

李培谦, 药震, 邵元元, 等. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌的筛选及防治效果[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(17): 115–121.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.17.018

黄瓜枯萎病拮抗放线菌的筛选及防治效果

李培谦^{1,2}, 药震², 邵元元¹, 冯宝珍²

[1. 北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室/广西地表过程与智能模拟重点实验室(南宁师范大学), 广西南宁 530000;
2. 运城学院生命科学系, 山西运城 044000]

摘要:为筛选黄瓜枯萎病生防菌, 采集黄瓜根际土壤分离放线菌, 通过对峙培养获得一株具有较强抑菌活性的放线菌 CA-6。根据形态特征、生理生化特性及 16S rDNA 序列系统进化分析确定菌株 CA-6 为卡那链霉菌 (*Streptomyces kanamyceticus*)。CA-6 发酵液具有强烈的抑菌活性, 其 5 倍稀释液对黄瓜枯萎病菌分生孢子萌发及菌丝生长抑制率分别达到 100.00%、96.22%, 其 100 倍稀释液对孢子和菌丝抑制率也在 50% 以上。黄瓜苗盆栽防效试验结果显示, 菌株 CA-6 发酵液对黄瓜枯萎病防效可达 67.38%。放线菌 CA-6 对黄瓜枯萎病菌具有较好的抑菌活性, 具有开发成天然抗菌活性物质的潜力。

关键词:黄瓜枯萎病菌; 链霉菌; 抑菌活性; 生物防治

中图分类号:S436.421.1⁺3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)17-0115-06

黄瓜真菌性枯萎病 (*Fusarium wilt disease*) 是黄瓜生产上的毁灭性病害之一, 该病害由尖孢镰刀菌黄瓜专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 引起, 该病害在世界黄瓜种植区广泛发生, 给黄瓜生产造成严重损失^[1]。该病的化学防治常以多菌灵、咪鲜胺、恶霉灵、代森锰锌等杀菌剂为主, 但高频次、大剂量使用化学药剂给生态环境带来巨大压力, 农药残留和环境安全已经成了危害人类健康的棘手问题^[2]。因而, 从环保生态角度研究广谱高效的生防菌对枯萎病防治具有不可替代的作用。

近年来报道的对黄瓜枯萎病具有拮抗作用的微生物有真菌^[3-5]、细菌^[6-8]和放线菌^[9-12]。棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*)、哈茨木霉 (*T. harzianum*) 和拟康氏木霉 (*T. pseudokoningii*) 联合接种对黄瓜枯萎病防效可达 81.5%^[3], 而深绿木霉

(*T. atroviride*) 的水分散粒剂效果优于哈茨木霉^[4]。葡萄汁有孢汉逊酵母 (*Hanseniaspora uvarum*) 菌株 1-101 在固体培养基上对黄瓜枯萎病菌具有完全抑制作用^[5]。芽孢杆菌中巨大芽孢杆菌^[6]、多粘类芽孢杆菌^[6]、枯草芽孢杆菌^[6]、解淀粉芽孢杆菌^[7]和贝莱斯芽孢杆菌^[8]等均对黄瓜枯萎病菌具有抑制作用。而放线菌中对黄瓜枯萎病具有良好抑制效果的生防菌以链霉菌属 (*Streptomyces*) 居多, 如黄赭色链霉菌 (*S. silaceus*) 11F 菌株对黄瓜枯萎病防效为 73.45%^[9], 比基尼链霉菌 (*S. bikiniensis*) HD-087 菌株对黄瓜枯萎病菌具有明显的抑制效果^[10]; *S. luridus* 对黄瓜枯萎病菌抑制率达到 53.3%^[11]; 龟裂链霉菌 (*S. rimosus*) M527 菌株发酵产物对黄瓜枯萎病菌的拮抗作用明显^[12]。然而, 放线菌资源丰富, 种类繁多, 已研究报道的种类有限。而且, 由于目前使用的一些化合物的高残留性以及病原物出现的抗药性, 所以挖掘新抗生素和其他生物活性代谢物仍然是新药研究的重要目标^[13]。

本研究以农业生产上难以防治的黄瓜枯萎病菌为靶标, 进行拮抗放线菌筛选, 并对高活性菌株进行发酵复筛、种类鉴定、室内及离体防效研究。本研究旨在为黄瓜枯萎病生物防治提供理论依据, 也为拮抗生防菌资源开发奠定基础。

收稿日期: 2021-10-20

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31501665); 北部湾环境演变与资源利用教育部重点实验室和广西地表过程与智能模拟重点实验室 (南宁师范大学) 开放基金 [编号: NNU-KLOP-K(X)1904]; 山西省高校科技创新项目 (编号: 2021L468); 山西省自然科学基金 (编号: 20210302123083、20210302123087); 运城科技局项目 (编号: YCKJ-7021029、YCKJ-2021030); 运城学院食品科学与工程重点学科项目 (编号: XK-2021010)。

作者简介: 李培谦 (1983—), 男, 山东济南人, 博士, 副教授, 主要从事生物防治研究。E-mail: lipeiqlanfly@126.com。

通信作者: 冯宝珍, 博士, 教授, 主要从事果蔬病害防治研究。E-mail: fengbaozhen@ycu.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验于 2018 年 10 月至 2020 年 11 月在运城学院逸夫实验楼及智能温室开展。2018 年 10 月于山西省运城市北相镇黄瓜大棚采集土壤样品,采用五点取样法在健康黄瓜根际取土。取 50 ~ 100 g 土样装入无菌自封袋备用。供试病原菌黄瓜枯萎病菌 (*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 保存于笔者所在实验室^[14]。

高氏一号培养基:1 g KNO_3 、0.5 g K_2HPO_4 、0.5 g MgSO_4 、0.5 g NaCl 、0.01 g FeSO_4 、20 g 可溶性淀粉,1 000 mL 蒸馏水。马铃薯葡萄糖(PDA)培养基:200 g 马铃薯,15 g 葡萄糖,1.5% 琼脂粉,1 000 mL 蒸馏水。10% 小米培养基:10 g 葡萄糖,3 g 蛋白胨,2.5 g NaCl ,2 g CaCO_3 ,10 g 小麦,1 000 mL 蒸馏水,pH 值 = 7.2。

1.2 放线菌的分离与纯化

将风干土样研磨成粉,称取 10 g 倒入 90 mL 无菌水中,搅拌溶解后静置 10 min,取上清液。将上清液梯度稀释后与 50 ℃ 左右高氏一号培养基混匀后倒平板,置于 28 ℃ 培养箱培养 1 周,长出菌落后转接到新的高氏一号平板,具体方法参见文献^[15]。

1.3 拮抗放线菌的筛选

1.3.1 拮抗菌株的初筛 根据参见文献^[16]的方法,准备放线菌和黄瓜枯萎病菌菌饼。将黄瓜枯萎病菌菌饼接种于 PDA 平板中央,同时将放线菌菌饼接种于距病原菌约 2.0 cm 的四周,25 ℃ 培养 7 d,对照组只接黄瓜枯萎病菌菌饼。观察病原菌菌落生长情况,并测量菌落直径,每个处理重复 3 次。

1.3.2 放线菌发酵液活性测定 放线菌 CA-6 用高氏一号液体培养基于 28 ℃、180 r/min 振荡培养 72 h;然后再按 6% 的接种量接入到装液量为 200 mL 的 10% 小米培养基中(500 mL 三角瓶),在上述培养条件下发酵 5 d。发酵结束后,用快速定性滤纸抽滤得到发酵液;所得发酵液再用 0.22 μm 的无菌过滤器过滤,置于 4 ℃ 冰箱备用。

采用滤纸条法和牛津杯法检测发酵液的抑菌活性。滤纸条法:PDA 平板正中接病原菌菌饼,然后在菌饼两侧同等距离处贴滤纸条,然后加入 100 μL 发酵液浸润,以无菌水作为对照,试验重复 3 次。牛津杯法:制备 1.0×10^6 个/mL 黄瓜枯萎病分生孢子悬浮液,将 200 μL 孢子悬浮液均匀涂布在

PDA 平板上,然后将 4 个无菌牛津杯均匀放置在 PDA 平板上,将 200 μL 发酵滤液置于牛津杯中,以无菌水为对照,将平板置于 25 ℃ 下恒温培养 5 d,然后测量抑菌圈宽度,每个处理设置 3 个重复。

1.4 拮抗菌株的分类地位

1.4.1 表型特征及生理生化特征 在高氏一号培养基上培养 7 ~ 10 d,观察气生菌丝、基内菌丝颜色,可溶性色素的有无,根据文献描述的方法对菌株进行初步鉴定^[17]。采用插片法观察菌株 CA-6 在高氏一号培养基的基内菌丝形态和孢子特征。菌株生理生化特性分析参照《放线菌快速鉴定与系统分类》和《微生物资源学》中相应章节的描述进行^[18-19]。

1.4.2 分子鉴定 利用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取 CA-6 基因组 DNA,以细菌 16S rDNA 通用引物 27F:5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 和 1492R:5' - GGCTACCTTGTTACGACTT-3' 进行 PCR 扩增。50 μL 反应体系:2 \times Taq Master Mix 25 μL 、基因组 DNA 1 μL 、引物各 1 μL ,ddH₂O 补足至 50 μL 。反应程序为 94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,55 ℃ 30 s,72 ℃ 1 min,32 个循环;最后 72 ℃ 10 min^[16]。

扩增产物经电泳初步检测后,送到生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 分析比对,并下载模式菌株的 16S rDNA 序列。采用 MEGA-X 构建 NJ(Neighbour-Joining)系统发育树以明确菌株分类地位^[20-21]。

1.5 CA-6 对黄瓜枯萎病的拮抗活性及防效测定

1.5.1 发酵液对黄瓜枯萎病菌丝生长的影响 25 ℃ 培养箱内将黄瓜枯萎病菌在 PDA 平板上培养 1 周,用打孔器取菌饼(直径 7 mm)。将无菌发酵原液与 PDA 培养基按一定比例混匀制成含药平板,使发酵液稀释成 5、10、50、100、200 倍液;将菌饼接至平板中央,25 ℃ 下培养 7 d 后,以十字交叉法测量菌落直径大小,计算菌丝生长抑制率。菌丝生长速率计算公式参照文献^[16]进行。以无菌水的处理为对照,设置 3 个重复。

1.5.2 发酵液对黄瓜枯萎病菌分生孢子萌发的影响 制备浓度为 1.0×10^7 个/mL 的黄瓜枯萎病孢子悬浮液;加入适量上述发酵液将孢子悬浮液终浓度调为 1.0×10^6 个/mL,于 25 ℃ 暗培养 24 h 后镜检,每个处理观察 3 个视野,分别观察 50 个分生孢子,统计孢子萌发率。如果分生孢子抽出芽管

(芽管长度至少为分生孢子长度的一半)、长出菌丝,则判定分生孢子已萌发^[22]。以无菌水为对照,每个处理 3 个重复,参照文献中方法计算孢子萌发率^[22]。

1.5.3 CA-6 发酵液对盆栽黄瓜苗的防治效果

利用盆栽黄瓜苗测定 CA-6 对黄瓜苗期枯萎病的室内防效。按上述方法制备黄瓜枯萎病菌孢子悬浮液 10^7 个/mL,接种感病黄瓜品种(9930)的幼苗。试验设置 2 个处理:(1)接种病原菌 + CA-6 发酵液原液;(2)接种病原菌分生孢子悬浮液,每个处理使病原菌分生孢子终浓度调节为 10^6 CFU/mL,分别移栽 20 棵黄瓜幼苗并用 50 mL 接种液灌根处理。具体测试方法参见文献[23]。试验设置 3 个重复,14 d 后测量并记录发病情况^[24],计算病情指数和防治效果。病情指数 = Σ (病株数 \times 相应级数)/总株数 \times 最高级数 $\times 100$;防治效果 = (对照病情指数 - 处理病情指数)/对照病情指数 $\times 100\%$ 。

1.6 数据处理

采用 SPSS 20.0 统计分析软件对测量数据进行差异显著性检验(Duncan's 新复极差法, $\alpha = 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株分离

共获得 48 株放线菌纯培养,编号为 CA-1 ~ CA-48。通过形态观察,初步去除重复菌株,根据平板对峙培养结果,发现对黄瓜枯萎病具有明显拮抗作用的放线菌有 5 株(表 1),其中菌株 CA-6 抑菌率达 69.36%,因此本研究选择 CA-6 进行后续试验(图 1)。

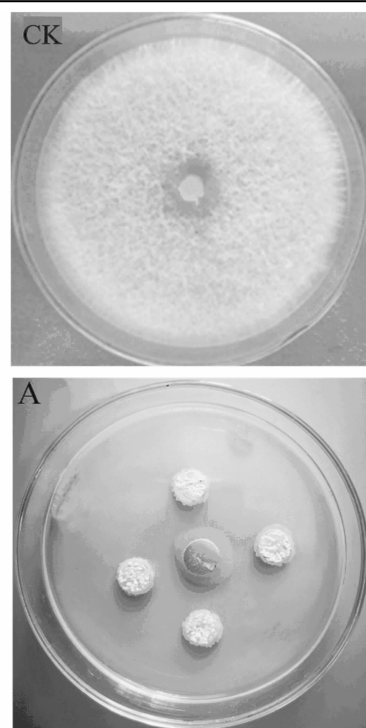
表 1 放线菌对黄瓜枯萎病菌的抑制作用初筛结果

菌株编号	菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)
CK	8.42 ± 0.12	—
CA-1	4.41 ± 0.06	$47.62 \pm 0.14a$
CA-2	3.42 ± 0.02	$59.38 \pm 0.08a$
CA-6	2.58 ± 0.04	$69.36 \pm 0.06a$
CA-31	3.49 ± 0.06	$58.55 \pm 0.06b$
CA-40	3.80 ± 0.02	$54.87 \pm 0.04c$

注:同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著,表 3、表 4 同。

2.2 拮抗放线菌复筛

对拮抗放线菌进行复筛,结果表明,发酵液抑菌活性显著,牛津杯周围出现了明显的抑菌圈,抑



A—CA-6; CK—对照

图 1 拮抗放线菌 CA-6 与黄瓜枯萎病菌平板对峙效果

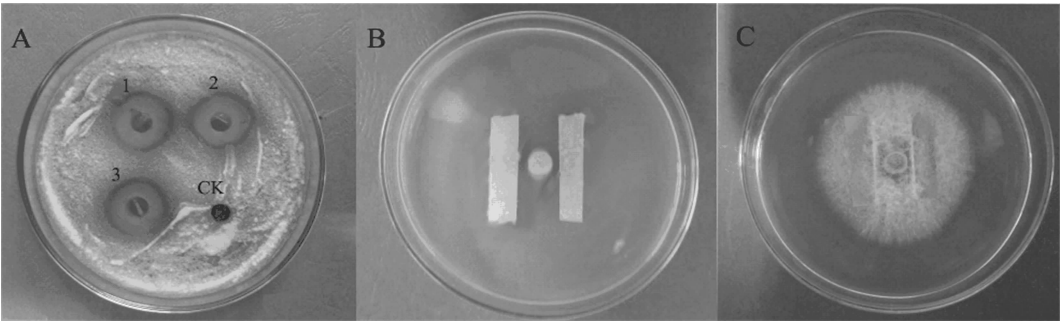
菌圈直径可达 17.8 mm(图 2-A);浸润发酵液的无菌滤纸条具有明显的抑制活性,而对照组病原菌能正常生长(图 2-B、图 2-C)。因此,放线菌 CA-6 发酵液具有明显的抑菌活性,可以作为黄瓜枯萎病候选生防菌用于后续试验。

2.3 CA-6 菌株鉴定

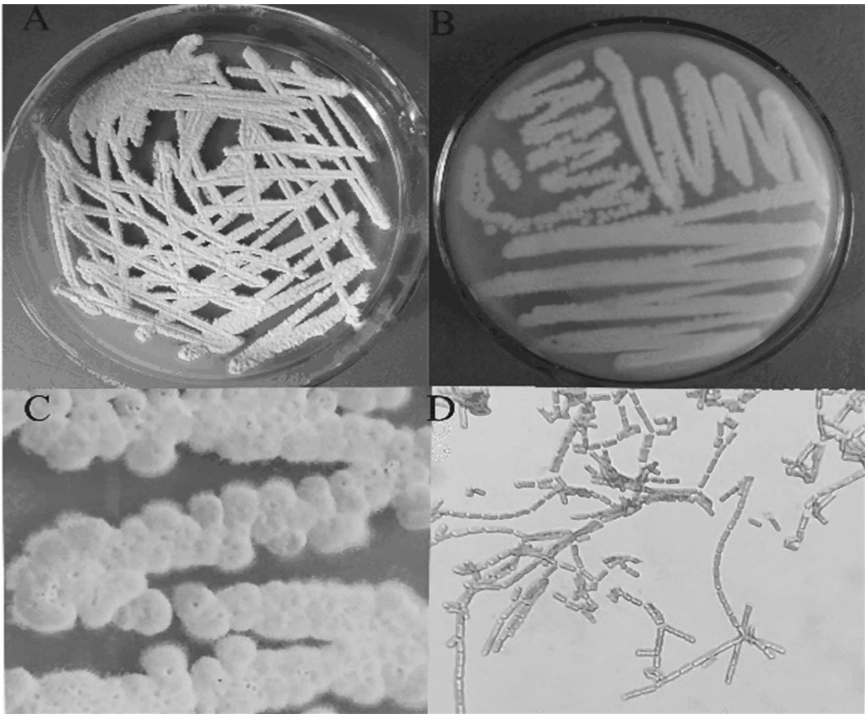
2.3.1 形态特征 放线菌 CA-6 在高氏一号培养基上菌落呈扁平状,近圆形,孢子丝乳白色,培养过程中无色素产生(图 3);其基丝连续、气生菌丝发达,可产生大量孢子。

2.3.2 生理生化特征 根据《放线菌快速鉴定与系统分类》和《微生物资源学》的相关章节方法对菌株生理生化进行分析^[18-19]。由表 2 可知,菌株 CA-6 能使淀粉、纤维素水解,能使牛奶凝固和胨化,能使明胶液化,不能使硝酸盐还原,不能产生硫化氢。能利用 D-葡萄糖、D-果糖、蔗糖,不能利用麦芽糖、鼠李糖。

2.3.3 分子鉴定 对放线菌株 CA-6 进行分子鉴定,结果表明,放线菌株 CA-6 的 16S rDNA 核苷酸总长为 1 433 bp(GenBank 登录号:MW652689)。经 BLAST 比对分析,发现与菌株 CA-6 同源性高者均属于链霉菌属。下载 16 个典型菌株的 16S rDNA 序列用 MEGA-X 软件 Neighbor-Joining 法构建进化



A—牛津杯试验(CK: 无菌水; 1~3: 发酵滤液); B—滤纸条试验; C—对照
图2 拮抗放线菌 CA-6 对黄瓜枯萎病菌抑制作用复筛结果



A—正面; B—背面; C—单菌落; D—孢子丝(100×)
图3 菌株 CA-6 的平板菌落及孢子丝

表 2 菌株 CA-6 的生理生化特征

生理生化特征	结果	生理生化特征	结果
淀粉水解	+	纤维素利用	+
硫化氢反应	-	牛奶胨化	+
硝酸盐还原	-	明胶液化	+
牛奶凝固	+	麦芽糖	-
蔗糖	+	D-果糖	+
鼠李糖	-	D-葡萄糖	+

注:“+”表示阳性反应或可利用;“-”表示阴性反应或不可利用。

树。图 4 结果表明,菌株 CA-6 与 *Streptomyces kanamyceticus* (FN646641.1) 亲缘关系最近,聚为一支,因此将菌株 CA-6 初步鉴定为卡那链霉菌

(*Streptomyces kanamyceticus*)。

2.4 放线菌 CA-6 对黄瓜枯萎病的抑菌活性及盆栽防效

2.4.1 发酵滤液对黄瓜枯萎病分生孢子萌发的抑制作用 经不同浓度发酵滤液处理的黄瓜枯萎病分生孢子萌发率差异明显,说明 CA-6 发酵滤液对黄瓜枯萎病菌分生孢子萌发具有明显的抑制效果。稀释 5 倍的发酵液处理的黄瓜枯萎病菌孢子萌发抑制率达 100.00%。当发酵液稀释 10 倍时对分生孢子的抑制率为 87.50%,稀释 100 倍时,对病原菌分生孢子萌发抑制率仍达 54.80%,而当稀释到 200 倍时,抑制效果明显减弱,分生孢子萌发抑制率只有 13.71%,抑菌活性显著降低(表 3)。

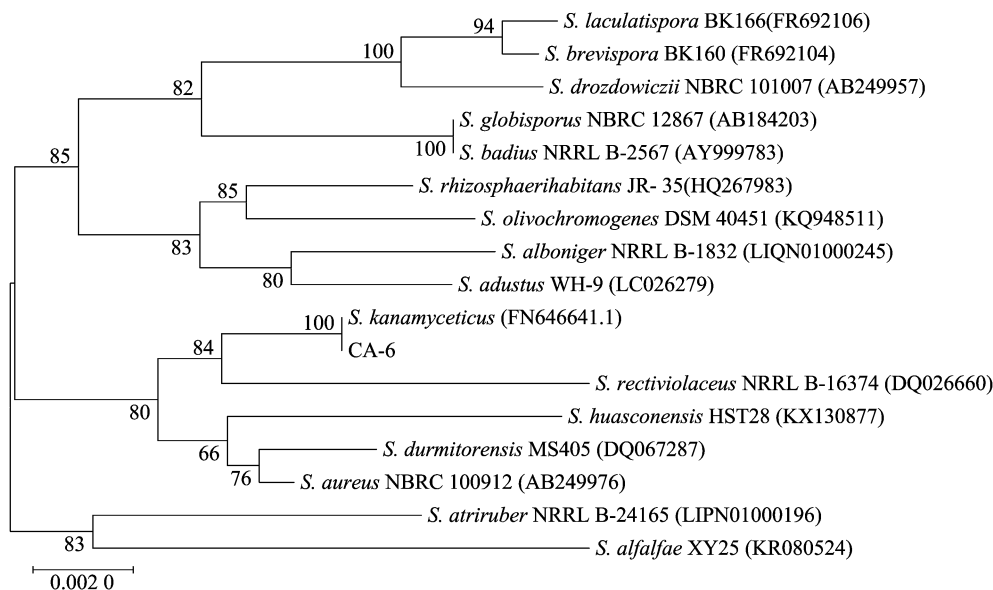


图4 基于菌株 CA-6 的 16S rDNA 序列构建的系统发育树

2.4.2 发酵液对黄瓜枯萎病菌生长的抑制效果
由表 3 可知,CA-6 发酵液对黄瓜枯萎病菌菌丝生长抑制效果明显。当发酵液稀释 5 倍时,对病原菌菌丝生长抑制率为 96.22%;当稀释 10 倍时,抑制率为 87.61%;当稀释 100 倍时,菌丝抑制率下降到 50.30%。当稀释 200 倍时,菌丝抑制率为 10.40%,抑菌活性显著降低。

表 3 菌株 CA-6 发酵滤液对黄瓜枯萎病菌菌丝生长的抑制作用

稀释倍数	分生孢子萌发抑制率 (%)	菌丝生长抑制率 (%)
5 ×	100.00 ± 0.0a	96.22 ± 1.1a
10 ×	87.50 ± 0.4b	87.61 ± 1.2b
100 ×	54.80 ± 1.1c	50.30 ± 0.6c
200 ×	13.71 ± 0.8d	10.40 ± 0.7d

2.4.3 发酵液对黄瓜枯萎病的防效 将 CA-6 菌株发酵后进行黄瓜枯萎病盆栽防效测定,结果(表 4)表明,接种菌株 CA-6 发酵原液有效降低了黄瓜枯萎病的发病,发病率明显降低,防治效果达 67.37%。CA-6 发酵液拮抗黄瓜幼苗枯萎病效果明显,具有生防菌株的潜力,具有良好的应用前景。

3 讨论与结论

真菌性枯萎病是农业生产上重要的土传病害,主要由镰孢菌属真菌尖孢镰孢菌(Fusarium oxysporum Schl.) 引起。据报道大田作物、园林花卉、林果及保护地蔬菜等均能发生真菌枯萎病,造成严重损失。枯萎病病原菌生存能力强、传播途径

表 4 菌株 CA-6 发酵滤液对盆栽黄瓜苗防病效果

处理	病害防治		
	发病率 (%)	病情指数	防病效果 (%)
黄瓜枯萎病菌	92.37 ± 1.82a	73.76 ± 2.37a	—
CA-6 发酵原液 + 病原菌	50.28 ± 3.08b	24.06 ± 1.3ab	67.38 ± 1.3

多,一旦发病很难根治。因此,近年来利用高活性生防菌防治枯萎病是治理该类病害的重要途径^[25]。筛选高防效拮抗微生物菌株是生防制剂开发的重要基础,本研究从黄瓜根际土壤中分离到一株对黄瓜枯萎病菌具有强烈拮抗作用的菌株 CA-6,该菌株对黄瓜枯萎病菌菌丝生长和孢子萌发的抑制作用明显。目前国内外枯萎病拮抗放线菌以链霉菌属生防菌报道居多^[10-11,23,26], S. bikiniensis HD-087 对黄瓜枯萎病菌具有明显的抑制效果^[10];菌株 S-101(Streptomyces luridus) 能抑制黄瓜枯萎病菌,而且对尖镰孢菌黏团专化型(F. oxysporum f. sp. conglutinans) 有抑制作用^[11]; S. rhizosphaericus 对苦瓜枯萎病具有良好的抑制作用^[23]; Streptomyces sp. CB-75 对香蕉枯萎病有较好的抑制作用^[26];这些研究均表明链霉菌具有控制土传病害的巨大潜力。据报道,卡那链霉菌对苜蓿炭疽病菌及粉红镰孢、尖镰孢等苜蓿根腐病菌均表现出良好的拮抗效果^[26];本研究将菌株 CA-6 初步鉴定为卡那链霉菌,该研究首次报道了用于枯萎病防治的卡那链霉菌。

链霉菌应用于生物防治主要是利用活体竞争作用,诱导或提高植物抗病性和代谢产物抑菌作

用^[27]。本研究中滤纸条和牛津杯试验结果均能证明 CA-6 发酵液对黄瓜枯萎病菌拮抗效果显著。本研究中共同接种黄瓜枯萎病菌与放线菌时比单一接种病原菌组的黄瓜苗发病率降低了 42.09 百分点,温室条件下,CA-6 发酵液对黄瓜苗期枯萎病的防效达到 67.38%,表明放线菌 CA-6 对病原菌的生防作用是由于发酵活性物质。据报道,放线菌菌株 S-101 发酵液对黄瓜枯萎病防效达 57.11%^[11],杀结链霉菌(*S. tubercidicus*)的代谢产物对稻瘟病的抑菌作用^[28],都与本研究结果相似;而链霉菌菌株 0250 菌悬液对盆栽和大田苦瓜枯萎病菌的防效和促生作用明显^[23],说明放线菌具有抑菌促生作用。而影响放线菌抗菌活性物质产生的关键因素是发酵条件,因此优化发酵条件是提高活性成分含量的必经途径^[27,29-30]。本试验通过小米培养基发酵,后续研究将通过单因素和正交试验优化发酵条件,以确定最佳发酵条件,提高活性成分含量。再者,生防菌能否在植物根部定殖也是决定大田试验效果的重要因素^[11],本研究下一步将通过荧光蛋白标记技术确定其定殖特性。本研究未确定该放线菌的抑菌活性物质,后续将通过层析技术、色谱技术等确定活性物质的成分及结构。

参考文献:

- [1] Hu J L, Lin X G, Wang J H, et al. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation enhances suppression of cucumber *Fusarium* wilt in greenhouse soils[J]. *Pedosphere*, 2010, 20(5): 586-593.
- [2] Luo W J, Liu L D, Qi G F, et al. Embedding *Bacillus velezensis* NH-1 in microcapsules for biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2019, 85(9): e03128-e03118.
- [3] 张春秋, 马光恕, 廉华, 等. 木霉对黄瓜幼苗生理特性及枯萎病防治效果的影响[J]. *植物保护*, 2018, 44(5): 238-246.
- [4] 朱森林, 王丹媚, 唐秀梅, 等. 木霉水分散粒剂的培养条件优化及其对黄瓜枯萎病的防治效果[J]. *浙江农业学报*, 2020, 32(6): 1009-1018.
- [5] 张俊杰, 尚益民, 田寅, 等. 1 株黄瓜枯萎病菌拮抗酵母的分离鉴定及其拮抗作用初探[J]. *河南农业大学学报*, 2019, 53(3): 393-399.
- [6] 季倩茹, 陈静, 胡远亮, 等. 3 种芽孢杆菌菌剂对黄瓜枯萎病的防效及其作用机制初探[J]. *华中农业大学学报*, 2020, 39(5): 101-107.
- [7] 张德珍, 李婷婷, 代惠洁, 等. 解淀粉芽孢杆菌 JF-1 对黄瓜的防病促生作用[J]. *北方园艺*, 2020(10): 16-21.
- [8] 罗文建, 杨凡, 史宣杰, 等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的分离鉴定及其生物防效[J]. *华中农业大学学报*, 2018, 37(3): 32-38.
- [9] 张涛涛, 张虹, 赵娟, 等. 黄赭色链霉菌 11F 发酵工艺及其对黄瓜幼苗生长的影响[J]. *科学技术与工程*, 2020, 20(16): 6391-6396.
- [10] Zhao S, Du C M, Tian C Y. Suppression of *Fusarium oxysporum* and induced resistance of plants involved in the biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by *Streptomyces bikiniensis* HD-087[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(9): 2919-2927.
- [11] 圆圆, 张虹, 苏道拉呼, 等. 抑制黄瓜枯萎病的链霉菌 S-101 及其生防作用研究[J]. *中国生物防治学报*, 2019, 35(5): 813-820.
- [12] 路丹丹, 赵艳芳, 马正, 等. 龟裂链霉菌 M527 抗真菌物质的分离鉴定及其在黄瓜枯萎病防治中的应用[J]. *中国生物防治学报*, 2016, 32(6): 783-787.
- [13] Busti E, Monciardini P, Cavaletti L, et al. Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2006, 152(Pt 3): 675-683.
- [14] Li P Q, Pu X M, Feng B Z, et al. FocVell influences asexual production, filamentous growth, biofilm formation, and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 312.
- [15] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 1975: 19-411.
- [16] 李培谦, 冯宝珍, 李新秀, 等. 番茄灰霉菌拮抗放线菌 LA-5 的筛选及鉴定[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(12): 4172-4180.
- [17] Errakhi R, Lebrihi A, Barakate M. *In vitro* and *in vivo* antagonism of actinomycetes isolated from Moroccan rhizospheric soils against *Sclerotium rolfsii*: a causal agent of root rot on sugar beet (*Beta vulgaris* L.)[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 107(2): 672-681.
- [18] 徐丽华, 姜恺, 张华, 等. 微生物资源学[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
- [19] 叶振凤, 吴湘琴, 吕冠华, 等. 梨树腐烂病的病原菌鉴定和化学药剂筛选[J]. *华中农业大学学报*, 2015, 34(2): 49-55.
- [20] Lu X H, Liu W Q, Xiang C G, et al. Genome-wide characterization of GRAS family and their potential roles in cold tolerance of cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(11): 3857.
- [21] 李培谦, 冯宝珍. 尖孢镰孢果胶裂解酶基因家族鉴定及感染表达模式分析[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2774-2783.
- [22] Veloukas T, Kalogeropoulou P, Markoglou A N, et al. Fitness and competitive ability of *Botrytis cinerea* field isolates with dual resistance to SDHI and QoI fungicides, associated with several sdhB and the cytb G143A mutations[J]. *Phytopathology*, 2014, 104(4): 347-356.
- [23] 李晓芳, 田叶韩, 彭海莹, 等. 防治苦瓜枯萎病的拮抗放线菌分离筛选及鉴定[J]. *应用生态学报*, 2020, 31(11): 3869-3879.
- [24] Pu X M, Xie B Y, Li P Q, et al. Analysis of the defence-related mechanism in cucumber seedlings in relation to root colonization by nonpathogenic *Fusarium oxysporum* CS-20[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 355(2): 142-151.

李正鹏,苏皖平,杨威,等.小麦全蚀病拮抗细菌 Z0-j 的鉴定及其生防潜力评估[J].江苏农业科学,2022,50(17):121-125.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.17.019

小麦全蚀病拮抗细菌 Z0-j 的鉴定及其生防潜力评估

李正鹏¹,苏皖平¹,杨威¹,宋虎卫¹,顾大路²,刘廷武¹,罗玉明¹

(1.江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室/淮阴师范学院生命科学院,江苏淮安 223300;

2.江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所,江苏淮安 223001)

摘要:为获得针对小麦全蚀病的优质生防资源,从 16S rDNA 序列分析、抑菌效果及显微观察、活性物质稳定性等方面鉴定和评估内生细菌 Z0-j 及其生防潜力。结果显示,内生细菌 Z0-j 为铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*),对靶标菌禾顶囊壳小麦变种(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)拮抗效果明显,引致靶标菌菌丝畸形、顶端膨大、原生质外渗、细胞膜透性增强的现象。同时,菌株 Z0-j 活性物质对温度、pH 值、紫外光照、超声波以及蛋白酶等外界因素有良好的耐受性。由此可见,内生细菌 Z0-j 是一株对小麦全蚀病具备良好开发潜力的生防菌株。

关键词:小麦全蚀病;假单胞菌;内生细菌;生物防治;稳定性

中图分类号:S435.121.4⁺9;S476.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2022)17-0121-05

由禾顶囊壳小麦变种(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)引起的小麦全蚀病,是世界上最重要的小麦根部病害,因其突出的土壤传播特性,一直是小麦亟待解决的防治难题^[1]。该病在我国安徽省、山东省和河南省等栽培地区广泛发生,目前主要采取化学药剂拌种的方法进行防治,而化学防治易引起环境污染及产生抗药性^[2]。随着人们环保、绿色意识的增强,利用微生物防控全蚀病已成为一条行之有效的途径。假单胞菌是广泛存在于植物根际的一类微生物,常常具备显著防治植物病害、促进植物生长的作用^[3]。其生防机制包括产生拮抗物质^[4]和铁载体或水解酶、营养竞争^[5]、生物膜的快

速形成^[6]以及诱导植物抗性^[7]等。因此,本研究在前期构建的微生物资源库基础上,以禾顶囊壳小麦变种为靶标菌,鉴定全蚀病生防菌株 Z0-j,并对其拮抗效果和代谢产物稳定性进行评估,为进一步开发利用奠定理论依据和技术支持。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病原真菌为禾顶囊壳小麦变种,由黑龙江八一农垦大学柯希望副教授惠赠。

供试生防细菌 Z0-j,2017 年 11 月筛选自江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室有益微生物资源库,编号 L031,保存于-80℃冰箱。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株活化 靶标菌:将斜面上保存的禾顶囊壳小麦变种扩繁于 PDA 培养基上,待菌落直径长至培养皿的一半时,待用。

菌株 Z0-j 发酵液制备:按照前期研究结果,将直径 7 mm 的菌饼接种到种子发酵培养液(250 mL

收稿日期:2021-10-21

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:31801791);江苏省高等学校自然科学研究面上项目(编号:17KJB210002)。

作者简介:李正鹏(1985—),男,河南信阳人,博士,讲师,主要从事植物病害综合治理研究。E-mail:zhp_li@163.com。

通信作者:罗玉明,教授,主要从事植物病害生物防治研究。E-mail:yumingluo@163.com。

[25]Chen Y F,Zhou D B,Qi D F,et al. Growth promotion and disease suppression ability of a *Streptomyces* sp. CB-75 from banana rhizosphere soil[J]. *Frontiers in Microbiology*,2018,8:2704.

[26]胡进玲,汪治刚,徐娜,等.防治紫花苜蓿真菌病害的生防菌筛选[J]. *草业学报*,2017,26(6):145-152.

[27]杨祁云,王成,冼海辉,等.海洋放线菌株 H74-18 抗菌活性及其发酵条件优化[J]. *中国海洋药物*,2020,39(5):52-58.

[28]阮宏椿,石姐姐,杜宜新,等.水稻稻瘟病拮抗稀有放线菌的筛

选及防治效果[J]. *中国生物防治学报*,2021,37(3):538-546.

[29]王飞飞,庾利,刘佳萌,等.放线菌 R2A14A-1 的活性代谢产物分离及菌株鉴定[J]. *中国抗生素杂志*,2014,39(10):721-728.

[30]程亮,罗明明,吴继纲,等.海洋放线菌 Y12-26 中抗真菌活性代谢产物的分离纯化与结构鉴定[J]. *中国抗生素杂志*,2017,42(8):631-638.