

姜瘟致病菌的分离鉴定及其生防芽胞杆菌的筛选

郑雪芳^{1#}, 舒江霞^{2#}, 王阶平¹, 杨晨³, 车建美¹, 肖荣凤¹, 陈梅春¹, 刘波^{1*}

1 福建省农业科学院资源环境与土壤肥料研究所, 福建 福州 350003

2 中福海峡平潭发展股份有限公司, 福建 福州 350000

3 湖南农业大学 植物保护学院, 湖南 长沙 410125

郑雪芳, 舒江霞, 王阶平, 杨晨, 车建美, 肖荣凤, 陈梅春, 刘波. 姜瘟致病菌的分离鉴定及其生防芽胞杆菌的筛选[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 136-149.

ZHENG Xuefang, SHU Jiangxia, WANG Jieping, YANG Chen, CHE Jianmei, XIAO Rongfeng, CHEN Meichun, LIU Bo. Isolation and identification of the causal organisms of ginger bacterial wilt and screening of *Bacillus* strains for biocontrol[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 136-149.

摘要:【目的】探究湖南省郴州市姜瘟发病情况, 鉴定病原菌, 筛选出拮抗生防菌, 为姜瘟的有效控制提供依据。【方法】系统调查湖南省郴州市生姜主产区姜瘟发生情况, 采集具有典型症状的姜块及其根系土壤, 分离其病原菌, 通过形态特征和分子鉴定确定病原菌的种属, 通过回接姜苗确定其致病性; 基于内源葡聚糖酶基因 *egl* 对分离的青枯雷尔氏菌进行序列变种鉴定; 以分离鉴定到的病原菌为靶标菌筛选生防芽胞杆菌, 并测定其防效。【结果】田间姜瘟平均发病率 8.52%; 从姜瘟病块分离到 2 株病原菌(FJAT-15492 和 FJAT-15494), 姜瘟根系土壤分离到 3 株病原菌(FJAT-15495、FJAT-15496 和 FJAT-15497); 经鉴定 FJAT-15492 为桑树肠杆菌(*Enterobacter mori*), 而其他 4 株菌为青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*); 致病性测定结果表明, 分离的桑树肠杆菌和青枯雷尔氏菌均会引起姜瘟病害。病原菌分布特性分析显示, 青枯雷尔氏菌在病姜块及其根系土壤中均有分布, 而桑树肠杆菌只在病姜块中分布, 且分布数量(1.33×10^3 CFU/g)显著低于青枯雷尔氏菌的分布数量(5.67×10^3 CFU/g)。演化型和序列变种鉴定结果表明, 分离到青枯雷尔氏菌属于演化 I 型, 序列变种 14; 通过抑菌圈试验发现, 短短芽胞杆菌(*Bacillus brevis*) FJAT-JK-2 对青枯雷尔氏菌、贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*) FJAT-54560 对桑树肠杆菌有较强拮抗作用, 抑菌圈直径分别为 19.41 mm 和 16.11 mm, 对姜瘟的室内防效分别为 69.45%和 61.11%。然而将 2 种生防菌发酵液按等体积混合对姜瘟的田间防效达 52.57%。【结论】本研究鉴定出姜瘟的致病菌, 并筛选出 2 株生防芽胞杆菌, 为姜瘟的生物防治提供新的菌株资源。

资助项目: 福建省公益类科研院所专项(2021R1034003); 福建省自然科学基金(2024J01173)

This work was supported by the Special Fund for Scientific Research Institutes in the Public Interest of Fujian Province (2021R1034003) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (2024J01173).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author. E-mail: fzliubo@163.com

Received: 2024-08-14; Accepted: 2024-10-29; Published online: 2024-10-30

关键词: 姜瘟; 桑树肠杆菌; 青枯菌; 芽胞杆菌; 演化型; 序列变种

Isolation and identification of the causal organisms of ginger bacterial wilt and screening of *Bacillus* strains for biocontrol

ZHENG Xuefang^{1#}, SHU Jiangxia^{2#}, WANG Jieping¹, YANG Chen³, CHE Jianmei¹, XIAO Rongfeng¹, CHEN Meichun¹, LIU Bo^{1*}

1 Institute of Resources, Environment and Soil Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian, China

2 Zhongfu Straits (Pingtan) Development Co., Ltd., Fuzhou 350000, Fujian, China

3 College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410125, Hunan, China

Abstract:[Objective] We investigated the occurrence of ginger bacterial wilt, identified the pathogens, and screened the antagonistic bacteria, aiming to provide a scientific basis for the control of the disease. **[Methods]** We systematically investigated the occurrence of bacterial wilt in the main ginger production areas in Chenzhou City, Hunan Province. The ginger tubers with typical symptoms of bacterial wilt and the rhizosphere soil were collected. Major pathogens were isolated and identified based on morphological characteristics and molecular evidence. The pathogenicity of the isolates was determined by inoculation of the isolates to ginger seedlings. Moreover, the sequevars of *Ralstonia solanacearum* isolates were identified based on the endogenous glucanase gene *egl*. Finally, the *Bacillus* strains for biocontrol of the pathogens were screened, and their biocontrol effects were measured. **[Results]** The average incidence of ginger bacterial wilt in the field was 8.52%. Two bacterial strains FJAT-15492 and FJAT-15494 were isolated from diseased ginger tubers, and three bacterial strains FJAT-15495, FJAT-15496, and FJAT-15497 were isolated from the rhizosphere soil of diseased ginger. The strain FJAT-15492 was identified as *Enterobacter mori* and the other four isolates were *R. solanacearum*. Both the isolates of *E. mori* and *R. solanacearum* could infect ginger seedlings and cause bacterial wilt. *R. solanacearum* strains existed in both diseased ginger tubers and rhizosphere soil, while *E. mori* only existed in diseased ginger tubers, with the count (1.33×10^3 CFU/g) lower than that (5.67×10^3 CFU/g) of *R. solanacearum*. Furthermore, the *R. Solanacearum* isolates were identified as phylotype I and sequevar 14. *Brevibacillus brevis* FJAT-JK-2 demonstrated inhibitory effect on *R. solanacearum*, and *Bacillus velezensis* FJAT-54560 on *E. mori*, with inhibition zone diameters of 19.41 mm and 16.11 mm and indoor control effects of 69.45% and 61.11%, respectively. Moreover, the fermentation mixture of the two biocontrol strains had the field control effect of 52.57%. **[Conclusion]** This work identified the pathogens of ginger bacterial wilt and provided two new biocontrol strains against the disease.

Keywords: ginger bacterial wilt; *Enterobacter mori*; *Ralstonia solanacearum*; *Bacillus*; phylotype; sequevar

生姜是姜科植物的根茎,属多年生草本植物,性温、味辛,具有很高的营养价值和药用价值,既作为调味品又集食用、药用为一体,是当前效益较高的创汇农产品之一^[1]。我国是全球生姜产量最多的国家,主产区包括山东、河北、辽宁、湖南、四川、贵州、广西、湖北等。2021年中国生姜种植面积36.89万hm²,产量达1219万t^[2]。姜瘟是一种重要土传病害,在热带和亚热带地区普遍发生,由于姜瘟逐年增加,严重影响了生姜的产量和质量,平常年份减产20%–30%,重病年减产可达50%–70%^[3-4]。

姜瘟通常被认为是由青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*,简称青枯菌)引起^[5-7]。然而,研究人员发现,因姜的品种和种植地域不同,感染姜瘟的致病菌也不同,如姚革等^[8]从四川省南充市南部县姜瘟土壤中分离出镰刀菌和核菌,而其他姜瘟地区则鉴定出瓜果腐霉、软腐欧式杆菌等致病菌;王胜利等^[9]从湖南省江永县姜瘟重病区的土壤分离到*R. solanacearum*和欧文氏杆菌(*Erwinia* spp.);姜艳鹏等^[10]鉴定出山东省安丘市凌河镇姜瘟土样的致病菌为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)。

目前,姜瘟防治主要通过化学防治,但可用于化学防治的低毒、高效药剂较少,且存在环境和农产品污染等问题^[11]。土传病害的生物防治具有重要潜力^[12-13]。研究人员对姜瘟的生物防治作了大量研究,不同类型生防菌如木霉菌、假单胞菌、芽孢杆菌等被筛选并应用到姜瘟防治中^[1,14-16]。芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)是多种植物病原菌的拮抗菌,可以通过分泌抗菌物质、营养和位点竞争、诱导抗性有效预防和控制作物病害^[17],被普遍认为是一种对环境友好、经济有效的防治病害途径^[18];芽孢杆菌能产生具有较强抗逆性的内生孢子,能耐盐、耐酸、耐

高低温且易培养和保存、有效期长等特性,因而受到商家的青睐^[19-20]。贝莱斯芽孢杆菌^[21]、解淀粉芽孢杆菌^[22-23]、枯草芽孢杆菌^[24-25]、多黏芽孢杆菌^[26]、蜡状芽孢杆菌^[27]等均已成功用于作物青枯病的防治。

本研究采集湖南省郴州市姜瘟重病区的姜块和土壤样本进行病原菌的分离和鉴定,对分离到的青枯菌进一步进行演化型和*egl*的序列变种鉴定,并筛选对姜瘟致病菌具有拮抗作用的芽孢杆菌,为后期田间姜瘟的有效控制提供依据。

1 材料与方 法

1.1 病害调查、样本采集和病原菌分离纯化

田间试验选址在湖南省郴州市(24°53′–26°50′N, 112°13′–114°14′E, 海拔150–160 m)属亚热带季风气候,年平均温度18.1℃,平均降雨量达1397.4 mm,全市耕地面积22.71万hm²。2023年6月对湖南省郴州市姜瘟进行病害调查和样本采集。采取点面结合的调查方式调查姜瘟发病率,观察植株和姜块发病症状。选取姜瘟发病严重的田块,将具有典型发病症状植株连根拔起,去除根围土壤,将带有根系土壤和姜块的样本装至塑料袋中,带回实验室进行相关研究。

分别采用2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC)培养基^[28]和营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基^[29]进行青枯菌和其他细菌分离。将病姜切成大小相近的姜块,长宽约1 cm、厚度约0.1 cm,用75%乙醇浸30 s,再转入10%次氯酸钠溶液中浸3 min,无菌水漂洗3次,无菌滤纸吸干。将消毒后的姜块贴片于TTC和NA培养基,30℃培养48 h

后, 观察菌落的形态, 姜块分离到 2 种致病菌(菌株编号分别为 FJAT-15492 和 FJAT-15494), 将菌株纯化后加入终浓度 20% 的甘油, -80°C 保存。

称取 10 g 土壤, 加入 90 mL 无菌水中, 180 r/min 振荡 30 min, 10 倍系列梯度稀释, 将 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 稀释液涂布于 TTC 和 NA 培养基上, 30°C 培养 48 h 后, 观察菌落的形态, 从姜瘟根系土分离到 3 株疑似致病菌(菌株编号分别为 FJAT-15495、FJAT-15496 和 FJAT-15497), 将菌株纯化后, 加入终浓度 20% 的甘油, -80°C 保存。

1.2 病原菌分离致病性测定及再分离

将上述分离的 5 株疑似致病菌在 NA 平板上活化后, 接种营养肉汤(nutrient broth, NB)培养基(0.3% 牛肉浸膏、0.5% 蛋白胨和 1% 葡萄糖), 于 30°C 、180 r/min 振荡培养 48 h 后, 用清水稀释至菌浓度为 1×10^9 CFU/mL, 用于致病力测定。

接种用品种为红皮南姜的生姜苗, 将长势一致的姜苗移栽到盛满土的塑料小钵中(小钵直径 15 cm、高 10 cm), 1 株/盆; 采用灌根接种法, 将上述菌悬液(浓度 1×10^9 CFU/mL)接种姜苗, 接种量 100 mL/盆, 以清水为对照, 每处理 10 株, 置光照培养箱[(30 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 12 h 光照培养, 12 h 暗培养, 相对湿度 80%]。接种后每天观察植株发病情况。

对发病植株的姜块及其根系土壤上的病原进行再分离鉴定, 分离方法与 1.1 相同, 完成柯赫氏法则验证。

1.3 病原菌的形态和分子鉴定

姜块和根系土分离到的菌株在 NA 或 TTC 平板上纯化, 30°C 培养 48 h, 观察菌株的菌落形态特征。

将分离到的病原菌采用 16S rRNA 基因通用引物 27F 和 1492R^[30]进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 2×Easy Taq PCR SuperMix 12 μL , ddH₂O 9 μL , 上、下游引物(10 mmol/L)各 1 μL , 模板 DNA 2 μL 。PCR 反应条件^[30]: 94°C 5 min; 94°C 30 s, 55°C 1 min, 72°C 1.5 min, 30 个循环; 72°C 7 min。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测为目的条带后, 送到福州尚亚生物技术有限公司进行序列测定。将获得序列提交 GenBank 数据库, 登录号为 PP218373.1, 采用 MEGA 6 软件^[31]和邻接(neighbor joining, NJ)法^[32]构建系统发育树, 确定分离的姜瘟致病菌所属的种。

利用青枯菌的特异性检测引物 pehA#6 和 pehA#3 对分离的疑似青枯菌进行分子检测^[33], PCR 反应体系 (25 μL): 2×Easy Taq PCR SuperMix 12 μL , ddH₂O 9 μL , 上、下游引物 (10 mmol/L)各 1 μL , 模板 DNA 2 μL 。PCR 反应程序参考文献^[33]。PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳后, 于凝胶成像仪(Bio-Rad 公司)观察结果。

1.4 青枯菌的演化型鉴定

采用复合 PCR 法鉴定青枯菌演化型, 复合 PCR 引物根据 Fegan 等的报道^[34]合成(表 1)。PCR 反应体系 (25 μL): 2×Easy Taq PCR SuperMix 12.5 μL , 引物 Nmult22:RR (10 $\mu\text{mol/L}$) 4 μL , 其他 6 个引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , DNA 1 μL , ddH₂O 1.5 μL 。PCR 反应程序参考文献^[34]。

1.5 青枯菌的序列变种鉴定

利用引物 Endo-F 和 Endo-R^[35] PCR 扩增青枯菌的 *egl* 基因, 引物序列见表 1。PCR 反应体系和反应程序参考文献^[35], PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测为目的条带后, 送到福州尚亚生物技术有限公司进行序列测定。从

表 1 青枯菌演化型和 *egl* 基因序列变种鉴定的引物序列Table 1 Primers used for phylotype and *egl* gene sequevar identification of the tested *Ralstonia solanacearum* strains

Primer name	Application	Primer sequences (5'→3')	Fragment size (bp)
AU759f	Species-specific primers of <i>R. solanacearum</i>	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	280
AU760r		GTCGCCGTCAAGCAATGCGGAATCG	
Nmult21:1F	The forward primer for phylotype I	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	144
Nmult21:2F	The forward primer for phylotype II	AAGTTATGGACGGTGGAAGTC	372
Nmult23:AF	The forward primer for phylotype III	ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT	91
Nmult22:InF	The forward primer for phylotype IV	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	213
Nmult22:RR	The reversed primer for phylotype identification	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA	
Endo-F	The primers for <i>egl</i> sequevar identification	ATGCATGCCGCTGGTCCGCCG	840
Endo-R		GCGTTGCCCGGCACGAACACC	

GenBank 数据库下载每个变种代表性菌株的 *egl* 基因序列, 用 ClustalX 软件, 将供试菌株 *egl* 基因序列与不同变种的 *egl* 基因序列进行多重比较, NJ 法构建系统发育树, 确定供试青枯菌归属的序列变种。

1.6 姜瘟致病菌的生防芽胞杆菌筛选

以上述分离的姜瘟致病菌桑树肠杆菌和青枯菌为靶标菌, 从已构建的芽胞杆菌资源库中筛选对这 2 种病原菌具拮抗作用的芽胞杆菌。制备含病原菌的双层培养基: 先制备 NA 固体培养基(含 1.8%琼脂), 然后将 1 mL 菌浓度为 1×10^9 CFU/mL 的致病菌与 9 mL NA 半固体培养基(含 0.8%琼脂)混合均匀后倒入 NA 固体培养基上; 用无菌的直径为 7 mm 打孔器在凝固的平板上打孔。供试芽胞杆菌在 NA 培养基上活化后, 接种 NB 培养基, 30 °C、180 r/min 振荡培养 48 h, 培养液过 0.22 μ m 滤膜后, 加入双层培养基的孔中, 以无菌水作为阴性对照, 链霉素作为阳性对照, 链霉素在桑树肠杆菌和青枯菌为靶标菌双层培养基中的添加浓度分别为 100 mg/mL 和 200 μ g/mL, 设 5 个重复, 30 °C 培养 48 h 后, 测量抑菌圈直径。

1.7 生防芽胞杆菌对姜瘟防治效果

1.7.1 室内防效测定

将上述筛选到的生防芽胞杆菌(FJAT-JK-2

对青枯菌具有拮抗和 FJAT-54560 对桑树肠杆菌具有拮抗)在 NA 培养基上活化后, 接种 NB 培养基, 于 30 °C、180 r/min 振荡培养 24 h 后, 菌液稀释至 10^8 CFU/mL, 设不同处理, 处理 1 (TR1): 灌根接种法预接种 FJAT-JK-2 于姜盆栽苗(2–3 叶龄)上, 3 d 后接种青枯菌, 生防菌与病原菌接种浓度均为 10^8 CFU/mL, 接种量均为 100 mL/盆; 对照组 1 (CK1): 姜苗未接种生防菌, 3 d 后接种青枯菌, 100 mL/盆; 处理 2 (TR2): 灌根接种法预接种 FJAT-54560 (菌浓度 10^8 CFU/mL), 3 d 后接种桑树肠杆菌(菌浓度 10^8 CFU/mL), 100 mL/盆; 对照组 2 (CK2): 姜苗未接种生防菌, 3 d 后接种桑树肠杆菌 100 mL/盆; 上述各处理 12 株姜苗, 设 3 个重复。接种后每天观察植株发病情况, 统计发病率, 并计算生防菌对姜瘟的防治效果。

1.7.2 田间防效测定

田间试验田块选取姜瘟样本采集地。将生防菌 FJAT-JK-2 和 FJAT-54560 的发酵液(制备方法与 1.7.1 相同)稀释至 10^8 CFU/mL, 等体积混合后, 灌根接种生姜植株(处理组), 500 mL/株, 每 10 d 灌根处理 1 次, 连续处理 5 次, 清水为对照, 处理组和对照组各 3 田块(初始发病率均约 8.5%), 于最后 1 次接种处理后 5 d, 统计田间姜瘟发病率, 并计算生防菌的田间防治效果。

$$DI=(dn/tn)\times 100\% \quad (1)$$

$$CE=(DI_{TR}-DI_{CK})/DI_{CK}\times 100\% \quad (2)$$

式中: DI 为发病率, dn 为发病株数, tn 为调查株数, CE 为防治效果, DI_{TR} 为处理组发病率, DI_{CK} 为对照组发病率。

2 结果与分析

2.1 姜瘟田间发病调查、致病菌的分离、形态特征及致病性测定

2023年7月对湖南省郴州市汝城县姜瘟调查发现,生姜种植田块发病较为严重(随机抽查8个田块),田间平均发病率8.52%(图1A)。发病姜块根部呈现出黄褐色,严重时内部组织发生软化腐烂,挤压会有白色浓液流出(图1B)。初发病时叶片边缘卷曲,黄化,至整个叶片退绿、枯萎。

从姜瘟病块样本分离到2株致病菌,菌株

编号分别为FJAT-15492和FJAT-15494,从姜瘟根系土壤分离到3株致病菌,菌株编号分别为FJAT-15495、FJAT-15496和FJAT-15497。其中菌株FJAT-15492在NA培养基上培养2d,菌落较小,圆形凸起、淡黄色,表面光滑、具有流动性(图1D);菌株FJAT-15494、FJAT-15495、FJAT-15496和FJAT-15497在TTC平板上培养2d,菌落与青枯菌菌落形态特征^[36]一致:菌落近圆形或不规则,表面湿润,具有流动性,中间粉红色,边缘白色(图1C)。

致病性测定结果表明,分离的疑似青枯菌接种姜盆栽苗12d,植株开始发病,叶片边缘卷曲,黄化,直至整个叶片枯萎(图1F),与姜瘟田间症状一致。另一种致病菌株FJAT-15492接种,姜苗也出现同样症状,但发病进程慢,接种20d植株才开始出现病症(图1G)。

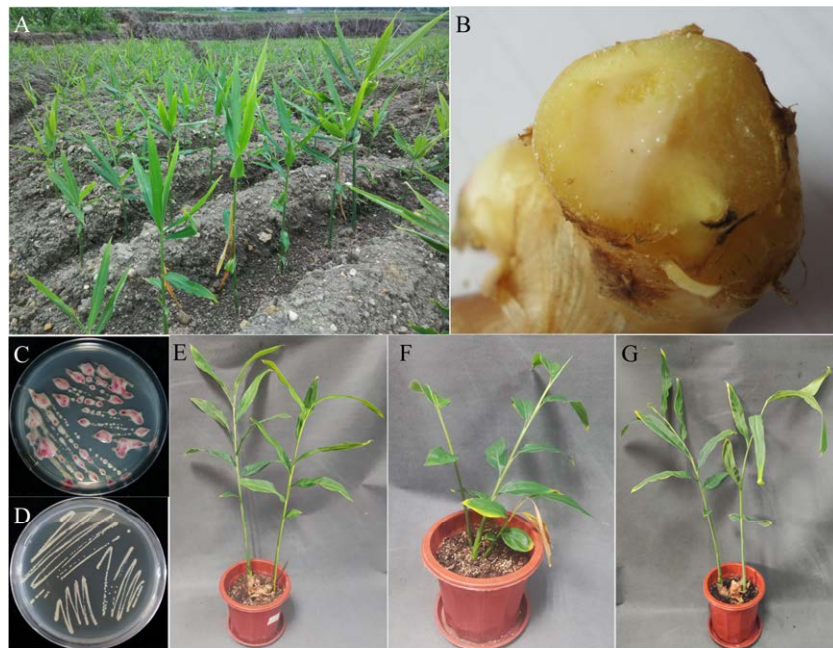


图1 姜瘟田间发病症状、病原菌分离及其致病性测定。A: 田间发病植株; B: 发病姜块症状; C、D: 姜瘟分离的病菌; E–G: 分离的青枯菌(F)和桑树肠杆菌(G)的致病性检测,清水为对照(E)。

Figure 1 Symptom, pathogen isolation and pathogenicity determination of ginger bacterial wilt. A: The diseased plant in field; B: Symptom of the diseased ginger tuber; C, D: The isolations of diseased ginger; E–G: Pathogenicity test for the isolations of *Ralstonia solanacearum* (F) and *Enterobacter mori* FJAT-15492 (G), with water as control (E).

2.2 姜瘟致病菌的分子鉴定

根据形态特征初步鉴定为青枯菌的菌株 FJAT-15494、FJAT-15495、FJAT-15496 和 FJAT-15497 (图 2A), 进一步利用青枯菌特异检测引物 *pehA*#6 和 *pehA*#3 进行分子鉴定, 结果表明, 经的 PCR 扩增, 4 株疑似青枯菌与参比菌株 GMI1000 阳性对照均扩增出 504 bp 的特异性条带, 无菌水阴性对照未扩增出相应条带(图

2B)。因此, 确定菌株 FJAT-15494、FJAT-15495、FJAT-15496 和 FJAT-15497 为青枯菌。

经 16S rRNA 基因鉴定, FJAT-15492 与 *E. mori* 模式菌株 D11^T 的 16S rRNA 基因序列相似性最高, 为 98.20%。在系统发育树上, FJAT-15492 与 *E. mori* 模式菌株 D11^T 聚在同一类群(图 2C)。因此, 经 16S rRNA 基因鉴定 FJAT-15492 为桑树肠杆菌 *E. mori*。

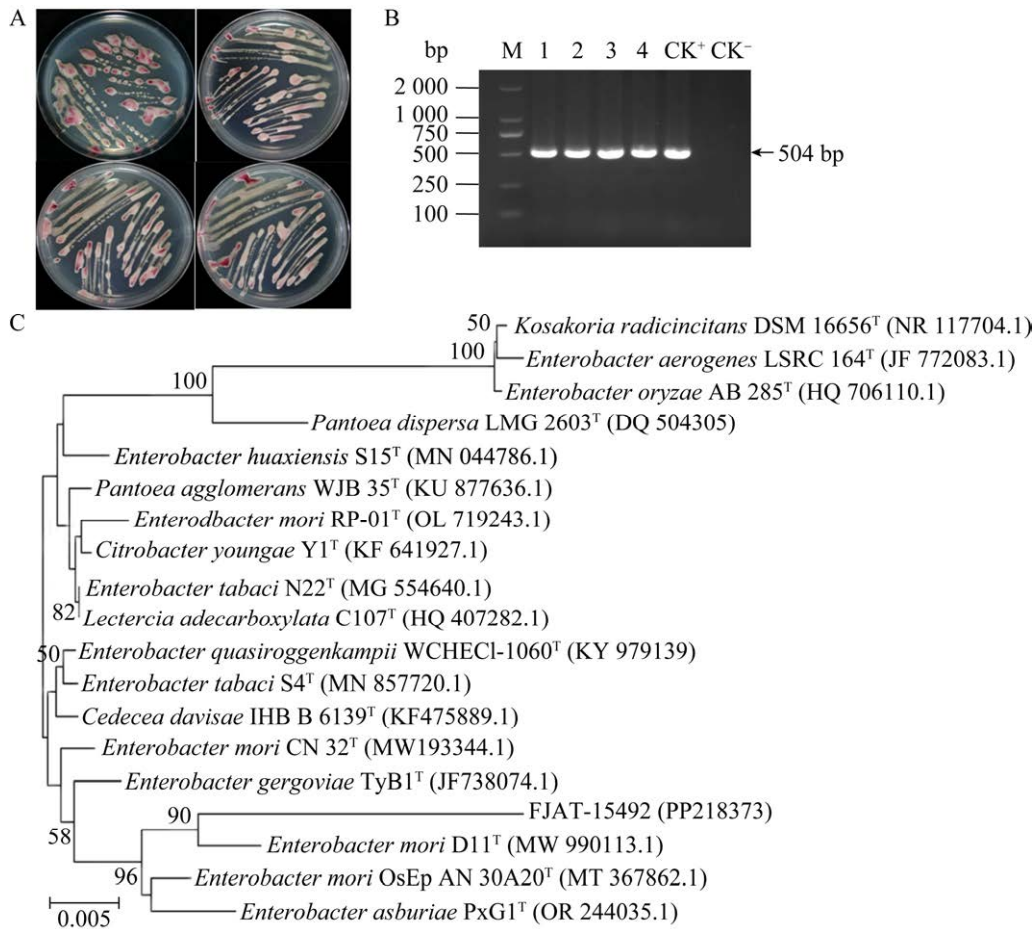


图 2 姜瘟致病菌鉴定。A: 分离青枯菌的形态鉴定; B: 分离青枯菌的分子鉴定(泳道 M: DNA 分子量标记; 泳道 1-4: 供试青枯菌菌株; CK⁺: 参比菌株 GMI1000; CK⁻: 无菌水对照); C: 基于 16S RNA 基因序列建立的菌株 FJAT-15492 与其近缘种的发育树。

Figure 2 Pathogen identification of ginger bacterial wilt. A: Morphological identification of *Ralstonia solanacearum* isolations; B: Molecular identification of *R. solanacearum* isolations (Lane M: DNA Ladder Marker; Lane 1-4: The tested *R. solanacearum* strains; CK⁺: Reference strain GMI1000; CK⁻: Distilled water as negative control); C: The phylogenetic tree based on 16S RNA gene sequence of strain FJAT-15492 and closely related species.

2.3 姜瘟致病菌的分布特性

统计 2 种不同致病菌桑树肠杆菌和青枯菌在病姜块和病姜根系土壤中的分布数量, 结果如表 2 显示, 桑树肠杆菌和青枯菌在病姜块均有分布, 但青枯菌分布数量(5.67×10^3 CFU/g)显著高于桑树肠杆菌的分布数量(1.33×10^3 CFU/g) ($P < 0.05$), 表明姜瘟是由桑树肠杆菌和青枯菌混合侵染, 且青枯菌是优势菌。在病姜根系土壤中只检测到青枯菌的分布(216.67×10^3 CFU/g),

未检测到桑树肠杆菌。

2.4 青枯菌的演化型和序列变种鉴定

分离到 4 株青枯菌, 编号分别为 FJAT-15494、FJAT-15495、FJAT-15496 和 FJAT-15497, 经演化型复合 PCR 扩增, 均出现 2 条带, 片段大小分别为 144 bp 和 280 bp, 其中 144 bp 条带为演化型 I 的特异性条带, 280 bp 条带为青枯菌的特异性条带(图 3A), 表明姜瘟分离到的 4 株青枯菌均属于演化型 I (亚洲分支) 菌株。

表 2 姜瘟致病菌在病块和根系土壤的分布数量

Table 2 Distribution of causal organism in the tuber and rhizosphere soil of ginger with bacterial wilt

Pathogen of ginger bacterial wilt	Tuber of diseased ginger distribution number ($\times 10^3$ CFU/g)	Rhizosphere soil of diseased ginger distribution number ($\times 10^3$ CFU/g)
<i>Enterobacter mori</i>	1.33±0.58b	0.00±0.00B
<i>Ralstonia solanacearum</i>	5.67±2.08a	216.67±35.12A

Data in the table are mean±SD, and the data are the mean of three replicates. Different lowercase and capital letters in the same column show values that are significantly different at the $P < 0.05$ and $P < 0.01$ level, respectively, by the least significant difference (LSD) test.

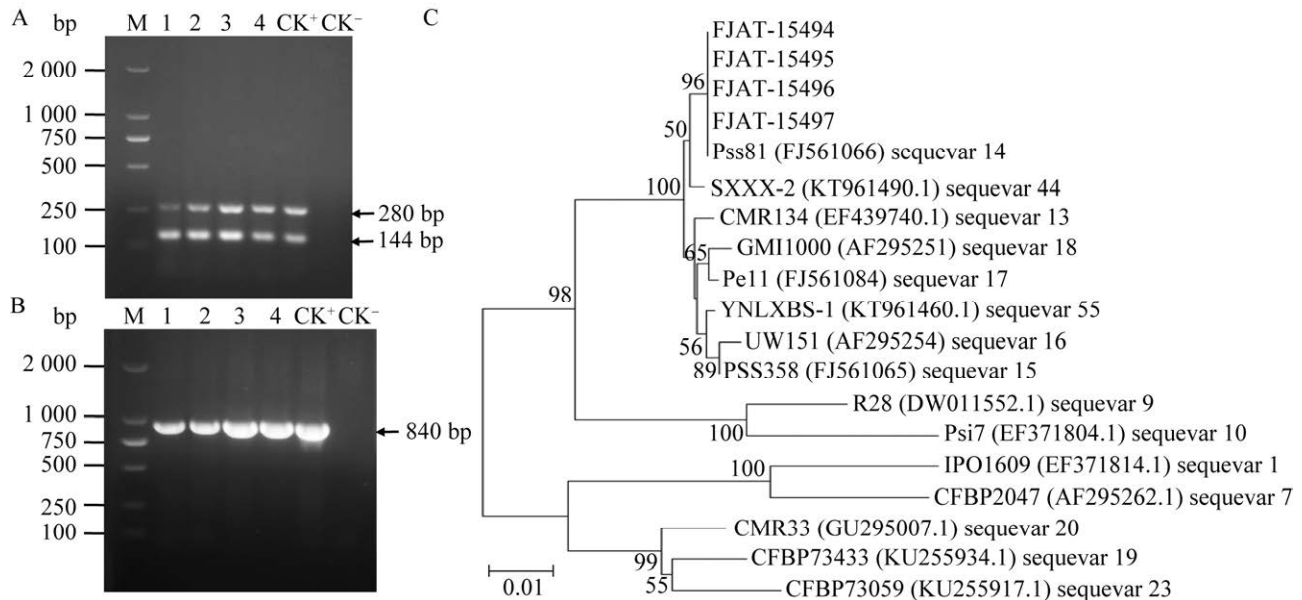


图 3 供试青枯菌的演化型和序列变种鉴定。A: 供试菌株经演化型复合 PCR 扩增产物的电泳图(泳道 M: DNA 分子量标记; 泳道 1-4: 供试青枯菌菌株; CK⁺: 参比菌株 GMI1000; CK⁻: 无菌水对照); B: 供试菌株 *egl* 基因 PCR 扩增产物电泳图; C: 基于 *egl* 基因序列建立的 3 株供试菌株的发育树。

Figure 3 Phylotype and sequevar identification of the tested *Ralstonia solanacearum* strains. A: Phylotype specific multiplex PCR product patterns of test strains (Lane M: DNA Ladder Marker; Lane 1-4: The tested *R. solanacearum* strains; CK⁺: The reference strain GMI1000; CK⁻: Distilled water as negative control); B: PCR results of *egl* gene for the test strains, the represents of each lane were the same to Figure A; C: Phylogenetic tree of test strains based on *egl* gene sequences.

基于 *egl* 基因序列对分离到的 4 株青枯菌进行序列变种鉴定, PCR 扩增条带大小为 840 bp (图 3B), 4 株青枯菌 *egl* 基因序列与 GenBank 已知不同序列变种进行同源比对, 采用邻接法构建系统发育树。结果表明, 供试 4 株青枯菌均属于序列变种 14, 而参比菌株 GMI1000 属于序列变种 18 (图 3C)。

2.5 姜瘟致病菌的生防芽胞杆菌筛选

供试的 21 株芽胞杆菌中, 贝莱斯芽胞杆菌 FJAT-54560 对桑树肠杆菌 FJAT-15492 有较强拮抗作用, 抑菌圈直径为 16.11 mm; 短短芽胞杆菌 FJAT-JK-2 对青枯菌 FJAT-15494 也具有较强抑菌活性, 抑菌圈直径为 19.41 mm; 而对照链霉素对桑树肠杆菌和青枯菌的抑菌直径分别为

19.56 mm 和 23.14 mm (表 3)。

进一步研究生防菌 FJAT-JK-2 和 FJAT-54560 对姜瘟的室内防效, 结果表明, 对照组 1 (CK1) 姜苗在接种青枯菌 12 d 植株开始发病, 23 d 植株发病率 100%; 对照组(CK2)姜苗在接种桑树肠杆菌 20 d 植株开始发病, 35 d 植株发病率 100%。处理组 1 (TR1)预接种 FJAT-JK-2, 3 d 后接种青枯菌, 植株 18 d 开始发病, 比 CK1 推迟发病 6 d, CK1 发病率 100.00%时, TR1 姜苗的发病率为 30.55%, 即 FJAT-JK-2 对姜瘟的防效达 69.45%。处理组 2 (TR2)预接种 FJAT-54560, 3 d 后接种桑树肠杆菌, 植株 25 d 开始发病, 比 CK2 推迟发病 5 d, CK2 发病率 100.00%时, TR2 姜苗的发病率为 38.89%, 防效达 61.11% (表 4)。

表 3 不同芽胞杆菌对姜瘟致病菌的拮抗活性

Table 3 Antimicrobial activity of the different *Bacillus* spp. strains against ginger bacterial wilt pathogen

Strain number	Species	Antibacterial circle diameter against <i>E. mori</i> (mm)	Antibacterial circle diameter against <i>R. solanacearum</i> (mm)
FJAT-54970	<i>Bacillus megaterium</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54974		0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54978		0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54986		0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54989		0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-2349	<i>Bacillus velezensis</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-17531		0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-51047		0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-52631		0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54560		16.11±0.15	0.00±0.00
FJAT-54972		0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-19700	<i>Bacillus tequilens</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54984		0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54973	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54975	<i>Bacillus safensis</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54979	<i>Bacillus licheniformis</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54981	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54985	<i>Bacillus aryabhatai</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-54987	<i>Bacillus pumilus</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-20261	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	0.00±0.00	0.00±0.00
FJAT-JK-2	<i>Brevibacillus brevis</i>	0.00±0.00	19.41±0.14
Streptomycin as control		19.56±0.32	23.14±0.46

Data in the table are mean±SD, and the data are the mean of five replicates.

表 4 两种生防菌对姜瘟的防治效果

Table 4 Control efficiency of two antibacteria against ginger bacterial wilt

Treatments	Disease incidence (%)	Control efficiency (%)
TR1	30.55±4.81	69.45±4.81
TR2	38.89±4.82	61.11±4.82
CK1	100.00±0.00	—
CK2	100.00±0.00	—

The data are mean±SD, and the data are the mean of three replicates. —: Indicates unable to calculate.

2.6 生防芽胞杆菌对姜瘟的田间防治效果

生防菌 FJAT-JK-2 和 FJAT-54560 的发酵制剂, 300 倍稀释后等体积混合, 灌根接种到姜瘟发病田块, 每 7 d 用药 1 次, 连续 5 次, 结果表明, 对照组姜瘟平均发病率达 19.44%, 处理组的姜瘟平均发病率为 9.22%, 平均防效达 52.57% (图 4)。

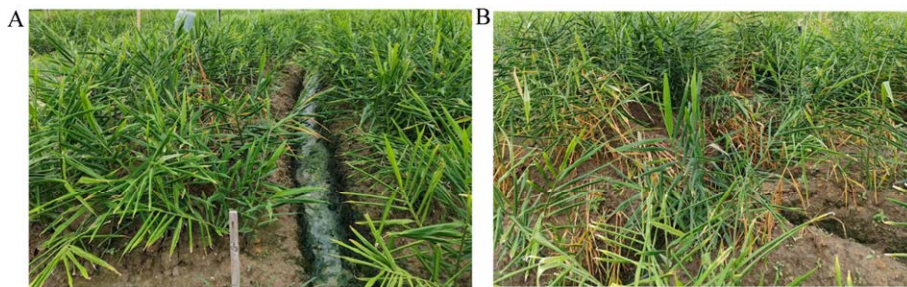


图 4 生防菌处理(A)和清水对照(B)的田间姜瘟发病情况

Figure 4 The incidence of ginger bacterial wilt in the field under biocontrol agent treatment(A) and water control (B).

3 讨论与结论

姜瘟病是危害生姜产量和品质的重要病害。长期以来, 对姜瘟致病菌一直存在着不同的看法^[37]。本研究对姜瘟发病地块的姜和土壤样本进行致病菌分离纯化, 根据 16S rRNA 基因和青枯菌特异性引物检测, 确定姜瘟致病菌为 *E. mori* 和 *R. solanacearum*。将分离到的 2 种致病菌回接姜苗, 均能引起姜瘟病害且症状与田间姜瘟症状一致。姜艳鹏等也从姜瘟发病田块分离鉴定出其致病菌为阴沟肠杆菌^[10]。肠杆菌可作为生姜内生菌, 在有利于细菌生存或宿主敏感条件下影响根茎的质量, 造成其腐烂^[38]。此外, 国内外众多研究表明, 姜瘟主要是由青枯菌侵染引起的^[37,39]。本研究发现, 湖南省郴州市姜瘟可能是由 *E. mori* 和 *R. solanacearum* 混合侵染引起的, 与前人研究报道不同, 即首

次发现姜瘟是 2 种病原菌混合感染, 且以 *R. solanacearum* 为优势种。

2005 年, Fegan 等提出青枯菌种下分化的 4 个分类单元, 即种、演化型、序列变种和克隆, 并建立了相应的鉴定方法^[34]。许多研究表明, 我国青枯菌以演化型 I 为主^[40-42]。本研究采用演化型复合 PCR 法将姜瘟分离的 4 株青枯菌鉴定为演化型 I, 与前人研究结果相吻合^[42]。基于 *egl* 基因序列, 青枯菌被划分超过 15 个序列变种^[42-43]。研究表明, 采集相同寄主、相同区域的青枯菌, 往往具有相同的序列变种^[44]。然而, She 等研究发现, 广东沙姜上分离到的青枯菌存在 5 个不同的序列变种^[42]。本研究发现, 从姜瘟土壤分离到的 4 株青枯菌与序列变种 14 的代表菌株 Pss81 聚在一类群, 一致性达 96%。参比菌株 GMI1000 则属于序列变种 18;

GMI1000 与 Pss81 均分离自番茄寄主, 其中 GMI1000 和 Pss81 分别来源法属圭亚那和中国台湾。说明青枯菌序列变种与寄主和地理来源无密切相关性。

芽胞杆菌属细菌因其具有生长快、抗逆性强, 易分离培养等特性, 成为目前生防菌剂生产常用菌种之一^[45]。芽胞杆菌已被广泛应用于青枯病防治中, 蜡状芽胞杆菌^[46]、枯草芽胞杆菌^[47]、贝莱斯芽胞杆菌^[21]等对姜瘟致病菌均具有显著的抑制作用, 是该病害生物防治的优良菌种资源。田间应用表明芽胞杆菌生防菌剂在稳定性、与化学农药的相容性等方面明显优于其他生防菌^[48], 本研究从 21 株不同芽胞杆菌中筛选出短短芽胞杆菌 FJAT-JK-2 对姜青枯菌、贝莱斯芽胞杆菌 FJAT-54560 对姜桑树肠杆菌具有拮抗作用的菌株, 为姜瘟病的生物防治提供生防菌资源。

生防菌从实验阶段到田间应用是一个复杂的过程。本研究筛选到对姜瘟致病菌具有显著抑菌效果的 2 株生防菌株, 其室内防效分别达 69.45% 和 61.11%, 但二者发酵混合液的田间防效仅为 52.57%。许多研究表明, 生防菌的田间防效低于室内防效^[49-50], 究其原因可能是田间环境复杂, 不可控制因素多, 使得生防菌的田间防效低且不稳定, 而且随着地理环境、生态环境等不同, 生防菌防效差异大, 如易有金等发现, 生防枯草芽胞杆菌 (*Bacillus subtilis*) B-001 对湖南省不同县的烟草青枯病防效介于 40.03%–78.14%^[51]。对于姜瘟的防控, 可充分利用不同防治方法的优点, 如可尝试将低毒化学农药和生防菌剂复配施用来提高防治效果。化学农药和生防菌剂复配对植物病害增效作用已有许多报道, 如陈长卿等将生防菌 NJ13 [甲基营养型芽胞杆菌 (*Bacillus methylotrophicus*)] 分别与 2 种化学药剂(啞菌环胺和苯醚甲环唑)

复配, 发现其对人参黑斑病田间防效具有增效作用^[52]; 刘合昌等研究发现, 生防芽胞杆菌 b702 与甲霜灵混剂对辣椒疫病的防治效果明显优于单剂^[53]。最后, 姜瘟防治重在预防: 生姜种植地应该选地势高、排水良好的地块; 在品种选择上, 依据当地种植条件, 选择抗病强的品种; 在生姜生长期, 雨后要及时排水, 以防水淹, 发现病株, 要及时挖除等。后续研究中, 需要进一步对筛选的生防菌进行定殖特性、菌株发酵技术、田间应用技术及生物安全性等研究, 以期开发高效环保生防菌剂应用于实际生产。

作者贡献声明

郑雪芳: 负责研究设计、数据分析和论文撰写; 舒江霞: 负责姜瘟病原菌分离鉴定和生防菌筛选; 王阶平: 参与生防菌田间应用研究和论文修订; 杨晨: 参与病原菌致病性鉴定和生防菌筛选; 车建美: 参与生防菌田间应用研究; 肖荣凤: 参与病原菌致病性鉴定; 陈梅春: 参与数据分析; 刘波: 负责研究设计和论文修订。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] 孙彩云, 潘军, 陈秀兰, 张玉忠, 高培基. 抑制姜瘟青枯假单胞菌的木霉菌株的筛选及其抑菌机理[J]. 山东大学学报(理学版), 2002, 37(4): 373-376. SUN CY, PAN J, CHEN XL, ZHANG YZ, GAO PJ. Screen of biocontrol *Trichoderma* spp. inhibiting *Pseudomonas solanacearum* 3 of ginger and its mechanism[J]. Journal of Shandong University (Natural Science), 2002, 37(4): 373-376 (in Chinese).
- [2] 王玉杰, 乔立娟, 赵帮宏. 2021 年我国生姜价格波动特征分析与 2022 年展望[J]. 长江蔬菜, 2022, 14: 1-4. WANG YJ, QIAO LJ, ZHAO BH. Analysis on fluctuation characteristics of ginger price in China in 2021 and its prospect in 2022[J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2022, 14: 1-4 (in Chinese).

- [3] 刘润叶, 杨土凤, 陈晓梅, 刘世贵, 刘崑, 龙章富. 一株拮抗姜瘟青枯劳尔氏菌的泛菌的分离及鉴定[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2007, 44(3): 683-686.
LIU RY, YANG TF, CHEN XM, LIU SG, LIU K, LONG ZF. Isolation and identification of a *Pantoea* strain against ginger bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science Edition), 2007, 44(3): 683-686 (in Chinese).
- [4] PRAMEELA TP, SUSEELA BHAI R. Bacterial wilt of ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) incited by *Ralstonia pseudosolanacearum*: a review based on pathogen diversity, diagnostics and management[J]. Journal of Plant Pathology, 2020, 102(3): 709-719.
- [5] 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.
- [6] RAJAMMA SB, RAJ A, KALAMPALATH V, EAPEN SJ. Elucidation of antibacterial effect of calcium chloride against *Ralstonia pseudosolanacearum* race 4 biovar 3 infecting ginger (*Zingiber officinale* Rosc.)[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(2): 663-671.
- [7] HUANG ZQ, LIU BW, YIN Y, LIANG F, XIE DS, HAN TT, LIU YZ, YAN B, LI Q, HUANG Y, LIU Q. Impact of biocontrol microbes on soil microbial diversity in ginger (*Zingiber officinale* Roscoe)[J]. Pest Management Science, 2021, 77(12): 5537-5546.
- [8] 姚革, 彭化贤. 四川省细菌性青枯病病原菌菌系及分布研究[J]. 西南农业大学学报, 1990, 12(5): 536-539.
YAO G, PENG HX. Studies on the strains and distribution of bacterial wilt (*Pseudomonas solanacearum*)[J]. Journal of Southwest Agricultural University, 1990, 12(5): 536-539 (in Chinese).
- [9] 王胜利, 龚晓, 周双德, 程鹏, 洪亚辉. 姜瘟致病菌的分离与鉴定及其拮抗菌的筛选[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2013, 39(3): 282-285.
WANG SL, GONG X, ZHOU SD, CHENG P, HONG YH. The isolation and identification of ginger blast pathogen and screening of its antagonistic fungus[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2013, 39(3): 282-285 (in Chinese).
- [10] 姜艳鹏, 胡振华, 张翠静, 隋业伟, 陆洪省. 枯草芽胞杆菌 J22 拮抗姜瘟阴沟肠杆菌的效果与机理研究[J]. 江苏农业科学, 2023, 51(2): 125-134.
JIANG YP, HU ZH, ZHANG CJ, SUI YW, LU HX. Antagonistic effect and mechanism of *Bacillus subtilis* J22 against *Enterobacter cloacae* in ginger blast[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2023, 51(2): 125-134 (in Chinese).
- [11] 张敏, 汤志良, 舒凯, 赵丹萍, 胡晓. 抗姜瘟病菌芽胞杆菌的诱变改良[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2010, 36(2): 153-158.
ZHANG M, TANG ZL, SHU K, ZHAO DP, HU X. Mutagenic improvement of *Bacillus cereus* resistant to *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2010, 36(2): 153-158 (in Chinese).
- [12] MAZZOLA M, FREILICHS. Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes[J]. Phytopathology, 2017, 107(3): 256-263.
- [13] HUANG MJ, XING HT, LI ZX, LI HL, WU L, JIANG YS. Identification and expression profile of the soil moisture and *Ralstonia solanacearum* response CYPome in ginger (*Zingiber officinale*)[J]. PeerJ, 2021, 9: e11755.
- [14] DINESH R, ANANDARAJ M, KUMAR A, BINI YK, SUBILA KP, ARAVIND R. Isolation, characterization, and evaluation of multi-trait plant growth promoting rhizobacteria for their growth promoting and disease suppressing effects on ginger[J]. Microbiological Research, 2015, 173: 34-43.
- [15] LIANG LQ, FU YJ, DENG SS, WU Y, GAO MY. Genomic, antimicrobial, and aphicidal traits of *Bacillus velezensis* ATR2, and its biocontrol potential against ginger rhizome rot disease caused by *Bacillus pumilus*[J]. Microorganisms, 2021, 10(1): 63.
- [16] ZHANG ST, JIANG QP, LIU XJ, LIU LH, DING W. Plant growth promoting rhizobacteria alleviate aluminum toxicity and ginger bacterial wilt in acidic continuous cropping soil[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 569512.
- [17] SHAFI J, TIAN H, JI MS. *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: a review[J]. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 2017, 31(3): 446-459.
- [18] KÖBERL M, RAMADAN EM, ADAM M, CARDINALE M, HALLMANN J, HEUER H, SMALLA K, BERG G. *Bacillus* and *Streptomyces* were selected as broad-spectrum antagonists against soilborne pathogens from arid areas in Egypt[J]. FEMS Microbiology Letters, 2013, 342(2): 168-178.
- [19] FRAVEL DR. Commercialization and implementation of biocontrol[J]. Annual Review of Phytopathology, 2005, 43: 337-359.
- [20] SHODA M. Bacterial control of plant diseases[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(6): 515-521.
- [21] HE PJ, TANG XD, WEI SH, AN JY, CUI WY. Complete genome sequence of *Bacillus velezensis* TH-1, a candidate biocontrol bacterium from China[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2023, 36(5): 305-308.
- [22] YAMAMOTO S, SHIRAISHI S, KAWAGOE Y, MOCHIZUKI M, SUZUKI S. Impact of *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 on control of bacterial wilt and powdery mildew in tomato[J]. Pest Management Science, 2015, 71(5): 722-727.
- [23] WANGXB, LIANG GB. Control efficacy of an endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* strain BZ6-1 against peanut bacterial Wilt, *Ralstonia solanacearum*[J]. BioMed Research International, 2014, 2014: 465435.
- [24] KWON JW, KIM SD. Characterization of an antibiotic produced by *Bacillus subtilis* JW-1 that suppresses *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2014, 24(1): 13-18.

- [25] CHEN Y, YAN F, CHAI YR, LIU HX, KOLTER R, LOSICK R, GUO JH. Biocontrol of tomato wilt disease by *Bacillus subtilis* isolates from natural environments depends on conserved genes mediating biofilm formation[J]. *Environmental Microbiology*, 2013, 15(3): 848-864.
- [26] 魏鸿刚, 邓嘉璐, 李元广, 王伟, 张道敬, 沈国敏. 青枯病生防菌的筛选、鉴定及其活性物质特性[J]. *中国生物防治*, 2007, 23(3): 237-242.
WEI HG, DENG JL, LI YG, WANG W, ZHANG DJ, SHEN GM. Selection of a biological control strain of plant bacterial wilt and its active metabolites[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2007, 23(3): 237-242 (in Chinese).
- [27] 刘波, 林营志, 朱育菁, 葛慈斌, 曹宜. 生防菌对青枯雷尔氏菌的致弱特性[J]. *农业生物技术学报*, 2004, 12(3): 322-329.
LIU B, LIN YZ, ZHU YJ, GE CB, CAO Y. Attenuation characteristics of bacterial-wilt-disease biocontrol strain Anti-8098A (*Bacillus cereus*) to *Ralstonia solanacearum*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2004, 12(3): 322-329 (in Chinese).
- [28] KELMAN A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium[J]. *Phytopathology*, 1954, 44: 693-695.
- [29] GWINN DD, THORNE CB. Transformation of *Bacillus Licheniformis*. *Journal of Bacteriology*, 1964, 87(3): 519-526.
- [30] GUPTA VK, SHIVASHARANAPPA N, KUMAR V, KUMAR A. Diagnostic evaluation of serological assays and different gene based PCR for detection of *Brucella melitensis* in goat[J]. *Small Ruminant Research*, 2014, 117(1): 94-102.
- [31] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, FILIPSKI A, KUMAR S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [32] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406-425.
- [33] GILLINGS M, FAHY P, DAVIES C. Restriction analysis of an amplified polygalacturonase gene fragment differentiates strains of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas solanacearum*[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1993, 17(1): 44-48.
- [34] FEGAN M, PRIOR P. How complex is “*Ralstonia solanacearum* species complex”?[M]//ALLEN C, PRIOR P, HAYWARD AC. *Bacterial Wilt Disease and the Ralstonia solanacearum Species Complex*. Saint Paul, Minnesota: APS Press, 2005, 449-462.
- [35] POUSSIER S, PRIOR P, LUISETTI J, HAYWARD C, FEGAN M. Partial sequencing of the hrpB and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex[J]. *Systematic and Applied Microbiology*, 2000, 23(4): 479-486.
- [36] 郑雪芳, 陈燕萍, 肖荣凤, 刘欣, 江城, 王阶平, 刘波. 水肥菌一体化番茄基质栽培系统青枯病病株和健株根际微生物群落结构的差异[J]. *微生物学报*, 2022, 62(4): 1524-1535.
- ZHENG XF, CHEN YP, XIAO RF, LIU X, JIANG C, WANG JP, LIU B. Difference of rhizobacterial community structure between bacterial wilt infected and healthy tomato plants in a substrate culture system[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(4): 1524-1535 (in Chinese).
- [37] 任欣正, 方仲达. 姜瘟病原细菌的鉴定[J]. *植物病理学报*, 1981, 11(1): 51-56.
REN XZ, FANG ZD. Identification of the causal organism of the bacterial wilt of ginger[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1981, 11(1): 51-56 (in Chinese).
- [38] NISHIJIMA KA, ALVAREZ AM, HEPPELRY PR, SHINTAKU MH, KEITH LM, SATO DM, BUSHE BC, ARMSTRONG JW, ZEE FT. Association of *Enterobacter cloacae* with rhizome rot of edible ginger in Hawaii[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(12): 1318-1327.
- [39] SURABY EJ, SRUTHI KB, ANTONY G. Genome-wide identification of type III effectors and other virulence factors in *Ralstonia pseudosolanacearum* causing bacterial wilt in ginger (*Zingiber officinale*)[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2022, 297(5): 1371-1388.
- [40] 徐进, 顾钢, 潘哲超, 吴畏, 许景升, 张昊, 陈顺辉, 冯洁. 福建烟草青枯菌演化型及生化变种鉴定研究[J]. *中国烟草学报*, 2010, 16(6): 66-71.
XU J, GU G, PAN ZC, WU W, XU JS, ZHANG H, CHEN SH, FENG J. Phylotype identification and biovar determination of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from Fujian Province[J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2010, 16(6): 66-71 (in Chinese).
- [41] 王国芬, 李超萍, 杨腊英, 徐春华, 郑行恺, 王童欣, 王亚荣, 于旭东. 星油藤青枯病原菌鉴定[J]. *植物病理学报*, 2019, 49(5): 602-611.
WANG GF, LI CP, YANG LY, XU CH, ZHENG XK, WANG TX, WANG YR, YU XD. Pathogen identification of Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.) bacterial wilt[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2019, 49(5): 602-611 (in Chinese).
- [42] SHE XM, HE ZF, LI HP. Genetic structure and phylogenetic relationships of *Ralstonia solanacearum* strains from diverse origins in Guangdong Province, China[J]. *Journal of Phytopathology*, 2018, 166(3): 177-186.
- [43] 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.
- [44] HE YL, CHEN YY, ZHANG YW, QIN XF, WEI XL, ZHENG DH, LIN W, LI QQ, YUANGQ. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* species complex strains obtained from Guangxi, China and their pathogenicity on plants in the *Cucurbitaceae* family and other botanical families[J]. *Plant Pathology*, 2021, 70(6): 1445-1454.
- [45] FIRA D, DIMKIĆ I, BERIĆ T, LOZO J, STANKOVIĆ S. Biological control of plant pathogens by *Bacillus* species[J]. *Journal of Biotechnology*, 2018, 285: 44-55.
- [46] WANG N, WANG LY, ZHU K, HOU SS, CHEN L, MI DD, GUI Y, QI YJ, JIANG CH, GUO JH. Plant root

- exudates are involved in *Bacillus cereus* AR156 mediated biocontrol against *Ralstonia solanacearum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 98.
- [47] 刘勇, 柯绍英, 黄小琴, 刘林. 枯草芽孢杆菌 BS2004 菌株的防病促生效果[J]. *中国生物防治*, 2008(S1): 46-49.
LIU Y, KE SY, HUANG XQ, LIU L. Effect of *Bacillus subtilis* strain BS2004 on promoting of plant health and growth[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2008(S1): 46-49 (in Chinese).
- [48] 苗成琪, 赵延存, 包艳, 凌军, 刘嘉钰, 李朝辉, 刘凤权. 高地芽孢杆菌 ST15 的筛选、鉴定及生防特性研究[J]. *中国生物防治学报*, 2022, 38(2): 458-468.
MIAO CQ, ZHAO YC, BAO Y, LING J, LIU JY, LI CH, LIU FQ. Screening, identification and biocontrol potential of *Bacillus altitudinis* ST15 against *Xanthomonas oryzae*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2022, 38(2): 458-468 (in Chinese).
- [49] 郭坚华, 郭亚辉, 张立新, 祁红英, 方中达. 辣椒青枯病拮抗菌株的筛选及田间防效的测定[J]. *中国生物防治*, 2001, 17(3): 101-106.
GUO JH, GUO YH, ZHANG LX, QI HY, FANG ZD. Screening for biocontrol agents against *Ralstonia solanacearum*[J]. *Chinese Journal of Biological Control*, 2001, 17(3): 101-106 (in Chinese).
- [50] 易有金, 尹华群, 罗宽, 刘学端, 刘二明. 烟草内生短芽孢杆菌的分离鉴定及对烟草青枯病的防效[J]. *植物病理学报*, 2007, 37(3): 301-306.
YI YJ, YIN HQ, LUO K, LIU XD, LIU EM. Isolation and identification of endophytic *Brevibacillus brevis* and its biocontrol effect against tobacco bacterial wilt[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37(3): 301-306 (in Chinese).
- [51] 易有金, 刘如石, 尹华群, 罗宽, 刘二明, 刘学端. 烟草青枯病拮抗内生细菌的分离、鉴定及其田间防效[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(3): 554-558.
YI YJ, LIU RS, YIN HQ, LUO K, LIU EM, LIU XD. Isolation, identification and field control efficacy of an endophytic strain against tobacco bacterial wilt (*Ralstonia solanacearum*)[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(3): 554-558 (in Chinese).
- [52] 陈长卿, 金辉, 姜云, 许朋, 闫东, 高洁. 生防菌株 NJ13 与化学农药复配对人参黑斑病的联合毒力及田间防效[J]. *农药*, 2019, 58(5): 381-384.
CHEN CQ, JIN H, JIANG Y, XU P, YAN D, GAO J. Co-toxicity and field control effects of biocontrol strain NJ13 and its mixture with chemical fungicides against *Alternaria panax*[J]. *Agrochemicals*, 2019, 58(5): 381-384 (in Chinese).
- [53] 刘合昌, 牛瞻光, 李忠海, 张淑静, 李光. 甲霜灵和生防菌 B702 对辣椒疫病联合作用机制研究[J]. *中国果菜*, 2008, 28(2): 22-23.
LIU HC, NIU ZG, LI ZH, ZHANG SJ, LI G. Study on the combined action mechanism of metalaxyl and biocontrol bacterium B702 on pepper blight[J]. *China Fruit & Vegetable*, 2008, 28(2): 22-23 (in Chinese).