

烟草黑胫病拮抗根际芽胞杆菌 FB-16 的 筛选鉴定及其抑菌活性

冯志珍¹ 陈太春¹ 段军娜¹ 陈德鑫² 成巨龙³ 安德荣^{1*}

(1. 西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100; 2. 中国烟草总公司青州烟草研究所, 青岛 266001; 3. 中国烟草总公司陕西省烟草研究所, 西安 710061)

摘要: 为获得对烟草黑胫病有较强生防效果的拮抗细菌, 从健康烟草根际采集 30 份土壤样品, 分离纯化得到 347 株细菌, 经病原真菌定向筛选后得到 1 株对烟草黑胫病菌等病原真菌拮抗活性较好的细菌 FB-16, 其对烟草黑胫病菌的抑菌带宽为 23 mm。采用菌丝生长速率法、作用机制试验、温室防病试验测定 FB-16 的抑菌作用, 并通过形态学特征、生理生化特征及 16S rDNA 序列分析对菌株进行鉴定。结果显示, 菌株 FB-16 发酵液对烟草黑胫病菌菌丝生长抑制率为 95.96%; 其代谢产物对烟草黑胫病菌菌丝有致畸作用; 菌株 FB-16 为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloiauefaciens* (GenBank 登录号为 JN245982); 饱和度 25% 硫酸铵获得的抑菌物质对烟草黑胫病菌的抑菌活性较高, 抑菌圈直径达 42.00 mm; FB-16 活性产物处理的烟草植株在接种烟草黑胫病菌 7 天后的防治效果为 69.96%。表明菌株 FB-16 在烟草黑胫病生物防治中具有潜在的利用价值。

关键词: 烟草黑胫病菌; 根际细菌; 抑菌活性; 防治效果

Screening, identification and antifungal activity of antagonistic rhizospheric *Bacillus* FB-16 against tobacco black shank

Feng Zhizhen¹ Chen Taichun¹ Duan Junna¹ Chen Dexin² Cheng Julong³ An Derong^{1*}

(1. College of Plant Protection, Northwest A & F University, Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. Qingzhou Tobacco Research Institute, China National Tobacco Corporation, Qingdao 266001, Shandong Province, China; 3. Shaanxi Tobacco Research Institute, China National Tobacco Corporation, Xi'an 710061, Shaanxi Province, China)

Abstract: In order to get a strong effect biocontrol bacteria for tobacco black shank, 347 bacteria strains were isolated from 30 soil samples, which collected from healthy tobacco rhizospheric soil. FB-16, a strain with strong effect on *Phytophthora nicotianae*, its inhibition zone was up to 23 mm. The methods of inhibition rate of mycelium growth, antifungal mechanism experiment, bonsai experiment in greenhouse were used to determine its antifungal effect. This strain was identified based on morphological, physiological and biochemical characteristics, and 16S rDNA phylogenetic analysis. The results showed that the inhibition rate of FB-16 fermented liquid against the mycelium growth of *P. nicotianae* was 95.96%. The FB-16 metabolite showed teratogenic effects on mycelia of *P. nicotianae*. The strain FB-16 was identified as *Bacillus amyloiauefaciens* (GenBank accession JN245982). The antifungal metabolite from stain FB-

基金项目: 高等学校学科创新引智计划 (No. B07049), 国家“863”计划 (2007AA021503), 中国烟草有害生物普查项目 (KJ-2010-04)

作者简介: 冯志珍, 女, 1986 年生, 硕士研究生, 研究方向为微生物资源利用, email: fzz870508@126.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: anderong323@163.com

收稿日期: 2011-09-08

16 extracted by 25% ammonium sulfate showed the most effective inhibition toward *P. nicotianae*, and its inhibition zone diameter was up to 42.00 mm. In the 7th day after treated with FB-16, the control effect on tobacco reached 69.96%. Conclusively, it has potential value in biological control against tobacco black shank.

Key words: *Phytophthora nicotianae*; rhizobacteria; antifungal activity; control efficacy

烟草黑胫病是由烟草疫霉 *Phytophthora nicotianae* Brada de Hann 引起的土传真菌性病害,俗称“黑根”、“黑杆疯”,多发生于成株期,少数在苗床期发生。幼苗染病时茎基部出现污黑色病斑,茎杆染病时茎基部初呈水渍状黑斑,严重时植株萎蔫死亡,该病平均发病率为 5%~12%,重者损失达 75%,甚至绝收^[1-2]。我国平均每年因烟草黑胫病造成的经济损失达 1 亿元以上,仅次于烟草病毒病^[3-5]。

烟草黑胫病自发现以来,引起了国内外学者的广泛关注,并对病害症状、病原物生物学特性、病害的发生发展规律、预测预报及防治措施等进行了大量研究。Broadbent^[6]研究表明,烟草黑胫病菌的拮抗细菌有假单胞杆菌 *Pseudomonas* spp. 和芽胞杆菌 *Bacillus* spp.,该拮抗菌通过产生抗菌素使烟草黑胫病菌菌丝溶解。English & Mitchell^[7]研究显示,在田间土壤中加入拮抗细菌,可以显著降低烟草黑胫病菌的侵染机会,从而减少发病率。王清海等^[2]从土壤中筛选到能使烟草黑胫病菌和辣椒疫霉病菌菌丝畸变、菌丝壁消解的链霉菌 *Streptomyces* spp.,其发酵液的热稳定性和酸碱稳定性较强,在 20~55℃、pH 值 3~9 都具有抑菌活性。

有关以烟草根际定向筛选的芽胞杆菌防治烟草黑胫病的研究鲜有报道,为此,作者对烟草种植区根际土壤进行拮抗细菌的分离筛选和抑菌作用测定,对抑菌效果显著的菌株进行菌株鉴定、活性产物的提取,并利用其粗提物进行温室防病试验,以期防治烟草黑胫病提供生防资源。

1 材料与方 法

1.1 材 料

植物病原真菌:烟草黑胫病菌 *Phytophthora nicotianae*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、苹果轮纹病菌 *Physalospora piricola*、小麦根腐病菌 *Bipolaris sorokiniana*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、稻瘟病菌 *Pyricularia oryzae*,除烟草黑胫病菌分离自烟草病株上外,其它植物病原真菌均由西北农林科技大学植物病害综合治理实验室提供。

土壤样品:采自陕西省陇县高发病地块烟草健康株的根际。

培养基:LB 固体培养基用于分离和保存根际细菌;LB 液体培养基用于发酵根际细菌;燕麦培养基用于培养烟草黑胫病菌;PDA 培养基用于对峙培养。

烟叶品种:苏晒 097,由陕西省烟草研究所提供。

药剂:58% 甲霜·锰锌 (metalaxyl mancozeb) 可湿性粉剂,江苏宝灵化工股份有限公司生产。

1.2 方 法

1.2.1 根际细菌的分离与筛选

细菌分离采用平板稀释法^[8],称取 1 g 土壤样品,加入玻璃珠、吐温、石英砂振荡和研磨根段,用无菌水稀释成 1×10^{-1} 、 1×10^{-2} 、 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 的悬浮液,置 220 r/min 摇床振荡 5 min。取 0.25 mL 上清液,用三角玻璃棒在 PDA 平板上涂抹均匀。倒置于 32℃ 恒温培养箱中培养 5~7 天。观察菌落生长情况,将单菌落挑出,纯化培养。

初筛采用抑菌圈法^[9],首先挑取烟草黑胫病菌菌丝制成菌悬液,将菌悬液与融化并冷却至 45℃ 左右的 PDA 培养基混匀,制平板。挑取 30℃ 活化培养 24 h 的供试细菌点接于烟草黑胫病菌平板上,28℃ 培养 3~4 天后,观察抑菌带大小。

复筛采用牛津杯法^[10],将初筛得到的菌株分别接种于装有 50 mL 液体 LB 培养基的三角瓶中,32℃、220 r/min 振荡培养 48 h。收集培养液于 4℃、10000 r/min 离心,将上清用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。在病原菌平板上等距离放置 4 个牛津杯,每杯中接入不同菌株的无菌培养滤液 50 μL,28℃ 培养 72 h,测量抑菌圈直径。

1.2.2 抑菌活性测定

拮抗细菌发酵液对菌丝生长的抑制率:采用生长速率法^[11],将发酵液经 10000 r/min 离心过滤,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,在无菌条件下,按无菌发酵液与培养基 1:9 的比例与冷却至 45℃ 左右的 PDA 培养基混匀,并制成含无菌发酵液的平板培养基,在每个培养基中央放入 1 个直径 5 mm 的病原菌饼,28℃ 恒温培养 3~4 天后,采用十字交叉法测

量菌落直径,计算菌丝生长抑制率。

抑制率(%) = [(对照生长直径 - 处理生长直径) / 对照生长直径] × 100

以加同样比例的无菌水的培养基为对照,每处理3次重复。

发酵液活性物质对菌丝的抑制作用:采用平板对峙法^[12],在PDA平板中央接病原菌菌饼,在距平板中心3 cm的四周接拮抗菌株,30℃倒置培养3天。观察靠近拮抗菌的抑菌圈边缘菌丝生长情况,以远离拮抗菌的边缘菌丝为对照,显微镜观察拮抗细菌活性产物对病原菌菌丝形态的影响。

1.2.3 拮抗细菌的鉴定

菌体形态、培养特征观察及生理生化指标测定参照柳凤等^[13]。

16S rDNA 基因序列测定及其系统进化树的构建参照 Todorov 等^[14],提取细菌基因组 DNA 为模板,以 F27(5'-TACGGTACCTTGTACACT-3')和 R1492(5'-CTGAGCCAGGATCAAAC-3')为上、下游引物扩增菌株的16S rDNA。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测后送上海生工生物工程有限公司进行序列测定。登陆NCBI网站,将测序结果用BLAST软件进行同源性比较,提交注册登录号。以Clustal X进行多序列比对后,用MEGA 4.0的Neighbor-Joining法构建系统发育树,并进行1000次Bootstraps检测。

1.2.4 FB-16 抑菌物质的提取

将拮抗细菌 FB-16 接种到 LB 液体培养基中,对照为 LB 液体培养基,28℃、150 r/min 振荡培养 24 h,10000 r/min 离心 20 min,去菌体,加入不同质量的硫酸铵,使硫酸铵饱和度分别为 10%、20%、25%、30%、35%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%,4℃下静置沉淀 24 h,弃上清,沉淀用 25 mmol/L 磷酸缓冲液溶解,透析脱盐后与烟草黑胫病菌对峙培养,36 h 后用滤纸片法^[15]测定抑菌圈直径。

1.2.5 温室防病试验

刮下在燕麦培养基上培养 7 天的黑胫病菌菌丝,加入 0.1% KNO₃ 溶液浸泡,加无菌水搅碎,8℃下放置 20 min 后稀释 10 倍,加入 1% 葡萄糖后备用。将拮抗细菌粗提物制备成 0.01 g/mL 的活性产物粗提液。盆栽试验使用灭菌菜地土,装入 10 cm × 10 cm 的盆栽钵中,移栽后在接黑胫病菌前 5 天灌施拮抗细菌粗提液,每次每株 10 mL。对照药剂 58% 甲霜·锰锌可湿性粉剂以 500 倍液于接种黑胫病菌

前 24 h 灌根,每株 10 mL,设清水处理为空白对照,每个处理 15 株,3 次重复。当烟苗长至 6~7 片真叶时接种烟草黑胫病菌,每株 10 mL,接种前用少量清水润湿土壤。处理后将植株置于 20℃ 黑暗条件下 24 h,再置于 28℃ 室温培养。7 天后调查烟草植株发病情况,统计发病率和病情指数,计算相对防治效果。防治效果(%) = [(对照病情指数 - 处理病情指数) / 对照病情指数] × 100^[16]。

1.2.6 数据分析

采用 SPSS 16.0 软件中的 Duncan 氏新复极差法对所有数据进行单因素分析。

2 结果与分析

2.1 烟草根际拮抗细菌的筛选

采集烟草根际土壤样品 30 份,分离得到 347 株细菌。以烟草黑胫病菌、番茄灰霉病菌、苹果轮纹病菌、小麦根腐病菌、棉花枯萎病菌、稻瘟病菌 6 种真菌为供试植物病原真菌,初筛拮抗细菌 109 株,通过发酵液抗性复筛,发现其中 48 株的拮抗作用较为明显,培养 72 h 后,对各病原菌抑菌带宽均在 7 mm 以上。其中菌株 FB-16 对 6 种病原真菌的拮抗活性较好,抑菌带宽均在 15 mm 以上,对烟草黑胫病菌的抑菌带宽为 23 mm,与苹果轮纹病菌、小麦根腐病菌、棉花枯萎病菌、稻瘟病菌均达显著差异(表 1)。

2.2 菌株 FB-16 发酵液对菌株生长的抑制率

菌株 FB-16 发酵液对烟草黑胫病菌、番茄灰霉病菌、小麦根腐病菌、稻瘟病菌的抑制率达到 90% 以上,其中对烟草黑胫病菌的菌丝生长抑制率达 95.96%,说明菌株 FB-16 抑菌效果较好(表 1)。

2.3 菌株 FB-16 对菌丝生长的抑制作用

菌株 FB-16 分泌产生的次生代谢物使得植物病原真菌的菌丝顶端和分枝处较为膨大;菌丝分枝增多,粗而短;菌丝体内部细胞原生质体分布不均匀,浓缩成不规则体,部分菌丝内原生质有流出形成空壳的现象(图 1-a)。对照菌丝生长细长而均匀,细胞结构较为清晰,并无膨大畸形现象(图 1-b)。

2.4 菌株 FB-16 的鉴定

2.4.1 培养性状、形态学特征及生理生化特征

拮抗细菌 FB-16 为革兰氏染色阳性菌,在 LB 固体培养基上菌落呈圆形、不光滑、不透明、边缘不规则、表面褶皱,菌落呈乳白色至黄色,具有一定的粘附性。显微镜下观察,菌体呈杆状,长约 2 μm,单生,周生鞭毛,可形成内生芽胞,芽胞呈椭圆形(图 2)。

表 1 菌株 FB-16 对供试病原真菌的拮抗作用

Table 1 Determining pathogen fungal antagonism of strain FB-16

病原真菌 Pathogenic fungus	抑菌带宽(mm) Inhibition zone	抑制率(%) Inhibitory rate	病原真菌 Pathogenic fungus	抑菌带宽(mm) Inhibition zone	抑制率(%) Inhibitory rate
烟草黑胫病菌 <i>P. nicotianae</i>	23.00 ± 1.00 A	95.96 ± 1.27 A	番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	22.33 ± 0.58 A	95.68 ± 1.85 A
苹果轮纹病菌 <i>P. piricola</i>	15.67 ± 1.15 C	80.69 ± 1.43 C	小麦根腐病菌 <i>B. sorokiniana</i>	19.00 ± 1.00 B	90.66 ± 0.94 B
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	18.00 ± 1.00 B	88.11 ± 0.15 B	稻瘟病菌 <i>P. oryzae</i>	19.67 ± 0.58 B	94.49 ± 1.12 A

注:表中数据为平均值 ± 标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.01$ 水平差异显著。Note: The data are mean ± SD. The different letters in the same column show significant difference at $P < 0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

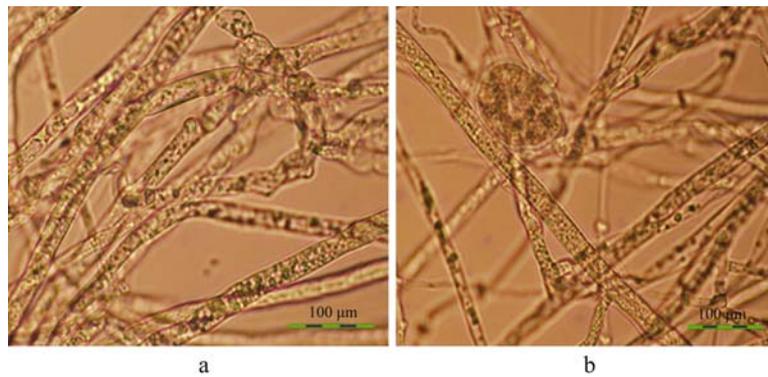


图 1 菌株 FB-16 对烟草黑胫病菌菌丝生长的抑制作用

Fig. 1 Inhibiting effect of stain FB-16 on *Phytophthora nicotianae*

注:a:受抑制的病菌菌丝;b:正常菌丝。Note: a: Abnormal mycelium; b: normal mycelium.

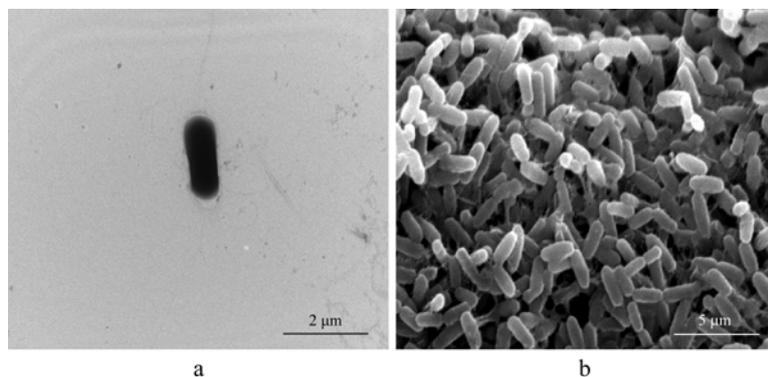


图 2 透射电镜(a)和扫描电镜(b)下菌株 FB-16 形态

Fig. 2 Images of strain FB-16 from transmission (a) and scanning (b) electron microscopy

菌株生理生化特征表明:菌株 FB-16 可以使明胶液化;能水解淀粉和还原硝酸盐;葡萄糖、蔗糖、接触酶及氧化酶均呈阳性;甲基红试验、V-P 试验及柠檬酸盐生长试验为阳性;不利用丙二酸盐;不产生吡啶;不产生 H_2S ;葡萄糖发酵不产气。最高生长温度为 $50^\circ C$,最低生长温度为 $15^\circ C$,最适生长温度为 $25 \sim 30^\circ C$;最高 pH 值为 8.0,最低 pH 值为 5.0,最适 pH 值为 $6.0 \sim 6.5$;具有耐盐性,可以在 10% 的 NaCl 培养基中生长(表 2)。

2.4.2 16S rDNA 序列分析与系统进化树构建

以 FB-16 基因组 DNA 为模板,用引物 F27 和 R1492 进行 PCR 扩增,测得该菌株的 16S rDNA 核苷酸序列长度为 1 472 bp, GenBank 登录号为 JN245982。通过与 NCBI 中模式菌株的 16S rDNA 序列比对分析和系统发育树的构建(图 3),可知菌株 FB-16 与解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* FZB42^T 进化关系最近,同源性达到 99.728%。综合菌株的培养特征、形态和生理

表 2 菌株 FB-16 的生理生化特征

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of strain FB-16

测试项目 Test item	结果 Result	测试项目 Test item	结果 Result
接触酶 Peroxidase	+	柠檬酸盐 Citrate solution	+
葡萄糖产气 Glucose gas production	-	生长温度 Growth temperature (°C)	10 -
淀粉水解 Starch hydrolysis	+		30 +
吲哚试验 IPA test	-		50 +
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+		55 -
甲基红试验 Methyl red	+	pH	4.4 -
V-P 试验 V-P test	+		5.7 +
明胶液化 Hydrolysis of gelatin	+		8.0 +
硫化氢 H ₂ S production	-		9.5 -
丙二酸盐 Malonate utilize	-	NaCl	5% +
蔗糖 Sucrose	+		7% +
氧化酶 Oxidase	+		10% +
葡萄糖 Glucose	+		15% -

注: + : 阳性反应; - : 阴性反应。Note: + : Positive; - : negative.

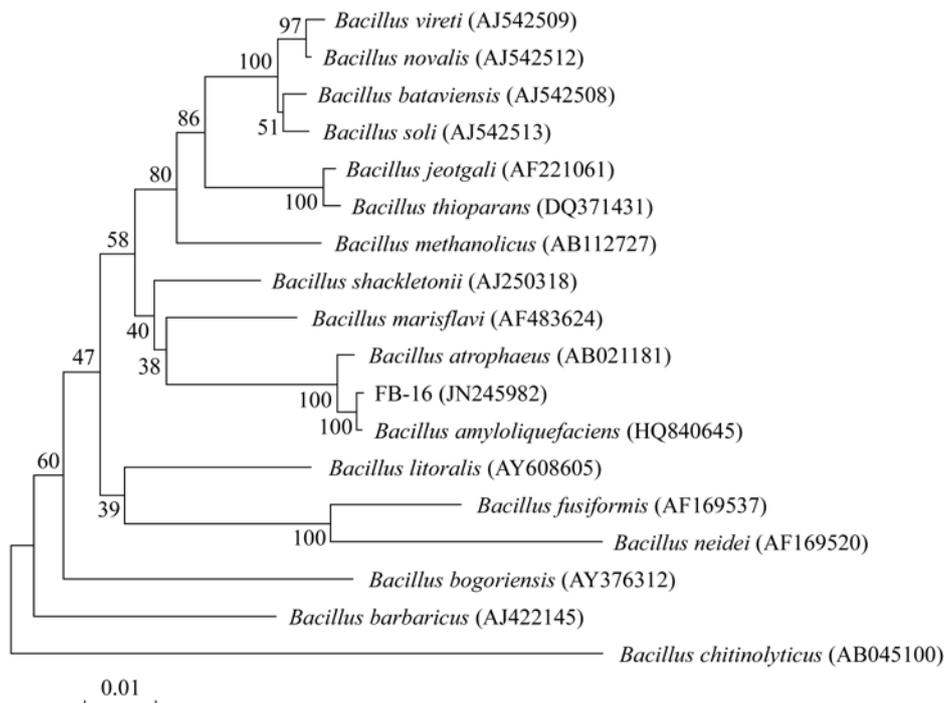


图 3 菌株 FB-16 的系统进化树

Fig. 3 Evolutional tree of strain FB-16

生化特征及 16S rDNA 序列分析结果, 菌株 FB-16 为解淀粉芽胞杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens*。

2.5 菌株 FB-16 抑菌物质的抑菌活性

菌株 FB-16 能够分泌胞外抑菌物质, 饱和度为 35% 及 35% 以上时无沉淀析出, 即对烟草黑胫病菌无抑菌活性, 而饱和度 10% ~ 30% 硫酸铵获得的抑菌物质对烟草黑胫病菌均具有抑菌活性, 但抑菌活

性不同, 其中, 饱和度 25% 硫酸铵获得抑菌物质的抑菌圈直径较大, 即抑菌活性较高 (表 3)。

2.6 菌株 FB-16 活性物质的温室防病效果

菌株 FB-16 活性产物粗提液处理的烟草植株在接种烟草黑胫病 7 天后的发病率为 43.33%, 病情指数为 27.92, 防治效果为 69.96%; 而对照药剂 58% 甲霜·锰锌可湿性粉剂 500 倍液处理的发病率

表 3 不同饱和度硫酸铵获得 FB-16 抑菌物质的抑菌活性

Table 3 Antifungal activity of ammonium sulfate precipitation of the antagonists from strain FB-16

硫酸铵饱和度(%) Ammonium sulfate saturation concentration	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone	硫酸铵饱和度(%) Ammonium sulfate saturation concentration	抑菌圈直径(mm) Diameter of inhibition zone
10	35.33 ± 1.53 B	50	—
20	38.67 ± 1.53 AB	60	—
25	42.00 ± 1.00 A	70	—
30	36.33 ± 1.53 B	80	—
35	—	90	—
40	—	100	—

注:表中数据为平均值 ± 标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.01$ 水平差异显著。Note: The data are mean ± SD. The different letters in the same column show significant difference at $P < 0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

为 36.67%, 病情指数为 22.92, 防治效果为 75.34% (表 4)。说明拮抗菌 FB-16 对烟草黑胫病有较好的

预防效果, 菌株 FB-16 及其代谢产物可以作为生防制剂应用于烟草黑胫病的防治。

表 4 菌株 FB-16 对烟草黑胫病的温室防治效果

Table 4 Control efficacy of strain FB-16 on tobacco black shank in greenhouse

处理 Treatment	发病率(%) Incidence	病情指数 Disease index	防治效果(%) Control efficacy
FB-16 (0.01 g/mL, 10 mL/plant)	43.33 ± 3.34 B	27.92 ± 0.72 B	69.96 ± 0.55 B
58% 甲霜·锰锌可湿性粉剂 Metalaxyl mancozeb WP (500 ×, 10 mL/plant)	36.67 ± 3.34 C	22.92 ± 0.72 C	75.34 ± 0.59 A
清水对照 CK	100.00 ± 0.00 A	92.92 ± 0.72 A	—

注:表中数据为平均值 ± 标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.01$ 水平差异显著。Note: The data are mean ± SD. The different letters in the same column show significant difference at $P < 0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

本研究从健康烟草根际土壤中分离筛选得到 1 株对烟草黑胫病菌等病原真菌拮抗活性较好的细菌 FB-16。菌株 FB-16 分泌产生的次生代谢物对烟草黑胫病菌菌丝生长的致畸作用, 一方面与发酵液中活性物质能够抑制病原菌正常生长的菌体蛋白的合成有关, 另一方面与拮抗菌产生的某些溶菌酶有关^[17]。温室盆栽试验显示, 菌株 FB-16 活性产物对烟草黑胫病有明显的防治效果, 在烟草黑胫病生物防治中具潜在的利用价值。

经细菌学和分子生物学分类鉴定, 菌株 FB-16 为解淀粉芽胞杆菌 *B. amyloliquefaciens*, 且对多种病原菌有较强的抑制作用。该抑制作用与 FB-16 产生了某种拮抗物质有关, 故用不同饱和度硫酸铵对菌株 FB-16 抑菌物质进行粗提, 结果显示饱和度 25% 硫酸铵获得的抑菌物质抑菌活性最高, 表明该抑菌物质可能是某种蛋白质。

何建清等^[18]研究表明, 在诱发产孢过程中, 受到培养基种类、光照、变温处理及菌株等多种因素的影响。本研究中, 烟草黑胫病菌在 PDA 培养基及燕麦培养基上均未产生孢子, 因此温室盆栽试验采用菌悬液接种病原菌, 故其防效结果与大田有一些出入。

从不同作物根际分离筛选出有益根际细菌, 再施用于作物根部是生防研究的一条捷径。目前, 国内外对烟草黑胫病生防菌株的研究多集中于木霉的研究上, 对芽胞杆菌的研究相对较少^[19]。从抗性、定制能力以及生防效果等方面考虑, 芽胞杆菌的研究价值比木霉高。本研究对菌株 FB-16 菌丝形态进行了观察, 其核酸、蛋白质、细胞壁以及与抗病相关的酶活性变化等还有待于进一步研究。

参考文献(References)

- [1] 孔凡玉, 朱贤朝, 石金开, 等. 我国烟草侵染性病害发生趋势及防治对策. 中国烟草, 1995(1): 31-34

- [2] 王清海, 万平平, 李安娜, 等. 土壤拮抗链霉菌 R-(15) 菌株发酵产物的抑菌作用. 中国农学通报, 2006, 22(2): 327-330
- [3] 陈瑞森, 朱贤朝, 王智发, 等. 全国 16 个主产烟省(区) 烟草侵染性病害调研报告. 中国烟草科学, 1997, 1(4): 1-7
- [4] 蔡勇, 肖启明, 杜桂萍. 烟草黑胫病生物防治的研究进展. 安徽农业科学, 2010, 38(11): 5708-5710, 5743
- [5] 马国胜, 高智谋, 陈娟. 烟草黑胫病研究进展. 烟草科技, 2001(9): 44-48
- [6] Broadbent P. Bacteria and actinomycetes antagonistic to fungal root pathogens in Australian soil. Australian Journal of Biological Sciences, 1971, 24: 925-944
- [7] English J T, Mitchell D J. Relationship between the development of root systems of tobacco and infection by *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*. Phytopathology, 1988, 78: 1478-1483
- [8] Niemann H, Losekann T, de Beer D, et al. Novel microbial communities of the Haakon Mosby mud volcano and their role as a methane sink. Nature, 2006, 443(5227): 854-858
- [9] 张晓舟, 徐剑宏, 李顺鹏. 植病生防芽孢杆菌的分离筛选与初步鉴定. 土壤, 2005, 37(1): 85-88
- [10] 方敦煌, 吴祖建, 邓云龙, 等. 防治烟草赤星病拮抗根际芽孢杆菌的筛选. 植物病理学报, 2006, 36(6): 555-561
- [11] Lamour K H, Hausbeck M K. Effect of crop rotation on the survival of *P. capsici* in Michigan. Plant Disease, 2003, 87(7): 841-845
- [12] 李爱荣, 安德荣. 两株生防荧光假单胞杆菌的室内筛选实验. 微生物学杂志, 2003, 23(4): 11-13
- [13] 柳凤, 欧雄常, 何红, 等. 红树内生细菌 AmS2 菌株对芒果炭疽病菌的抑制作用. 植物保护学报, 2010, 37(5): 453-458
- [14] Todorov S D, Meincken M, Dicks L M T. Factors affecting the adsorption of bacteriocins ST194BZ and ST23LD to *Lactobacillus sakei* and *Enterococcus* sp. Journal of General and Applied Microbiology, 2006, 52: 159-167
- [15] 单文荣, 李俊霞, 刘花粉. 滤纸片法筛选不同活性物对棉花黄萎病菌抑制效果研究. 中国农学通报, 2010, 26(19): 285-289
- [16] 马冠华, 周常勇, 肖崇刚, 等. 烟草内生细菌 Itb57 的鉴定及其对烟草黑胫病的防治效果. 植物保护学报, 2010, 37(2): 148-152
- [17] Picard K, Tirilly Y, Benhamou N. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(10): 4305-4314
- [18] 何建清, 张格杰, 岳海梅, 等. 番茄早疫病菌拮抗放线菌 10-4 的鉴定. 植物保护学报, 2010, 37(4): 307-312
- [19] 王革, 李梅云, 段玉琪, 等. 木霉菌对烟草黑胫病菌的拮抗机制及其生物防治研究. 云南大学学报(自然科学版), 2001, 23(3): 222-226