



# 抗青枯病型根际促生菌(PGPR)菌群构建及其生物防控机制

刘艳霞<sup>1</sup>, 陶正朋<sup>2</sup>, 李想<sup>3\*</sup>, 张恒<sup>1</sup>, 朱经伟<sup>1</sup>, 王丰<sup>1</sup>, 焦剑<sup>3</sup>, 王克敏<sup>3</sup>,  
徐健<sup>3</sup>, 汪维维<sup>4</sup>, 李寒<sup>1</sup>

- 1 贵州省烟草科学研究所, 贵州 贵阳 550000
- 2 贵州大学烟草学院, 贵州 贵阳, 550000
- 3 中国烟草总公司贵州省公司, 贵州 贵阳 550000
- 4 贵州省烟草公司遵义市公司, 贵州 遵义 563000

刘艳霞, 陶正朋, 李想, 张恒, 朱经伟, 王丰, 焦剑, 王克敏, 徐健, 汪维维, 李寒. 抗青枯病型根际促生菌(PGPR)菌群构建及其生物防控机制[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1099-1114.

LIU Yanxia, TAO Zhengpeng, LI Xiang, ZHANG Heng, ZHU Jingwei, WANG Feng, JIAO Jian, WANG Kemin, XU Jian, WANG Weiwei, LI Han. Construction of bacterial wilt-resistant and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and the mechanism of biocontrol[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1099-1114.

**摘要:** 【目的】根际促生菌(plant growth promoting rhizobacteria, PGPR)防控青枯病效果不稳定是目前有益微生物生防应用的瓶颈问题, 构建稳定高效拮抗青枯菌的 PGPR 菌群是生物防控的关键。【方法】以前期筛选到的 8 株 PGPR 菌株(112、114、Ba-S、TLZZ、LX4、LX7、Ps-S 和 VC110)和青枯菌(*Ralstonia solanacearum*, Rs)为研究对象, 在前期获得烟草根系分泌物组成的基础上, 采用限菌微系统和生态微孔板结合绿色荧光蛋白标记、定量聚合酶链式反应(quantitative polymerase chain reaction, qPCR)、断棒模型设计等方法, 探究 PGPR 菌群对青枯菌入侵烟草根际的抵御机制, 并在田间进行抗病、促生效果验证。【结果】LX4、Ba-S、LX7 可以充分利用烟草根系分泌物中的氨基酸、糖类碳源抑制青枯菌生长, LX7 和 112 在所有酸类碳源下均对青枯菌有抑制作用, 最高抑菌率分别为 40.12% (LX7+乳酸)和 35.15% (112+柠檬酸)。Ps-S、112 和 VC110 的基础生态位宽度(basal niche breadth, Bsw)分别比 Rs (Bsw=2.56)高 41.9%、41.0%和 38.1%, Ba-S 的基础生态位重叠指数(niche overlap index, NOI)显著比其他 PGPR 菌株高 4.88%–61.76%, 与青枯菌存在明显

资助项目: 国家自然科学基金(31860597); 中国烟草总公司贵州省公司科技项目(201905, 2021XM18, 2022XM03); 贵州省科技厅院士工作站(黔科合平台人才[2020]4004)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31860597), the Science and Technology Project of China Tobacco Guizhou Company Bureau (201905, 2021XM18, 2022XM03), and the Science and Technology Department-Academician Workstation of Guizhou Province ([2020]4004).

\*Corresponding author. E-mail: newcool1361214@163.com

Received: 2022-07-15; Accepted: 2022-10-25; Published online: 2022-11-03

的营养利用性竞争。4株PGPR组成的菌群组合中病情指数平均为27.01%，根际青枯菌数量平均为 $1.1 \times 10^4$  CFU/g，显著低于单株和2株PGPR菌群组合，8株PGPR组成菌群处理烟株未发病，根际青枯菌数量平均为 $3.5 \times 10^2$  CFU/g。由LX4、Ba-S、LX7和VC110构成的菌群组合(菌群组合32)对不同碳源的利用效率显著高于青枯菌，尤其体现在醇类和糖类碳源利用方面，分别是青枯菌的1.62倍和1.41倍。菌群组合32田间防效显著高于其他处理，分别比菌群39 (Ba-S、VC110、114和TLZZ)、40 (LX4、LX7、VC110和112)和43 (Ba-S、VC110、114和112)高27.18%、60.05%和54.80%，菌群32处理的产量和产值相对较好，分别较不施PGPR的对照增加67.50%和73.53%。

【结论】可以利用不同PGPR菌株对青枯菌营养竞争或者拮抗竞争的特点构建PGPR菌群，多样性的PGPR菌群可以显著提高抵抗病原菌入侵的能力。

关键词：根际促生菌；青枯菌；生态位重叠指数；菌群构建；生物防控

## Construction of bacterial wilt-resistant and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and the mechanism of biocontrol

LIU Yanxia<sup>1</sup>, TAO Zhengpeng<sup>2</sup>, LI Xiang<sup>3\*</sup>, ZHANG Heng<sup>1</sup>, ZHU Jingwei<sup>1</sup>, WANG Feng<sup>1</sup>, JIAO Jian<sup>3</sup>, WANG Kemin<sup>3</sup>, XU Jian<sup>3</sup>, WANG Weiwei<sup>4</sup>, LI Han<sup>1</sup>

1 Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550000, Guizhou, China

2 College of Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang 550000, Guizhou, China

3 China Tobacco Guizhou Company, Guiyang 550000, Guizhou, China

4 Zunyi City Company of Guizhou Tobacco Corporation, Zunyi 563000, Guizhou, China

**Abstract:** [Objective] The effect of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on bacterial wilt is unstable, which poses a challenge to the application of beneficial microorganisms. Thus, developing a stable and efficient PGPR flora against bacterial wilt is the key to the biocontrol. [Methods] The 8 anti-*Ralstonia solanacearum* (Rs) strains of PGPR (112, 114, Ba-S, TLZZ, LX4, LX7, Ps-S, and VC110) that had been screened out by our research group and Rs were studied. Based on the composition of tobacco root exudates, the microbial restriction microsystem, microplate, green fluorescent protein labeling, quantitative PCR, rod model design, and other methods were employed to explore the mechanism of PGPR against Rs in tobacco rhizosphere. In addition, experiment on the disease-resistant and growth-promoting effects was carried out in the field. [Results] LX4, Ba-S, and LX7 can make full use of amino acids and carbohydrates in tobacco root exudates as carbon sources to inhibit the growth of Rs. LX7 and 112 suppressed Rs with all acid carbon sources, and the highest antibacterial rates were 40.12% (LX7+lactic acid) and 35.15% (112+citric acid), respectively. The basal niche breadth (Bsw) of Ps-S, 112, and VC110 was 41.9%, 41.0%, and 38.1% higher than that of Rs (Bsw=2.56), respectively. The basal niche overlap index (NOI) of Ba-S was 4.88%–61.76% significantly higher than that of any other PGPR strains, and this strain obviously competed with Rs for nutrients. The average disease index was 27.01% and the average count of Rs in

tobacco rhizosphere was  $1.1 \times 10^4$  CFU/g in the treatments with the combinations of four PGPR strains, which were significantly lower than those in the treatments with one PGPR strain and two strains. The tobacco plants treated with 8 strains of PGPR were free from the wilt, with the average Rs count of  $3.5 \times 10^2$  CFU/g. The utilization efficiency of different carbon sources by combination 32 (consisting of LX4, Ba-S, LX7 and VC110) was significantly higher than that by Rs and particularly the utilization efficiency of alcohols and carbohydrate by the combination was 1.62 and 1.41 folds that by Rs. The field effect of combination 32 against Rs was significantly stronger than that of other treatments. Especially, the Rs-controlling rate was 27.18%, 60.05%, and 54.80% higher than that of combinations 39 (Ba-S, VC110, 114, and TLZZ), 40 (LX4, LX7, VC110, and 112), and 43 (Ba-S, VC110, 114, and 112), respectively. The yield and output value in the treatment with combination 32 were the highest among all treatments, which were 67.50% and 73.53% higher than those of the control treatment, separately. **[Conclusion]** Via the nutrient competition or antagonistic characteristics, different PGPR strains can be fully utilized to develop PGPR flora against *R. solanacearum*. The diverse PGPR floras have significantly stronger ability to resist the invasion of pathogenic bacteria.

**Keywords:** plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR); *Ralstonia solanacearum*; niche overlap index; microflora construction; biocontrol

近年来,由于植烟土壤连作、不科学施用化肥,导致土壤板结酸化、土壤养分富集化、土壤微生物群落失衡,进而造成土传病害的爆发。烟草青枯病是由青枯劳尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的一种以土壤传播为主的毁灭性细菌性烟草病害,在我国 14 个省(区)暴发流行,主要为长江流域及其以南烟区,已经威胁我国烟草产业的可持续发展<sup>[1]</sup>。

为寻求绿色环保的阻控土传病害的手段,研究者开始关注能够促进植物生长并抑制有害生物 的 根 际 促 生 菌 (plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)<sup>[2-5]</sup>。增加土壤中有益微生物类群,有利于恢复土壤生态平衡,实现农业可持续发展,是目前研究的热点<sup>[6]</sup>。PGPR 通过直接(利用性竞争)和间接竞争(拮抗性竞争)等方式抵御病原菌对根系的入侵<sup>[7]</sup>。前者主要是指 PGPR 与病原菌争夺根际资源,资源利用效率决定着竞争结果。后者即 PGPR 利用根际养分资源(如分泌物)产生一些对青枯菌有抑制作用或有毒的物

质,使病原菌生长(资源利用效率)受到抑制或者被杀死<sup>[8]</sup>。以往的研究常将直接竞争和间接竞争分开考虑,而在复杂的根际生态系统中,这 2 种竞争方式是相辅相成的<sup>[9]</sup>。

目前已有大量 PGPR 防控烟草病原菌的报道,分别报道了枯草芽孢杆菌、类芽孢杆菌、多粘芽孢杆菌等微生物通过植物免疫激发<sup>[10]</sup>、产生抗生物质<sup>[11]</sup>等机制,减少烟草病害发生。然而大多数 PGPR 在温室生防效果较好,施入土壤后无法稳定抵御病原菌对根系的入侵,主要是因为以往的研究重点在单株菌株防御能力上,忽略了 PGPR 菌群之间及其与青枯菌的交互作用。本研究利用前期获得的多株 PGPR 菌株以及根系分泌物成分,研究 PGPR 菌株利用烟草根系分泌物中不同碳源的特征及拮抗青枯菌效果,探明 PGPR 菌株碳源基础生态位及重叠指数,采用断棒模型等方法利用生物多样性-生态系统功能理论构建高多样性 PGPR 菌群并验证其应用效果,以期烟草青枯病防控提供理论依据和应用基础。

# 1 材料与方

## 1.1 PGPR 菌株

项目组前期筛选出 LX4 (枯草芽孢杆菌, *Bacillus subtilis*, CGMCC No. 8265)、Ba-S (解淀粉芽孢杆菌, *Bacillus amyloliquefaciens*, CGMCC No. 8262)、LX7 (解淀粉芽孢杆菌, *Bacillus amyloliquefaciens*, CGMCC No. 8267)、VC110 (甲基营养型芽孢杆菌, *Bacillus methylotrophicus*, CGMCC No. 16521)、114 (简单芽孢杆菌, *Bacillus simplex*, CGMCC No. 16517)、112 (噬烟碱节杆菌, *Arthrobacter nicotinovorans*, CGMCC No. 16516)、TLZZ (莫海威芽孢杆菌, *Bacillus mojaviensis*, CGMCC No. 8268)和 Ps-S (荧光假单胞菌, *Pseudomonas fluorescens*, CGMCC No.8263)等 8 株 PGPR 菌株(图 1), 对烟草青枯菌 Rs (GenBank 登录号:CP002819)具有较强的拮抗作用, 抑菌圈直径分别为 5.00、5.06、1.93、0.56、0.85、5.16、2.56、1.03 cm<sup>[12]</sup>, 彼此间无拮抗作用。

## 1.2 供试培养基与土壤

牛肉膏蛋白胨液体培养基(g/L)<sup>[13]</sup>: 牛肉膏 5, 蛋白胨 10, NaCl 5, 自来水 1 000 mL, pH 7.0, 用于培养 PGPR 菌株。

茄科劳尔氏菌半选择培养基(TZC, g/L)<sup>[14]</sup>: 蛋白胨 10, 酪蛋白水解氨基酸 1, 琼脂粉 15,

甘油 5 mL、蒸馏水 1 000 mL。培养基 121 °C灭菌 20 min 后待降到 50 °C后再添加多黏菌素 B, 终浓度为 100 µg/mL, 结晶紫 5 µg/mL, 氯化三苯基四氮唑 50 µg/mL, 杆菌肽 25 µg/mL, 青霉素 0.5 µg/mL, 氯霉素 5 µg/mL 和放线菌酮 100 µg/mL, 用于培养烟草青枯病原菌 *Ralstonia solanacearum*。

OS 无机盐培养基(g/L): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7.00, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6.80, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.19, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.00, CaCl<sub>2</sub>·7H<sub>2</sub>O 8.80×10<sup>-2</sup>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.00×10<sup>-3</sup>, Na-EDTA 2.50×10<sup>-3</sup>, MnSO<sub>4</sub>·6H<sub>2</sub>O 1.54×10<sup>-3</sup>, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 3.90×10<sup>-4</sup>, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 1.80×10<sup>-4</sup>。用于菌种特征性碳源试验。

TSA 或 TSB 培养基(g/L): 胰蛋白胨 15.0, 大豆胨 5.0, 氯化钠 5.0, 琼脂 15.0, pH 值 7.3±0.2, 用于细菌的培养。

田间防控验证试验供试土壤为黄壤, pH 5.45, 有机质 48.6 g/kg, 全氮 2.29 g/kg, 碱解氮 158 mg/kg, 速效磷 48.9 mg/kg, 速效钾 543 mg/kg。未开展试验前青枯病发病率为 63.7%。

## 1.3 绿色荧光蛋白标记(green fluorescent protein, gfp)标记茄科劳尔氏菌与测定 gfp-R. solanacearum 的数量

项目组通过前期研究, 对茄科劳尔氏菌(青枯菌)进行了 gfp 标记<sup>[15]</sup>, 待长出菌落后在荧光显微镜上检测 gfp 标记情况并计算质粒转化效

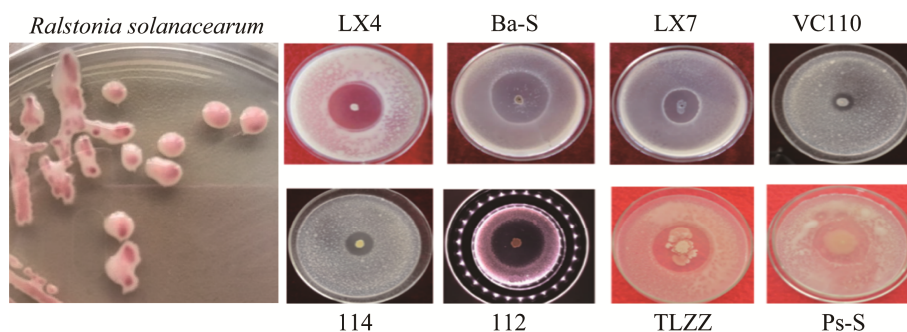


图 1 烟草青枯菌及筛选到的 PGPR 菌株及拮抗 Rs 菌落形态

Figure 1 The colonial morphology and antagonistic effect the selected PGPR strains to *Ralstonia solanacearum*. *R. solanacearum* is the pathogen of tobacco bacterial wilt. LX4, Ba-S, LX7, VC110, 114, 112, TLZZ, and Ps-S means the PGPR strains.

率。标记后茄科劳尔氏菌菌落形态与野生型形态进行对比, *gfp* 标记的茄科劳尔氏菌命名为 *gfp-R. solanacearum* (*gfp-Rs*)。

茄科劳尔氏菌的荧光定量 PCR 反应中, 特异性引物选用正向引物 Flic-F: 5'-GAACGCCA ACGGTGCGAACT-3', 反向引物 Flic-R: 5'-GGC GGCCTTCAGGGAGGTC-3', 片段大小为 400 bp。反应总体系、荧光定量 PCR 仪反应程序、溶解曲线步骤以及基因克隆、筛选、质粒提取均参照 Li 等<sup>[16]</sup> 的方法进行。

#### 1.4 PGPR 菌株与青枯菌竞争碳源基础生态位及重叠指数

将牛肉膏蛋白胨液体培养基和茄科劳尔氏菌半选择培养基分装于 2 mL 离心管后, 将 8 株 PGPR (112、114、Ba-S、TLZZ、LX4、LX7、Ps-S、VC110) 及茄科劳尔氏菌 *Rs* 接种于离心管内, 放入 30 °C、170 r/min 的摇床内培养 48 h 后用生理盐水(0.85%)洗脱 3 遍, 去除内生碳源, 调整  $OD_{600}$  为 0.5 待用。

从前期研究中选取烟草根系分泌物中主要的 48 种碳源<sup>[17]</sup>(表 1)。在 96 孔微孔板中分别加入四唑类氧化还原染料和专性培养基(OS 无机盐培养基与根系分泌物中主要物质按 1:1 配置)。培养好的 PGPR 或病原菌菌液接种量都为 5%, 48 种化学碳源的浓度为 10 mmol/L。分别设定

A1、A2 为空白, 只加四唑类氧化还原染料和专性培养基, 不加菌液, 放入 30 °C 恒温培养箱培养。由于无机盐培养基不含碳源, 菌种使用的碳源由化学碳源提供。PGPR 菌株和青枯菌培养 24 h 后用酶标仪测定  $OD_{600}$  值。

基础生态位宽度(basal niche breadth,  $B_{sw}$ )又称生态位大小, 反映物种对资源环境的适应状态和对资源的利用程度<sup>[18]</sup>。如果资源的可利用性较多, 则生态位宽度相就增加。其计算方法见公式(1)。

$$B_{sw} = -\sum_{i=1}^s P_i \ln P_i \quad (1)$$

式中,  $P_i$  为物种在资源系列中第  $i$  资源位的利用占该种对资源总数利用的比值;  $s$  为资源位数;  $B_{sw}$  的取值范围为  $[0, \ln S]$ 。

生态位重叠区域即两物种均能利用的碳源(图 2), 两者碳源利用的相似性即为生态位重叠指数(niche overlap index, NOI)。其计算方法见公式(2)

$$NOI = \frac{\sum_{k=1}^s P_{ik} P_{jk}}{\sqrt{\sum_{k=1}^s P_{ik}^2} \sqrt{\sum_{k=1}^s P_{jk}^2}} \quad (2)$$

式中,  $P_{ik}$ 、 $P_{jk}$  分别为物种  $i$  和物种  $j$  在第  $k$  资源位上的利用占物种在整个资源的总利用的比例;  $s$  为资源位数。

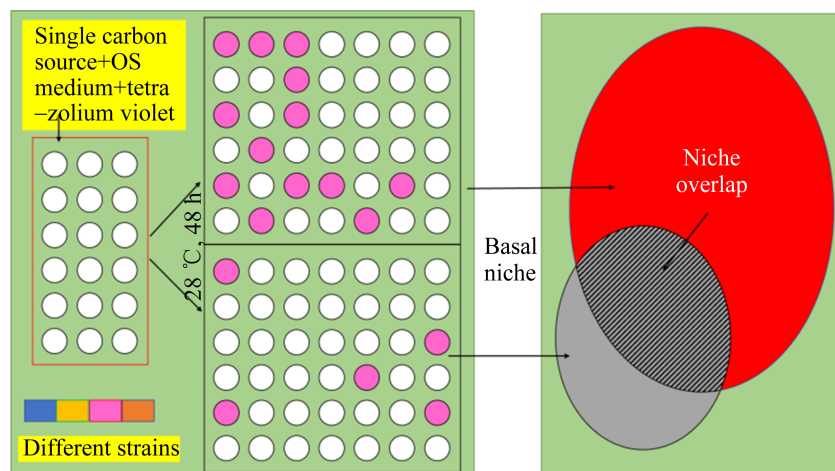


图 2 微孔板系统测定 PGPR 菌株基础生态位和重叠指数

Figure 2 Determination of basal niche and niche overlap index of PGPR strains by microplate system.

表 1 烟草根系分泌物主要碳源

Table 1 Main carbon sources in tobacco root exudates

Carbon types	Carbon sources
Alcohols	Inositol
	D-mannitol
	Sorbitol
Amino acids	Alanine
	Glycine
	Histidine
	Lysine
	Phenylalanine
	Proline
	Serine
	Threonine
	Tryptophan
	Valine
Carbohydrate	Glucose
	Sucrose
	Arabinose
	Rhamnose
	D-mannose
	Fructose
	Galactose
	Xylose
	Ribose
Acids	Acetic acid
	Citric acid
	Lactic acid
	Maleic acid
	Malic acid
	Tartaric acid
	Oxalic acid
	Benzoic acid
	Phenylpropionic acid
	Cinnamic acid
	Myristic acid
	Fumaric acid
	Palmitic acid
	Succinic acid
	3-hydroxybutyric acid
	Stearic acid
	p-hydroxybenzoic acid
Others	Vitamin H
	Nicotine
	Eugenol
	Glycerin
	Neophytadiene
	Scopolamine
	Solanone
	4-tert-phenol
	Pectin

## 1.5 断棒模型构建 PGPR 菌株群落组合及对青枯菌的防治效果

采用断棒模型设计试验(图 3), 用来组建不同种类或丰富度的群落<sup>[19-21]</sup>, 这种方法使得每个多样性水平下每种微生物出现的频次一致, 减少工作量的同时保障试验设计的科学严谨性。本研究中设计的群落组合见表 2。

通过限菌微系统研究烟株根际 PGPR 群落与青枯菌的拮抗效果。烟草种子在营养琼脂平板上进行无菌催芽后, 移植到装有蛭石:石英砂=1:1 的组培瓶中, 浇灌无菌的 1/2 浓度的 Hongland 营养液, 将组培瓶放置到光照培养箱, 光照强度为 2 500 lx, 16 h/8 h 光/暗周期。将不同 PGPR 群落按照表 2 组合接种至限菌微系统中, 每株 PGPR 菌株接种量为 2 mL, 2 d 后, 将青枯菌作为入侵者接种到限菌微系统, 接种量为 PGPR 群落总接种量的 50%, 限菌 25 °C 暗室培养 30 d (湿度保持为 80%), 检测烟株青枯病发病情况。

## 1.6 PGPR 群落组合和青枯菌 Rs 对不同碳源的利用程度

分别将 NA 培养基上活化的 PGPR 菌株和 TZC 培养基上活化的 Rs 菌株转接到 TSA 固体培养基上划线, 30 °C 连续培养 24 h, 挑取 TSA 平板上的单菌落摇菌后, 以 1:10 比例转接至 TSB 液体培养基, 30 °C、170 r/min 培养 24 h, 至  $OD_{600}$  值为 1.0 左右。

由于 TSA 和 TSB 培养基不含碳源, 菌株在 TSA 和 TSB 培养基上培养一段可以消耗细菌本身的内生碳源<sup>[22]</sup>。将 1/10 TSB 培养基上培养的新鲜菌液 4 500 r/min 常温离心 5 min, 收集菌体, 用无菌生理盐水(0.95% NaCl)洗涤菌体, 具体步骤为: 用生理盐水重悬菌体, 4 500 r/min 离心 5 min 收集菌体, 重复 3 次洗涤过程以除去残留的培养基, 最后用无菌生理盐水调节  $OD_{600}=0.5$ 。



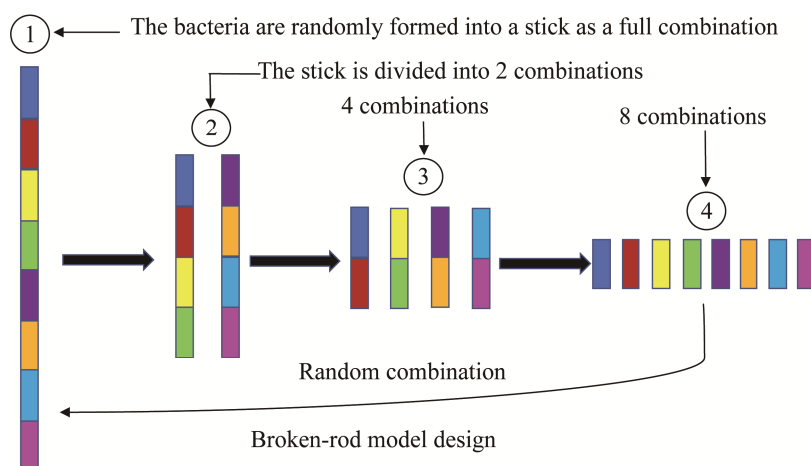


图3 断棒模型设计 PGPR 群落组合

Figure 3 Broken-rod model design of PGPR community assemblies.

为检测 PGPR 菌株群落组合与 Rs 对单一碳源的利用效率, 在 96 孔细胞培养板(Costar)中加入根系分泌物中的单一碳源 OS 培养基, 单一碳源的终浓度为 10 mmol/L, 接种配制好的菌悬液使初始菌  $OD_{600}$  值为 0.05。96 孔细胞培养板(Costar)置于 30 °C、170 r/min 培养, 48 h 后在酶标仪上检测菌液  $OD_{600}$  值。

以在单一碳源条件下细菌生长的最大生长速率表征细菌对该种碳源的利用效率。瞬时生长速率计算公式为<sup>[23]</sup>:  $\mu = (\ln X_{t_2} - \ln X_{t_1}) / (t_2 - t_1)$ , 其中  $\mu$ 、 $X$ 、 $t$  分别指的是瞬时生长速率、0 h 和 48 h 细菌细胞密度( $OD_{600}$ )、时间(h)。综合各碳源的利用效率分别统计醇类、氨基酸类、糖类、酸类和其他类碳源不同 PGPR 群落组合和 Rs 的利用效率。

### 1.7 不同 PGPR 群落组合田间防控验证

田间防控验证试验于 2021 年在贵州省黔南州长顺县广顺镇石洞村(26.03°N, 106.45°E)开展。采用随机区组试验设计, 对限菌微系统中青枯病防治效果较好的 4 个菌群组合(PGPR 菌群组合 32、39、40 和 43)处理开展田间效果验证, 其中清水为对照, 各小区采用井窖式栽烟, 栽烟 120 株, 4 次重复。各处理于移栽时先对烟苗进

行蘸根, 然后按每株 10 mL 进行灌根, 封窖时, 按每株 20 mL 进行灌根。移栽后 90 d, 按 GB/T 23222 标准调查青枯病发病情况<sup>[24]</sup>, 计算防治效果<sup>[25]</sup>(公式 3)。

防治效果 =

$$\left[ \frac{(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数})}{\text{对照病情指数}} \right] \times 100\% \quad (3)$$

烟叶成熟后依据 GB 2635—1992 统计烟叶主要经济性状。

### 1.8 数据处理

采用 Microsoft Excel 2016、SPSS Base Ver.13.0 软件进行数据统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 PGPR 菌株在单一碳源条件对青枯菌的抑菌效果

LX4、Ba-S、LX7、VC110、112 以及 TLZZ 在烟草根系分泌物单一碳源为醇类的条件下, 均能对青枯菌的生长产生抑制作用, 114 和 Ps-S 在山梨糖醇作为唯一碳源时对青枯菌无抑制作用(表 3)。TLZZ 在肌醇作为单一碳源条件下较其他 PGPR 菌株抑菌率最大, 达到 35.67%, LX7

表 2 利用断棒模型设计的 PGPR 群落组合

Table 2 PGPR community assembles by broken-rod model design

Community assemblage	Community composition								Level
	LX4	Ba-S	LX7	VC110	114	112	TLZZ	Ps-S	
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	1	0	0	0	0	0	0	0	1
5	1	0	0	0	0	0	0	0	1
6	0	1	0	0	0	0	0	0	1
7	0	1	0	0	0	0	0	0	1
8	0	0	1	0	0	0	0	0	1
9	0	0	1	0	0	0	0	0	1
10	0	0	0	1	0	0	0	0	1
11	0	0	0	1	0	0	0	0	1
12	0	0	0	0	1	0	0	0	1
13	0	0	0	0	1	0	0	0	1
14	0	0	0	0	0	1	0	0	1
15	0	0	0	0	0	1	0	0	1
16	0	0	0	0	0	0	1	0	1
17	0	0	0	0	0	0	1	0	1
18	0	0	0	0	0	0	0	1	1
19	0	0	0	0	0	0	0	1	1
20	1	1	0	0	0	0	0	0	2
21	0	0	1	1	0	0	0	0	2
22	0	0	0	0	1	1	0	0	2
23	0	0	0	0	0	0	1	1	2
24	1	0	1	0	0	0	0	0	2
25	0	1	0	1	0	0	0	0	2
26	0	0	0	0	1	0	1	0	2
27	0	0	0	0	0	1	0	1	2
28	1	0	0	0	1	0	0	0	2
29	0	1	0	0	0	1	0	0	2
30	0	0	1	0	0	0	1	0	2
31	0	0	0	1	0	0	0	1	2
32	1	1	1	1	0	0	0	0	4
33	0	0	0	0	1	1	1	1	4
34	1	0	1	0	1	0	1	0	4
35	0	1	0	1	0	1	0	1	4
36	1	1	0	0	1	1	0	0	4
37	0	0	1	1	0	0	1	1	4
38	1	0	1	0	0	1	0	1	4
39	0	1	0	1	1	0	1	0	4
40	1	0	1	1	0	1	0	0	4
41	0	1	0	0	1	0	1	1	4
42	1	0	1	0	0	0	1	1	4
43	0	1	0	1	1	1	0	0	4
44	1	1	1	1	1	1	1	1	8
45	1	1	1	1	1	1	1	1	8
46	1	1	1	1	1	1	1	1	8
47	1	1	1	1	1	1	1	1	8
48	1	1	1	1	1	1	1	1	8

1, 0 indicate whether the bacteria are present in the community or not, respectively.



表 3 不同 PGPR 菌株在单一碳源条件下对青枯菌的抑菌率(%)

Table 3 The bacteriostatic effect of the different PGPR strains against *Ralstonia solanacearum* under the single carbon source condition (%)

Carbon source	LX4	Ba-S	LX7	VC110	114	112	TLZZ	Ps-S
Alcohols								
Inositol	11.65	29.51	31.44	22.86	23.67	19.16	35.67	4.73
D-mannitol	28.24	23.07	32.03	30.95	17.33	14.92	11.74	4.94
Sorbitol	7.65	28.53	32.29	25.17	0	25.74	12.01	0
Amino acids								
Alanine	32.65	28.59	28.53	34.27	2.51	29.11	0	3.47
Glycine	24.07	40.60	30.18	28.53	14.08	15.90	13.32	0
Histidine	27.94	31.44	28.06	32.76	25.81	20.63	0	12.54
Lysine	19.68	33.01	32.45	26.37	33.17	26.74	2.29	13.49
Phenylalanine	24.85	32.91	25.17	26.24	10.57	27.34	31.81	2.29
Proline	27.52	29.45	26.92	30.41	19.38	27.70	0	10.39
Serine	31.01	28.12	21.27	34.62	9.84	26.61	33.47	0
Threonine	30.63	30.24	24.85	34.37	5.04	30.57	0	0
Tryptophan	32.86	32.71	27.46	30.74	1.85	27.82	12.62	0
Valine	31.39	31.23	21.41	32.71	7.55	32.08	0	0
Carbohydrate								
Glucose	22.66	30.46	21.34	30.02	14.92	18.48	38.65	0
Sucrose	27.94	23.87	38.73	30.35	14.75	22.11	28.06	0
Arabinose	31.81	31.81	27.58	36.97	6.86	32.86	0	6.26
Rhamnose	22.80	27.64	31.23	33.17	24.79	19.23	0	2.83
D-mannose	22.38	26.06	28.18	32.50	18.63	19.16	0	0
Fructose	28.99	15.9	22.11	30.52	17.09	24.59	21.55	5.35
Galactose	27.22	28.76	29.74	31.01	0	27.52	7.35	4.94
Xylose	28.47	33.37	27.52	26.74	15.66	30.90	16.86	5.56
Ribose	28.06	30.90	27.46	30.29	0	30.74	0	7.06
Acids								
Acetic acid	0	32.13	9.37	0	0	0.06	0	0
Citric acid	34.76	33.97	37.69	36.42	31.81	35.15	16.06	29.90
Lactic acid	37.29	41.12	40.12	16.78	0	32.03	0	30.41
Maleic acid	30.63	36.60	31.23	32.29	68.93	22.93	12.19	0
Malic acid	26.68	23.67	28.65	31.65	26.86	25.49	13.83	0
Tartaric acid	31.23	33.52	33.72	32.08	24.46	28.12	29.79	15.08
Oxalic acid	31.44	39.83	36.00	33.82	0	27.82	35.95	8.99
Benzoic acid	29.28	25.17	26.24	32.96	0	28.53	0	1.74
Phenylpropionic acid	29.17	30.24	22.73	35.10	16.46	26.68	0	0.85
Cinnamic acid	23.07	30.63	21.06	35.77	0	26.37	23.47	0
Myristic acid	22.73	33.77	32.13	28.71	3.37	28.99	0	0.28
Fumaric acid	24.46	0	29.79	33.27	11.83	26.92	24.26	11.92
Palmitic acid	20.12	29.22	28.82	31.71	6.36	29.96	11.74	0.74
Succinic acid	33.12	29.96	26.92	34.47	11.39	29.90	2.83	3.47
3-hydroxybutyric acid	28.47	39.91	39.87	26.12	0	30.35	33.92	18.94
Stearic acid	29.90	33.12	18.48	36.05	19.61	25.55	0	0
p-hydroxybenzoic acid	31.12	27.10	19.97	34.47	0	24.46	0	6.06
Others								
Vitamin H	28.41	27.52	24.26	35.24	20.12	26.74	0	3.15
Nicotine	24.85	27.28	19.97	33.07	19.01	29.28	0	0
Eugenol	28.53	29.57	22.73	36.19	26.49	24.53	0	0
Glycerin	29.90	34.81	24.79	33.22	0	30.29	10.30	3.26
Neophytadien	22.04	36.56	30.29	30.57	0	27.70	0	0.51
Scopolamine	28.06	32.50	19.75	31.17	17.64	26.55	0	0.28
Solanone	28.76	28.82	23.67	30.24	16.62	25.74	18.56	0
4-tert-phenol	24.33	28.47	23.07	34.27	10.30	29.11	0	0
Pectin	23.67	30.90	17.09	35.39	21.48	27.70	0	5.66

在山梨糖醇作为单一碳源条件下抑菌效果最好, 达到 32.29%。LX4、Ba-S、LX7、VC110、114 和 112 在单一碳源为氨基酸类条件下, 均对青枯菌有抑制作用, 以上各菌株分别在色氨酸(32.86%)、甘氨酸(40.6%)、赖氨酸(32.45%)、丝氨酸(34.62%)、赖氨酸(33.17%)和缬氨酸(32.08%)为单一碳源条件下, 对青枯菌的抑菌率达最高值。LX4、Ba-S、LX7、VC110 和 112 在单一碳源为糖类条件下, 均对青枯菌有抑制作用, 以上各菌株分别在阿拉伯糖(31.81%)、木糖(33.37%)、蔗糖(38.73%)、阿拉伯糖(36.97%)和阿拉伯糖(32.86%)条件下的抑菌率达到最高。LX7 和 112 在单一碳源为酸类条件下, 均对青枯菌有抑制作用, 以上各菌株分别在乳酸(40.12%)和柠檬酸(35.15%)条件下达到最高抑菌率。LX4、Ba-S、LX7、VC110 和 112 在其他碳源条件下也均可以抑制青枯菌的生长。

## 2.2 PGPR 碳源基础生态位宽度及其与青枯菌生态位重叠指数

不同 PGPR 菌株基础生态位宽度和重叠指数见图 4。Ps-S、112 和 VC110 的基础生态位宽度( $B_{sw}$ )相对较高, 无显著差异, 分别比 Rs ( $B_{sw}=2.56$ )高 41.9%、41.0%和 38.1%。TLZZ 的  $B_{sw}$  显著低于 Ps-S、112、VC110 和 114, 与 LX4 无显著差异, 显著高于 Ba-S 和 LX7。LX4、Ba-S 和 LX7 菌株的  $B_{sw}$  无显著差异。Ba-S 的  $B_{sw}$  在 8 株 PGPR 菌株最小, 仅比 Rs 高 4.78%。各 PGPR 菌株与青枯菌基础生态位重叠指数(NOI)与  $B_{sw}$  趋势并不一致, Ba-S 的 NOI 显著高于其他 PGPR 菌株, 较 LX4、LX7、VC110、114、112、TLZZ 和 Ps-S 分别高 4.88%、61.76%、33.71%、14.50%、14.15%、13.99%和 8.50%。LX4 和 Ps-S 的 NOI 无显著差异, 均显著高于 114、112、TLZZ 和 LX7。114、112 和 TLZZ 的 NOI 无显著差异, 均显著高于 LX7, LX7 的 NOI 仅为 Ba-S 的

61.82%。8 株 PGPR 与青枯菌比较后的 NOI 分别为 0.47、0.49、0.30、0.37、0.43、0.43 和 0.45, 都介于 0.10–0.50 之间, 说明 8 株 PGPR 与青枯菌间存在一定程度的竞争。

## 2.3 不同 PGPR 菌群组合下烟草青枯病的防治效果

在限菌微系统条件下, 16 个单一 PGPR 菌株处理(菌群组合 4–19)的病情指数平均为 60.52%, 根际青枯菌数量平均为  $1.30 \times 10^6$  CFU/g (表 4), 其中 Ba-S 处理(菌群组合 7)的病情指数最低, 仅是病情指数最高 Ps-S 处理(菌群组合 18)的 57.28%, 同时根际青枯菌数量也最低, 为  $7.94 \times 10^4$  CFU/g, 仅为对照处理(菌群组合 1–3)的 1.10%; 由 2 株 PGPR 组成的菌群组合中(菌群组合 20–31), 病情指数平均为 45.09%, 根际青枯菌数量平均为  $2.03 \times 10^5$  CFU/g, 菌群组合 20、21、22、24、25、28、29 和 30 之间的病情指数无显著差异, 显著低于其他菌群处理; 由 4 株 PGPR 组成的菌群组合中(菌群组合 32–43), 病情指数平均为 27.01%, 根际青枯菌平均数量为  $1.10 \times 10^4$  CFU/g, 菌群组合 32、39、40 和 43 之间的病情指数无显著差异, 均显著低于其

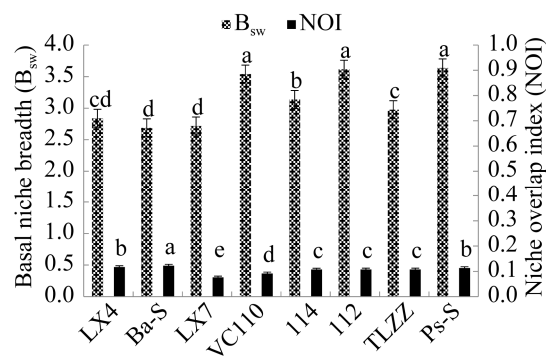


图 4 不同 PGPR 菌株基础生态位宽度和重叠指数  
Figure 4 The basal niche breadth and niche overlap index of the selected PGPR strains. Different lowercase letters on the top of each bar indicate significant difference at the 0.05 level, the same as below.

表 4 不同 PGPR 菌群组合对烟草青枯病的防治效果

Table 4 Biocontrol of different PGPR community combinations on tobacco bacterial wilt

Community assemblage	Disease index (%)	Rs population (lg(CFU/g))	Community assemblage	Disease index (%)	Rs population (lg(CFU/g))	Community assemblage	Disease index (%)	Rs population (lg(CFU/g))
1	100a	6.8a	17	71.8b	6.5a	33	44.3c	4.8c
2	100a	6.9a	18	78.9b	6.6a	34	30.9f	4.1c
3	100a	6.9a	19	76.7b	6.6a	35	22.1g	3.5d
4	60.2c	5.8b	20	32.4f	4.4c	36	28.6g	3.3d
5	61.5c	5.7b	21	35.2f	4.2c	37	35.7f	4.3c
6	48.6e	5.1b	22	50.2d	5.1bc	38	33.3f	4.1c
7	45.2e	4.9bc	23	60.8c	6.0a	39	16.7h	2.0e
8	56.7d	5.8b	24	38.4f	4.8c	40	18.4h	2.7e
9	53.2d	5.6b	25	36.7f	4.7c	41	30.8fg	3.7d
10	51.3d	5.5b	26	48.3e	5.1b	42	39.4ef	4.1c
11	50.9d	5.4b	27	66.9c	5.8b	43	13.2h	2.8e
12	65.2c	6.3a	28	40.1ef	4.6c	44	0.0i	2.3e
13	63.8c	6.2a	29	38.5f	4.4c	45	0.0i	2.1e
14	55.6d	5.6b	30	38.4f	4.3c	46	0.0i	2.5e
15	57.8d	5.5b	31	55.2d	5.5b	47	0.0i	2.8e
16	70.9b	6.4a	32	10.6g	2.2e	48	0.0i	2.7e

Different lowercase letters within the same column indicate significant difference at the 0.05 level, the same as below.

他菌群处理,因此选择这 4 种菌群组合作为后续田间试验验证。由 8 株 PGPR 组成的菌群组合,烟株均未发病,根际青枯菌数量平均为  $3.54 \times 10^2$  CFU/g,但生产成本较高。综合考虑病情指数、根际青枯菌数量和生产成本,选择菌群组合 32、39、40 和 43 进一步进行田间验证试验。

## 2.4 不同 PGPR 菌群组合和 Rs 对不同碳源的利用效率差异

以微生物菌群在不同碳源条件下的生长速率来表征微生物对这种碳源的利用效率,4 种菌群组合和青枯菌均能利用烟草根系分泌物中的碳源,但其利用碳源的强度有所差异(表 5)。菌群组合 32 对醇类利用效率显著高于其他处理,是青枯菌的 1.62 倍,菌群 39 和青枯菌对醇类利用效率无显著差异,菌群组合 32、40 和 43 对醇

类碳源的利用效率分别比 Rs 的增加 62.48%、38.21%和 22.30%;菌群组合 32、39 和 43 对氨基酸类碳源的利用效率无显著差异,均显著高于菌群 40;菌群组合 32 对糖类利用效率显著高于其他处理,是青枯菌的 1.41 倍,菌群组合 39、40 和青枯菌对糖类利用效率无显著差异,菌群组合 43 为各处理的最低,仅为菌群组合 32 的 57.91%;菌群组合 39 对酸类利用效率显著高于其他处理,菌群组合 32 和青枯菌对酸类利用率无显著差异,菌群组合 40 和 43 之间无显著差异;菌群组合 32 对其他类碳源利用效率显著高于其他处理,菌群组合 40 和青枯菌对其他类碳源利用效率无显著差异,菌群组合 39 和 43 之间无显著差异,菌群组合 32 对其他类碳源的利用效率是青枯菌的 1.18 倍。

表 5 不同菌群组合和 Rs 在不同碳源条件下的最大生长速率

Table 5 The maximum growth rate of the different community combinations and Rs in the different carbon source

Carbon source	Strain assemblage 32	Strain assemblage 39	Strain assemblage 40	Strain assemblage 43	gfp-Rs
Alcohols	1.654±0.002c	1.035±0.003d	1.407±0.004a	1.245±0.003c	1.018±0.005e
Amino acids	1.284±0.003e	1.306±0.003b	1.119±0.004e	1.253±0.003b	1.194±0.005d
Carbohydrate	1.701±0.002b	1.286±0.003c	1.369±0.002b	0.985±0.002d	1.212±0.003c
Acids	1.953±0.002a	2.223±0.003a	1.341±0.005c	1.324±0.004a	1.965±0.005a
Others	1.477±0.002d	0.832±0.005e	1.248±0.003d	0.778±0.004e	1.251±0.004b

Different lowercase letters within the same column indicate significant difference at the 0.05 level, the same as below.

## 2.5 不同 PGPR 菌群组合的田间防控验证

添加不同处理的 PGPR 菌群组合均能显著降低青枯病的发生(表 6), 其中 PGPR 菌群 32 组合防治效果显著高于其他处理, 分别比菌群 39、40 和 43 高 27.18%、60.05%和 54.80%, PGPR 菌群 39 组合防治效果好于菌群 40 和 43 处理, 分别比菌群 40 和 43 高 25.85%和 21.72%; PGPR

菌群 32 组合的产量和产值在所有处理中最高, 分别比对照处理高 67.50%和 73.53%。PGPR 菌群 40 和 43 在产量和产值上无显著差异, 与不施 PGPR 对照之间存在显著差异。虽然 PGPR 处理烟株也存在部分发病, 但发病时间推迟 7–20 d, 增加采烤叶片数, 进而增加产量和产值。

表 6 不同 PGPR 菌群组合处理田间防控验证

Table 6 Effect of the different PGPR community combinations on tobacco bacterial wilt control

Treatments	Yield (kg/hm <sup>2</sup> )	Output value (RMB yuan/hm <sup>2</sup> )	Control efficiency (%)
CK	1 211.55d	35 535d	—
Strain assemblage 32	2 029.35a	61 665a	61.3a
Strain assemblage 39	1 777.95b	54 120b	48.2b
Strain assemblage 40	1 585.35c	47 550c	38.3c
Strain assemblage 43	1 558.20c	46 740c	39.6c

Different lowercase letters within the same column indicate significant difference at the 0.05 level. —: No such value.

## 3 讨论

大量研究证实 PGPR 广泛存在于多种植物的根围, 主要种类包括芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.)和假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.), 其中荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)在许多植物的根围都占了绝对优势, 可达 60%–93%<sup>[26]</sup>; 此外, 还包括黄杆菌属(*Flavobacterium* sp.)、固氮菌属(*Azotobacter* sp.)、固氮螺菌属(*Azospirillum* sp.)、肠杆菌属(*Enterobacter* sp.)<sup>[27]</sup>。Guo 等<sup>[28]</sup>的研究发现 3 种植物促生根际细菌——沙雷氏菌属、假单胞菌和芽孢杆菌, 组合配方使用一年防效达

68.4%–99.5%, 使用两年防效达 63.4%–78.5%。本研究的 8 株 PPGR 在前期的研究中发现都具有较强的拮抗和促生效果, 抑菌圈直径为 0.56–5.16 cm, 其中 LX4、LX7 具有较大的促生潜力和对大多数的病原菌均具有一定的拮抗作用, 根际定殖的数量在 30 d 后仍然维持在 10<sup>6</sup> CFU/g 根以上<sup>[12]</sup>。

目前研究发现烟草根系分泌物中主要物质为水溶性有机酸、酚酸类、糖类、氨基酸、多肽、嘌呤和核苷等<sup>[29]</sup>。由于不同烟草品种分泌物的种类和含量不相同, 因此对病原菌和拮抗菌生长的影响不同<sup>[30]</sup>。郝文雅等<sup>[31]</sup>的研究结果发现,

水稻和西瓜根系分泌物中的丙氨酸、谷氨酸、天冬氨酸和精氨酸可促进西瓜专化型尖孢镰刀菌孢子萌发, 而丝氨酸主要抑制此病原菌的生长。而本研究中发现 LX4、Ba-S、LX7、VC110 和 112 在所有氨基酸、糖类碳源下均对青枯菌有抑制作用, 最高抑菌率均达到 30%以上, 说明以上 PGPR 可以充分利用烟草根系分泌物中的氨基酸、糖类碳源对青枯菌进行防控。前人研究发现青枯菌对有机酸的利用显著高于外加施入拮抗菌<sup>[32]</sup>, 这也是土壤酸化往往容易导致青枯病高发的原因之一<sup>[33]</sup>, 而本研究发现 LX7 和 112 在所有酸类碳源下均对青枯菌有抑制作用, LX7 在乳酸条件下最高抑菌率达 40.12%, 说明 LX7 和 112 具有生物防控青枯病的潜力。

生态位宽度即微生物可利用的资源总数, 可以表明微生物物种丰富度的水平<sup>[34]</sup>。微生物物种的丰富度在群落中多体现出生物多样性效应<sup>[35]</sup>, 在时间和空间的双重波动下可以提高微生物在根际中的存活率<sup>[20]</sup>。微生物种群多样下的生态位宽度可加强环境整体的资源利用, 从而帮助细菌在根际定殖<sup>[36-37]</sup>。生态位宽度越大越能增加引入细菌群落与潜在病原体之间的资源竞争力, 增强植株对病原入侵的抵抗力, 从而达到生物防控的目的<sup>[22]</sup>。生态位重叠指数是指非病原微生物与病原菌共同可利用的碳源与病原菌可利用碳源的比值。非病原微生物的 NOI 越高, 其与病原菌的竞争能力越强, 能获取大部分病原菌能利用的碳源<sup>[38]</sup>。Ji 等<sup>[22]</sup>发现, 拮抗菌与病原菌生态位重叠指数越高, 生防菌的生防效率越高, 生防菌与病原菌的利用性竞争能力显著影响生防菌的生防效率。在本研究中, Ba-S、LX4 和 Ps-S 与 Rs 的生态重叠指数显著高于其他 PGPR, 分别比生态位重叠指数最低的 LX7 高 61.8%、54.3%和 49.2%, 高值生态位重叠指数表明 PGPR 与青枯病菌 Rs 存在较强的营养竞争;

Ps-S 虽然对碳源利用的生态位宽度较高, 但由于与 Rs 的生态位重叠指数较高, 因此在利用这些抵御 Rs 的能力上有所欠缺, 表现为抵御病原菌入侵的碳源利用效率较低。

植物微生物组在帮助植物抗逆和抗病虫害过程中发挥着重要作用<sup>[39-40]</sup>。微生物群落成员之间存在着复杂的相互作用, 从而形成生态网络<sup>[41]</sup>。进化理论认为自然选择下微生物会通过驱动相互竞争利用不重叠的资源达到共存<sup>[42]</sup>。前人基于生物多样性-生态系统功能理论模型和微生物群落成员的互作关系, 构建了稳定增强有益功能的人工合成菌群, 并预测了复杂群落的互作关系以及对病原菌入侵的抵抗能力<sup>[20]</sup>。构建人工合成菌群应充分考虑 3 个方面, 一是增加合成菌群与病原菌资源利用的重叠度, 同时避免菌群资源分配的不均衡<sup>[34]</sup>; 二是结合菌株资源竞争、拮抗竞争能力或其他有益特性, 确保有益菌群施用后能更好地适应环境和发挥有益功能<sup>[43-44]</sup>; 三是合成菌群成员的筛选应考虑多个营养级别微生物间的协同效应<sup>[45]</sup>。本研究中群落组合 32 (由 LX4、Ba-S、LX7 和 VC110 构成) 和群落组合 39 (由 Ba-S、VC110、114 和 TLZZ 构成) 中, 各组成菌株基础生态宽度和生态位重叠指数均与青枯菌在多个营养级别形成竞争关系, 另一方面部分菌株还可以分泌拮抗物质, 比如 LX7 在烟苗根际定殖能力强, 产生氰化氢 (hydrogen cyanide, HCN), 抑制病原菌<sup>[14]</sup>, 是比较理想的生防菌株。同时微生物群落的多样性改善了根际引入益生菌群落的存活条件, PGPR 群落丰富度与青枯病的发生率显著负相关, 这表明高 PGPR 群落多样性可能存在多种 PGPR 互作或促进次生代谢物质的产生<sup>[46]</sup>。前人已经证明, PGPR 菌株通过合作从生产环境中清除铁载体<sup>[47]</sup>。此外, PGPR 的多样性也可能影响微生物的表型性状, 例如生物膜形成<sup>[48]</sup>, 这在本研究中没有

进行检测,但可能对微生物群落及青枯病的防控具有重要的作用,可以在后续研究中开展研究。

## 4 结论

利用不同 PGPR 菌株对青枯菌营养竞争或者拮抗竞争的特点构建 PGPR 菌群,多样且彼此间无拮抗作用的 PGPR 菌群可以显著提高抵抗病原菌入侵的能力。由 LX4、Ba-S、LX7 和 VC110 构成的菌群组合(菌群组合 32)在对醇类、氨基酸类和有机酸、糖类等碳源条件下的生长速率高,田间应用产量、产值和防治效果都显著优于其他菌群组合,具有广泛应用前景。

## 参考文献

- [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] ANDREOTE FD, PEREIRA E SILVA MC. Microbial communities associated with plants: learning from nature to apply it in agriculture[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2017, 37: 29-34.
- [3] DASHTI NH, ALI NY, CHERIAN VM, MONTASSER MS. Application of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in combination with a mild strain of *Cucumber mosaic virus* (CMV) associated with viral satellite RNAs to enhance growth and protection against a virulent strain of CMV in tomato[J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2012, 34(2): 177-186.
- [4] HAHM MS, SUMAYO M, HWANG YJ, JEON SA, PARK SJ, LEE JY, AHN JH, KIM BS, RYU CM, GHIM SY. Biological control and plant growth promoting capacity of rhizobacteria on pepper under greenhouse and field conditions[J]. *Journal of Microbiology*, 2012, 50(3): 380-385.
- [5] YUAN WF, RUAN S, QI GF, WANG R, ZHAO XY. Plant growth-promoting and antibacterial activities of cultivable bacteria alive in tobacco field against *Ralstonia solanacearum*[J]. *Environmental Microbiology*, 2022, 24(3): 1411-1429.
- [6] BHATTACHARYYA PN, JHA DK. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(4): 1327-1350.
- [7] RECEP K, FIKRETTIN S, ERKOL D, CAFER E. Biological control of the potato dry rot caused by *Fusarium* species using PGPR strains[J]. *Biological Control*, 2009, 50(2): 194-198.
- [8] YAO LX, WU ZS, ZHENG YY, KALEEM I, LI C. Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton[J]. *European Journal of Soil Biology*, 2010, 46(1): 49-54.
- [9] JIANG GF, ZHANG YL, GAN GY, LI WL, WAN W, JIANG YQ, YANG TJ, ZHANG Y, XU YC, WANG YK, SHEN QR, WEI Z, DINI-ANDREOTE F. Exploring rhizo-microbiome transplants as a tool for protective plant-microbiome manipulation[J]. *ISME Communications*, 2022, 2: 10.
- [10] WANG S, WU HJ, QIAO JQ, MA LL, LIU J, XIA YF, GAO XW. Molecular mechanism of plant growth promotion and induced systemic resistance to tobacco mosaic virus by *Bacillus* spp.[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 19(10): 1250-1258.
- [11] ZHANG SA, REDDY MS, KLOEPPER JW. Tobacco growth enhancement and blue mold disease protection by rhizobacteria: relationship between plant growth promotion and systemic disease protection by PGPR strain 90-166[J]. *Plant and Soil*, 2004, 262(1): 277-288.
- [12] 李想, 刘艳霞, 夏范讲, 蔡刘体, 张恒, 石俊雄. 烟草根际促生菌(PGPR)的筛选、鉴定及促生机理研究[J]. *中国烟草学报*, 2017, 23(3): 111-118.  
LI X, LIU YX, XIA FJ, CAI LT, ZHANG H, SHI JX. Screening, identification and plant growth-promotion mechanism of tobacco plants rhizobacteria[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2017, 23(3): 111-118 (in Chinese).
- [13] 赵斌, 何绍江. 微生物学实验[M]. 北京: 科学出版社, 2002.  
ZHAO B, HE SJ. *Microbiology Experiment*[M]. Beijing: Science Press, 2002 (in Chinese).
- [14] ENGELBRECHT MC. Modification of a semi-selective medium for the isolation and quantification of *Pseudomonas solanacearum*[J]. *ACIAR Bacterial Wilt Newsletter*, 1994(10): 3-5.
- [15] 李想, 刘艳霞, 蔡刘体, 张恒, 石俊雄. 烟草青枯病菌在烟草根际的定殖及最适发病条件[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(5): 796-804.

- LI X, LIU YX, CAI LT, ZHANG H, SHI JX. Colonization of *Ralstonia solanacearum* on tobacco roots and factors affecting virulence[J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(5): 796-804 (in Chinese).
- [16] LI X, LIU Y, CAI L, ZHANG H, SHI J, YUAN Y. Factors affecting the virulence of *Ralstonia solanacearum* and its colonization on tobacco roots[J]. Plant Pathology, 2017, 66(8): 1345-1356.
- [17] LIU YX, LI X, CAI K, CAI LT, LU N, SHI JX. Identification of benzoic acid and 3-phenylpropanoic acid in tobacco root exudates and their role in the growth of rhizosphere microorganisms[J]. Applied Soil Ecology, 2015, 93: 78-87.
- [18] LEVINS R. Evolution in Changing Environments: Some Theoretical Explorations[M]. Princeton, NJ: Princeton University Press, 1968.
- [19] BELL T, LILLEY AK, HECTOR A, SCHMID B, KING L, NEWMAN JA. A linear model method for biodiversity-ecosystem functioning experiments[J]. The American Naturalist, 2009, 174(6): 836-849.
- [20] HU J, WEI Z, FRIMAN VP, GU SH, WANG XF, EISENHAUER N, YANG TJ, MA J, SHEN QR, XU YC, JOUSSET A. Probiotic diversity enhances rhizosphere microbiome function and plant disease suppression[J]. mBio, 2016, 7(6): e01790-e01716.
- [21] van ELSAS JD, CHIURAZZI M, MALLON CA, ELHOTTOVÁ D, KRIŠTŮFEK V, SALLES JF. Microbial diversity determines the invasion of soil by a bacterial pathogen[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(4): 1159-1164.
- [22] JI PS, WILSON M. Assessment of the importance of similarity in carbon source utilization profiles between the biological control agent and the pathogen in biological control of bacterial speck of tomato[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4383-4389.
- [23] 王岁楼. 微生物比生长速率  $\mu$  的含义[J]. 郑州轻工业学院学报, 1993, 8(4): 6-9.
- WANG SL. Meaning on specific growth rate of microorganism[J]. Journal of Zhengzhou Institute of Light Industry, 1993, 8(4): 6-9 (in Chinese).
- [24] GB/T 23222-2008, 烟草病虫害分组及调查方法[S]. 北京, 中国标准出版社, 2009.
- GB/T 23222-2008, Tobacco disease and insect pest grouping and investigation methods. Beijing, China Standard Press, 2009 (in Chinese).
- [25] 刘艳霞, 李想, 曹毅, 陆宁, 石俊雄. 抑制烟草青枯病型生物有机肥的田间防效研究[J]. 植物营养与肥料学报, 2014, 20(5): 1203-1211.
- LIU YX, LI X, CAO Y, LU N, SHI JX. Field control efficiency of tobacco specific bio-organic fertilizer on tobacco bacterial wilt[J]. Journal of Plant Nutrition and Fertilizer, 2014, 20(5): 1203-1211 (in Chinese).
- [26] ZAIDI A, AHMAD E, KHAN MS, SAIF S, RIZVI A. Role of plant growth promoting rhizobacteria in sustainable production of vegetables: current perspective[J]. Scientia Horticulturae, 2015, 193: 231-239.
- [27] TAGHAVI S, BARAC T, GREENBERG B, BORREMANS B, VANGRONSVELD J, van der LELIE D. Horizontal gene transfer to endogenous endophytic bacteria from poplar improves phytoremediation of toluene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8500-8505.
- [28] GUO JH, QI HY, GUO YH, GE HL, GONG LY, ZHANG LX, SUN PH. Biocontrol of tomato wilt by plant growth-promoting rhizobacteria[J]. Biological Control, 2004, 29(1): 66-72.
- [29] 高欣欣, 于会泳, 张继光, 刘帅帅, 时鹏, 王树键, 申国明. 烤烟根系分泌物的分离鉴定及对种子萌发的影响[J]. 中国烟草科学, 2012, 33(3): 87-91.
- GAO XX, YU HY, ZHANG JG, LIU SS, SHI P, WANG SJ, SHEN GM. Identification of chemical compositions of root exudates from flue-cured tobacco and their influence to seed germination[J]. Chinese Tobacco Science, 2012, 33(3): 87-91 (in Chinese).
- [30] 邱文龙. 不同品种烟草根系分泌物的组分分析与抗黑胫病的关系[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2014.
- QIU WL. Researches on the relationship between root exudates of different flue-cured tobacco varieties and resistant of black shank disease (*Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*)[D]. Taian: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2014 (in Chinese).
- [31] 郝文雅, 沈其荣, 冉炜, 徐阳春, 任丽轩. 西瓜和水稻根系分泌物中糖和氨基酸对西瓜枯萎病原菌生长的影响[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(3): 77-82.
- HAO WY, SHEN QR, RAN W, XU YC, REN LX. The effects of sugars and amino acids in watermelon and rice root exudates on the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2011, 34(3): 77-82 (in Chinese).



- [32] 刘艳霞, 沈宏, 李想, 张恒, 邹焱, 朱经伟, 向阳. 烟草青枯病劳尔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.  
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).
- [33] KIM BS, FRENCH E, CALDWELL D, HARRINGTON EJ, IYER-PASCUZZI AS. Bacterial wilt disease: host resistance and pathogen virulence mechanisms[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2016, 95: 37-43.
- [34] WEI Z, YANG TJ, FRIMAN VP, XU YC, SHEN QR, JOUSSET A. Trophic network architecture of root-associated bacterial communities determines pathogen invasion and plant health[J]. *Nature Communications*, 2015, 6: 8413.
- [35] COYTE KZ, SCHLUTER J, FOSTER KR. The ecology of the microbiome: networks, competition, and stability[J]. *Science*, 2015, 350(6261): 663-666.
- [36] MALLON CA, POLY F, LE ROUX X, MARRING I, van ELSAS JD, SALLES JF. Resource pulses can alleviate the biodiversity-invasion relationship in soil microbial communities[J]. *Ecology*, 2015, 96(4): 915-926.
- [37] SALLES JF, POLY F, SCHMID B, LE ROUX X. Community niche predicts the functioning of denitrifying bacterial assemblages[J]. *Ecology*, 2009, 90(12): 3324-3332.
- [38] MALLON CA, LE ROUX X, van DOORN GS, DINI-ANDREOTE F, POLY F, SALLES JF. The impact of failure: unsuccessful bacterial invasions steer the soil microbial community away from the invader's niche[J]. *The ISME Journal*, 2018, 12(3): 728-741.
- [39] BERENDSEN RL, PIETERSE CMJ, BAKKER PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health[J]. *Trends in Plant Science*, 2012, 17(8): 478-486.
- [40] WEI Z, GU YA, FRIMAN VP, KOWALCHUK GA, XU YC, SHEN QR, JOUSSET A. Initial soil microbiome composition and functioning predetermine future plant health[J]. *Science Advances*, 2019, 5(9): eaaw0759.
- [41] FOSTER KR, BELL T. Competition, not cooperation, dominates interactions among culturable microbial species[J]. *Current Biology*, 2012, 22(19): 1845-1850.
- [42] BARBER JN, SEZMIS AL, WOODS LC, ANDERSON TD, VOSS JM, MCDONALD MJ. The evolution of coexistence from competition in experimental co-cultures of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The ISME Journal*, 2021, 15(3): 746-761.
- [43] HU J, WEI Z, WEIDNER S, FRIMAN VP, XU YC, SHEN QR, JOUSSET A. Probiotic *Pseudomonas* communities enhance plant growth and nutrient assimilation via diversity-mediated ecosystem functioning[J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2017, 113: 122-129.
- [44] LI M, WEI Z, WANG JN, JOUSSET A, FRIMAN VP, XU YC, SHEN QR, POMMIER T. Facilitation promotes invasions in plant-associated microbial communities[J]. *Ecology Letters*, 2019, 22(1): 149-158.
- [45] WANG XF, WEI Z, LI M, WANG XQ, SHAN AQ, MEI XL, JOUSSET A, SHEN QR, XU YC, FRIMAN VP. Parasites and competitors suppress bacterial pathogen synergistically due to evolutionary trade-offs[J]. *Evolution*, 2017, 71(3): 733-746.
- [46] LAWRENCE D, FIEGNA F, BEHREND S, BUNDY JG, PHILLIMORE AB, BELL T, BARRACLOUGH TG. Species interactions alter evolutionary responses to a novel environment[J]. *PLoS Biology*, 2012, 10(5): e1001330.
- [47] LI M, POMMIER T, YIN Y, WANG JN, GU SH, JOUSSET A, KEUSKAMP J, WANG HG, WEI Z, XU YC, SHEN QR, KOWALCHUK GA. Indirect reduction of *Ralstonia solanacearum* via pathogen helper inhibition[J]. *The ISME Journal*, 2022, 16(3): 868-875.
- [48] SENEVIRATNE G, WEERASEKARA MLMAW, SENEVIRATNE KACN, ZAVAHIR JS, KECSKÉS ML, KENNEDY IR. Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action[A]// *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*[M]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010: 81-95.