

嗜酸性 PGPR 菌株 CLB-17 的筛选、鉴定 及其对烟草青枯病菌的生防活性



赵 倩¹ 李军民² 雷 庭³ 王 静^{1*} 蔡宪杰^{4*}

(1. 中国农业科学院烟草研究所, 烟草行业病虫害监测与综合治理重点开放实验室, 山东 青岛 266101;
2. 山东省日照烟草有限公司, 山东 日照 276000; 3. 贵州省烟草公司黔南分公司, 贵州 都匀 558000;
4. 上海烟草集团有限责任公司, 上海 200082)

摘要: 为提高生防菌在酸性土壤中对烟草青枯病的生防效果, 采用室内酸性平板快速筛选法从烟草根际土壤中筛选嗜酸性拮抗细菌, 应用 Biolog GEN III 自动微生物鉴定系统结合 16S rDNA 序列分析进行种类鉴定, 并采用室内琼脂扩散法在 pH 5.5 和 pH 7.0 培养条件下比较其对烟草青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 的抑制活性, 通过盆栽试验测定其对烟草青枯病的防效及对烟草的促生作用, 通过测定胞外酶活性和铁载体含量分析其生防特性。结果表明: 从烟草根际土壤中筛选获得 1 株具有高拮抗活性的嗜酸性细菌, 命名为 CLB-17, 并将其鉴定为枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*。在 pH 5.5 条件下, 菌株 CLB-17 的拮抗活性最强, 其发酵液对烟草青枯病菌的抑菌带宽度为 7.11 mm, 而在 pH 7.0 条件下抑菌带宽度为 6.37 mm; 在 pH 5.5 条件下, CLB-17 菌株的铁载体相对含量(2.12)及蛋白酶活性(40.12 U/mL)、葡聚糖酶活性(142.52 U/mL)和酸性磷酸酯酶活性(6.42 U/mL)均高于 pH 7.0 条件下各指标(1.51、36.14 U/mL、110.24 U/mL 和 6.11 U/mL); 该菌株在 pH 5.5 条件下对烟草青枯病的防效为 76.99%, 高于在 pH 7.0 条件下的防效 66.18%; 且烟草株高、整株干重、根干重和叶绿素含量均显著高于 pH 7.0 处理和空白对照。表明枯草芽孢杆菌 CLB-17 在酸性条件下的生防活性高, 在酸性土壤中对烟草青枯病的生防效果更好, 且对烟草生长具有促进作用。

关键词: 烟草青枯病; 植物根际促生细菌; 酸性土壤; 枯草芽孢杆菌

Screening, identification and evaluation of acidophilic *Bacillus subtilis* CLB-17 for biocontrol of *Ralstonia solanacearum* causing tobacco wilt

Zhao Qian¹ Li Junmin² Lei Ting³ Wang Jing^{1*} Cai Xianjie^{4*}

(1. Key Laboratory of Tobacco Pest Monitoring Controlling & Integrated Management, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, Shandong Province, China; 2. Shandong Provincial Tobacco Company Rizhao Branch, Rizhao 276000, China; 3. Qiannan Branch of Guizhou Tobacco Company, Duyun 558000, Guizhou Province, China; 4. Shanghai Tobacco Group Co. Ltd., Shanghai 200082, China)

Abstract: To search for biocontrol agent for tobacco bacterial wilt in acid soils, an antagonistic bacterium against *Ralstonia solanacearum* causing tobacco bacterial wilt was screened out from tobacco rhizosphere based on a rapid screening method using a pH 5.5 nutrient agar (NA) medium and identified by Biolog GEN III combined with 16S rDNA sequence analysis. Its efficacy against tobacco bacterial wilt and growth promoting effect on tobacco were evaluated in pH 5.5 and pH 7.0 soils in greenhouse, and

基金项目: 贵州省烟草公司科技项目(201907), 山东省烟草公司科技重大专项(KN268-202007), 上海烟草集团有限责任公司科技项目(40796),

中国农业科学院科技创新工程(ASTIP-TRIC04)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: wangjing06@caas.cn, caixj@sh.tobacco.com.cn

收稿日期: 2020-07-10

the biocontrol related siderophore contents and enzyme activities were characterized by biochemical test. The results showed that an acidophilic antagonistic bacterium was obtained and named as CLB-17, identified as *Bacillus subtilis*. *Bacillus subtilis* CLB-17 had a higher inhibitory activity against *R. solanacearum* in acid conditions than in neutral conditions. At pH 5.5, the fermentation broth of CLB-17 had a 7.11 mm inhibitory bandwidth on NA plates, which was wider than the 6.37 mm inhibitory bandwidth at pH 7.0. The *B. subtilis* CLB-17 could secret siderophore, protease, glucanase and acid phosphatase. The relative content of siderophore (2.12), protease activity (40.12 U/mL), glucanase activity (142.52 U/mL) and acid phosphatase activity (6.42 U/mL) of CLB-17 at pH 5.5 were higher than those at pH 7.0 (1.51, 36.14 U/mL, 110.24 U/mL and 6.11 U/mL). In pot experiments, the control efficacy of *B. subtilis* CLB-17 on tobacco bacterial wilt was 76.99% at pH 5.5, which was higher than the control efficacy of 66.18% at pH 7.0. Similarly, CLB-17 significantly increased tobacco plant height, whole plant dry weight, root dry weight and chlorophyll content more in pH 5.5 soil than in pH 7.0 soil. These results suggested that an efficient plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) strain was obtained for further improving the biocontrol effect on tobacco bacterial wilt and the growth promotion of tobacco in acid soils.

Key words: tobacco bacterial wilt; plant growth promoting rhizobacteria; acid soil; *Bacillus subtilis*

烟草青枯病是由茄科劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的一种毁灭性土传病害,每年给烟草生产带来巨大的经济损失(Robertson et al., 2004)。影响烟草青枯病发生的因素很多,其中土壤环境条件是最重要的影响因子,包括土壤类型、酸碱度和微量元素含量等(陈玉蓝,2004)。近年来,由于大面积连作、环境污染和酸性肥料施用等因素导致我国植烟土壤酸化日趋严重。另外,烟草青枯病菌具有嗜酸性,喜欢偏酸性环境(Li et al., 2017)。因此,土壤酸化与青枯病的发生密切相关,发生青枯病的土壤pH明显低于正常土壤pH(Seo et al., 2012),酸化植烟土壤中青枯病发生日趋严重,降低了烟草产量和品质。

目前,我国极酸性植烟土壤(pH<4.5)面积占全国植烟土壤面积的比例为2.4%,酸性植烟土壤(pH介于4.5~5.5)所占比例为18.6%,弱酸性植烟土壤(pH介于5.5~6.5)所占比例为26.3%(陈江华等,2004),其中,湖南省烟区植烟土壤pH 5.0以下的占9.64%,pH介于5.5~6.5的占26.91%(许自成等,2008)。土壤酸化导致烟草青枯病等土传病害发生严重,已影响到当地烟草产业的可持续发展(张翼,2008)。而防治青枯病的措施主要包括生物、化学、农业和综合管理方法(Huet et al., 2014; Yuliar et al., 2015; Liu et al., 2016),但由于烟草青枯病菌地理分布广、寄主范围大和生存能力强的特点,至今仍无理想的防治措施(Yang et al., 2018),酸性土壤中烟草青枯病的防控更为困难。因此,筛选适用于酸性土壤中烟草青枯病绿色防控的拮抗微生物具有重要意义。

基于拮抗微生物和病原物互作的生物防治被认为是减少化学农药使用和改善植物健康的可替代或补充的方式(Patiño-Vera et al., 2005)。在植物根茎类病害的生物防治中,根际促生菌通过分泌拮抗物质和诱导植物抗性从而直接或间接抑制病原菌侵染和促进植物生长(Compan et al., 2005);这类菌还可以通过竞争根系分泌物来减少病原物可用营养物质,进而减轻植物所受伤害(Wu et al., 2017)。植物根际促生菌中的优势菌属主要包括芽孢杆菌属 *Bacillus*、假单胞菌属 *Pseudomonas* 和肠杆菌属 *Enterobacter*,均具有较强的适应逆境能力,且能够产生抗生物质和生长调节物质,在促进烟株生长和防治病害方面发挥着重要作用(Yendyo et al., 2018)。目前,国内外已利用有益细菌(潘文道等,2008;李碧德,2018; Song et al., 2018)和真菌(朱红惠等,2005)、噬菌体(Elhalag et al., 2018)、抗性植株(彭曙光等,2011)以及芸薹属植物(Gómez-Lama et al., 2018)等对青枯病进行生物防治,但在酸性植烟土壤条件下对烟草青枯病进行生物防治的研究尚少。因此,本研究从湖南省张家界市酸化植烟地块中烟草青枯病重发田采集的健株根际土样中分离拮抗菌株,结合 Biolog GEN III 自动微生物鉴定系统和 16S rDNA 基因序列分析对其进行鉴定,并分别在酸性和中性条件下研究其对烟草青枯病菌的抑制活性、相关生防特性及防病促生作用,以期为酸性土壤中高效防控烟草青枯病的微生物资源开发及其应用研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试青枯菌:参照Li et al.(2016)方法自湖南省张家界市慈利县江垭镇酸性植烟田块(pH 5.6)罹病烟株根部分离获得,经室内鉴定为茄科劳尔氏菌1号生理小种,生物型III,可在pH 5.2条件下正常生长(杨晓宇等,2014),保存于中国农业科学院烟草研究所植物保护研究中心-80°C冰箱。

供试烟草和土壤:烟草品种为中国农业科学院烟草研究所培育的K326,培养条件为光周期14 L:10 D、昼夜温度28°C/25°C、相对湿度75%,生育期45 d;供试灭菌土壤为中国农业科学院烟草研究所试验基地提供的湿热灭菌土,pH 6.6;野外烟草根际土壤样品于2018年7月采集自湖南省张家界市慈利县高峰乡双河村(pH 5.75)、江垭镇细毛坪村(pH 5.4)和三官寺镇吴王坡村(pH 4.9)的酸性植烟土壤烟田,每块田随机采集健株根际土壤10份,每份样品100 g,混匀后于-20°C保存,备用。

培养基:营养肉汤(nutrient broth,NB)液体培养基成分为葡萄糖15 g、酵母粉1 g、胰蛋白胨5 g、牛肉浸膏3 g,去离子水定容至1 L,pH 7.0;营养琼脂(nutrient agar,NA)培养基为NB液体培养基中加15 g琼脂粉;蔗糖-天冬酰胺(glucose asparagine agar,GAA)液体培养基成分为蔗糖20 g,L-天冬酰胺2 g、K₂HPO₄ 1 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、FeCl₃ 0.16 μmol/L,去离子水定容至1 L,pH 7.0;无机磷液体培养基成分为葡萄糖10 g、MgCl₂·6H₂O 5 g、MgSO₄·7H₂O 0.25 g、(NH₄)₂SO₄ 0.1 g、KCl 0.2 g、Ca₃(PO₄)₂ 25 g,去离子水定容至1 L,pH 7.5;产IAA培养基成分为牛肉膏5 g、蛋白胨10 g、NaCl 5 g、L-色氨酸0.5 g,去离子水定容至1 L,pH 7.2。

药剂、试剂及仪器:3%中生菌素(zhongsheng-mycin)可湿性粉剂,江西正邦作物保护有限公司。2×Taq PCR Master Mix、铬天青(chromeazurol S,CAS),日本TaKaRa公司;EsayPure® Bacteria Genomic DNA Purification Kit,北京全式金生物技术有限公司;BUG+B培养基,美国伯腾仪器有限公司;其余试剂均为国产分析纯。Biolog GEN III微孔板、Biolog自动微生物鉴定系统和Biolog浊度仪,美国伯腾仪器有限公司;S-3E pH计,北京胜达惠捷科技有限公司;ProFlex PCR仪,美国Applied Biosystems公司;DYY-8C电泳仪,北京市六一仪器有限公司;Gel-Doc-It TS Imaging System凝胶成像仪,美国UVP公

司;UV-6000 METASH紫外分光光度计,上海仪元析仪器有限公司;LHP-150恒温培养箱,常州中诚仪器制造有限公司;JEM-2100透射电镜,日本JEOL公司。

1.2 方法

1.2.1 嗜酸性根际促生菌的筛选

嗜酸性植物根际促生菌筛选参照刘国红等(2013)方法并略作改动。称取10 g野外烟草根际土壤样品置于装有90 mL无菌水的三角瓶中,于28°C、150 r/min条件下振荡20 min,即制成土壤悬液原液,以10倍梯度稀释至10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴后,分别吸取100 μL各梯度土壤悬液涂布到预先混有烟草青枯病菌、pH 5.5的NA平板上,每个浓度处理3次重复。于28°C下黑暗培养2 d后观察有无抑菌圈产生,以抑菌圈直径的大小为依据判断筛选细菌的拮抗活性,并选择抑菌活性表现最好的1株嗜酸性拮抗细菌作为供试菌株进行后续试验。

1.2.2 嗜酸性拮抗细菌的鉴定

参照Biolog GEN III自动微生物鉴定系统操作指南,通过Biolog GEN III微孔板对嗜酸性拮抗细菌进行94种表型测试,其中包括71种碳源利用测试和23种化学敏感测试(张朝正和郭兰珍,2009)。将拮抗菌株在Biolog鉴定专用BUG+B培养基上于33°C黑暗培养24 h后,利用Biolog浊度仪将菌株细胞浓度的透光率调至90%~98%,然后将培养获得的菌悬液倒入V型加样水槽中,用8通道电动移液器将菌悬液按顺序加入Biolog GEN III微孔板中,每孔100 μL,33°C黑暗培养4~6 h和16~24 h时用读数仪读取菌株的特征性碳源代谢指纹特征,并将测定结果与Biolog数据库中的菌株进行比对分析,对嗜酸性拮抗细菌进行初步鉴定。

同时对拮抗菌株进行分子生物学鉴定。按照EsayPure® Bacteria Genomic DNA Purification Kit操作步骤提取拮抗菌株的基因组DNA,采用16S rDNA通用引物27 F(5'-AGAGTTGATCCTGGCTCAG-3')/1492 R(5'-GGCTACCTGTTACGACTT-3')进行PCR扩增(张朝正和郭兰珍,2009),试验所用引物均由上海派森诺生物科技股份有限公司合成。25 μL PCR反应体系:模板DNA 2 μL、上下游引物各1 μL、5×Prime STAR Buffer(Mg²⁺ Plus) 5 μL、dNTP Mixture 2 μL、DNA聚合酶0.25 μL,ddH₂O补足25 μL。PCR反应条件:94°C预变性5 min;94°C变性1 min,56°C退火1 min,72°C延伸90 s,35个循环;72°C终延伸7 min。PCR扩增产物送上海派森诺生物科技股份有限公司进行测序,将测序所得序列在NCBI数

据库进行BLAST同源性比对并递交GenBank获取登录号,应用MEGA 6.0软件基于邻接法以海胆芽孢杆菌 *Bacillus hemicentroti* (GenBank登录号HM460885)为外群构建系统发育树,1 000次重复检验,确定菌株分类地位。

1.2.3 不同酸碱度条件下拮抗菌株抑菌活性的测定

采用琼脂扩散法(张立帆,2017)测定拮抗菌株发酵液的抑菌活性。首先用pH 4.0及8.0的酸碱缓冲液滴定NB液体培养基pH至5.5、6.0、6.5、7.0和7.5,121℃灭菌20 min,然后将拮抗菌株分别接种于不同pH的NB液体培养基中,于28℃、150 r/min条件下振荡培养24 h,利用紫外分光光度计测量并用NB液体培养基将拮抗菌株发酵液浓度调整为10⁸ CFU/mL和10⁹ CFU/mL,备用。同时将烟草青枯病菌接种于pH 7.0的NB液体培养基中,于28℃、150 r/min条件下振荡培养48 h,利用紫外分光光度计测量并用NB液体培养基将其浓度调整为10⁸ CFU/mL和10¹⁰ CFU/mL,备用。取10⁸ CFU/mL烟草青枯病菌悬浮液均匀喷雾NA平板,打取直径9 mm琼脂孔并在其中加入10⁸ CFU/mL拮抗菌株发酵液50 μL,阴性对照为等量相同pH的NB液体培养基,28℃培养48 h后观察烟草青枯病菌的生长情况,并采用十字交叉法测量各处理的抑菌带宽度。

为进一步明确拮抗菌株的抑菌活性,测定其在酸性条件下无菌滤液的抑菌活性。将上述制备的不同pH的10⁸ CFU/mL拮抗菌株发酵液在4℃条件下以5 000 r/min离心5 min,取上清液经孔径0.22 μm细菌过滤器滤去菌体细胞,即获得无菌滤液,按照上述发酵液抑菌方法通过测量抑菌带宽度测定无菌滤液对烟草青枯病菌的抑制作用。同时,分别取不同pH的10⁸ CFU/mL拮抗菌株无菌滤液9 mL与浓度为10¹⁰ CFU/mL的烟草青枯病菌悬浮液1 mL混合,于28℃、150 r/min条件下振荡培养48 h,以9 mL NB液体培养基混合1 mL 10¹⁰ CFU/mL烟草青枯病菌悬浮液作为对照,于相同条件下进行培养,每个处理3次重复。分别取适量混合培养48 h的菌液在4℃、5 000 r/min条件下离心5 min,收集菌体沉淀经PBS缓冲液冲洗3次,并以200 μL PBS缓冲液重悬后,加入500 μL 2.5% 戊二醛固定2 h,10 000 r/min离心20 min,留下沉淀经50%、75%、90%、100%叔丁醇梯度脱水,每次15 min,真空干燥1 h,采用透射电镜观察烟草青枯病菌菌体的变化情况。

1.2.4 酸性和中性条件下拮抗菌株生防特性测定

参照胡碧惠(2014)方法测定拮抗菌株的铁载体

产量。将1.2.3制备的10⁹ CFU/mL拮抗菌株发酵液按体积比1:100分别接种于pH 5.5和pH 7.0的GAA液体培养基中,以未接种的GAA液体培养基为空白对照,于28℃、150 r/min条件下振荡培养32 h后,以10 000 r/min离心15 min,取上清液和CAS检测液按体积比1:1充分混匀,采用紫外分光光度计测定630 nm波长处的吸光值A;以相同方法测定空白对照吸光值Ar作为参比值,铁载体的相对含量为A/Ar。每个处理3次重复。

采用钼锑抗比色法测定拮抗菌株的溶磷作用(Pikovskaya et al., 1948)。将10⁹ CFU/mL拮抗菌株发酵液按体积比1:100分别接种于pH 5.5和7.0的无机磷培养基中,于28℃、150 r/min条件下振荡培养5 d,采用紫外分光光度计测定630 nm波长处的吸光值,以未接种无机磷培养基为空白对照,每个处理3次重复。

参照Salkowski比色法测定拮抗菌株的IAA分泌量(詹寿发等,2017)。将10⁹ CFU/mL拮抗菌株发酵液按体积比1:100分别接种于pH 5.5和pH 7.0、色氨酸含量为100 mg/L的NB液体培养基中,于28℃、150 r/min条件下振荡培养12 d,采用紫外分光光度计测定540 nm波长处的吸光值,以未接种、含100 mg/L色氨酸的NB液体培养基为空白对照,每个处理3次重复。

参照福林酚试剂法(赵伟伟,2016)测定拮抗菌株的蛋白酶活性。将10⁹ CFU/mL拮抗菌株发酵液按体积比1:100分别接种于pH 5.5和7.0的NB液体培养基中,于28℃、150 r/min条件下振荡培养3 d,以10 000 r/min离心10 min,取上清液即为粗酶液,采用紫外分光光度计测定500 nm波长处的吸光值,以未接种的NB液体培养基为空白对照,每个处理3次重复。参照DNS比色法(李皎等,2014)测定拮抗菌株的葡聚糖酶活性。粗酶液的提取同蛋白酶,采用紫外分光光度计测定540 nm波长处的吸光值,以未接种的NB液体培养基为空白对照,每个处理3次重复。

采用对硝基酚比色法(邢楠楠等,2011)测定拮抗菌株的磷酸酯酶活性。将10⁹ CFU/mL拮抗菌株发酵液按体积比1:100分别接种于pH 5.5和7.0的NB液体培养基中,于28℃、150 r/min条件下振荡培养3 d,以10 000 r/min离心10 min,取上清液即为粗酶液。取0.02 mol/L对硝基苯磷酸二钠0.5 mL、pH 4.6乙酸缓冲液1.5 mL于试管中混匀,在37℃预热5 min,加入粗酶液0.5 mL,立即混匀并记时,37℃保

温20 min,加入0.5 mol/L NaOH 1 mL终止酶反应,以先加入NaOH再加入酶液作为空白对照,采用紫外分光光度计测定405 nm处的吸光值。每个处理3次重复。

1.2.5 酸性和中性条件下拮抗菌株的防病效果测定

采用盆栽试验测定拮抗菌株对烟草青枯病的防效。试验共设3个处理,分别为 10^8 CFU/mL拮抗菌株发酵液、3%中生菌素可湿性粉剂1 500倍稀释液和无菌水对照。首先参照施河丽等(2018)方法制备不同酸碱度的土壤。将供试灭菌土壤过孔径9 mm的筛,用适量酸、碱缓冲液充分混匀,称取5 g土壤至50 mL锥形瓶中,按照质量比2.5:1.0加入去离子水,250 r/min振荡20 min,静置30 min测定pH并将其pH分别调整至5.5和7.0,备用。将供试烟苗根部经无水乙醇消毒和无菌水漂洗后,于各处理液体中浸根40 min,然后移栽至分别盛有pH 5.5和pH 7.0的土壤、直径为10 cm的花盆中缓苗3 d,用10 mL浓度为 10^8 CFU/mL的烟草青枯病菌悬浮液灌根,接种后烟苗置于光周期为14 L:10 D、昼夜温度均为30℃、相对湿度为75%的人工气候室内培养,每个处理3次重复,每个重复25株烟苗。待烟株出现青枯病萎蔫症状后,逐日观察烟株发病情况,待空白对照的发病率达到60%以上时,调查各处理烟株的发病情况,并计算病情指数和防效。病情指数=(发病株数×该病级代表值)/(调查总株数×9)×100;防效=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100%。病情分级参照烟草病虫害分级及调查方法(GB/T 23222—2008)。0级,全株无病;1级,茎部偶有褪绿

斑,或病侧1/2以下叶片调萎;3级,茎部有黑色条斑,但不超过茎高1/2,或病侧1/2至2/3叶片调萎;5级,茎基部黑色条斑超过茎高1/2,但未到达茎顶部,或病侧2/3以上叶片调萎;7级,茎部黑色条斑到达茎顶部,或病株叶片全部调萎;9级,病株基本枯死。

1.2.6 酸性和中性条件下拮抗菌株的促生作用测定

在室内盆栽条件下测定拮抗菌株对烟草的促生作用。试验共设2个处理,分别为 10^8 CFU/mL拮抗菌株发酵液和无菌水对照。将各处理烟苗分别移栽至装有pH 5.5和pH 7.0的灭菌土壤、直径为10 cm的花盆中,置于光周期为14 L:10 D、昼夜温度为28℃/25℃、相对湿度为75%的人工气候室内培养,每个处理3次重复,每个重复25株烟苗。30 d后拔出所有烟苗用流水小心洗去根部泥土,按YC/T 142—2010方法调查烟草的农艺性状,测量并记录各处理烟株株高,将烟株于70℃烘箱中烘干至恒重,称量整株干重和根干重,采用丙酮乙醇混合液法(Chen et al., 2014)测定各处理烟叶叶绿素含量。

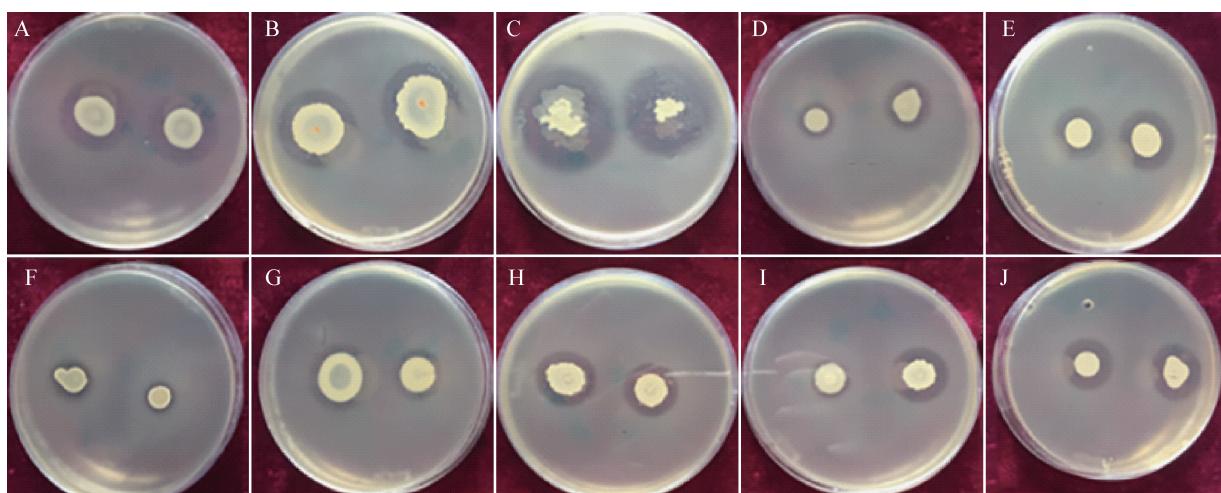
1.3 数据分析

利用DPS 9.50软件对数据进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 嗜酸性拮抗细菌筛选结果

经酸性NA平板初筛获得10株对烟草青枯病菌有较高抑制活性的拮抗细菌(图1);从中选择对峙拮抗活性最好的1株菌株进行后续试验,并将其命名为CLB-17。



A: CLP-23; B: CLB-4; C: CLB-17; D: CLP-10; E: CLP-7; F: CLP-13; G: CLP-9; H: CLB-21; I: CLB-3; J: CLB-1.

图1 筛选获得10株对烟草青枯病菌有较高拮抗作用的嗜酸性菌株

Fig. 1 Ten strains with antagonistic effects against *Ralstonia solanacearum*

2.2 菌株CLB-17的鉴定结果

2.2.1 Biolog GEN III鉴定结果

Biolog GEN III鉴定结果显示,培养24 h后菌株CLB-17能利用 α -D-葡萄糖、D-山梨醇、L-丙氨酸、甘油、L-天门冬氨酸、柠檬酸、L-谷氨酸和蔗糖,该菌株代谢特征与枯草芽孢杆菌*Bacillus subtilis*的相似度较高,可初步鉴定为枯草芽孢杆菌*B. subtilis*。

2.2.2 分子生物学鉴定结果

序列分析结果显示,菌株CLB-17的16S rDNA

基因序列长度为1 417 bp,提交至GenBank获得登录号为KX664475,BLAST同源性比对结果显示,菌株CLB-17与枯草芽孢杆菌(GenBank登录号为JF496383.1)的同源性最高,相似度为100%。基于16S rDNA基因序列构建菌株CLB-17的系统发育树(图2),结果显示菌株CLB-17与枯草芽孢杆菌聚为一支。结合Biolog GEN III鉴定结果和分子生物学分析结果,最终将菌株CLB-17鉴定为枯草芽孢杆菌*B. subtilis*。

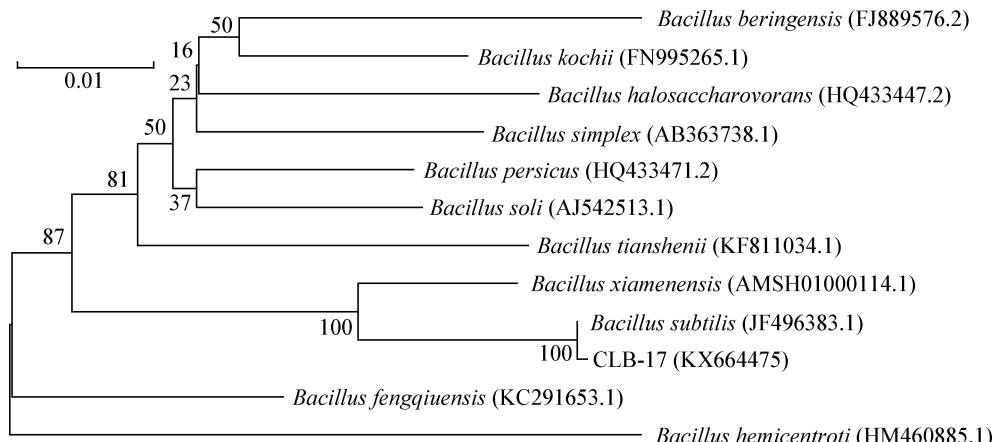


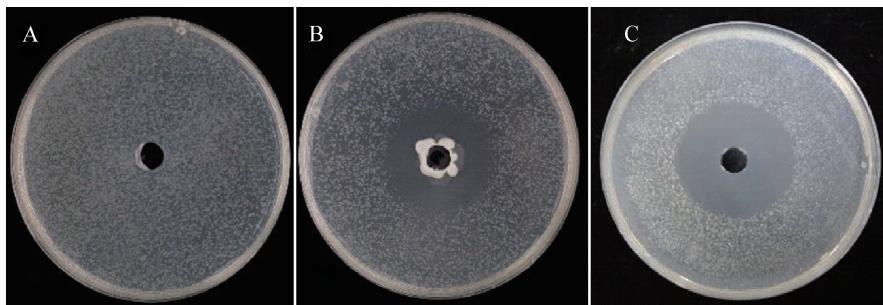
图2 基于16S rDNA序列构建拮抗菌株CLB-17与相关菌株的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain CLB-17 and other related strains constructed based on 16S rDNA sequences

2.3 不同酸碱度条件下菌株CLB-17的抑菌活性

对峙培养48 h后,拮抗菌株CLB-17发酵液和无菌滤液对烟草青枯病菌均有较好的抑制作用,在

NA平板上出现宽窄不同的透明抑菌圈,抑菌带宽度分别为9.39 mm和7.00 mm(图3)。



A: 对照; B: CLB-17发酵液; C: CLB-17无菌滤液。

A: CK; B: bacteria suspension of CLB-17; C: sterile filtrate of CLB-17.

图3 pH 5.5培养条件下嗜酸拮抗细菌CLB-17对烟草青枯病菌的抑制活性

Fig. 3 Inhibition effects of *Bacillus subtilis* CLB-17 against *Ralstonia solanacearum* at pH 5.5

2.3.1 菌株CLB-17发酵液的抑菌活性

pH 5.5条件下菌株CLB-17发酵液对烟草青枯病菌的抑制活性最强,抑菌带宽度为7.11 mm;随着pH升高,菌株CLB-17的抑制活性逐渐下降,当pH 7.5时,抑菌带宽度仅为6.37 mm,处理间差异显著(图4)。表明菌株CLB-17在酸性条件下的拮抗活性较强,在pH 5.5条件下活性最强,随pH升高其拮

抗活性呈下降趋势。

2.3.2 菌株CLB-17无菌滤液的抑菌活性

经透射电镜观察发现,菌株CLB-17无菌滤液与烟草青枯病菌混合培养48 h后,烟草青枯病菌菌体出现不同程度的损伤,杆状菌体细胞壁边缘破损,杆状菌体变形,出现不同程度的凹陷、畸形,且大部分内含物已外泄(图5-A),菌体处于严重瓦解状态。

而对照烟草青枯病菌菌体在培养48 h时仍呈完整的杆状,外形规则饱满,细胞壁完整(图5-B)。表明菌株CLB-17能够破坏烟草青枯病菌菌体,最终导致病菌死亡,从而起到拮抗作用。

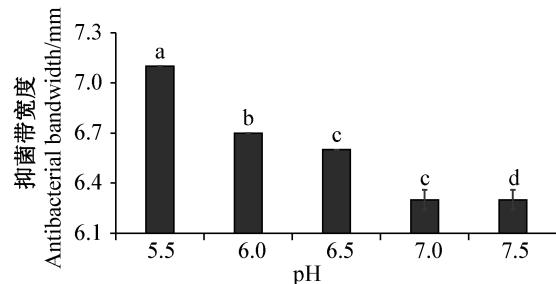


图4 不同酸碱度条件下拮抗菌株CLB-17对烟草青枯病菌的抑制活性

Fig. 4 Antagonistic activities of *Bacillus subtilis* CLB-17 under different pHs

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$)。

2.4 酸性和中性条件下菌株CLB-17的生防特性

酸性(pH 5.5)和中性(pH 7.0)培养条件下,菌株

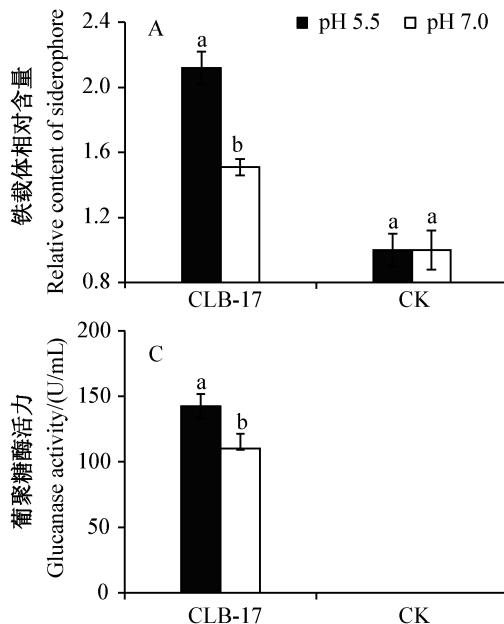


图6 酸性和中性条件下拮抗菌株CLB-17的生防特性

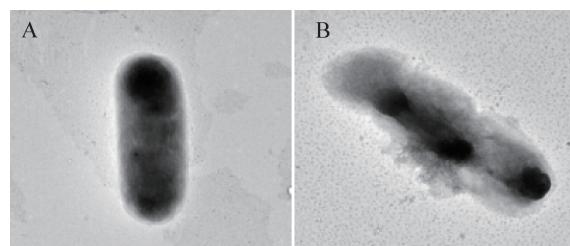
Fig. 6 The contrast of biocontrol characteristics of *Bacillus subtilis* CLB-17 under acid and neutral conditions

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$)。

2.5 酸性和中性条件下菌株CLB-17的温室防效

接种烟草青枯病菌20 d后病情调查结果显示,在酸性和中性土壤中菌株CLB-17对烟草青枯病均

CLB-17的铁载体相对含量分别为2.12和1.51,前者显著高于后者(图6-A);蛋白酶活性分别为40.12 U/mL和36.14 U/mL,两者差异不显著(图6-B);葡聚糖酶活性在酸性条件下为142.52 U/mL,较中性条件下(110.24 U/mL)显著提高30.6%(图6-C);磷酸酯酶活性分别为6.42 U/mL和6.11 U/mL,两者差异显著(图6-D)。表明菌株CLB-17能够分泌铁载体、蛋白酶、葡聚糖酶和酸性磷酸酯酶,且在酸性条件下的各指标均高于在中性条件下。但菌株CLB-17不能分泌IAA且不具备溶磷能力。

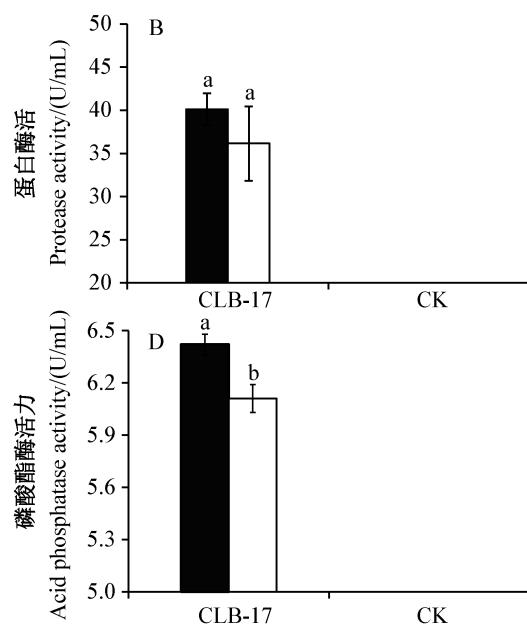


A: CLB-17 无菌滤液处理; B: 空白对照。

A: Treatment of strain CLB-17 sterile filtrate; B: CK.

图5 菌株CLB-17无菌滤液对烟草青枯病菌的影响(40 000×)

Fig. 5 Effects of sterile filtrate of *Bacillus subtilis* CLB-17 on *Ralstonia solanacearum* (40 000×)



具有较好的防效。在酸性(pH 5.5)土壤中,菌株CLB-17处理后烟草青枯病病情指数为17.63,防效为76.99%,对照药剂中生菌素处理后烟草青枯病

情指数为46.96,防效为38.69%,前者防效显著高于后者(图7),而空白对照烟草青枯病病情指数为76.59,发病较重。在中性(pH 7.0)土壤中,菌株CLB-17处理后烟草青枯病病情指数为23.56,防效显著下降为66.18%,对照药剂中生菌素处理后烟草青枯病病情指数37.48,防效为46.30%,而空白处理烟草青枯病病情指数为69.78,发病程度重于上述2个处理,生防菌处理和药剂处理防效差异显著。表明菌株CLB-17在酸性和中性土壤中对烟草青枯病均有一定的防效,且在酸性土壤中的防效更高,并高于中生菌素的防效。

2.6 酸性和中性条件下菌株CLB-17对烟草的促生作用

在酸性和中性土壤中,相较于空白对照,菌株CLB-17处理对烟草的株高、整株干重、根干重和叶绿素含量均有显著的促进作用。pH 5.5酸性土壤中,菌株CLB-17处理后烟草的株高、整株干重、根干重和叶绿素含量分别较空白对照显著增加了43.73%、35.29%、17.16%和46.88%。此外,pH 7.0中性土壤中,菌株CLB-17处理后烟草的株高、整株干

重、根干重和叶绿素含量分别较空白对照显著增加了19.97%、11.22%、5.04%和35.61%(表1)。表明菌株CLB-17有助于酸性和中性土壤中烟草生物量的积累,从而促进烟草生长,且菌株CLB-17在酸性条件下对烟草的促生效果更显著。

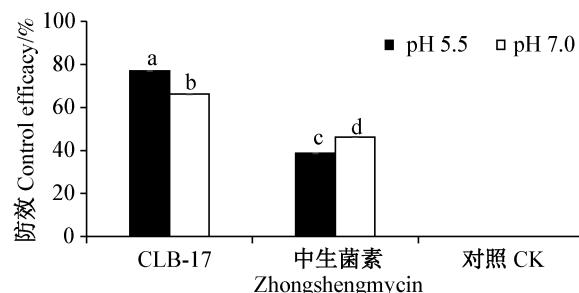


图7 菌株CLB-17在酸性和中性土壤中对烟草青枯病的防效

Fig. 7 Control efficacy of *Bacillus subtilis* CLB-17 under acidic and neutral soils

图中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$)。

表1 CLB-17菌株在酸性和中性土壤中对烟草的促生效果

Table 1 The growth promotion of CLB-17 under acid and neutral conditions

处理 Treatment	株高 Plant height/cm	整株干重 Whole plant dry weight/g	根干重 Root dry weight/g	叶绿素 Chlorophyll content/(mg/g)
CLB-17	pH 5.5 10.55±0.71 a	12.23±1.26 a	3.21±0.26 a	2.43±0.41 a
	pH 7.0 9.01±0.81 b	10.21±0.98 b	2.71±0.28 b	1.98±0.71 b
对照 CK	pH 5.5 7.34±1.42 d	9.04±1.01 d	2.74±0.31 c	1.68±0.81 c
	pH 7.0 7.51±0.93 c	9.18±0.99 c	2.58±0.29 d	1.46±1.04 d

表中数据为平均数±标准差。同列不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验差异显著($P<0.05$)。Data are mean±SD. Different lowercase letters indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P<0.05$)。

3 讨论

为筛选适用于防治连作酸性土壤中烟草青枯病的生防菌株,本研究基于酸性培养条件和烟草青枯病拮抗菌快速筛选方法,从酸化植烟地块烟草青枯病重发田采集的健株根际土样中筛选到1株嗜酸性拮抗细菌CLB-17,通过Biolog GEN III自动微生物鉴定系统和16S rDNA序列分析将其鉴定为枯草芽孢杆菌。在pH 5.5酸性条件下,拮抗菌株CLB-17发酵液和无菌滤液对烟草青枯病菌的拮抗活性最强,说明酸性条件有利于该拮抗菌株的生长和繁殖;进一步通过透射电镜观察到菌株CLB-17的无菌滤液能破坏烟草青枯病菌杆状细胞并使其内含物泄露,进而造成菌体死亡,说明枯草芽孢杆菌菌株CLB-17可以通过分泌胞外物质抑制烟草青枯病菌的生长。已有研究表明,许多由真菌和细菌产生的

胞外酶都参与了微生物在植物病害生物防治中的生防活动,一些生防菌株会产生胞外蛋白酶、葡聚糖酶和磷酸酯酶等细胞壁降解酶类,通过降解病原真菌或细菌细胞壁从而起到破坏作用(da Silva et al., 2019)。因此,透射电镜观察结果验证了菌株CLB-17在发酵过程中产生可以拮抗烟草青枯病菌的抗生物质。

筛选并利用具有多种拮抗机制的芽孢杆菌作为生防菌剂是植物病害生物防治研究的重要内容。芽孢杆菌作为重要的植物根际促生细菌,被用于多种作物病害生物防治研究中,如芽孢杆菌BPR7菌株通过产生IAA、铁载体、ACC脱氨酶、氰化物和裂解酶等物质强烈抑制了多种植物病原物的生长,并溶解了各种有机和无机磷酸盐以及钾和锌(Kumar et al., 2012);李全胜等(2018)发现莫哈韦芽孢杆菌*B.*

mojavensis 菌株 H14 通过产生蛋白酶和分泌表面活性素、丰原素及溶杆菌素脂肽类抗生素抑制病原菌的生长; 张斌等(2015)筛选出的解淀粉芽孢杆菌 *B. amyloliquefaciens* 菌株 SY177、SY290 和 SQ728 以及枯草芽孢杆菌菌株 LS536 通过分泌蛋白酶抑制番茄青枯病菌的生长。本研究发现, 枯草芽孢杆菌菌株 CLB-17 能够向胞外分泌蛋白酶和葡聚糖酶, 可能通过在发酵过程中分泌这些胞外抗生物质破坏烟草青枯病菌杆状细胞, 进而抑制其正常生长。另一方面, 菌株 CLB-17 还能产生与防病直接相关的铁载体以及促进生长密切相关的酸性磷酸酯酶, 且酸性培养条件下其铁载体含量以及酶活力高于中性培养条件下。铁作为细菌生长和代谢过程中必不可少的微量元素, 很多生防菌株通过与病原微生物竞争铁元素从而抑制病原微生物的生长, 控制病害的发生。如 Kloepper et al.(1980) 报道在低铁条件下, 植物根际促生菌株通过合成螯合铁离子——铁载体, 限制病原微生物生长, 且增强自身对低量铁的高效利用。铁载体是一种对 Fe^{3+} 具有极高亲和力的低分子量化合物, 可以改变铁的难溶性, 将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 并从铁载体-铁复合物中释放出来, 通过这种方式消耗铁元素来与病原微生物竞争铁, 从而降低病害的发生(周波和代金霞, 2017)。本研究结果进一步阐明了在酸性条件下, 菌株 CLB-17 可能通过分泌更多的螯合物来限制烟草青枯病菌吸收铁元素, 从而发挥其抑菌作用。生防菌株除了产生以上抗生物质外, Margalef et al.(2017) 研究指出, 磷酸酯酶是由细菌、真菌和植物根部产生的, 能将复杂的、不可利用的磷转化为可同化的磷, 为土壤提供磷素供植物生长利用, 该酶与促进植物生长效应密切相关。本研究结果显示, 在酸性培养条件下, 菌株 CLB-17 分泌的酸性磷酸酯酶活性增强, 表明其在酸性条件下对烟草的促生作用更强, 综合分析该菌株在酸性土壤中施用时能够提高其对烟草青枯病的防效以及对烟草的促生效果。不同生防芽孢杆菌的拮抗机制亦不同, 有的菌株以一种生防机制为主, 有的菌株则以多种生防机制协同作用, 但枯草芽孢杆菌菌株 CLB-17 在其防病和促生效应中是如何发挥各自作用的还需进一步研究验证。

为进一步了解筛选获得的拮抗菌株的应用生防潜力, 本研究模拟大田中的酸性土壤条件, 采用温室盆栽试验验证嗜酸性枯草芽孢杆菌 CLB-17 菌株的防病和促生效果。目前, 市售的一些生物肥料以芽

孢杆菌属种类居多。谷纪涛(2017)通过抑菌试验、酶活性测定试验、室内盆栽试验以及大田控病试验, 发现枯草芽孢杆菌和多黏类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* 对烟草野火病的防控效果均较为理想, 可以应用于生产上烟草野火病的防治。本研究结果显示, 在酸性土壤中, 枯草芽孢杆菌菌株 CLB-17 发酵液对烟草青枯病的防效显著高于对照药剂中生菌素, 说明菌株 CLB-17 适用于酸性土壤中烟草青枯病的生物防治, 具有研发为防治烟草青枯病以及其他作物青枯病生物菌剂的潜力。同时, 经枯草芽孢杆菌菌株 CLB-17 发酵液处理过的烟株在株高、根干重、整株干重和叶绿素含量上均较空白对照有显著增长, 且酸性条件下的促生效果更显著, 表明枯草芽孢杆菌菌株 CLB-17 在酸性土壤中更有利于发挥其促生作用。

参 考 文 献 (References)

- Chen JH, Li ZH, Liu JL, Wang G, Long HY, Lei QL, Zhang RL, Zhang WL. 2004. Evaluation of soil nutrients condition in major tobacco production region of China. *Acta Tabacaria Sinica*, 10(3): 14-18 [陈江华, 李志宏, 刘建利, 王刚, 龙怀玉, 雷秋良, 张认连, 张维理. 2004. 全国主要烟区土壤养分丰缺状况评价. 中国烟草学报, 10(3): 14-18]
- Chen YL. 2014. A study on the acidity characteristics of tobacco planting soil in Sichuan Province and its influencing factors. Master thesis. Ya'an: Sichuan Agricultural University (in Chinese). [陈玉蓝. 2014. 四川省植烟土壤酸度特征及其影响因素研究. 硕士学位论文. 雅安: 四川农业大学]
- Chen YS, Wang GY, Wang H, Cheng CH, Zang GG, Guo XB, Liu RH. 2014. Phytochemical profiles and antioxidant activities in six species of ramie leaves. *PLoS ONE*, 9(9): e108140
- Compan S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Barka EA. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(9): 4951-4959
- da Silva RR. 2019. Agricultural enzymes, phosphatases, peptidases, and sulfatases and the expectations for sustainable agriculture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(16): 4395-4396
- Elhalag K, Nasr-Eldin M, Hussien A, Ahmad A. 2018. Potential use of soilborne lytic Podoviridae phage as a biocontrol agent against *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Basic Microbiology*, 58(8): 658-669
- Gómez-Lama Cabanás C, Legarda G, Ruano-Rosa D, Pizarro-Tobías P, Valverde-Corredor A, Niqui JL, Triviño JC, Roca A, Mercado-Blanco J. 2018. Indigenous *Pseudomonas* spp. strains from the olive (*Olea europaea* L.) rhizosphere as effective biocontrol agents against *Verticillium dahliae*: from the host roots to the bacterial genomes. *Frontiers in Microbiology*, 9: 277

- Gu JT. 2017. Control effects of two antagonistic microbial agents on tobacco wildfire. Master thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [谷纪涛. 2017. 两种拮抗微生物菌剂对烟草野火病的控制作用研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Hu BH, Zhao CG, Yang SP. 2014. Influence of iron on siderophore and photosynthetic pigments biosynthesis by siderophore-producing *Rhodopseudomonas palustris*. *Acta Microbiologica Sinica*, 54(4): 408–416 (in Chinese) [胡碧惠, 赵春贵, 杨素萍. 2014. 铁对产铁载体的沼泽红假单胞菌光合色素与铁载体合成的影响. 微生物学报, 54(4): 408–416]
- Huet G. 2014. Breeding for resistances to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Plant Science*, 5: 715
- Kloepfer JW, Leong J, Teintze M, Schroth MN. 1980. *Pseudomonas* siderophores: a mechanism explaining disease-suppressive soils. *Current Microbiology*, 4(5): 317–320
- Kumar P, Dubey RC, Maheshwari DK. 2012. *Bacillus* strains isolated from rhizosphere showed plant growth promoting and antagonistic activity against phytopathogens. *Microbiological Research*, 167(8): 493–499
- Li BD. 2018. The study of the control effects of two biological control agents (*Paenibacillus polymyxa* and *Pseudomonas fluorescens*) on tobacco bacterial wilt. Master thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [李碧德. 2018. 两种生防菌(*Paenibacillus polymyxa* 与 *Pseudomonas fluorescens*)防控烟草青枯病的特性研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Li J, Yang GW, Wang DM, Mao Y, Deng Y. 2014. DNS method for determination of β -glucanase activity with protective agent. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 60(7): 6–7 (in Chinese) [李皎, 杨国武, 汪大敏, 毛勇, 邓媛. 2014. DNS法测定带有保护剂的 β -葡聚糖酶活研究. 陕西农业科学, 60(7): 6–7]
- Li QS, Xie ZM, Liu Z, Zhang GL, Wu DM, Tian Y. 2018. Screening and identification of antagonistic bacterium H14 against *Verticillium dahliae* Kleb. and its antagonistic mechanisms. *Journal of Plant Protection*, 45(6): 1204–1211 (in Chinese) [李全胜, 谢宗铭, 刘政, 张国丽, 武冬梅, 田英. 2018. 棉花黄萎病拮抗细菌H14的筛选鉴定及其拮抗机理分析. 植物保护学报, 45(6): 1204–1211]
- Li SL, Liu YQ, Wang J, Yang L, Zhang ST, Xu C, Ding W. 2017. Soil acidification aggravates the occurrence of bacterial wilt in South China. *Frontiers in Microbiology*, 8: e703
- Li YY, Feng J, Liu H, Wang L, Hsiang T, Li XH, Huang JB. 2016. Genetic diversity and pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* causing tobacco bacterial wilt in China. *Plant Disease*, 100(7): 1288–1296
- Liu GH, Liu B, Lin NQ. 2013. Rapidly screening and identification of an antagonistic *Bacillus* sp. against *Ralstonia solanacearum*. *Chinese Journal of Biological Control*, 29(3): 473–480 (in Chinese) [刘国红, 刘波, 林乃铨. 2013. 青枯雷尔氏菌生防芽孢杆菌的快速筛选及其鉴定. 中国生物防治学报, 29(3): 473–480]
- Liu LJ, Sun CL, Liu XX, He XL, Liu M, Wu H, Tang CX, Jin CW, Zhang YS. 2016. Effect of calcium cyanamide, ammonium bicarbonate and lime mixture and ammonia water on survival of *Ralstonia solanacearum* and microbial community. *Scientific Reports*, 6: 19037
- Margalef O, Sardans J, Fernández-Martínez M, Molowny-Horas R, Janssens IA, Ciais P, Goll D, Richter A, Obersteiner M, Asensio D, et al. 2017. Global patterns of phosphatase activity in natural soils. *Scientific Reports*, 7: 1337
- Pan WD, He HH, Li QQ, Lin W, Wang T. 2008. Control effect of antagonistic actinomycete St-145 on tomato bacterial wilt. *Guangxi Plant Protection*, 21(3): 13–15 (in Chinese) [潘文道, 何鸿洪, 黎起秦, 林纬, 王涛. 2008. 拮抗放线菌St-145对番茄青枯病的防治效果. 广西植保, 21(3): 13–15]
- Patiño-Vera M, Jiménez B, Balderas K, Ortiz M, Allende R, Carrillo A, Galindo E. 2005. Pilot-scale production and liquid formulation of *Rhodotorula minuta*, a potential biocontrol agent of mango anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*, 99(3): 540–550
- Peng SG, Chen W, Cheng C, Li DJ. 2011. Transformation and function of *BCCodY* of antagonistic bacterium 2-Q-9 in transgenic tobacco variety K326. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 37(2): 143–146 (in Chinese) [彭曙光, 陈武, 程诚, 黎定军. 2011. 拮抗菌2-Q-9抑菌相关基因*BCCodY*转化烟草及其功能. 湖南农业大学学报(自然科学版), 37(2): 143–146]
- Pikovskaya R. 1948. Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17: 362–370
- Robertson AE, Wechter WP, Denny TP, Fortnum BA, Kluepfel DA. 2004. Relationship between avirulence gene (*avrA*) diversity in *Ralstonia solanacearum* and bacterial wilt incidence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 17(12): 1376–1384
- Seo S, Gomi K, Kaku H, Abe H, Seto H, Nakatsu S, Neya M, Kobayashi M, Nakaho K, Ichinose Y, et al. 2012. Identification of natural diterpenes that inhibit bacterial wilt disease in tobacco, tomato and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 53(8): 1432–1444
- Shi HL, Xiang BK, Tan J, Peng WX, Sun YX, Wang R, Wu WH, Wei GS, Ding CF. 2018. Analysis of bacterial community in rhizosphere soil of tobacco plant infected by bacterial wilt disease. *Acta Tabacaria Sinica*, 24(5): 57–65 (in Chinese) [施河丽, 向必坤, 谭军, 彭五星, 孙玉晓, 王瑞, 吴文昊, 魏国胜, 丁才夫. 2018. 烟草青枯病发病烟株根际土壤细菌群落分析. 中国烟草学报, 24(5): 57–65]
- Song SH, Fu SN, Sun XY, Li P, Wu JE, Dong TY, He F, Deng YY. 2018. Identification of cyclic dipeptides from *Escherichia coli* as new antimicrobial agents against *Ralstonia solanacearum*. *Molecules*, 23(1): e214
- Wu K, Su L, Fang ZY, Yuan SF, Wang LL, Shen B, Shen QR. 2017. Competitive use of root exudates by *Bacillus amyloliquefaciens* with *Ralstonia solanacearum* decreases the pathogenic population density and effectively controls tomato bacterial wilt. *Scientia Horticulturae*, 218: 132–138

- Xing NN, Zhao Y, Liu H, Zhang H, Li HY. 2011. Comparison of activities of amylase, esterase, acid phosphatase in ginseng radix et rhizoma from different origins and different growth periods. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 28(1): 44–47 (in Chinese) [邢楠楠, 赵雨, 刘宏, 张惠, 李红艳. 2011. 不同年限人参中淀粉酶、酯酶、酸性磷酸酯酶的活力比较. 中国现代应用药学, 28(1): 44–47]
- Xu ZC, Wang L, Xiao HQ. 2008. pH distribution and relationship to soil nutrient in Hunan tobacco lands. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 16(4): 830–834 (in Chinese) [许自成, 王林, 肖汉乾. 2008. 湖南烟区土壤pH分布特点及其与土壤养分的关系. 中国生态农业学报, 16(4): 830–834]
- Yang L, Wu LT, Yao XY, Zhao SY, Wang J, Li SL, Ding W. 2018. Hydroxycoumarins: new, effective plant-derived compounds reduce *Ralstonia pseudosolanacearum* populations and control tobacco bacterial wilt. Microbiological Research, 215: 15–21
- Yang XY, Zhang QJ, Yu CL, Chen GM, Su RN, Lü TX. 2014. Tolerance assays to acid and bile salt of *Lactobacillus* from different sources. Progress in Veterinary Medicine, 35(2): 73–77 (in Chinese) [杨晓宇, 张七斤, 于晨龙, 陈光明, 苏日娜, 吕天星. 2014. 不同来源乳酸菌的耐酸耐胆盐试验. 动物医学进展, 35(2): 73–77]
- Yendyo S, Ramesh GC, Pandey BR. 2018. Evaluation of *Trichoderma* spp., *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus subtilis* for biological control of *Ralstonia* wilt of tomato. F1000Research, 6: 2028
- Yuliar, Nion YA, Toyota K. 2015. Recent trends in control methods for bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. Microbes and Environments, 30(1): 1–11
- Zhan SF, Lu DN, Mao HY, Xiong RL, Huang D, Chen Y. 2017. Isolation of two phosphate/potaassium-solubilizing and IAA-producing strains of endophytic fungi and their plant growth promoting function. Soil and Fertilizer Sciences in China, (3): 142–151 (in Chinese) [詹寿发, 卢丹妮, 毛花英, 熊蓉露, 黄丹, 陈晔. 2017. 2株溶磷、解钾与产IAA的内生真菌菌株的筛选、鉴定及促生作用研究. 中国土壤与肥料, (3): 142–151]
- Zhang B, Qiao JQ, Liang XJ, Liu YZ, Chen ZY. 2015. Evaluation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia solanacearum*. Journal of Plant Protection, 42(3): 353–361 (in Chinese) [张斌, 乔俊卿, 梁雪杰, 刘邮洲, 陈志谊. 2015. 番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗细菌的评价. 植物保护学报, 42(3): 353–361]
- Zhang CZ, Guo LZ. 2009. Identification of microbe with lipase activity by 16S rDNA sequence analysis and biolog microstation system. Journal of Hebei University of Technology, 38(5): 52–55 (in Chinese) [张朝正, 郭兰珍. 2009. 利用16S rDNA序列分析和biolog快速鉴定方法鉴定产脂肪酶菌株. 河北工业大学学报, 38(5): 52–55]
- Zhang LF. 2017. Isolation, identification and biocontrol effect of antagonistic actinomycetes against tobacco bacterial wilt disease. Master thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [张立帆. 2017. 烟草青枯病拮抗放线菌的分离鉴定及其生防效果的研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Zhang Y. 2008. Soil microorganism and activities of soil enzymes in tobacco cultivated soil under continuous cropping conditions. Master thesis. Chongqing: Southwest University (in Chinese) [张翼. 2008. 连作烟地土壤微生物及土壤酶研究. 硕士学位论文. 重庆: 西南大学]
- Zhao WW. 2016. Isolation, purification and activity identification of black soybean trypsin inhibitor. Master thesis. Taiyuan: Shanxi University (in Chinese) [赵伟伟. 2016. 黑豆胰蛋白酶抑制剂的分离纯化及活性鉴定. 硕士学位论文. 太原: 山西大学]
- Zhou B, Dai JX. 2017. Isolation and identification of siderophore-producing rhizobacteria from rhizosphere soil of *Caragana* spp. and its growth-promoting effects. Northern Horticulture, (21): 122–129 (in Chinese) [周波, 代金霞. 2017. 柠条根际产铁载体促生菌的分离鉴定及其促生特性. 北方园艺, (21): 122–129]
- Zhu HH, Yao Q, Yang SZ. 2005. The influence of different AM fungi inoculation on the vegetative growth and reproduction of tomato. China Vegetables, (2): 9–11 (in Chinese) [朱红惠, 姚青, 羊宋贞. 2005. 不同AM真菌菌种对番茄生长发育的影响. 中国蔬菜, (2): 9–11]

(责任编辑:李美娟)