



云南省烟植地青枯菌 RS-22 的分离及其拮抗菌的筛选和鉴定

李军营^{Δ1} 赵琦琪^{Δ2} 杨超^{*3}

1 云南省烟草农业科学研究院 云南 昆明 650021

2 内蒙古大学生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010021

3 中国科学院微生物研究所 北京 100101

摘要:【背景】由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的烟草青枯病是一种重要土传病害,在我国南方烟区普遍发生。生物防控是针对烟草青枯病的一种有效防治措施,但是相关的研究报道还较少。【目的】分离云南省烟植地的青枯病原菌,筛选其拮抗菌并对其抑菌效果进行鉴定。【方法】采用平板稀释法从云南感病烟草中分离获得青枯菌,采用平板对峙法筛选青枯菌拮抗菌,筛选得到的拮抗菌通过 16S rRNA 基因测序比对确定菌种类型,并在实验室和大田鉴定其对青枯病的防治效果。【结果】从感病烟草茎中分离出一株强致病性青枯菌小种 RS-22,该菌能侵染烟草和番茄并最终使植物死亡;筛选出 12 株 RS-22 拮抗菌,其中拮抗作用最强的是 Y4;Y4 被鉴定为一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*),其菌体和分泌物都能抑制 RS-22 生长;Y4 根部灌根处理能显著提高烟草和番茄对青枯菌 RS-22 的抗性,Y4 处理能使感病烟草部分恢复正常,在云南文山州烟草种植大田施加 Y4 菌剂和菌剂有机肥混合物也能显著降低烟草青枯病的感病率。【结论】青枯菌 RS-22 具有广谱的致病性,筛选的拮抗菌 Y4 能显著抑制青枯菌生长,而且对青枯菌侵染植物有很好的防治效果。研究结果为进一步研究烟草青枯病的生物防控提供了新的理论依据。

关键词: 烟草青枯病, 青枯菌, 拮抗菌, 生物防治

Isolation and identification of *Ralstonia solanacearum*-22 and its antagonistic bacteria in tobacco plantations of Yunnan provinceLI Junying^{Δ1} ZHAO Qiqi^{Δ2} YANG Chao^{*3}

1 Yunnan Academy of Tobacco Agriculture Science, Kunming, Yunnan 650021, China

2 School of Life Sciences, University of Inner Mongolia, Hohhot, Inner Mongolia 010021, China

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

Abstract: [Background] Tobacco bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* is a typical soil borne bacteriosis, which widely occurs in the tobacco farms in south of China. Biological control is an

Foundation items: Science and Technology Project of Yunnan Tobacco Company (2018530000241017, 2017YN06)

ΔThese authors equally contributed to this work

*Corresponding author: Tel: 86-10-64806158; E-mail: chaoyang@im.ac.cn

Received: 11-11-2020; Accepted: 13-11-2020; Published online: 26-01-2021

基金项目: 云南省烟草公司科技项目(2018530000241017, 2017YN06)

Δ对本文贡献相同

*通信作者: Tel: 010-64806158; E-mail: chaoyang@im.ac.cn

收稿日期: 2020-11-11; 接受日期: 2020-11-13; 网络首发日期: 2021-01-26

effective measure to alleviate the occurrence of the tobacco wilt disease; however, the antagonistic agents still lack. **[Objective]** To identify the *R. solanacearum* isolates in tobacco plantations of Yunnan province, and to screen its antagonistic bacteria for biocontrol of tobacco wilt disease. **[Methods]** *R. solanacearum* was isolated and identified from the infected tobacco tissues from the farms in Yunnan province by the plate dilution method. Antagonistic bacteria were isolated by the plate confrontation method and the antagonism against wilt disease was investigated under laboratory and field conditions. **[Results]** The *R. solanacearum* strain RS-22 was isolated from the infected tobacco plant stem. Koch's postulates was employed to further confirm the causal agent of the wilt disease. The antagonistic microorganism screening led to the discoveries of 12 biocontrol bacteria. Among them, the strain Y4, a *Bacillus amyloliquefaciens*, showed the strongest antagonistic effect to RS-22. Pretreatment of the tobacco or tomato plants by root irrigation significantly enhanced their resistance to the bacterial wilt disease. Moreover, syringe injection of Y4 could significantly promote the survival rate of the RS-22 infected *N. benthamiana* plants. Field application of Y4 remarkably alleviated the wilt disease in the tobacco farms in Wenshan county of Yunnan province. **[Conclusion]** RS-22 has a broad spectrum pathogenicity. Y4 significantly suppressed the growth of RS-22 and has excellent biocontrol effect on the RS-22 infection. This study provides a useful tool for the biological control of tobacco wilt disease.

Keywords: tobacco bacterial wilt, *Ralstonia solanacearum*, antagonistic bacteria, biological control

烟草青枯病(Tobacco Bacterial Wilt)是由青枯劳尔氏菌(简称青枯菌, *Ralstonia solanacearum*)引起的一类土传植物病害,在我国主要烟区均普遍发生,而且已经成为严重威胁烟草产量和质量的毁灭性病害^[1]。在自然界中,青枯菌宿主广泛,烟草、番茄、马铃薯等经济作物都能被其侵染,侵染方式主要是通过植物根部伤口或天然孔口侵入宿主体内;侵染过程中,宿主会表现出叶片萎蔫扩散至整株枯死的现象,同时伴随根部和茎部维管束逐渐变黑至腐烂变空的症状^[2-3]。

目前,针对烟草青枯病的防治措施主要包括化学药剂防治、抗性品种选育、生物防治等^[4]。化学药剂防治虽然效果显著,但会造成环境污染,对环境不够友好;抗性品种选育周期长,而且青枯菌的变异可能导致抗性减弱或消失,同时抗性品种也可能存在产量低的问题;生物防治能够利用微生物间的拮抗、竞争、寄生和捕食等关系抑制或杀死病原菌,而拮抗微生物生长过程中产生的次生代谢物质也能够直接或间接地抑制或杀死病原菌^[5]。由于生物防治效果比较显著,而且对环境十分友好,因此越来越多地受到人们的重视。

本研究在云南昆明烟草种植区青枯病发病烟

草中分离出一株具有广谱致病性的青枯菌 RS-22,同时筛选和分离出 12 株能够抑制青枯菌生长的拮抗菌株,通过 16S rRNA 基因序列鉴定,主要为芽孢杆菌、假单胞菌等。通过平板、实验室和大田实验,对其中一株拮抗菌 Y4 进行了鉴定和抑菌效果研究,以期今后烟草和番茄等由青枯菌引起的病害的生物防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

从云南省文山州青枯病试验田获得青枯病染病和健康烟草;取长势较为一致的 3 株烟草,采集与根系结合较紧密的 4 mm 内的根际土壤。其他试验植物为本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)、烟草栽培品种红花大金元和番茄,均为实验室内种植。

1.1.2 培养基、主要试剂和仪器

牛肉浸膏培养基参照参考文献[6]配制。牛肉浸膏,生工生物工程(上海)股份有限公司;胰蛋白胨, Thermo Fisher Scientific 公司;氯化钠,国药集团化学试剂有限公司;琼脂,北京兰博利德生物技术有限公司;Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, 诺唯赞生物科技有限公司。恒温培

养箱,上海一恒科学仪器公司;PCR 仪,Bio-Rad 公司。

1.2 青枯菌的分离与纯化

选取新鲜的发病植株,从茎部的病健结合处切取少量组织,先以灭菌水清洗 2-3 次,然后 75% 酒精浸泡 10 s,随后以灭菌水冲洗 3 次,在超净工作台晾干磨碎后加入 10 mL 灭菌水。28 °C、200 r/min 培养 30 min。随后将裂解液稀释到浓度为 10^{-2} – 10^{-4} ,吸取 100 μ L 均匀涂布于牛肉浸膏培养基,在 28 °C 培养箱中培养 2-3 d,挑取细菌菌落,通过平板划线的方法进行纯化,得到纯化后的菌株,总共得到 26 株。采用 CTAB 法^[7]提取细菌基因组 DNA,以细菌 16S rRNA 基因序列引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3')进行 PCR 扩增,PCR 反应体系和反应条件参考 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 说明书。PCR 产物的测序结果在 NCBI 数据库中进行比对,确定该菌株为青枯菌,并将其命名为 RS-22。

1.3 柯赫氏法则鉴定

将分离纯化得到的青枯菌 RS-22 以茎部划伤接种以及根部灌溉^[8]的方式接种到本氏烟、红花大金元和番茄上,观察植物的发病状况。

1.4 拮抗菌的筛选和鉴定

利用平板对峙的方法^[9]筛选拮抗菌:挑取青枯菌单克隆于牛肉浸膏液体培养基中,28 °C、200 r/min 培养过夜,调整 OD_{600} 为 2.0,将青枯菌按照 1:500 的体积分数加入到牛肉浸膏培养固体中,制成含菌平板,待用。

将青枯菌发病程度较轻的地块烟草根际土壤作为筛选对象。将土壤溶解于 10 mL 无菌水,以 0.25 mm 孔径滤网过滤,仅留下溶液,依次稀释到 10^{-1} – 10^{-6} 的浓度,吸取 100 μ L 均匀涂布至含有青枯菌的平板,28 °C 恒温培养 2-3 d。筛选抑制青枯菌生长的菌落,通过平板划线的方式分离纯化出单克隆后,提取菌体基因组 DNA,同 1.2 节通过 PCR 扩增 16S rRNA 基因并进行测序,将数据在

NCBI 中进行比对,确定拮抗菌的种属。

1.5 拮抗菌 Y4 在培养基上对青枯菌的抑制作用

将筛选鉴定的 Y4 菌株培养液 5 μ L (OD_{600} 为 1.0)点到青枯菌平板上,观察青枯菌与拮抗菌的生长状态。

1.6 拮抗菌 Y4 在本氏烟、红花大金元和番茄上对青枯菌的预防作用

将拮抗菌 Y4 挑取单克隆,接种到 20 mL 牛肉浸膏液体培养基中,28 °C、200 r/min 培养 2 d 后 6 000 r/min 离心 5 min 收集菌体,以无菌水重悬,调整菌体浓度到 OD_{600} 为 2.0,直接灌入生长 4 周的本氏烟、烟草红花大金元和番茄幼苗的土壤中,在第 7 天以及第 14 天时,在植物根部灌入 OD_{600} 为 1.0 的青枯菌,观察植物生长和发病状态。

1.7 拮抗菌 Y4 对本氏烟的治愈效果

将青枯菌在牛肉浸膏液体培养基中 28 °C、200 r/min 培养过夜,调节菌体 OD_{600} 为 2.0,通过伤口接种到烟草的茎秆上,等到烟草出现叶片萎蔫时,将 Y4 接种到萎蔫的烟草上,观察烟草的生长变化。

1.8 拮抗菌 Y4 在云南文山烟草种植基地对烟草青枯病的预防作用

将拮抗菌 Y4 制成菌剂和添加至有机肥 2 种形式(1.04×10^{10} CFU/mL, 75 L/hm²),于 2019 年 4 月 25 日在烟草移栽时施加于云南文山州青枯病常年发病程度较高的田块,分别在烟草团棵期、旺长期和打顶期观测烟草青枯病的发病情况。

1.9 数据分析

数据采用 SPSS 18.0 软件进行单因素 ANOVA 分析。

2 结果与分析

2.1 青枯菌 RS-22 的分离和鉴别

利用牛肉浸膏培养基,从田间获得的青枯病发病烟草茎秆中分离出 26 种纯化的菌体,其中 3 株和已报道的青枯菌具有相似的菌落形态。对这 3 株

菌的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增和基因测序, 经过序列比对, 发现该 3 株菌是同一株菌, 均为青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)。该菌与 GMI1000 亲缘关系最近^[10], 将这个菌株编号为 RS-22, 相关的菌株和常见菌进化树见图 1A。

2.2 柯赫氏法则鉴定 RS-22 的致病性

利用分离出来的青枯菌 RS-22 通过柯赫氏法则鉴定其致病性。RS-22 通过茎部伤口接种生长 4 周的本氏烟, 大约经过 5–7 d 植株开始出现萎蔫, 大约 10 d 植株完全死亡; 而根部灌溉接种 RS-22 的本氏烟, 7–8 d 烟草开始出现萎蔫, 大约 12 d 植株完全死亡(图 1B)。这表明 RS-22 通过烟草的伤口以及根毛部位侵入到烟草中, 从而导致植株发病

直至死亡。同时, 根部灌溉接种 RS-22 的烟草栽培种红花大金元和番茄也能发病并最终死亡(图 1B), 表明青枯菌 RS-22 具有广谱致病性。

2.3 RS-22 拮抗菌的筛选与鉴定

通过平板筛选、分离纯化和平板对峙的方法, 从云南烟草感病田块和健康烟草植株的根部土壤中筛选出共 12 株对 RS-22 有显著抑菌效果的拮抗菌株。通过 16S rRNA 基因序列检测, 筛选到的拮抗菌如表 1 所示, 主要有芽孢菌和假单胞菌等拮抗菌。这些拮抗菌对青枯菌有不同的抑制效果, 其中抑制能力较强的是 Y4 和 Y8, 其次是 Y1 和 Y2, 而其余菌株对青枯菌生长的抑制效果较弱, 但抑菌圈直径都大于 1 cm。

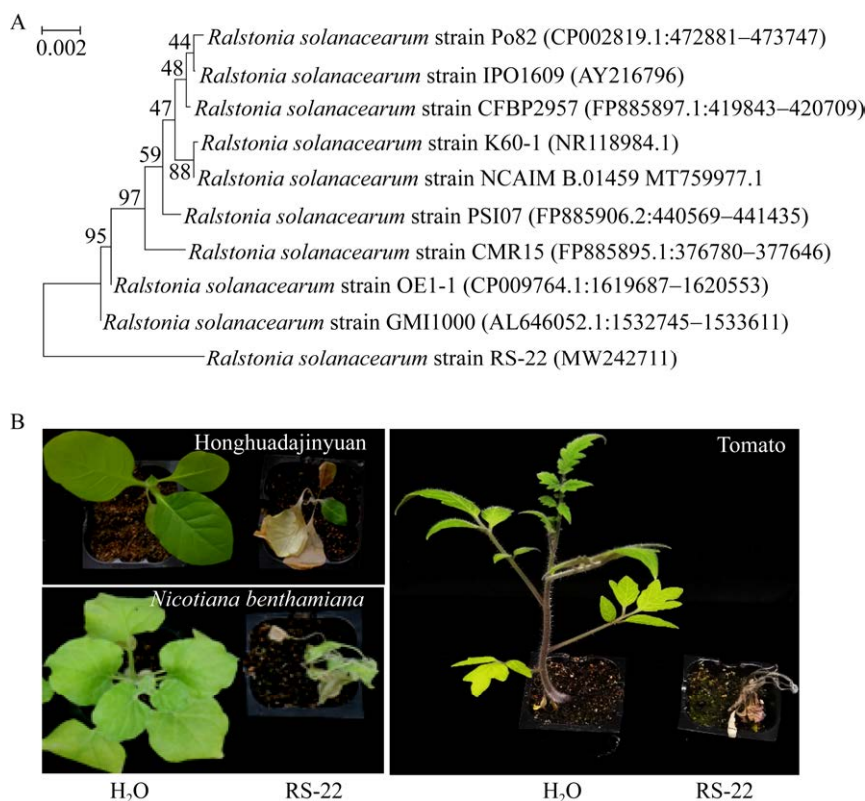


图 1 青枯菌 RS-22 对红花大金元、本氏烟和番茄的致病性分析

Figure 1 Symptoms of bacterial wilt disease caused by RS-22 in tobacco, *N. benthamiana* and tomato plants

Note: A: Phylogenetic tree of RS-22 and its relative strains based on 16S rRNA gene by neighbor-joining method. The number upon the branch was branch length, and the GenBank numbers were showed in parentheses. Scale bar: Each nucleotide sites replacement value. B: Symptoms of bacterial wilt infected by RS-22

表 1 从烟草根际土壤筛选出的拮抗菌种类
Table 1 Antagonistic strains isolated from the rhizosphere soil of the healthy tobacco plants

拮抗菌株 Antagonistic bacteria	菌株种类 Species name	相似度 Identity (%)
Y1	<i>Pseudomonas protegens</i> CHA0	99.64
Y2	<i>Pseudomonas</i> sp. strain 2-31	98.49
Y4	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> strain MPA1034	98.70
Y8	<i>Pseudomonas paralactis</i> strain DSM29164	99.23
Z1	<i>Pseudomonas brenneri</i> strain CFML97-391	98.63
Z2	<i>Pseudomonas brenneri</i> strain CFML97-391	97.94
T3	<i>Bacillus subtilis</i> strain IAM 12118	99.33
T4	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	97.42
T5	<i>Bacillus mobilis</i> strain MCCC1A05942	94.74
T6	<i>Bacillus mobilis</i> strain MCCC1A05942	99.52
T7	<i>Bacillus mobilis</i> strain MCCC1A05942	99.38
T8	<i>Serratia nematodiphila</i> strain DZ0503SBS1	99.36

2.4 拮抗菌 Y4 抑制 RS-22 的生长

拮抗菌 Y4 是一株解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens* strain MPA1034, 图 2A), 对青枯菌的抑菌效果最强, 抑菌圈直径接近 3 cm (图 2B), 因此选定拮抗菌株 Y4 进行后续试验。同时, 通过分析拮抗菌 Y4 的分泌物质对青枯菌的抑制效果, 发现其培养液上清可以显著抑制青枯菌在平板上的生长(图 2C)。此外, 拮抗菌 Y4 上清液也会显著抑制 RS-22 在培养基中的生长, 而且抑制效率随着上清液浓度的提高而逐渐加强(图 2D), 表明拮抗菌 Y4 菌体及其分泌物质都能显著拮抗青枯菌 RS-22。

2.5 拮抗菌 Y4 对烟草和番茄青枯病的预防作用

提前一周用 Y4 菌液灌入生长 4 周左右本氏烟和烟草栽培种红花大金元的根部, 再通过根部灌溉接种 RS-22。结果发现用 Y4 菌液预处理的植株几乎不感病, 成活率达到约 95%, 而对照植株则全部发病致死(图 3A 和 3B)。利用相同的方法发现 Y4 预处理也能显著提高番茄对 RS-22 的抗病性, 其成活率约 90% (图 3C 和 3D)。这些结果表明拮抗菌 Y4 可能防止青枯菌从植物的根部侵入, 达到预防的效果。

2.6 拮抗菌 Y4 对发病烟草的治愈作用

将本氏烟草划伤接种青枯菌 5 d 后, 烟草叶片开始出现萎蔫症状, 随后在烟草茎部注射 OD_{600} 为 2.0 的 Y4 菌液。随着烟草的生长, 约 60% 注射 Y4 菌液的烟草萎蔫症状消失, 生长逐渐恢复至健康植株的表型。相反, 注射无菌水的烟草则全部萎蔫死亡(图 3E 和 3F)。这些结果表明拮抗菌 Y4 对感染青枯病的植物有一定的治愈效果。

2.7 拮抗菌 Y4 的烟草田间预防试验

为了进一步验证拮抗菌 Y4 对青枯病的防治作用, 分别将其制成菌剂(Microbial Inoculum, MI)和添加至有机肥(Organic Fertilizers, OF)这 2 种形式, 于 2019 年 4 月施加于云南文山州青枯病常年发病程度较高的试验田块, 观测其对烟草青枯病的抑制效果。与对照相比, 施加 Y4 菌剂和添加 Y4 的有机肥可以显著降低烟草青枯病的感染率(图 4A 和 4B)。在团棵期、旺长期和打顶期, 施加 Y4 菌剂的烟草发病率分别是 3%、3.7%和 8.4%, 施加 Y4 有机肥的发病率约为 6%、7%和 17.4%, 而对照田块烟草的发病率分别为 11%、19%和 42%, Y4 菌剂的防治效果要好于 Y4 有机肥(图 4A 和 4B)。这些结果证明了拮抗菌 Y4 在田间对烟草青枯病有比较好的防治效果。

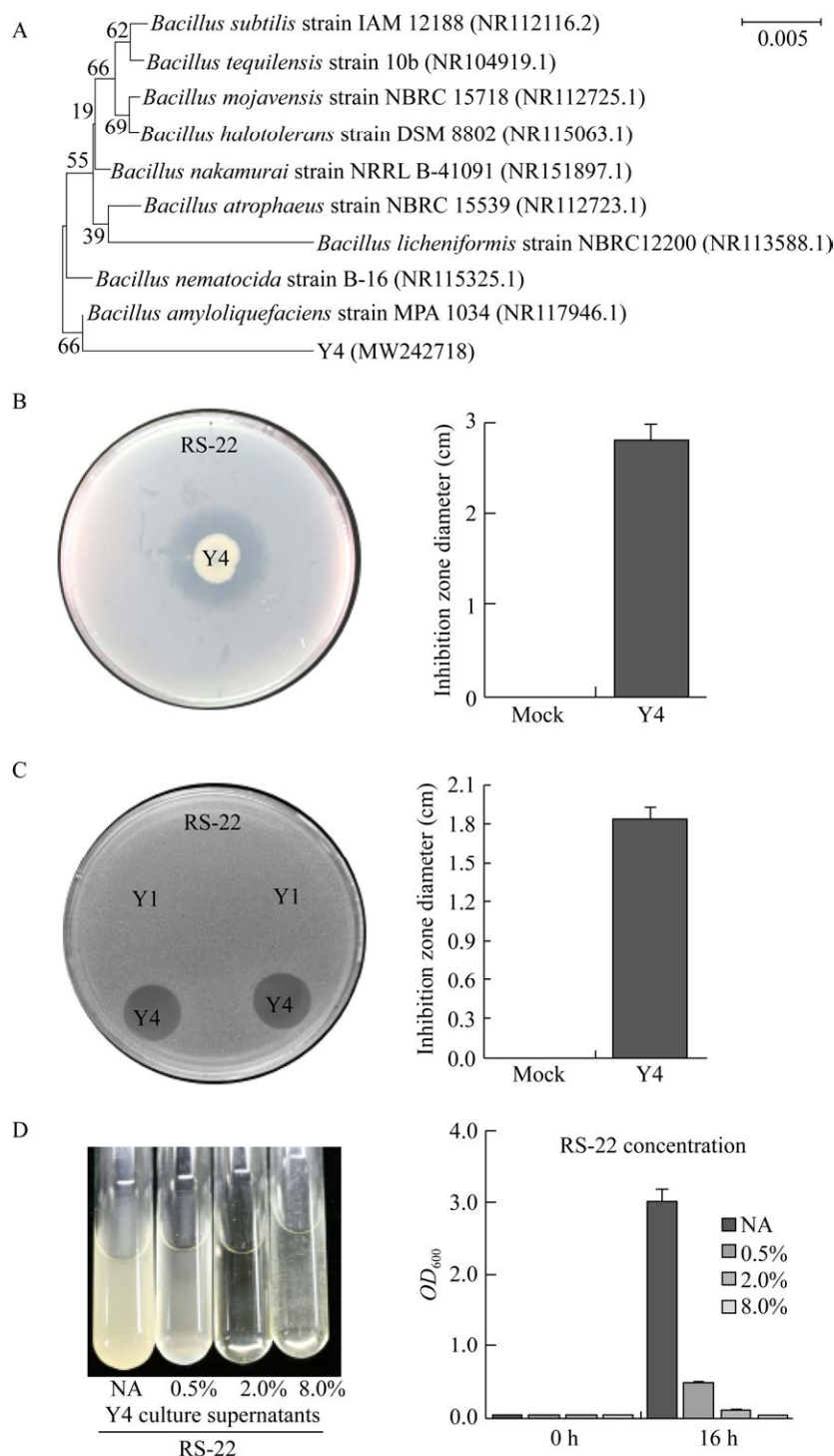


图 2 Y4 对青枯菌 RS-22 的抑制作用

Figure 2 Y4 suppresses the growth of RS-22

Note: A: Phylogenetic tree of Y4 and its relative strains based on 16S rRNA gene by neighbor-joining method; The number upon the branch was branch length, and the GenBank numbers were showed in parentheses; Scale bar: Each nucleotide sites replacement value. B: Antagonism of Y4 against RS-22. C: The secretions of Y4 suppress the growth of RS-22; The secretions of Y1 served as a negative control. D: The secretions of Y4 suppress the growth of RS-22 in culture

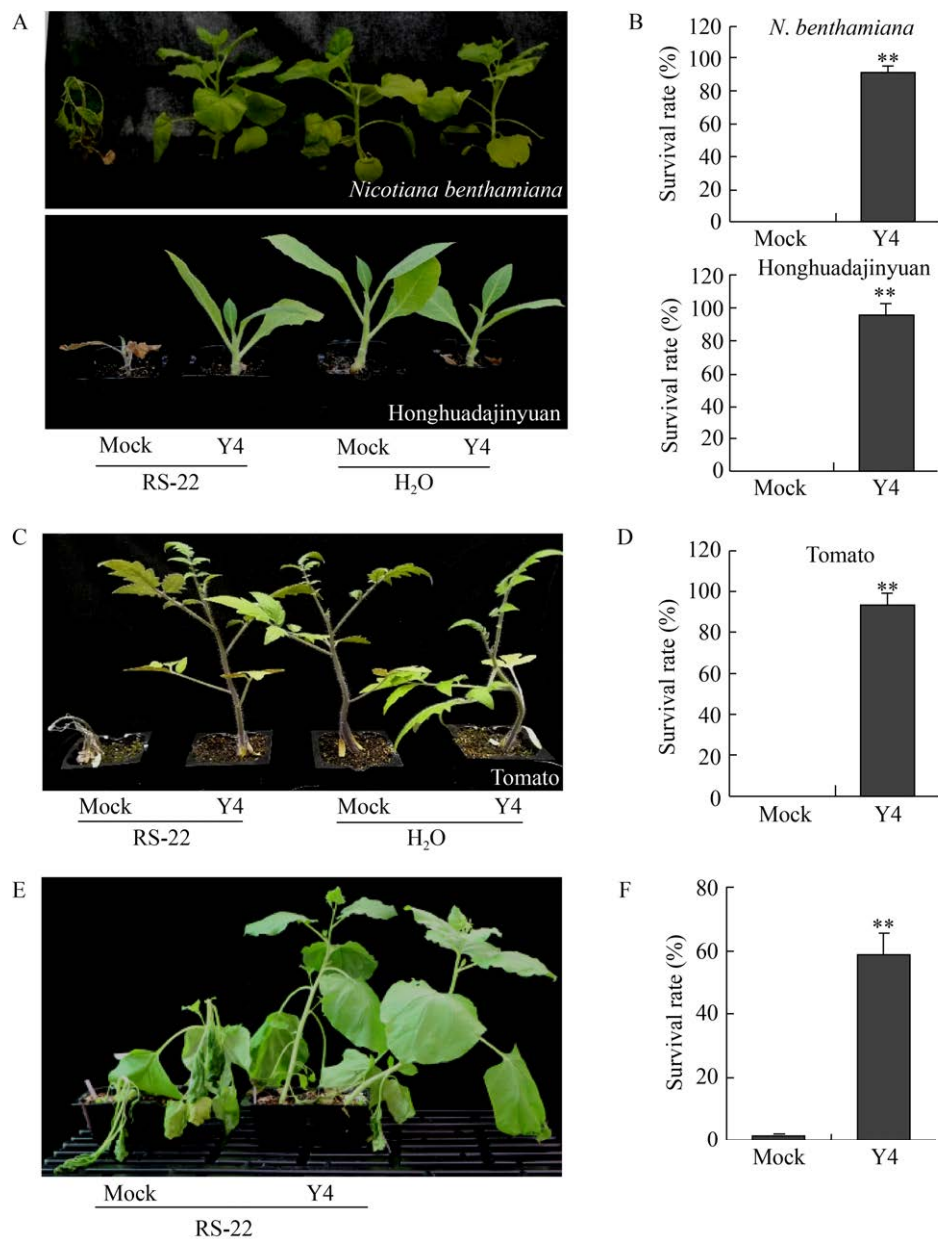


图 3 Y4 对 RS-22 对植物侵染的预防和治愈作用

Figure 3 Y4 suppressed RS-22 infection in plants

Note: A: Pretreatment of Y4 suppressed RS-22 infection in *N. benthamiana* and tobacco; B: The survival rate of Y4 pretreated *N. benthamiana* and tobacco infected by RS-22; C: Pretreatment of Y4 suppressed RS-22 infection in tomato; D: The survival rate of Y4 pretreated tomato infected by RS-22; E: Y4 treatment enhanced the survival rate of *N. benthamiana* caused by the RS-22; F: The survival rate of Y4 treated *N. benthamiana*. **: Significant differences from the mock at $P < 0.01$ (student's *t*-test)

3 讨论与结论

烟草青枯病是影响世界烟草生产的重要病害之一, 各国学者一直在从事相关方面的研究, 虽然取得了一定的进展, 但仍有很多问题需要解决。青

枯菌是目前国际上研究植物病原细菌致病机制的模式系统之一^[11]。我们从云南青枯病感病烟草上分离出一种新的青枯菌 RS-22, 该菌相对来说与已经鉴定的青枯菌(*Ralstonia solanacearum*) GMI1000

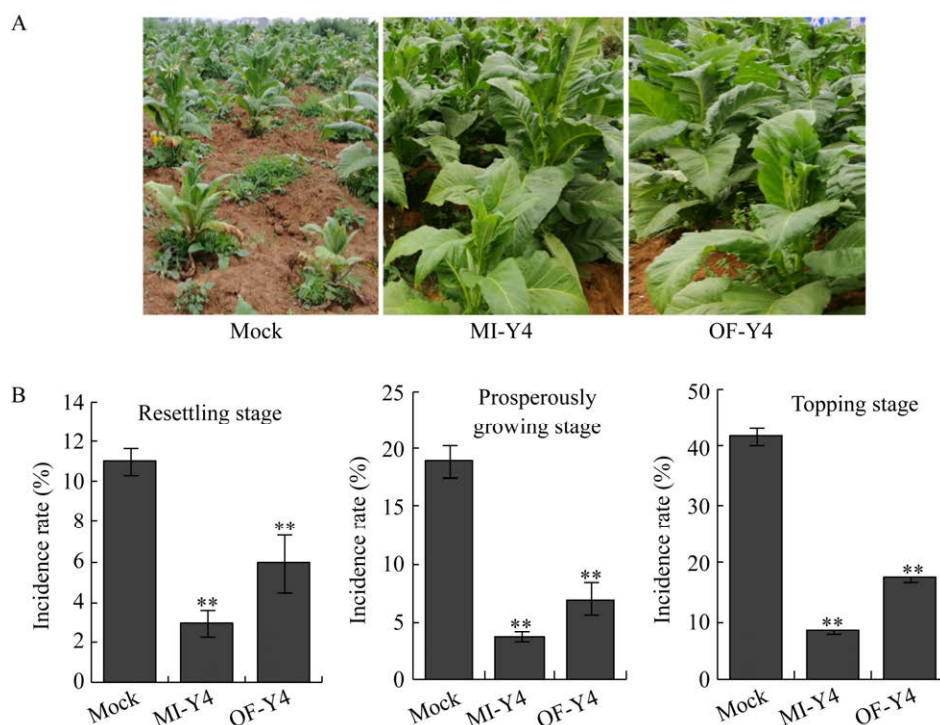


图4 拮抗菌 Y4 处理降低了云南文山州大田烟草青枯病的感病率

Figure 4 Y4 reduced the incidence rate of the bacterial wilt in fields of Wenshan of Yunnan

Note: A: Phenotype of tobacco treated with Y4 in fields at the prosperously growing stage; B: The incidence rate of bacterial wilt at different stages of tobacco under different treatments. MI: Microbial inoculum; OF: Organic fertilizers added with Y4. **: Significant differences from the mock at $P < 0.01$ (student's t -test)

亲缘关系接近^[10]，与别的青枯菌亲缘关系则远一些。同时，初步的实验结果也显示 RS-22 与 GMI1000 相比在发病程度上有一定的不同，表现在烟草上侵染性更强，发病程度更加严重，这也表明 RS-22 作为云南烟草青枯病的主要病原具有一定的特异性。

目前烟草青枯病的防治仍然是烟草生产上有待解决的一大难题，人们仍难以用一种方法从根本上解决烟草青枯病的问题，只能多种方法相结合，尽量减轻青枯病的危害。由于抗药性和农药残留等问题，生物防控以对环境污染较小且具有可持续发展性而越来越被重视，但是相关的研究进展较为缓慢^[12]。早先研究发现拮抗菌株 K1 和 K2 显著抑制烟草青枯病，而 K2 的抑制效果好于 K1，进一步研究发现适当浓度的 K1 和 K2 能破坏青枯菌的形态^[13]，但是它们在大田对青枯病的抑

制效果还有待进一步研究。重庆黔江烟区健康土壤筛选出一株对烟草青枯菌有较明显抑制作用的铜绿假单胞菌^[14]。曾维爱等的研究表明苗期使用菌根真菌结合生防制剂能够有效地防治烟草青枯病，并能改善烟叶品质^[15]。刘艳霞等在贵州烟区经鉴定分离到青枯菌及其拮抗菌枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)，并发现了烟草菌与拮抗菌对根系分泌物的竞争作用^[16]。

我们从云南烟草田块土壤分离出了 12 株 RS-22 的拮抗菌，其中 Y4 解淀粉芽孢杆菌对青枯菌的抑菌效应最强，并且在实验室和田间以不同形式的处理都使烟草等植物对青枯菌的侵染有比较好的预防效果，同时也对已经感染青枯菌的烟草具有一定的治愈效果，显示出了其作为生物菌剂来防治烟草青枯病的潜力和可能性。值得注意的是，这些拮抗菌来源于云南采样地青枯病发病

的田块, 拮抗菌的应用方面必须适应当地的气候和土壤条件, 适宜在当地作为生物有机肥进行使用和推广。接下来, 我们将分析其他拮抗菌对青枯菌侵染植物的影响及其在田间对青枯病预防能力的鉴定, 包括单个拮抗菌和与拮抗菌 Y4 混合共同使用等方式鉴定其效果, 评估这些拮抗菌对烟草田间土壤生态的影响, 使其更加适合烟草和番茄等植物的生长, 降低下一季的投入成本, 以期达到综合治理的效果, 为环境的可持续发展提供保障。

REFERENCES

- [1] Jiang GF, Wei Z, Xu J, Chen HL, Zhang Y, She XM, Macho AP, Ding W, Liao BS. Bacterial wilt in China: history, current status, and future perspectives[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1549
- [2] Da Silva Xavier A, De Almeida JCF, De Melo AG, Rousseau GM, Tremblay DM, De Rezende RR, Moineau S, Alfenas-Zerbini P. Characterization of CRISPR-Cas systems in the *Ralstonia solanacearum* species complex[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(2): 223-239
- [3] Hikichi Y, Mori YK, Ishikawa S, Hayashi K, Ohnishi K, Kiba A, Kai KJ. Regulation involved in colonization of intercellular spaces of host plants in *Ralstonia solanacearum*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 967
- [4] Wang J, Long SF, Wang ZW, Chen JW, Jiang FY, Li X. Research progress in controlling tomato bacterial wilt[J]. *China Vegetables*, 2020(1): 22-30 (in Chinese)
王杰, 龙世芳, 王正文, 谌金吾, 姜发洋, 李星. 番茄青枯病防治研究进展[J]. *中国蔬菜*, 2020(1): 22-30
- [5] Liu XC. A study on effects of changes and control of temperature and humidity on the occurring of tobacco bacterial wilt and the control techniques[D]. Chongqing: Master's Thesis of Southwest University, 2014 (in Chinese)
刘宪臣. 温湿度对烟草青枯病发生的影响及调控技术研究[D]. 重庆: 西南大学硕士学位论文, 2014
- [6] Fang ZD. Research Methods of Plant Disease[M]. 3rd ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998 (in Chinese)
方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998
- [7] Li R, Mock R, Huang Q, Abad J, Hartung J, Kinard G. A reliable and inexpensive method of nucleic acid extraction for the PCR-based detection of diverse plant pathogens[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 154(1/2): 48-55
- [8] Li YY, Liu HL, Wang L, Zhu B, Huang JB, Xu RB, Li XH. Pathogenicity of *Ralstonia solanacearum* infecting tobacco in Enshi of Hubei province[J]. *Chinese Tobacco Science*, 2015, 36(5): 59-63 (in Chinese)
黎妍妍, 刘海龙, 王林, 朱宝, 黄俊斌, 许汝冰, 李锡宏. 湖北恩施烟区烟草青枯菌致病力分析[J]. *中国烟草科学*, 2015, 36(5): 59-63
- [9] Ding AY, Zheng JF, Shi CK, Yin FW. Screening of antagonists against several important tobacco diseases[J]. *Chinese Tobacco Science*, 1999(1): 10-11 (in Chinese)
丁爱云, 郑继法, 时呈奎, 殷复伟. 烟草几种重要病害拮抗菌的筛选[J]. *中国烟草科学*, 1999(1): 10-11
- [10] Peeters N, Guidot A, Vailleau F, Valls M. *Ralstonia solanacearum*, a widespread bacterial plant pathogen in the post-genomic era[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(7): 651-662
- [11] Schell MA. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2000, 38: 263-292
- [12] Zhou XJ, Wang J, Yang YW, Zhao TC, Gao BD. Advances in tobacco bacterial wilt disease[J]. *Microbiology China*, 2012, 39(10): 1479-1486 (in Chinese)
周训军, 王静, 杨玉文, 赵廷昌, 高必达. 烟草青枯病研究进展[J]. *微生物学通报*, 2012, 39(10): 1479-1486
- [13] Wang AN, Zhao ZF, Liu ZZ, Liu YX. Effect of K1, K2 anti-bacterial agents on tobacco *Ralstonia solanacearum*[J]. *Engineering*, 2010, 2(11): 930-934
- [14] Dong XW, Miao L, Jin CL, Dong KM, Zhou XJ. Isolation and identification of a soil bacterial strain efficiently inhibiting *Ralstonia solanacearum* in tobacco field[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2011, 23(6): 30-33 (in Chinese)
董夏伟, 缪莉, 靳翠丽, 董昆明, 周晓见. 一株高效抑制烟草青枯病菌的烟田土壤细菌的分离与鉴定[J]. *江西农业学报*, 2011, 23(6): 30-33
- [15] Zeng WA, Long SP, Li HG, Peng FY, Huang YN. Effects of inoculating different arbuscular mycorrhizal fungus at seedling stage on wilt disease resistance in tobacco[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2011, 42(6): 612-615 (in Chinese)
曾维爱, 龙世平, 李宏光, 彭福元, 黄艳宁. 苗期接种不同丛枝菌根真菌对烟草青枯病防治效果的影响[J]. *南方农业学报*, 2011, 42(6): 612-615
- [16] Liu YX, Shen H, Li X, Zhang H, Zou Y, Zhu JW, Xiang Y. Competitive use of plant root exudates by *Ralstonia solanacearum* causing tobacco bacterial wilt and its antagonistic bacterium LX4[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2020, 60(2): 333-348 (in Chinese)
刘艳霞, 沈宏, 李想, 张恒, 邹焱, 朱经伟, 向阳. 烟草青枯病劳氏菌与拮抗菌对根系分泌物的竞争作用[J]. *微生物学报*, 2020, 60(2): 333-348