

DOI:10.13718/j.cnki.zwys.2021.02.002

烟草青枯病的生物防治研究进展^①

何洪令¹, 李钠钾², 孙成成¹,
腾 凯³, 田明慧³, 李石力¹

1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715;
2. 重庆市烟草科学研究所, 重庆 400715;
3. 湖南省烟草公司湘西自治州公司, 湖南 吉首 416000

摘 要: 本文在简述烟草青枯病发生及防治现状的基础上, 着重阐述了烟草青枯病生物防治方法中应用无致病力青枯菌、生防菌及噬菌体等对烟草青枯病的控病效果及研究进展, 指出了现有微生物制剂存在的问题及可深入研究的方

关键词: 烟草; 青枯病; 生物防治

中图分类号: S435.72 **文献标志码:** A **文章编号:** 1007-1067(2021)02-0004-05

1 烟草青枯病的发生及防治

1.1 烟草青枯病的发生

我国烟草种植面积及总产量在世界排名第一. 烟草能够生长的环境受海拔、气温、土壤条件等因素制约, 大多集中在一定区域, 连作现象的普遍发生使得土壤 pH 值降低, 导致在正常施肥状态下烟叶品质及产量下降^[1]. 此外, 连作还会导致土传病原菌大量积累, 土传病害暴发, 造成严重的经济损失.

烟草青枯病(Tobacco bacterial wilt)最典型的症状为叶片枯萎, 茎秆上出现黑色条斑. 引发烟草青枯病的病原菌为青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*), 是一种十分常见的土传病原细菌, 在全世界广泛分布, 寄主植物多达 50 余科, 200 多个属^[2]. 青枯雷尔氏菌一般从烟草的根部伤口、根尖或者次生根侵入, 不能由气孔侵入, 最终在木质部定殖, 产生大量的胞外多糖, 堵塞维管束组织使得营养不能正常供给, 从而导致烟株单侧叶片萎蔫, 叶片发黄坏死, 烟株生长发育缓慢, 最终整株死亡^[3].

1.2 烟草青枯病的防治现状

目前, 对于烟草青枯病的防治方法主要有休耕轮作、培育抗病品种、化学防治、生物防治等, 虽然在一定程度上可以减轻烟草青枯病的发生, 但是仍然存在一定的局限性.

在休耕轮作方面, 一是耕地资源十分有限, 二是适合烟草种植的环境也受到制约, 根本没有办法大规

① 收稿日期: 2021-01-15

基金项目: 中国烟草总公司重庆市公司烟草科学研究所科技项目(C20203NY4101); 湖南省烟草公司湘西州公司技术开发项目(2020433100200183).

作者简介: 何洪令, 硕士研究生, 主要从事烟草青枯病拮抗细菌研究. E-mail: 1790800095@qq.com

通信作者: 李石力, 博士, 主要从事根际微生态与病害调控研究. E-mail: yuanls2016@swu.edu.cn

模推广.在培育抗病品种方面,迄今为止,还未培育出一种可有效抗烟草青枯病的品种,陆宁等^[4]对12个烤烟品种通过十二孔板、培养皿小苗、菌液灌根、注射接菌等方法进行抗烟草青枯病的品种筛选,研究表明,K326、贵烟等品种对烟草青枯病存在一定抗性.由于抗病品种的匮乏,选育抗病品种的过程复杂,难度较大,且存在抗性效果不好,抗性容易丧失等现象,仍需要不断的探索及大量的研究支持.在化学防治方面,长期连作的植烟土壤由于养分比例失调,导致烟株生长发育不良,病虫害大发生,所以在烟草生产上就会投入大量的肥料及化学农药,而烟草青枯病之类的细菌性土传病害很难通过杀菌剂进行简单的靶标性防控,所以农药的使用效果不够明显,而且病原菌容易产生抗药性,加大浓度使用农药又使得烟叶农药残留超标,带来土壤环境污染及烟叶安全性问题^[5].从可持续发展的角度出发,寻找一种高效且绿色的防控烟草青枯病的方法成了研究者们亟需攻破的难题.

生物防治具有安全无公害、长效等优点,尤其是利用微生物之间的营养竞争、生态位竞争及拮抗物质的产生等方式抑制病原菌的积累,从而减轻病害的发生,这是当前防控烟草青枯病的研究热点.土传性病害的暴发,很大程度上是由于土壤微生态的失衡.众多研究表明,土壤环境中的微生物在维持土壤生态平衡,保护土壤健康方面发挥着重要作用.筛选有针对性的防控烟草青枯病的有益微生物,调控土壤微生态平衡,增强土壤自身的免疫力,对烟草青枯病的防治具有重要意义.

2 烟草青枯病的生物防治

2.1 无致病力青枯病菌在防治烟草青枯病上的应用

自 Okabe^[6]于1954年首次发现青枯不同菌株之间存在拮抗作用以来,许多研究者开展了利用无致病力的青枯菌防治烟草青枯病的研究.无致病力的青枯菌菌株可以产生抑制青枯菌生长的细菌素,从而抑制烟草青枯病的发生.Chen等^[7]通过温室和田间试验表明,无致病力青枯菌菌株产生的细菌素对烟草青枯病有一定的防治效果,但是后期防效降低.肖田等^[8]采用室内平板喷雾法对从茄子、辣椒、番茄、烟草青枯病病株中分离出的116株无致病力青枯菌进行拮抗筛选试验,结果表明,其中有21株无致病力青枯菌菌株对青枯菌的生长有明显抑制作用;利用烟草品种 MsK326 进行室内盆栽试验的结果显示,无致病力青枯菌菌株 Tmjd1-3 和 Aujd8-2-1 可有效减轻烟草青枯病的发生,20 d 后的相对防效分别为 58.4% 和 97%.同时,他们还发现无致病力青枯菌自身分泌的体外活性物质与生防作用可能相关.此外,福建省农业科学院利用无致病力青枯病菌研制出一种新型的“植物疫苗”,可有效防治相关植物青枯病的发生^[9].上述研究表明,无致病力青枯菌可有效防控烟草青枯病的发生,其原理一是无致病力青枯菌可以分泌抑菌活性物质抑制烟草有致病力青枯菌的生长,二是无致病力青枯菌通过生态位竞争、诱导植株抗性等机制抑制烟草青枯病的发生^[10-11].

2.2 生防菌在防治烟草青枯病上的应用

2.2.1 芽孢杆菌

芽孢杆菌(*Bacillus* spp.)是一类好氧或兼性厌氧且可以产生抗逆性内生孢子的杆状细菌,在土壤中含菌量十分丰富,具有分离频率高、极易培养和保存、有效期长等特性,是生防菌中重要的研究对象^[12].目前,在烟草青枯病防治上效果较好的芽孢杆菌主要有枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、多粘芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)等^[13-16].彭细桥等^[17]从湖南桂阳烟草青枯病发生较重的地区采集的健康烟株上,共分离到160株内生细菌菌株.通过对峙培养法共筛选到32个菌株对烟草青枯菌有拮抗作用,其中H-1、H-9和H-11抑菌圈分别为3.0, 3.0, 4.5 mm,有较强的拮抗作用.鉴定结果为H-1为枯草芽孢杆菌,H-9和H-11为短芽孢杆菌.段燕平等^[18]从云南和贵州烟草青枯病发生较重的地区采集的600份健康烟草根际土壤,筛选出1株枯草芽孢杆菌,通过平板拮抗试验,表明对青枯菌具有较好的拮抗效果,在后续的盆栽试验中,其相对防效达到

66.0%，并发现蛋白多肽类物质为枯草芽孢杆菌的主要抑菌活性物质。陈巧玲等^[19]通过荧光定量PCR技术，研究了生物有机肥对盆栽烟草根际青枯病原菌和拮抗菌动态变化的影响。研究表明，施用添加了短芽孢杆菌的生物有机肥能显著降低烟草青枯病的发生，抑制土壤中青枯菌的增长，并且对烟草还有促生作用。

2.2.2 假单胞杆菌

假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)通过强大的繁殖能力，能够在植物的根部快速繁殖，形成保护体，不但能够阻止病原菌的侵染、定殖，还可以保护植物的根部，促进植物的生长，因而受到研究者的广泛关注。在假单胞菌属中对荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)报道较多。其中，荧光假单胞菌是国内应用较多的一种生防菌，已经进行了农药产品登记，进行商业化生产。柳辉林等^[20]通过对荧光假单胞菌3 000亿个/g粉剂进行田间药效试验，结果表明，在每667 m²用量为512.5~662.5 g的范围内，烟叶收获80%时调查，其增产率在25%以上，对烟草青枯病的防治效果在54.1%以上。西南大学张伏军^[21]从重庆黔江石郎烟区烟草根际土壤中分离得到一株铜绿假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)命名为SWU31-2，通过菌株在烟草上的定殖及盆栽试验，验证了对烟草青枯病有较强拮抗活性。另外，有相关研究表明，假单胞杆菌在根际定殖时，之所以会抑制病原菌的生长，是其会产生噬铁素，同时还促进了植物的生长^[12]。

2.2.3 链霉菌

链霉菌属于放线菌的一种，工业上用于抗生素的生产，自然界中70%以上的抗生素均由链霉素菌产生，利用它们可有效防控烟草青枯病。陆铮铮等^[22]从烟草根围土壤中分离了97株放线菌，通过平板对峙培养法筛选出3株拮抗作用较强的链霉菌，其平均抑菌圈直径为：粉红孢类群中的玫瑰暗黄链霉菌(*S. roseofulvus* *Preobrazhenskaya*)54.66 mm，绿色类群中的橄榄绿链霉菌(*S. olivaceoviridis* *Preobrazhenskaya*)43.20 mm，灰褐类群中的黄麻链霉菌(*S. corchorusii* *Ahmed*)20.34 mm。倪海军^[23]采用滤纸片法对安徽皖南烟区采集的土壤筛选烟草青枯病的拮抗菌，在筛选出的6株拮抗菌中，菌株XC4抑菌效果较好且稳定，抑菌圈直径为12.5 mm，通过形态学观察、分子鉴定、生理生化特性测定和美国Biolog微生物鉴定系统等方法对其进行鉴定，该菌株为绿褐色链霉菌(*Streptomyces viridobrunneus*)。有相关报道称，将3种链霉菌制作成种子包衣剂处理植物种子能有效防治青枯病^[24]。

2.2.4 菌根真菌

由于菌根真菌能够和植物根系紧密结合，一部分在植物根系内，一部分在植物根系外，以增加植物与环境之间的联系，可以用来防治烟草青枯病，从而引发了研究者的广泛关注。自然环境中木霉属真菌分布广泛，其中哈茨木霉已形成产品，以其分生孢子制剂用于田间的病害防控^[25]。曾维爱等^[26]为了探究接种不同丛枝菌根真菌及其结合生防制剂对烟株、烟叶品质及烟草青枯病的影响，通过漂浮育苗技术，在播种期分别接种摩西球囊霉、聚丛球囊霉及生防制剂，结果显示，各处理青枯病的发病率均低于空白对照，其中接种摩西球囊霉+生防制剂(20 mL)处理还可改善烟株的生长状况。刘先良等^[27]通过盆栽试验研究了接种丛枝菌根真菌对烟草青枯病的防控效果以及丛枝菌根对抗病相关酶活性及丙二醛含量的影响。结果表明，接种丛枝菌根真菌可有效促进烟株的生长，且烟叶叶片过氧化物酶活性增加，丙二醛含量下降，说明接种丛枝菌根真菌可提高烟株对烟草青枯病的抗性。

2.3 噬菌体在防治烟草青枯病上的应用

噬菌体(Phage)是可以侵袭细菌的一类病毒，由于噬菌体吸附器官与受体菌表面的受体分子互补，决定了其宿主特异性。噬菌体是病毒中最为普遍和分布最广的群体，可在一些充满细菌群落的地方，如泥土、动物的肠道里找到它们。有研究者通过对烟地土壤中青枯菌的噬菌体进行筛选，并使其成为有效防治烟草青枯病的生物防治方法。例如，胡蓉花等^[28]采用双层平板培养分离法，对江西省吉安市烟田采集的土壤样

本进行青枯菌噬菌体的分离,共分离出6个青枯菌噬菌体,并验证了噬菌体间生物学特性存在的差异,其中噬菌体 P2Tb1556 对氯仿敏感,而对紫外光和乙醚不敏感.高苗^[29]从烟草青枯病病圃健康烟株的根际土壤中分离出一株噬菌体,通过形态学、分子生物学等技术进行鉴定并且通过盆栽灌根试验确定了其对烟草青枯病的影响,相对防效达到 94.87%;此外,还利用宏基因组学明确了其对土壤细菌微生物种群多样性的影响.但由于噬菌体的高度特异性,使其应用的范围有所局限.

3 问题与展望

到目前为止,尽管对烟草青枯病生物防治的研究取得了突破性进展,已有众多研究者进行生物防治材料的筛选和对烟草青枯病的防治效果评价,市面上出现的微生物活性制剂也越来越多,但是微生物制剂的使用往往受环境的影响较大,其稳定性尚待提高.微生物制剂使用后,对土壤环境及其他微生物的影响也需要更多的数据来验证.微生物制剂对烟草青枯病的控病机理,微生物菌剂在施用到土壤环境中后能否保证其活性,将微生物菌剂与生物菌肥进行复配能否提高其对烟草青枯病的控病效果,以及将无致病力菌株、微生物菌剂、噬菌体等生物防治手段结合,能否更加有效地控制烟草青枯病的发生等都是需要后续进一步的研究.

参考文献:

- [1] 张长华,王智明,陈叶君,等.连作对烤烟生长及土壤氮磷钾养分的影响[J].贵州农业科学,2007,35(4):62-65.
- [2] KAWASAKI, TAKERU, SATSUMA, et al. Monitoring of Phytopathogenic *Ralstonia solanacearum* Cells Using Green Fluorescent Protein-Expressing Plasmid Derived from Bacteriophage ϕ RSS1 (GENETICS, MOLECULAR BIOLOGY, AND GENE ENGINEERING)[J]. Journal of Bioscience & Bioengineering, 2007, 106(6): 451-456.
- [3] GENIN, STEPHANE. Molecular Traits Controlling Host Range and Adaptation to Plants in *Ralstonia solanacearum*[J]. New Phytologist, 2010, 187(4): 920-928.
- [4] 陆宁,任学良,汪汉成,等.不同烤烟品种(系)对青枯病的抗性鉴定[J].湖北农业科学,2015,54(4):864-867.
- [5] 王津军,刘永军,王朝佐,等.农药残留对烟叶安全性的影响及中国烟草农药残留的现状[C].昆明:云南省烟草学会2007—2008年度学术年会,2008.
- [6] OKABE N. Studies on *Pseud solanacearum*: V. Antagonism Among the Strains of *P solanacearum*[J]. Reports of the Faculty of Agriculture Shizuoka University, 1954, 4: 37-40.
- [7] CHEN W Y, ECHANDI E. Effects of Avirulent Bacteriocin-Producing Strains of *Pseudomonas solanacearum* on the Control of Bacterial Wilt of Tobacco[J]. Plant Pathology, 2010, 33(2): 245-253.
- [8] 肖田,肖崇刚,邹阳,等.青枯菌无致病力菌株对烟草青枯病的控病作用初步研究[J].植物保护,2008,34(2):79-82.
- [9] 福建省农业科学院.福建研制成功“植物疫苗”,有效防治植物青枯病[J].福建农业科技,2011(5):15.
- [10] 郑雪芳,刘波,朱育菁,等.青枯菌无致病力菌株 FJAT-1458 与强致病力株 FJAT-91 的竞争生长作用[J].中国生物防治学报,2019,35(1):75-80.
- [11] 陈庆河,翁启勇,胡方平.无致病力青枯菌株对番茄青枯病的防治效果[J].中国生物防治,2004,20(1):42-44.
- [12] 陈程,黎定军,陈武.烟草青枯病生物防治研究进展[J].作物研究,2011,25(6):639-642.
- [13] 杨合同,唐文华,迟建国,等.植病生防菌株 B1301 的种类鉴定及其对生姜青枯病的作用机理和防治效果[J].中国生物防治,2002,18(1):21-24.
- [14] 汪汉成,王茂胜,黄艳飞,等.烟草青枯病拮抗菌株 X-60 的分离鉴定及其表型组学分析[J].植物病理学报,2016,46(3):409-419.
- [15] 陈志敏,彭业敏,张晓阳,等.烟草青枯病田间防治药剂的筛选[J].湖南农业科学,2012(7):79-81.
- [16] 易有金,肖浪涛,王若仲,等.内生枯草芽孢杆菌 B-001 对烟草幼苗的促生作用及其生长动态[J].植物保护学报,2007,34(6):619-623.
- [17] 彭细桥,刘红艳,罗宽,等.烟草内生青枯病拮抗菌的筛选和初步鉴定[J].中国烟草科学,2007,28(2):38-40.
- [18] 段燕平,杨金广,杨继洪,等.抗烟草青枯病菌的枯草芽孢杆菌 SH7 的筛选与鉴定[J].吉林农业大学学报,2012,34(1):52-57.
- [19] 陈巧玲,胡江,汪汉成,等.生物有机肥对盆栽烟草根际青枯病原菌和短芽孢杆菌数量的影响[J].南京农业大学学报,2012,35(1):75-79.
- [20] 柳辉林,张剑,徐隆根,等.荧光假单胞菌 3000 亿个/克粉剂防治烟草青枯病田间药效试验[J].农药科学与管理,2008,29(6):24-26.

- [21] 张伏军. 烟草青枯菌拮抗细菌 swu31-2 的分离及其生物防治效果的研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2008.
- [22] 陆铮铮, 彭丽娟, 丁海霞, 等. 烟草青枯菌拮抗放线菌的筛选及鉴定 [J]. 中国烟草科学, 2013(2): 54-58.
- [23] 倪海军. 烟草青枯病拮抗菌的筛选及其生防应用研究 [D]. 合肥: 合肥工业大学, 2016.
- [24] EL-ABYAD M S, EL-SAYED M A, EL-SHANSHOURY A R, et al. Towards the Biological Control of Fungal and Bacterial Diseases of Tomato Using Antagonistic *Streptomyces* Spp.[J]. Plant and Soil, 1993, 149(2): 185-195.
- [25] 屈海泳, 刘连妹, 王雪梅. 木霉菌在生物防治上应用的研究进展 [J]. 湖北农业科学, 2009, 48(3): 743-746.
- [26] 曾维爱, 龙世平, 李宏光, 等. 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.
- [27] 刘先良, 习向银, 申 鸿, 等. 接种丛枝菌根真菌对烟草青枯病抗性的影响 [J]. 烟草科技, 2014(5): 94-98.
- [28] 胡蓉花, 余成鹏, 任敏华, 等. 烟草青枯病菌噬菌体分离及其生物学特性研究 [J]. 广东农业科学, 2019, 46(11): 78-84.
- [29] 高 苗. 青枯雷尔氏菌噬菌体的分离鉴定及应用研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.

Advances in Research of Biological Control of Tobacco Bacterial Wilt

HE Hong-ling¹, LI Na-jia², SUN Cheng-cheng¹,
TENG Kai³, TIAN Ming-hui³, LI Shi-li¹

1. School of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Chongqing Institute of Tobacco Science, Chongqing 400715, China;

3. Xiangxi Autonomous Prefecture Branch of Hunan Tobacco Company, Jishou Hunan 416000, China

Abstract: Based on a brief description of the present situation of the occurrence and control of tobacco bacterial wilt, this article focuses on the control efficacy of non-pathogenic bacterial wilt bacteria, biocontrol bacteria and bacteriophages in biological control of tobacco bacterial wilt and the advances of researches in this respect. Finally, it points out the existing problems of the microbial preparations available at present and the directions for further research.

Key words: tobacco; bacterial wilt; biological control