistic bacteria against cucumber soil-borne diseases[J]. Chinese Journal of Biological Control. 2022, 38(6): 1582-1591. (in Chinese)

[29] 李铁军, 丁邦琴, 蔡凤, 陈玉霜. 生防菌菌株 LDB1 对植物病原真菌的抑菌谱[J]. 湖北农业科学, 2015, 54(2): 341-345.
LI T J, DING B Q, CAI F, CHEN Y S. Antifungal spectrum of biocontrol bacterium strain LDB1 against plant pathogen fungi[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2015, 54(2): 341-345.

(in Chinese)

[30] 冯金龙, 杨成德, 陈秀蓉, 王玉琴, 姚玉玲, 王颖. 解淀粉芽孢杆菌 S27 的鉴定、生物学功能测定及其对马铃薯病原真菌的拮抗作用研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2013, 48(4): 56-61.
FENG J L, YANG C D, CHEN X R, WANG Y Q, YAO Y L, WANG Y. Identification and biology function determination of *Bacillus amyloliquefaciens* S27 and its antagonism for several pathogenic fungus of potato[J]. Journal of Gansu Agricultural University, 2013, 48(4): 56-61. (in Chinese)

[31] 郭海, 杨成德, 姚玉玲, 崔月贞, 牛小丽, 薛莉. 高寒草地牧草内生细菌 262AG6 拮抗功能测定及鉴定[J]. 西北农业学报, 2017, 26(10): 1529-1536.
GUO H, YANG C D, YAO Y L, CUI Y Z, NIU X L, XUE L. Identification and determination of antagonistic function of endophytic bacteria 262AG6 from *Kobresia humilis* in alpine grassland[J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica, 2017, 26(10): 1529-1536. (in Chinese)

[32] 方园, 彭勇政, 廖长贵, 陈路生, 周琦, 黄俭, 阎依超, 王慕媛, 张祎坤, 邹丽芳, 陈功友. 一株具有防病促生功能的贝莱斯芽孢杆菌 SF327[J]. 微生物学报, 2022, 62(10): 4071-4088.
FANG Y, PENG Y Z, LIAO C G, CHEN L S, ZHOU Q, HUANG J, YAN Y C, WANG M Y, ZHANG Y K, ZOU L F, CHEN G Y. *Bacillus velezensis* SF327, a potential biocontrol agent with the functions of preventing plant diseases and promoting plant growth[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(10): 4071-4088. (in Chinese)

[33] 邱睿, 李芳芳, 徐敏, 李成军, 李小杰, 陈玉国, 白静科, 孙玥涵, 李淑君. 烟草品种对镰刀菌根腐病的抗性鉴定[J]. 中国烟草学报, 2019, 25(4): 59-63.
QIU R, LI F F, XU M, LI C J, LI X J, CHEN Y G, BAI J K, SUN Y H, LI S J. Evaluation of resistance to *Fusarium* root rot of selected tobacco varieties[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2019, 25(4): 59-63. (in Chinese)

[34] 张强, 王胜光, 吴利民, 姜志龙, 孟洁, 陆宁海. 小麦茎基腐病生防菌 HB-081 的鉴定及抑菌活性[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2022, 50(6): 7-14.
ZHANG Q, WANG S G, WU L M, JIANG Z L, MENG J, LU N H. Identification and activity of biocontrol strain HB-081 against wheat crown rot[J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology (Natural Sciences Edition), 2022, 50(6): 7-14. (in Chinese)

[35] 蔡东宏. 中国剑麻业现状和发展对策[J]. 广西热作科技, 2000(4): 20-22.
CAI D H. China sisal industry status quo and development countermeasures[J]. Guangxi Science & Technology of Tropical Crops, 2000(4): 20-22. (in Chinese)

[36] 郑金龙, 高建明, 张世清, 陈河龙, 刘巧莲, 易克贤. 剑麻斑马纹病病原鉴定[J]. 东北农业大学学报, 2011, 42(12): 59-64.
ZHENG J L, GAO J M, ZHANG S Q, CHEN H L, LIU Q L, YI K X. Pathogen identification of zebra disease of sisal[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2011, 42(12): 59-64. (in Chinese)

[37] 陈河龙, 郭朝铭, 刘巧莲, 高建明, 张世清, 郑金龙, 易克贤. 龙舌兰麻种质资源抗斑马纹病鉴定研究[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 546-550.
CHEN H L, GUO C M, LIU Q L, GAO J M, ZHANG S Q, ZHENG J L, YI K X. Identification of resistance to *Phytophthra parasitica* var. *nicotianae* in *Agave* germplasm[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(4): 546-550. (in Chinese)

[38] 陶玉兰. 再论 H·11648 剑麻斑马纹病的发生及防治措施[J]. 广西热作科技, 1996(2): 12-15.
TAO Y L. Revisiting H·11648 against sisal zebra print occurrence and control measures[J]. Agricultural Research and Application, 1996(2): 12-15. (in Chinese)

[39] 郑金龙, 高建明, 张世清, 陈河龙, 刘巧莲, 习金根, 易克贤. 6 种杀菌剂对剑麻斑马纹病的田间药效试验[J]. 江西农业学报, 2011, 23(11): 115-116, 127.
ZHENG J L, GAO J M, ZHANG S Q, CHEN H L, LIU Q L, XI J G, YI K X. Field experiments of control effects of six fungicides on sisal zebra disease[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2011, 23(11): 115-116, 127. (in Chinese)

[40] 刘巧莲, 郑金龙, 张世清, 高建明, 陈河龙, 江程记, 易克贤. 13 种药剂对剑麻斑马纹病病原菌的室内毒力测定[J]. 热带作物学报, 2010, 31(11): 2010-2014.
LIU Q L, ZHNEG J L, ZHANG S Q, GAO J M, CHEN H L, JIANG C J, YI K X. The indoor toxicity determination of 13 fungicides against *Phytophthora nicotianae* isolates from sisal[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2010, 31(11): 2010-2014. (in Chinese)

[41] 裴超群, 陶玉兰. 龙舌兰杂种 76416 抗斑马纹病选育[J]. 广西热作科技, 1993(2): 5-10.
PEI C Q, TAO Y L. Agave hybrid 76416 selection for sisal zebra resistance[J]. Guangxi Science & Technology of Tropical Crops, 1993(2): 5-10. (in Chinese)

[42] 熊和平. 麻类作物育种学[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 320-321.
XIONG H P. Hemp crop breeding[M]. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008: 320-321. (in Chinese)

[43] NONG Q Y, LIU Y A, QIN L T, LIU M, MO L Y, LIANG Y P, ZENG H H. Toxic mechanism of three azole fungicides and their mixture to green alga *Chlorella pyrenoidosa*[J]. Chemosphere, 2021, 262: 127793.

[44] 王爱玉, 薛超, 杨媛雪, 张芸, 鹿秀云, 赵鸣. 枯草芽孢杆

菌对棉花立枯病和黄萎病的防效评价[J]. 新疆农业科学, 2021, 58(12): 2244-2249.
WANG A Y, XUE C, YANG Y X, ZHANG Y, LU X Y, ZHAO M. Evaluation of control effect by *Bacillus subtilis* on the damping-off and *Verticillium* wilt of cotton[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2021, 58(12): 2244-2249. (in Chinese)

[45] 糜芳, 吴紫燕, 王承芳, 张莹莹, 干华磊, 毛伟力. 1 株解淀粉芽孢杆菌的分离、鉴定及在马铃薯疮痂病防治上的应用[J]. 江苏农业科学, 2021, 49(18): 122-127.
MI F, WU Z Y, WANG C F, ZHANG Y Y, GAN H L, MAO W L. Isolation and identification of a strain of *Bacillus amyloliquefaciens* and its application in prevention and treatment of potato scab[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2021, 49(18): 122-127. (in Chinese)

[46] 吴翔, 甘炳成, 谢丽源, 谭昊, 黄忠乾, 彭卫红, 唐杰. 一株烟草青枯拮抗细菌的筛选、鉴定和培养特性研究[J]. 中国土壤与肥料, 2019(2): 208-215.
WU X, GAN B C, XIE L Y, TAN H, HUANG Z Q, PENG W H, TANG J. Screening, identification and culture condition optimization of a bacteria against *Ralstonia solanacearum* of tobacco[J]. Soil and Fertilizer Sciences in China, 2019(2): 208-215. (in Chinese)

[47] 石晶盈, 刘爱媛, 冯淑杰, 李雪萍, 陈维信. 番木瓜内生细菌 MG-Y2 的鉴定及其生防作用[J]. 果树学报, 2007(6): 810-814.
SHI J Y, LIU A Y, FENG S J, LI X P, CHEN W X. Identification and biocontrol effect of endophytic bacterial strain MG-Y2 isolated from papaya[J]. Journal of Fruit Science, 2007(6): 810-814. (in Chinese)

[48] 张文军, 毛维兴, 张树武, 薛应钰, 徐秉良. 深绿木霉 T2 菌株对苹果霉心病的防治效果研究[J]. 中国果树, 2018(5): 11-14.
ZHANG W J, MAO W X, ZHANG S W, XUE Y Y, XU B L. Efficiency of *Trichoderma atroviride* T2 strain in controlling of apple mould core[J]. China Fruits, 2018(5): 11-14. (in Chinese)

[49] 危潇, 黎妍妍, 姚经武, 曹春霞, 黄大野. 哈茨木霉 WF2 菌株鉴定及对烟草黑胫病的防效[J]. 中南农业科技, 2023, 44(11): 12-15.
WEI X, LI Y Y, YAO J W, CAO C X, HUANG D Y. *Trichoderma harzianum* identification of WF2 strain and its efficacy against black shin disease of tobacco[J]. South-Central Agricultural Science and Technology, 2023, 44(11): 12-15. (in Chinese)

[50] 张玉丹, 谭琳, 任佐华, 杨艺帅, 杨学宇, 胡秋龙. 茶炭疽病拮抗链霉菌的筛选鉴定与拮抗能力测定[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(3): 646-656.
ZHANG Y D, TAN L, REN Z H, YANG Y S, YANG X Y, HU Q L. Screening, identification and determination of antagonistic actinomycetes strain against tea anthracnose[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2023, 39(3): 646-656. (in Chinese)

[51] GROSS H, LOPER J E. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp.[J]. Natural Products Report, 2009, 26(11): 1408-1446.

[52] ISWANDI A, BOSSIER P, VANDENABEELE J, VERSTRAETE W. Relation between soil microbial activity and the effect of seed inoculation with the rhizopseudomonad strain 7NSK2 on plant growth[J]. Biology and Fertility of Soils, 1987, 3: 147-151.

[53] 农业上的应用: 生物防治[J]. 生物技术通报, 1990(5): 82-85.
Application in agriculture: biological control[J]. Biotechnology Bulletin, 1990(5): 82-85. (in Chinese)

[54] 谯天敏, 朱天辉, 李姝江. 铜绿假单胞菌 ZB27 的定殖能力及对杂交竹梢枯病的防控作用[J]. 植物保护学报, 2011, 38(2): 133-138.
QIAO T M, ZHU T H, LI S J. Colonization of *Pseudomonas aeruginosa* ZB27 and its control effect on hybrid bamboo blight[J]. Journal of Plant Protection, 2011, 38(2): 133-138. (in Chinese)

[55] 任小平, 谢关林, 王笑. 铜绿假单胞菌 ZJ1999 对水稻纹枯病的防治及其在水稻上的定殖[J]. 中国生物防治, 2006(1): 54-57.
REN X P, XIE G L, WANG X. Application and colonization of *Pseudomonas aeruginosa* ZJ1999 for biocontrol of *Rhizoctonia solani* pathogen of rice sheath blight[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2006(1): 54-57. (in Chinese)

[56] BANO N, MUSARRAT J. Characterization of a new *Pseudomonas aeruginosa* strain NJ-15 as a potential biocontrol agent[J]. Current Microbiology, 2003, 46: 324-328.

[57] SULOCHANA M B, JAYACHANDRA S Y, KUMAR S K A, DAYANAND A. Antifungal attributes of siderophore produced by the *Pseudomonas aeruginosa* JAS-25[J]. Journal of Basic Microbiology, 2014, 54(5): 418-424.

[58] 蒋海霞, 周莲, 何亚文. 铜绿假单胞菌生防菌株抑菌代谢产物及其生防应用研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(7): 1338-1349.
JIANG H X, ZHOU L, HE Y W. Research progress in biocontrol strain *Pseudomonas aeruginosa* antifungal metabolites and their applications in biocontrol[J]. Microbiology, 2015, 42(7): 1338-1349. (in Chinese)

[59] WU D Q, YE J, OU H Y, WEI X, HUANG X, HE Y W, XU Y. Genomic analysis and temperature-dependent transcriptome profiles of the rhizosphere originating strain *Pseudomonas aeruginosa* M18[J]. BMC Genomics, 2011, 12: 438.