

# 黄瓜枯萎病拮抗菌的分离鉴定及其生物防效

罗文建<sup>1</sup> 杨 凡<sup>2</sup> 史宣杰<sup>2</sup> 赵秀云<sup>1</sup>

1. 华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070; 2. 河南省农业科学院园艺研究所, 郑州 450002

**摘要** 从黄瓜根际土壤和根、茎中分离出对黄瓜枯萎病病原菌——尖孢镰刀菌黄瓜专化型具有较强拮抗作用的细菌菌株 7 株, 这些细菌在平板上对尖孢镰刀菌的抑菌效果最高可达 46%。经济福平抗生素诱导抗性后, 这 7 株菌株共得到具有抗性的菌株 4 株: GJ-9、NH-1、P<sub>7</sub>、XX<sub>2</sub>J<sub>7</sub>。检测有利福平标记的菌株在黄瓜苗根系和植株内的定殖能力, 结果显示菌株在黄瓜苗具有良好的定殖能力, 并且能通过根部运输进入茎中, 从而显著提高黄瓜苗的 PAL、POD 和 PPO 防御酶活性。盆栽试验结果表明: 将筛选到的 7 株拮抗菌的发酵液对黄瓜苗进行处理, 其中拮抗菌 NH-1 的发酵液对黄瓜枯萎病具有显著的防治效果, 其处理后的黄瓜苗病情指数为 26.00, 防治效果达到 66.03%。根据其生长形态特征及对其进行 *gyrb* 基因序列分析, 鉴定其为贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)。

**关键词** 黄瓜枯萎病; 拮抗菌; 生物防效; 芽胞杆菌

**中图分类号** S 436.421.1<sup>+</sup>3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)03-0032-07

黄瓜枯萎病是一种由尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp.cucumerium Owen)病原菌引起的黄瓜病害, 该病原菌的侵染方式为根部侵染, 通过破坏植株的维管束, 影响植株的营养运输和营养吸收, 收导致植株枯萎死亡<sup>[1]</sup>。目前生产上主要采用田间轮作和植株嫁接的方式来防治枯萎病害, 并配合施用化学农药的方式来防治病害, 这在一定程度上能快速地防治病害, 但在使用化学药剂过程中容易带来药物残留等一系列环境污染, 因此, 生物防治理念越来越受到人们的重视<sup>[2]</sup>。生物防治是用一种生物通过拮抗抑制作用来防治另外一种生物的方法。目前用的较多的是利用真菌、细菌等微生物分泌抗生物质来防治植物病害。芽胞杆菌由于可以形成抗逆性极强的芽胞, 且能在土壤中良好地定殖, 因此受到广大科研人员的重视<sup>[3]</sup>, 而贝莱斯芽胞杆菌在其中占据着重要的位置。2011 年, 詹发强等<sup>[4]</sup>报道了一种贝莱斯芽胞杆菌及其作为番茄枯萎病拮抗菌中的应用, 2012 年, 朱天辉等<sup>[5]</sup>利用 *Bacillus velezensis* ZJ20 制成生物液体制剂, 用于预防梢枯病。2017 年, 金疏桐等<sup>[6]</sup>研究了内生贝莱斯芽胞杆菌的生物拮抗活性。笔者在河南地区黄瓜枯萎病发病田间采集到健康黄瓜植株, 从其根茎及根际土壤中分离出具有显著拮抗效果的芽胞杆菌菌株,

其中 1 株命名为 NH-1 的菌株在室外具有较强的生物防效, 对其进行了分析鉴定, 以期用于对黄瓜枯萎病的生物防治的研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料和培养基

1) 材料。分别从河南郑州、新乡、内黄等地发病田采取健康的黄瓜苗和根际土壤, 用于分离根、茎及根际土壤中的细菌。

2) PDA 培养基。用于病原真菌的分离培养。马铃薯 200 g、蔗糖 20 g、无菌水 1 L, 马铃薯去皮切碎, 加水煮沸 30 min, 用双层纱布过滤, 取滤液加蔗糖, 加水补足 1 000 mL, pH 自然, 灭菌(121 ℃, 20 min)。

3) LB 培养基。用于拮抗菌活化及发酵培养。胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 6.8~7.0, 灭菌(121 ℃, 20 min)。

### 1.2 黄瓜植株内生细菌的分离纯化

1) 黄瓜苗内生细菌的分离。将取样黄瓜苗植株根茎洗净, 称取 0.3 g 左右的根茎组织, 无菌水洗净后, 用 75% 的乙醇表面消毒 30 s, 再置于 0.1% 的升汞溶液中消毒 1.5 min, 消毒完毕后立即用无菌水漂洗 2~3 次。将处理后的根茎组织放入研钵内, 加

入 3 mL 无菌水,充分研碎,将研碎后的组织浆液进行梯度稀释,取稀释液 100  $\mu\text{L}$  进行涂布平板,在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养箱中培养 1~2 d,长出单菌落后进行划线纯化保存<sup>[7]</sup>。

2) 根际土壤中细菌的分离。称取所取样黄瓜植株的根际土壤 10 g,置于加有 90 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中,振荡摇晃 30 min,土壤浆液按照梯度稀释法稀释,取一定梯度稀释液 100  $\mu\text{L}$  涂布于 LB 培养基上,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 1~2 d,挑取单菌落进行划线纯化保存<sup>[8]</sup>。

### 1.3 拮抗菌的筛选

采用平板对峙法<sup>[9]</sup>,将尖孢镰刀菌预先在 PDA 平板上进行活化,用打孔器将活化好的病原菌打成直径 1 cm 大小的块状置于平板中央,28  $^{\circ}\text{C}$  下培养 2 d后,在培养好的病原菌平板背面以菌饼为中心画十字,在平板内十字的每个方向上,距菌落边缘 2~3 cm 处点接 3~4 个菌株,每个处理重复 3 次,设空白对照(只接种病原菌,不接种供试菌株),在 28  $^{\circ}\text{C}$  的生化恒温培养箱中培养 5~7 d,观察菌落的生长状态以及拮抗菌株对病原菌的拮抗效果,记录数据。

### 1.4 拮抗菌发酵液热处理抑菌活性

将活化得到的拮抗芽胞杆菌按 2% 的接种量接种至 50 mL 的 LB 发酵培养基中发酵培养 48 h,得到的发酵液 8 000 r/min 离心 15 min,取上清液,于 115  $^{\circ}\text{C}$  灭菌 10 min,按体积比 1:10 的比例加入 PDA 培养基中,以不加发酵液为空白对照,倒平板,在每个平板中央接入 5 mm 真菌菌饼,28  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养,48 h 开始测量各处理中真菌生长菌丝直径,计算抑菌率<sup>[10]</sup>。

$$\text{抑菌率} = (\text{对照组菌落半径} - \text{处理组菌落半径}) / \text{对照组菌落半径} \times 100\%$$

### 1.5 拮抗菌株诱导利福平抗性

称取利福平粉末 0.5 g 溶于 50 mL 二甲基亚砜中,配制成 10 mg/mL 的终质量浓度,过滤除菌处理,分装于 1.5 mL 离心管中备用。配制分别含 0.5、1、2、5、10、20、40、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  不同质量浓度 Rif 的固体 LB 培养基。单菌落划线法对所分离筛选得到的芽胞杆菌依次在含各浓度利福平抗性平板上划线培养,稳定培养 3 代后直至产生抗利福平 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,即得具有所要的利福平标记的菌株<sup>[11]</sup>。在长有尖孢镰刀菌的平板上点接具有利福平抗性的菌株,检测诱导抗性前后菌株的拮抗性变化。

### 1.6 利福平标记菌株在黄瓜植株内的定殖研究

将利福平标记菌株经摇瓶发酵培养至

10<sup>8</sup> cfu/mL 左右,做灌根处理<sup>[12]</sup>。试验共设 2 个处理:①灌根处理。将长至子叶期的黄瓜苗移栽至装有无菌营养土的花盆中,待其生长至三叶期后用 Rif 标记发酵菌液按每株苗 10 mL 的量灌根;②空白对照。同上处理,待黄瓜苗长至三叶期后浇灌每株苗 10 mL 无菌水。

在灌根时间分别为 7、14、21、35、45 d 后随机取样,检测黄瓜苗根茎及根际土壤中的 Rif 标记菌,取 0.3~0.5 g 灌根后的黄瓜苗根茎,清洗干净后表面用 70% 的乙醇消毒 30 s,然后用 0.1% 升汞浸泡处理 1.5~3 min 后,用无菌水漂洗 3 次,晾干表面水后剪碎加入 3 mL 无菌水在研钵中充分捣碎,取研磨浆液进行梯度稀释,取混匀后的稀释液 100  $\mu\text{L}$  涂布于含 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  利福平的 LB 平板上,每个处理至少 3 个重复,37  $^{\circ}\text{C}$  恒温培养 2 d,根据每个平板上生长出的菌落数,计算每克鲜质量根茎组织中的活菌数(cfu/g)。

另外称取 10 g 根际土于 90 mL 无菌水中振荡 30 min,系列稀释后涂布于含 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  利福平的 LB 平板上培养计数,计算平均每克根际土的含菌量。

### 1.7 拮抗菌株对黄瓜苗防御反应酶系的影响

1) 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性测定。PAL 活性测定参照 Hano 等<sup>[13]</sup>方法,略有改变。取 0.25 g 处理的叶片组织加入 3 mL 缓冲液(5 mmol/L  $\beta$ -巯基乙醇,1 mmol/L EDTA,1% PVP,pH 8.4),加入少量石英砂于研钵中冰浴研磨,取上清为粗酶液。4  $^{\circ}\text{C}$  下 8 000 r/min 离心 20 min,收集上清液检测 PAL 酶活性。取酶液 4  $\mu\text{L}$ ,加入 3.9 mL 测定液(L-苯丙氨酸 20 mmol/L,0.05 mmol/L 硼酸缓冲液,pH 8.4)中,混匀后 40  $^{\circ}\text{C}$  下反应 1 h,在 290 nm 下测定 OD 值。以每克蛋白质每分钟 OD 值变化 0.01 定义为 1 个活力单位(U)。

2) 多酚氧化酶(PPO)活性测定。参照 Ali 等<sup>[14]</sup>文献方法,略有改变。取 0.25 g 处理的叶片组织加入 3 mL 的酶提取液(50 mmol/L 磷酸缓冲液,pH 7.0)匀浆,4  $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 r/min 离心 20 min,上清保存-20  $^{\circ}\text{C}$ ,用于酶检测。取 0.1 mL 酶液,加入 1.5 mL 0.05 mol/L 磷酸缓冲液,30  $^{\circ}\text{C}$  下反应 2 min,再加入 1.5 mL 20 mmol/L 邻苯二酚,在 420 nm 下测定,以每克蛋白质每分钟 420 nm 波长的 OD 值变化 0.01 定义为 1 个活力单位(U)。

3) 过氧化物酶(POD)活性测定。POD 的活性

测定采用邻甲氧基苯酚法,略有改变<sup>[15]</sup>。POD 酶液提取方法同 PPO,用 50 mmol/L 磷酸缓冲液将粗酶液稀释 10 倍,取 1 mL 酶液,加入 1 mL 50 mmol/L 磷酸缓冲液,再加入 1 mL 1%愈创木酚摇匀后,置 30 ℃下水浴 5 min,然后加入 1 mL 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>,于 470 nm 下测定,以每毫克蛋白质每分钟 470 波长的 OD 值变化 0.01 为 1 个活力单位(U)。

1.8 盆栽田间试验

2016 年 10 月在河南省新乡市郊区开展大棚试验。以固体发酵的方式发酵拮抗菌株各 1 kg。并接种病原菌尖孢镰刀菌,按 1%接种于 500 mL PDA 发酵培养基中,37 ℃ 180 r/min 发酵 3~5 d。将拮抗菌的固体发酵物质稀释 10 倍和病原菌一起混合,取黄瓜苗种子浸泡在混合液中 30 min,将浸泡过后的种子播种于穴盘内,每个处理播种 20 盘,每盘 40 孔。待黄瓜苗种子发芽后,长至尖叶期时,再次取拮抗菌的固体发酵产物稀释 10 倍后浇灌苗。对照组种子只接种病原菌不浇灌拮抗菌发酵物,30 d 后统计黄瓜苗的发病情况,并统计病情指数和防治效果<sup>[16]</sup>。

1.9 拮抗菌的鉴定

将平板上活化好的拮抗菌株接种到装有 3 mL LB 液体培养基的 10 mL 培养瓶内,放在 37 ℃恒温摇床上过夜培养。取 1 mL 培养好的菌液离心去上清,在沉淀中加入 50 μL ddH<sub>2</sub>O 煮沸 10 min,离心取上清液做模板。并以细菌 *gyrB* 基因系列通用引物对菌株的 *gyrB* 基因进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为:2×Taq Master Mix( Dye Plus)25 μL,正反向引物各 2 μL,ddH<sub>2</sub>O 19 μL,模板 2 μL,总体积为 50 μL。PCR 反应条件为:95 ℃ 4 min;94 ℃ 1 min,60 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,30 个循环;72 ℃ 7 min<sup>[17]</sup>。将产物送上海生工公司进行测序,将测序序列在 NCBI 上比对,选取同源性较高的菌株进行系统发育树的构建。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌的分离和筛选

分离出黄瓜内生细菌 89 株,经过平板对峙实验,7 株菌株具有较明显的拮抗效果(图 1),发酵上清液热处理后抑菌活性均可达 35%及以上(表 1),分别编号为 NH-1、P<sub>6</sub>、P<sub>7</sub>、NH-9、XX<sub>2</sub>G<sub>1</sub>、GJ-9、XX<sub>2</sub>J<sub>7</sub>。其中菌株 NH-1 的拮抗效果最好,它的发酵上清液热处理后抑菌率可达 44.66%,经过 10 次

传代后仍具有较稳定的拮抗效果。此外如表 1 所示,菌株 P<sub>6</sub>和菌株 XX<sub>2</sub>G<sub>1</sub>的拮抗效果也较明显,发酵上清液热处理后的抑菌效果分别为 44.44%和 43.75%。

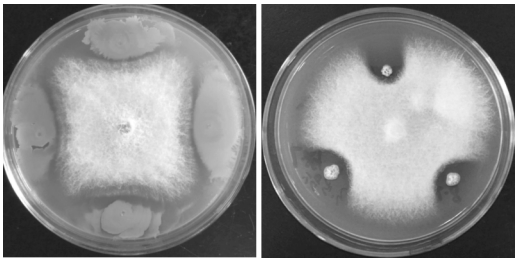


图 1 7 株拮抗菌对尖孢镰刀菌的平板拮抗作用

Fig.1 Antagonism of 7 antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum*

表 1 拮抗菌株发酵上清液热处理后抑菌率

Table 1 Inhibition rate of fermentation supernatant of antagonistic bacteria

菌株 Strain	抑菌率/% Inhibition rate
NH-1	44.66±0.04
P <sub>6</sub>	44.44±0.01
P <sub>7</sub>	38.46±0.01
NH-9	25.66±0.01
XX <sub>2</sub> G <sub>1</sub>	43.75±0.03
GJ-9	36.94±0.03
XX <sub>2</sub> J <sub>7</sub>	33.33±0.01

2.2 利福平诱导情况

通过在含利福平 LB 平板上连续的培养,共诱导到 4 株抗性较稳定的菌株分别为 NH-1、GJ-9、XX<sub>2</sub>J<sub>7</sub>、P<sub>7</sub>,对比原菌株的抗性如图 2 所示,抗性菌株的抑菌活性与原始菌株相似。

2.3 利福平抗性菌株在植株内的定殖效果

对分离得到的 4 株拮抗菌进行盆栽定殖试验,4 株拮抗菌在黄瓜苗根茎及根际土壤中定殖效果良好,其中在黄瓜苗根中定殖效果如图 3 所示:浇灌拮抗菌 7 d 后细菌数量可达 10<sup>5</sup> cfu/g,14~35 d 维持在 1×10<sup>6</sup>~3.5×10<sup>6</sup> cfu/g,在 35~45 d 后可达 3.5×10<sup>6</sup>~4×10<sup>6</sup> cfu/g,但是 XX<sub>2</sub>J<sub>7</sub>在 21 d 后细菌数量有所下降,相比于其他菌株定殖效果不佳。在茎中的定殖效果如图 4 所示:从刚开始的 10<sup>5</sup>数量级持续上升至 35 d 后的 10<sup>6</sup> cfu/g,在茎中检测到的细菌数量最高的是 NH-1,最高可达 3.5×10<sup>6</sup> cfu/g。土壤中的定殖效果如图 5 所示,由于是采取根部灌根的方式处理黄瓜苗,因此在土壤中检测到的细菌数量要比根茎中要多,定殖效果最稳定的是 NH-1,从最初检测到的 2.6×10<sup>8</sup> cfu/g 到 35 d 后持续增长



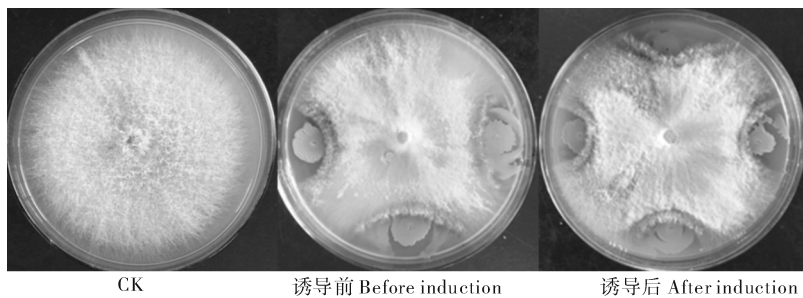


图 2 拮抗菌株利福平诱导结果

Fig.2 Results of rifampin induction in antagonistic strains

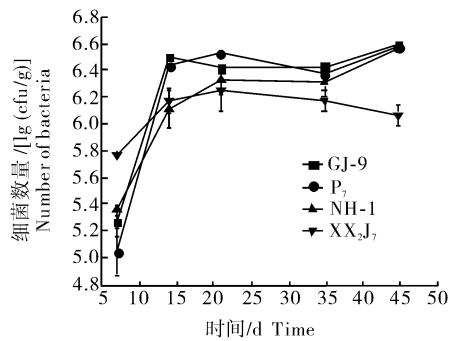


图 3 拮抗菌在黄瓜苗根部的定殖效果

Fig.3 Colonization effect of antagonistic bacteria on root of cucumber seedlings

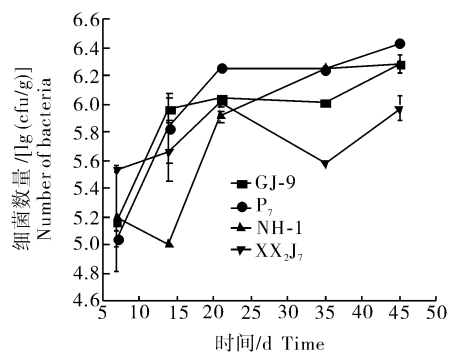


图 4 拮抗菌在黄瓜苗茎部的定殖效果

Fig.4 Colonization effect of antagonistic bacteria on stem of cucumber seedlings

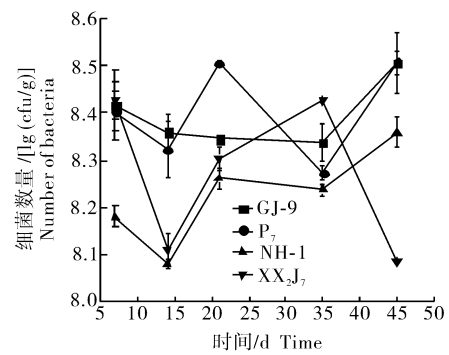


图 5 拮抗菌在黄瓜苗根际土壤中的定殖效果

Fig.5 Colonization effect of antagonistic bacteria in rhizosphere soil of cucumber seedlings

至  $3.2 \times 10^8$  cfu/g, 其他几株菌相对来说波动较大, 在 45 d 后检测可达  $10^8$  cfu/g 水平。由此可见, 4 株拮抗菌株在黄瓜苗植株内定殖效果良好。

2.4 拮抗芽胞杆菌菌株对黄瓜根部防御反应酶系的影响

1) 苯丙氨酸解氨酶(PAL)活性变化。由图 6 可见, 经拮抗菌株  $XX_2J_7$  处理后的黄瓜苗 PAL 活性显著高于对照组, 在第 5 天后出现最高值, 为对照组的 1.26 倍, 第 6 天后, 酶活性出现下降; 拮抗菌株  $P_7$  发酵液处理黄瓜苗后, PAL 活性在第 3 天达到最大值, 是对照组的 1.32 倍; 而菌株 GJ-9 处理的苗 PAL 的活性相对较平缓, 但酶活性比对照组要高; NH-1 菌株发酵液处理后, PAL 活性变化较显著, 在第 2 天就高于对照组, 第 3 天达到峰值, 相比于对照组的 1.43 倍, 且 PAL 活性保持稳定。

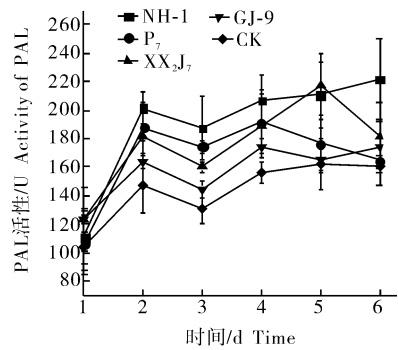


图 6 经 4 株拮抗菌发酵液处理后黄瓜苗内苯丙氨酸解氨酶的活性变化

Fig.6 Activity changes of phenylalanine ammonia-lyase in cucumber seedlings treated with four strains of antagonistic bacteria

2) 多酚氧化酶(PPO)活性变化。由图 7 结果可见, 4 株拮抗菌株发酵液处理黄瓜苗后前期 PPO 表现酶活性显著高于对照组, 随后均下降。PPO 活性变化较显著的是经 GJ-9 处理过的黄瓜苗, 在处理第 3 天后高于对照组, 后持续稳定增长, 在第 5 天后达

到最高值,为对照组的 1.66 倍,在第 6 天酶活性下降,但 PPO 活性仍高于对照组。

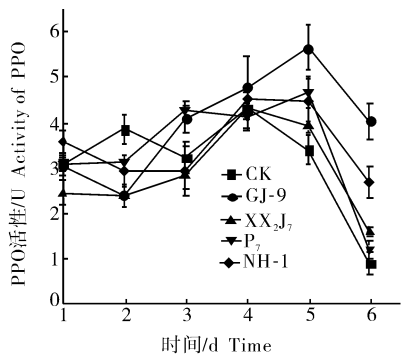


图 7 经 4 株拮抗菌发酵液处理后黄瓜苗内多酚氧化酶(PPO)活性变化

Fig.7 Changes of polyphenol oxidase (PPO) activity in cucumber seedlings treated with four strains of antagonistic bacteria

3)过氧化物酶(POD)活性变化。由图 8 结果分析可得,相比于对照组,经拮抗菌发酵液处理后的黄瓜苗体内的 POD 活性波动变化较大。在拮抗菌刺激后,幼苗内的酶活性表现为:经菌株 XX<sub>2</sub>J<sub>7</sub>处理后,在第 5 天酶活性达到峰值,为对照组的 1.98 倍;经菌株 P<sub>7</sub>处理后,POD 活性在第 4 天达到峰值,为对照组的 2.67 倍;而经 GJ-9 处理后的黄瓜苗在第 5 天酶活性最高,为对照组的 1.86 倍;经 NH-1 菌株处理的黄瓜苗的酶活性在第 4 天达到最高峰,是对照组的 1.52 倍。

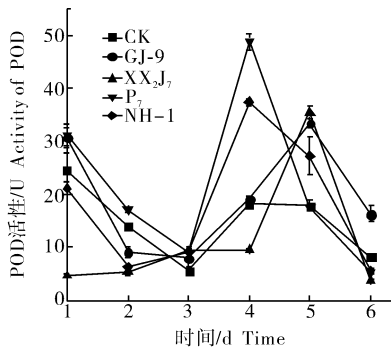


图 8 经 4 株拮抗菌发酵液处理后黄瓜苗内过氧化物酶(POD)活性变化

Fig.8 Changes of peroxidase (POD) activity in cucumber seedlings treated with four strains of antagonistic bacteria

2.5 拮抗菌对黄瓜枯萎病的防治效果

对 4 株拮抗菌的发酵物质进行温室盆栽试验,以不加菌剂为空白对照,结果如表 2。分析可见,使用了拮抗菌株的发酵物质后,黄瓜枯萎病的病情指

数降低了不少,对照处理的病情指数为 92.00,其中拮抗菌株 GJ-9 的病情指数为 34.33,防治效果为 49.13%;菌株 P<sub>7</sub> 病情指数为 33.67 防治效果为 49.43%;菌株 XX<sub>2</sub>J<sub>7</sub> 病情指数为 54.67,防治效果为 24.23%;NH-1 处理的黄瓜苗效果最佳,病情指数为 26.00,防治效果可达 66.03%。

表 2 生防菌对黄瓜枯萎病的防治效果  
Table 2 Effect of biocontrol of antagonistic bacteria on *Fusarium oxysporum*

菌株 Strain	病情指数 Disease index	防治效果/% Control effect
CK	92.00±2.65a	—
P <sub>7</sub>	33.67±3.05c	49.43±0.31b
GJ-9	34.33±3.05c	49.13±1.63b
NH-1	26.00±3.00c	66.03±0.95a
XX <sub>2</sub> J <sub>7</sub>	54.67±2.52b	24.23±1.19c

注:小写字母不同表示差异显著(P<0.05)。Note: Differences in lowercase letters indicate significant differences (P<0.05).

2.6 拮抗菌株形态观察及鉴定

对生防效果最佳的菌株 NH-1 进行分析鉴定,结果如图 9 所示。对菌株的形态观察可见,其表面粗糙干燥、边缘不规则,中部环状隆起不透明。菌落颜色为灰白色、光泽灰暗、呈不规则的形状。在显微镜下可以清晰地看到视野中有很多杆状菌体,芽胞中生,因此初步鉴定其为芽胞杆菌属。

细菌的 *gyrB* 基因即促旋酶(*gyrase*)的 B 亚单位基因,是蛋白编码基因的典型代表,与 16SrDNA 相比,它更具优越性。芽胞杆菌在细菌的 *gyrB* 基因序列中具有多个保守性区段,由这些保守区设计出的细菌通用引物不会与其他的 DNA 互补,而细菌的 *gyrB* 可变区的不同是区分其种类的一大标准。C 图为根据菌株 NH-1 的 *gyrB* 基因序列与 GenBank 数据库中的序列进行对比分析,通过软件绘制的系统发育树图,菌株的 *gyrB* 基因片段为 1.5 kb 大小,菌株的系统发育树结果显示,NH-1 菌株与贝莱斯芽胞杆菌相似度为 99%,综上初步判断 NH-1 为贝莱斯芽胞杆菌(*Bacillus velezensis*)。

3 讨 论

在自然环境土壤生态系统中,微生物群落发挥着重要的作用,并处于平衡发展的状态,在人工生态环境中,由于化肥农药等化学元素的使用,打破了微生物原有的平衡,使得有益微生物种群减少,病害种群增多,从而引起一系列的农作物病害。施用一定

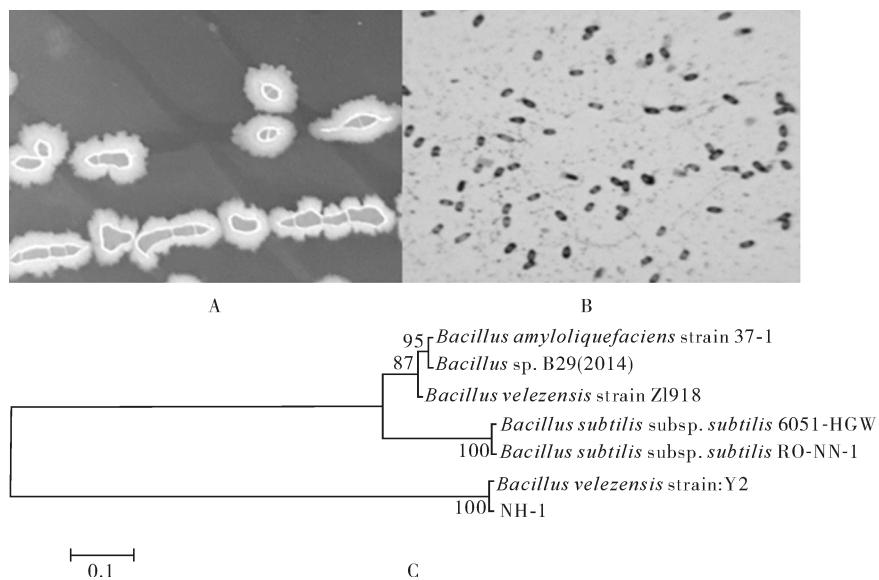


图 9 芽胞杆菌 NH-1 的分析鉴定

Fig.9 Analysis and identification of *Bacillus* NH-1

量的有益微生物如拮抗细菌放线菌等,可在一定程度上改善土壤中的微生物群落结构,进而对植株环境有益<sup>[18]</sup>。

植物内生菌是一类寄生于植物组织、器官内部或细胞间隙的真菌或细菌,具有生物多样性和功能多样性,在微生物生态系统中占据着重要的作用<sup>[19]</sup>。内生菌通过代谢活动和代谢产物影响宿主植物的生长,并通过在植物根际利用次生营养物质来调节微生物群落的生态平衡<sup>[20]</sup>,因此,内生菌成为人们利用的一种新生物资源。内生菌具有分布广泛、种类繁多、活性多样的特点,普遍存在于陆生及水生植物中<sup>[21]</sup>。

目前,黄瓜枯萎病造成的土传病害主要依赖于化学农药的防治,虽然在一定程度上有效控制了土传病害的危害,但无法从根本上解决土传病害的发生<sup>[22]</sup>。使用拮抗微生物及其代谢产物进行黄瓜枯萎病等土传病害的防治,不仅可减少化学农药的使用,降低农药残留,延缓病菌抗药性的产生,而且能改善土壤微生物类群,增强植物抗病性,是防治黄瓜枯萎病等土传病害的一项标本兼治的有效措施<sup>[23]</sup>。李晶等<sup>[24]</sup>报道,经大田试验,枯草芽胞杆菌 B29 菌株对黄瓜枯萎病的防效达 84.9%,增产 12.57%。张璐等<sup>[25]</sup>报道短短芽胞杆菌 DS-1 对黄瓜种子萌发具有促生作用,并在植株生长期间对黄瓜枯萎病具有较显著的生防作用,防治效果可达 84.92%。

本试验从黄瓜根际土壤和根、茎中分离出对黄瓜枯萎病病原菌——尖孢镰刀菌黄瓜专化型具有较强拮抗作用的细菌菌株 7 株,经利福平抗生素诱导抗性后得到具有抗性的菌株 4 株:GJ-9、NH-1、P<sub>7</sub>、XX<sub>2</sub>J<sub>7</sub>,对这 4 株芽胞杆菌的抗病效果和生防效果进行研究后发现,菌株 NH-1 具有最强的生物防效,经鉴定为贝莱斯芽胞杆菌,在对其发酵液经热处理后仍具有较高的抑菌活性,因此,在微生物农药方面具有发展潜力。

参 考 文 献

[1] 韦巧婕,郑新艳,邓开英,等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及其生物防效[J]. 南京农业大学学报,2013,36(1):40-46.

[2] 刘琴,徐健,刘怀阿,等. 黄瓜内生放线菌 SR-1102 分离及对枯萎病拮抗活性[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版),2015,36(2):83-88.

[3] 张璐,丁延芹,杜秉海,等. 黄瓜枯萎病病原拮抗细菌 DS-1 菌株鉴定及其生防效果研究[J]. 园艺学报,2010,37(4):575-580.

[4] 詹发强,杨文琦,侯新强,等. 一种贝莱斯芽胞杆菌及其在番茄枯萎病拮抗中的应用:CN102286412A[P]. 2011-12-11.

[5] 朱天辉,李姝江,梁漫,等. 贝莱斯芽胞杆菌 ZJ20 菌株及其液体制剂:CN102703342A[P]. 2012-10-03.

[6] 金疏桐,王祖华,徐启燃,等. 内生贝莱斯芽胞杆菌生物拮抗活性的研究[J]. 中国微生态学杂志,2017,29(4):385-389.

[7] 吴洪生,周晓冬,李鹤,等. 黄瓜、西瓜枯萎病拮抗细菌的初步分离与鉴定[J]. 西南农业学报,2013,26(3):1019-1025.

[8] 卜春亚,贾玉琦,王有年,等. 黄瓜枯萎病生防芽胞杆菌的定向

筛选及其抑菌活性物质特性分析[J]. 中国农学通报, 2013, 29 (31): 101-107.

[9] 高芬, 穆凌霄, 魏颖颖, 等. 烟草赤星病菌拮抗链霉菌的多重筛选及发酵液理化性质[J]. 华北农学报, 2007, 22(6): 171-175.

[10] 于秀敏. 两株拮抗细菌防治黄瓜枯萎病的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2009.

[11] 李晶. 黄瓜枯萎病高效拮抗枯草芽胞杆菌的筛选及生防机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2009.

[12] 张树生. 微生物有机肥缓解黄瓜枯萎病的生物学效应及其作用机制[D]. 南京: 南京农业大学, 2009.

[13] HANO C, ADDI M, FLINIAUX O, et al. Molecular characterization of cell death induced by a compatible interaction between *Fusarium oxysporum* f. sp. *linii* and flax (*Linum usitatissimum*) cells[J]. Plant Physiol Bioch, 2008, 46 (5/6): 590-600

[14] ALI M B, SINGH N, SHOHAEI A M, et al. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress[J]. Plant Sci, 2006, 171 (1): 147-154.

[15] ZHANG Y S, LIU B Y, LI Z Q. Molecular cloning of a classical plant Peroxidase from *Artemisia annua* and its effect on the biosynthesis of Artemisinin *in vitro*[J]. Acta Bot Sin, 2004, 46 (11): 1338-1346.

[16] 闫霜, 吴洪生, 周晓冬, 等. 黄瓜枯萎病生物防治研究进展[J]. 山东农业科学, 2011(1): 86-92.

[17] 张献芳. 利用半凝集素构建内生工程菌及其抗同翅目害虫效果研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.

[18] 罗文辉, 黄忠明, 吴运华. 黄瓜枯萎病的发生与防治[J]. 现代农业科技, 2007(19): 92-93.

[19] 刘俊. 黄瓜枯萎病的发生与无公害防治[J]. 农村实用技术, 2010 (8): 35-35.

[20] 林中正, 魏润洁, 盛云泽, 等. 黄瓜枯萎病研究概述[J]. 北京农业, 2011(30): 91-92.

[21] 乔胜伟. 一株黄瓜枯萎病拮抗细菌的分离鉴定及其相关特性的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2010.

[22] AND G C P, LUMSDEN R D. Biological control of soilborne fungal propagules[J]. Annual review of phytopathology, 1980, 18: 389-413.

[23] 张璐. 黄瓜枯萎病病原拮抗菌的筛选鉴定及其生防效果研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2007.

[24] 李晶, 杨谦, 张淑梅, 等. 枯草芽胞杆菌 B29 菌株防治黄瓜枯萎病的田间效果及安全性评价初报[J]. 中国蔬菜, 2009(2): 30-33.

[25] 张璐, 丁延芹, 杜秉海, 等. 黄瓜枯萎病病原拮抗细菌 DS-1 菌株鉴定及其生防效果研究[J]. 园艺学报, 2010, 37(4): 575-580.

Isolation and identification of antagonistic bacteria and biological control efficiency on cucumber *Fusarium* wilt

LUO Wenjian<sup>1</sup> YANG Fan<sup>2</sup> SHI Xuanjie<sup>2</sup> ZHAO Xiuyun<sup>1</sup>

1.College of Life Science and Technology ,Huazhong Agricultural University,Wuhan 430070,China ;  
2. Institute of Horticulture ,Henan Academy of Agricultural Sciences ,Zhengzhou 450002,China

**Abstract** Seven bacterial strains with strong antagonistic effect on the pathogen of cucumber *Fusarium oxysporum* were isolated from the rhizosphere soil, root and stem of cucumber, and the inhibition rate of these bacteria on the plate was up to 46%. Four strains including GJ-9, NH-1, P<sub>7</sub> and XX<sub>2</sub>J<sub>7</sub> with resistance to rifampicin were obtained. The results showed that these strains had good colonization ability in the cucumber seedling and could be transported into the stem through the root, which could significantly improve the activity of defense-related enzyme such as PAL, POD and PPO in the cucumber seedlings. The results showed that the fermentation broth of the antagonistic bacteria NH-1 had significant effect on the control of the cucumber *Fusarium* wilt, the disease index of the treated cucumber seedlings was 26.00, and its control effect reached 66.03%. According to the growth morphological characteristics and its *gyrb* gene sequence analysis, this bacteria was identified as *Bacillus velezensis*.

**Keywords** cucumber *Fusarium wilt*; antagonistic bacteria; biological control; *Bacillus*

(责任编辑: 边书京)