

抑制黄瓜枯萎病的链霉菌S-101及其生防作用研究

圆圆¹, 张虹¹, 苏道拉呼¹, 峥嵘^{1*}, 石玲玲², 吴慧玲^{2*}

(1. 内蒙古师范大学生命科学与技术学院, 呼和浩特 010022; 2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所, 北京 100097)

摘要: 为了获得抑制黄瓜枯萎病的高效生防菌, 对青海湖附近植被根系土壤中的微生物进行分离筛选。测定拮抗菌的抑菌活性及其对黄瓜枯萎病的防控效果。本文通过平板对峙法分离筛选出一株生防链霉菌 S-101, 该菌株对供试的几种病原真菌都有较好的拮抗作用, 其中对尖镰孢菌黄瓜专化型的抑制率为 53.3%, 对草莓炭疽菌的抑菌率为 45.5%; 并通过形态特征及 16S rDNA 序列分析对菌株 S-101 初步鉴定为 *Streptomyces luridus*; 盆栽试验结果表明, 菌株 S-101 发酵液对黄瓜枯萎病的防治效果达 57.11%; 通过构建绿色荧光蛋白标记的基因工程菌 S-101-GFP, 检测了该菌株在黄瓜根部及根围土壤中的定殖能力, 随着定殖天数的增加, 数量由处理时的 1×10^8 cfu/g 逐渐减少到 1×10^6 cfu/g, 0~14 d 下降较快, 21~28 d 下降较慢, 28~35 d 趋于稳定, 孢子数维持在 1×10^6 cfu/g。因此, 菌株 S-101 是防治黄瓜枯萎病的潜在生防菌株, 具有开发成为微生物农药的应用价值。

关键词: 生防菌; 黄瓜枯萎病; 分离鉴定; 生防效应; 定殖

中图分类号: S432.1 文献标识码: A 文章编号: 1005-9261(2019)05-0813-08

Biocontrol Effect of *Streptomyces* sp. S-101 against Cucumber Wilt

YUAN Yuan¹, ZHANG Hong¹, SU Daolahu¹, ZHENG Rong^{1*}, SHI Lingling², WU Huiling^{2*}

(1. College of Life Sciences and Technology, Inner Mongolia Normal University, Hohhot 010022, China; 2. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: In order to obtain efficient biocontrol bacteria against cucumber wilt, the microorganisms in the vegetation root soil near Qinghai Lake were isolated and screened. The activity of antagonistic bacteria and its control effect on cucumber wilt disease were determined. *Streptomyces* sp. strain S-101 was isolated and screened by plate confrontation method and its antagonism against different plant pathogens was investigated. The results showed that the strain had good effect on several pathogenic fungi, among which the inhibition rates on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumebrium* and *Colletotrichum gloeosporioides* were 53.3% and 45.5%, respectively. Based on morphological observation and 16S rDNA sequence analysis, the strain S-101 was preliminarily identified as *Streptomyces luridus*. Pot experiment showed that the fermentation broth displayed significant control effect on cucumber wilt with the efficacy of 57.11%. The strain S-101-GFP was able to colonize at the roots of cucumber. With the increase of colonization days, the number of labeled bacteria decreased from 1×10^8 cfu/g to 1×10^6 cfu/g. The number of colonies dropped rapidly in 0—14 days, fell slowly in 21—28 days and maintained a stable amount in 28—35 days at 1×10^6 cfu/g. Therefore, strain S-101 is a potential biocontrol strain against cucumber wilt, and has the application value of being developed into microbial fungicide.

Key words: biocontrol bacteria; cucumber wilt; isolation and identification; biocontrol effect; colonization

收稿日期: 2019-01-15

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFD0201300); 北京市自然科学基金(6192008); 北京市农林科学院创新专项(KJXC20170410)

作者简介: 圆圆, 硕士研究生, E-mail: ningyuan9070@163.com; *通信作者, 峥嵘, 博士, 教授, E-mail: zhengrong09@163.com; 吴慧玲, 博士, 副研究员, E-mail: wuhuiling925@126.com。

DOI: 10.16409/j.cnki.2095-039x.2019.05.025

链霉菌 *Streptomyces* 是放线菌门中最大的一个属, 菌丝呈丝状分枝, 革兰氏阳性好氧细菌, 能够产生多种具有生物活性的次生代谢产物, 如抗菌、抗病毒、抗癌、抗氧化特性、免疫抑制等^[1-7], 应用于各个领域。如波赛链霉菌产生的蒽环类抗生素对急性淋巴细胞、神经母细胞瘤和多种实体肿瘤具有较高的抑菌活性^[8]; 黄抗霉素链霉菌次生代谢产物中鉴定出一种杀线虫化合物, 对线虫 48 h 的致死率达 40%^[9]。此外, 链霉菌能够产生几丁质酶、葡聚糖酶和纤维素酶等胞外水解酶裂解真菌细胞壁, 使真菌生长受到阻碍, 链霉菌产生的氨基糖苷类、核苷类、多烯类、大环内酯类、四环素类抗生素对多种病原菌的细胞壁合成、蛋白质合成及核苷酸和核酸的合成具有抑制作用^[10-13]。

本研究以采集自青海湖附近植被根系土壤为样品, 采用稀释法分离菌株, 以尖镰孢菌黄瓜专化型为靶标, 通过皿内试验筛选出具有较高抑菌活性的链霉菌 S-101, 通过表型特征及 16S rDNA 序列分析对菌株进行鉴定, 并将携带绿色荧光蛋白基因的质粒导入目标菌株 S-101 中, 进行 *gfp* 基因标记, 初步探究了标记菌在黄瓜根部及根围土壤中的定殖规律, 设计盆栽试验评价菌株 S-101 防治黄瓜枯萎病的效果, 为黄瓜枯萎病的生物防治提供优良菌种资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 培养基 高氏 I 号培养基、马铃薯葡萄糖培养基 (PDA)、Luria-Bertani 固体培养基 (LB) 参照文献^[14]配制。种子培养基 (g/L): 蔗糖 15 g, 甘油 1.5 mL, 蛋白胨 40 g, KH_2PO_4 0.5 g, CaCO_3 0.5 g, NaCl 0.5 g, MgSO_4 0.5 g; G117 发酵培养基 (g/L): 玉米淀粉 30 g, 葡萄糖 10 g, 豆粕粉 20 g, 蛋白胨 6 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, KH_2PO_4 0.3 g, NaCl 7.5 g, CaCO_3 4 g, 高峰淀粉酶 0.05 g; MS 培养基: 800 mL 自来水, 加 20 g 黄豆饼粉, 121 °C 灭菌 15 min, 静置取上清 600 mL, 再加甘露醇 20 g, 琼脂 20 g, 最后用蒸馏水定容至 1 L。2×YT 培养基 (g/L): 酵母粉 10 g, 胰蛋白胨 16 g, NaCl 5 g。

1.1.2 质粒与抗生素浓度 表达载体 pIB139-*gfp* 由北京市农林科学院植物保护环境保护生防微生物研究室构建^[15]。LB 中阿伯拉霉素 100 μg/mL, 氯霉素 25 μg/mL, 卡那霉素 25 μg/mL, 羧苄酮酸 25 μg/mL。

1.1.3 靶标病原真菌 尖镰孢菌黄瓜专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumebrium* Owen、尖孢镰刀菌萎蔫专化型 *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea*、草莓炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、尖孢镰刀菌粘团专化型 *F. oxysporum* f. sp. *conglutinans* 和子囊菌亚门链核盘菌 *Monilinia fructicola* 由北京市农林科学院植物保护环境保护生防微生物研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 土壤的采集与链霉菌的分离 采自青海高原东北部青海湖 (东经 99°36′~100°16′, 北纬 36°32′~37°15′, 海拔 3260 m) 附近植被根系土壤。先用小铲除掉表面土, 取 10~30 cm 深处的土壤约 30 g, 3 个取样点的土样混为一份样品^[16]。称取 5 g 土样, 置于无菌培养皿中, 28 °C 自然干燥 7 d 后, 置于 80 °C 干热处理 1 h^[17]。采用稀释涂布法, 将处理后的样品称取 1 g 后, 倒入装有 9 mL 无菌水的离心管中, 28 °C、180 r/min 振荡摇匀 30 min 后, 静置 5 min, 以此为原液制备成不同浓度的稀释液, 选定 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 稀释浓度后, 用移液枪吸取 0.1 mL 的稀释液滴在高氏 I 号培养基上, 用无菌玻璃涂棒涂匀, 置于 28 °C 培养箱中培养 7 d, 然后从培养皿内分离出单菌落并保存于甘油管中。

1.2.2 平板对峙试验 将培养 7 d 的尖镰孢菌黄瓜专化型用无菌打孔器打成 7 mm 菌饼, 接在 PDA 平板中央, 采用对峙法将分离得到的菌株点接在距病原菌菌饼 20 mm 处, 每皿接种 2 个菌株, 同时设空白对照 (不接放线菌), 重复 3 次, 置于 25 °C 培养箱。筛选抑菌效果显著的菌株并计算其抑菌率, 抑菌率 (%) = (对照病原菌直径 - 拮抗菌对峙的病原菌直径) / 对照病原菌直径 × 100。

1.2.3 抑菌谱试验 通过平板对峙法, 测定从上一步试验中得到的拮抗菌株 S-101 对 6 种病原菌的抑菌活性, 试验方法同 1.2.2。

1.3 拮抗菌株 S-101 的鉴定

1.3.1 拮抗菌株 S-101 的形态特征 将菌株 S-101 接种于高氏 I 号平板上, 28 °C 培养 7 d 后, 对该菌株进行菌落形态观察, 记录基内菌丝颜色、气生菌丝颜色以及可溶性色素的有无及其颜色。同时参照文献^[18]

的方法用显微镜观察菌丝形态。

1.3.2 菌株 S-101 的 DNA 提取 用细菌基因组 DNA 快速提取试剂盒（北京博迈德生物技术有限公司，货号 DL111-01）提取 DNA，利用 16S rDNA 的通用引物 27F（5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）1492 R（5'-CGGTGTGTACAAGGCC-3'）进行 PCR 扩增^[19,20]，扩增体系：15 μL 2 \times *Taq* PCR Master Mix、1 μL DNA 模板、0.5 μL 引物 27F、0.5 μL 引物 1492 R、13 μL ddH₂O；PCR 扩增条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s、57 $^{\circ}\text{C}$ 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。由北京博迈德生物技术有限公司进行测序。

1.3.3 菌株 S-101 系统进化树的构建 根据菌株 S-101 的 16S rDNA 测序结果，利用 Blast 软件在 NCBI 数据库中进行同源性比对，使用 MEGA5 软件邻接法（neighbor-joining, N-J 法）运算 1000 次构建系统进化树，用自展法（Bootstrapping）对进化树进行评估。

1.4 菌株 S-101 防治黄瓜枯萎病的盆栽试验

1.4.1 育苗 将黄瓜种子（京研绿秀 F1）依次用 75% 酒精浸泡 10 min、无菌水洗净、1% 次氯酸钠浸泡 5 min、用无菌水清洗 3~4 次，至包衣颜色褪去，之后放入垫有滤纸片的无菌培养皿上，添加无菌水，26 $^{\circ}\text{C}$ 过夜催芽。将露白的种子播入育苗盘中，长至二叶一心时移栽到盆钵。

1.4.2 菌株 S-101 发酵液 将菌株 S-101 预先接种到种子培养基中，28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 24 h，以本实验室前期筛选出的最佳接种量 8%（孢子数为 1×10^8 cfu/mL）转接于 G117 发酵培养基中，28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 发酵培养 48 h，用无菌水稀释成孢子数为 1×10^7 cfu/mL 的发酵液，备用。

1.4.3 盆栽试验 将平板培养 8~10 d 的尖镰孢菌黄瓜专化型刮下来，用无菌水稀释成浓度为 1×10^8 cfu/mL 的病原菌孢子悬浮液，备用。挑选长势一致的黄瓜幼苗采用灌根法进行盆栽试验，接种方法：于黄瓜幼苗茎基部两侧 4 cm 处，用酒精灭过的刀片进行伤根处理后，移栽到大小为 6.5 cm \times 6.5 cm 的盆钵中，每盆 1 株，同时在每株幼苗根茎部加入 2 mL 相应的接种液。试验设 5 个处理，处理如下：（1）清水浇黄瓜幼苗根部作为空白对照；（2）病原菌孢子液接种到黄瓜幼苗根部；（3）菌株 S-101 发酵液接种于黄瓜幼苗根部；（4）同时接种病原菌孢子液与 S-101 菌株发酵液；（5）同时接种病原菌孢子液与 50% 多菌灵可湿性粉剂 800 倍稀释液。每个处理 20 株，试验重复 3 次，参照文献[21]的方法进行发病植株调查，并用 SPSS 16.0 处理数据。

1.5 菌株 S-101 在黄瓜上的定殖分析

链霉菌表达载体 pIB139-*gfp* 的构建及转化参照刘慧^[15]的方法，所用大肠杆菌和链霉菌接合转移的供体菌株为 *E. coli* ET12567（pUZ8002），将得到的菌株 S-101-GFP 进行 PCR 验证，扩增体系：15 μL 2 \times *Taq* PCR Master Mix、1 μL DNA 模板、0.5 μL 引物 GF（5'-GGAATTCATATGATGGTGAGCAAGGGCG-3'，*Nde*I）、0.5 μL 引物 GR（5'-CGGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCC-3'，*Eco*RI）、13 μL ddH₂O；PCR 扩增条件：94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 40 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min，同时用显微镜（NIKON-TE2000U 型荧光倒置显微镜，日本 Nikon 公司）检测观察荧光信号。将菌株 S-101-GFP 活化于含有阿伯拉抗性 PDA 培养基上 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 后，刮取孢子溶于无菌水中，制孢子悬浮液，浓度为 1×10^8 cfu/mL，备用。

将黄瓜种子依次用 75% 酒精浸泡 10 min、无菌水洗净、1% 次氯酸钠浸泡 5 min、无菌水清洗至包衣颜色褪去，之后放入垫有滤纸片的无菌培养皿上，添加无菌水，26 $^{\circ}\text{C}$ 过夜催芽。将发芽后（根长约 1 cm）的种子放入花盆中（土壤和蛭石 3:1），长至二叶一心时移栽到大小为 6.5 cm \times 6.5 cm 的盆钵中，每盆 1 株，处理 20 株，试验重复 3 次，在根茎部注入 5 mL 菌株 S-101-GFP 孢子悬浮液，分别于 7、14、21、28、35 d 取黄瓜根际土壤，同 1.2.1 中的方法用无菌水系列梯度稀释，取 0.1 mL 的稀释液涂在含有阿伯拉抗性 PDA 培养基上，观察计数菌落生长情况，并用荧光显微镜检测土壤及根部的荧光信号。

2 结果与分析

2.1 菌株的抑菌活性分析

平板对峙试验显示，分离到的 39 株放线菌中有 12.9% 的放线菌均对尖镰孢菌黄瓜专化型有抑制作用，其中菌株 S-101 抑菌活性最强（图 1），进一步分析菌株 S-101 的抑菌谱发现，该菌株对供试的 6 种病原

菌均有不同程度的抑制作用（表 1），其中对尖镰孢菌黄瓜专化型的抑菌率达到 53.3%，对草莓炭疽菌的抑菌率为 45.5%。



图 1 菌株 S-101 对尖镰孢菌黄瓜专化型的平板对峙效果

Fig. 1 Dual culture plates of control and inhibition of *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinu* by strain S-101

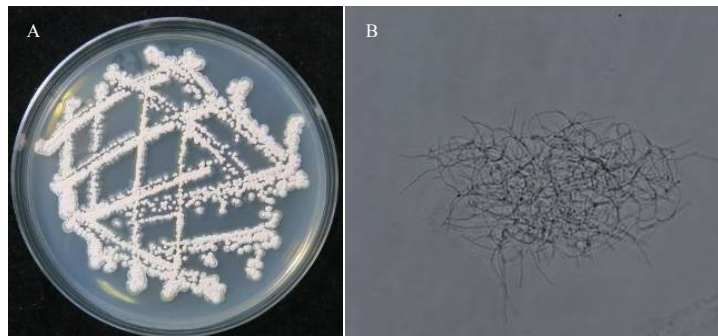
表 1 菌株 S-101 对不同病原菌的拮抗作用

Table 1 Antagonistic effect of strain S-101 on different pathogenic bacteria

病原菌 Pathogen	抑菌直径 Inhibition zone (mm)	抑菌率 Inhibition rate (%)
尖镰孢菌黄瓜专化型 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumebrium</i> Owen	48 ± 1.2	53.3
灰葡萄胞菌 <i>B. cinerea</i>	36 ± 2.2	40.0
尖孢镰刀菌粘团专化型 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>conglutinans</i>	29 ± 2.1	32.2
子囊菌亚门链核盘菌 <i>M. fructicola</i>	32 ± 1.3	35.5
尖孢镰刀菌（萎蔫专化型） <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>	37 ± 2.3	41.1
草莓炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	41 ± 3.1	45.5

2.2 菌株 S-101 的分类鉴定

菌株 S-101 在高氏 I 号平板上菌丝为白色，成熟的孢子呈浅粉色，无可溶性色素，菌落小而紧密、干而不透明，边缘呈放射状，在显微镜下菌丝体较为发达（图 2）。



A: 菌株 S-101 菌落形态 Colony morphology of strain S-101; B: 菌株 S-101 菌丝形态 Hypha morphology of strain S-101

图 2 菌株 S-101 形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of strain S-101

扩增拮抗菌株 S-101 DNA 获得 1.3 kb 片段，序列（MN396676）与 *S. luridus* NR112280.1 聚在一个分支上，说明它们亲缘关系最近，且序列比对同源率为 99%（图 3）。因此，菌株 S-101 初步鉴定为 *S. luridus*。

2.3 菌株 S-101 对黄瓜枯萎病的防控效果

黄瓜幼苗移栽 7 d 后开始发病，植株初期症状为个别叶片萎蔫，后期整株叶片萎蔫干枯。由表 2 可知，菌株 S-101 发酵液能有效降低黄瓜枯萎病的发病率和病情指数，其防治效果为 57.11%。菌株 S-101 发酵

液+病原菌孢子液处理与病原菌孢子液对照组相比较发病率降低了 71.67%，病情指数降低了 43.05%。菌株 S-101 发酵液+病原菌孢子液处理和多菌灵稀释液+病原菌孢子液处理组的发病率与病情指数在同一水平，并无显著差异。

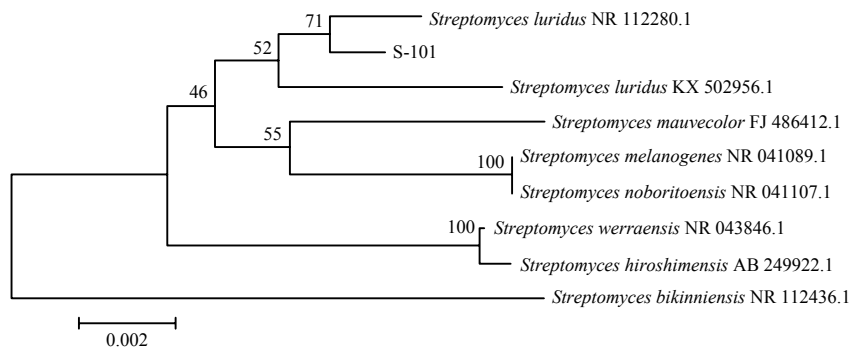


图 3 菌株 S-101 的 16S rDNA 序列同源性分析的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence of strain S-101

表 2 不同处理对黄瓜枯萎病的防治效果

Table 2 Control effects of different treatments on *Fusarium* wilt of cucumber

处理 Treatment	发病率 Rate of the diseased (%)	病情指数 Disease index	防治效果 Control effect (%)
对照 CK	0±0.0 c	0±0.0 c	—
病原菌孢子液 Pathogen spore solution	100.00±0.0 a	75.37±1.10 a	—
菌株 S-101 发酵液 Strain S-101 fermentation broth	0±0.0 c	0±0.0 c	—
菌株 S-101 发酵液+病原菌孢子液 Strain S-101 fermentation broth and pathogen spore solution	28.33±1.45 bc	32.32±1.30 bc	57.11
多菌灵+病原菌孢子液 Carbendazim and pathogen spore solution	30.42±1.12 b	33.54±1.23b	55.49

注：表中同一列数据含有不同字母者表示差异显著 ($P<0.05$)。

Note: The different letters following the data in the same column in the table indicate significant difference ($P<0.05$).

2.4 荧光标记菌株 S-101-GFP 的构建及检测

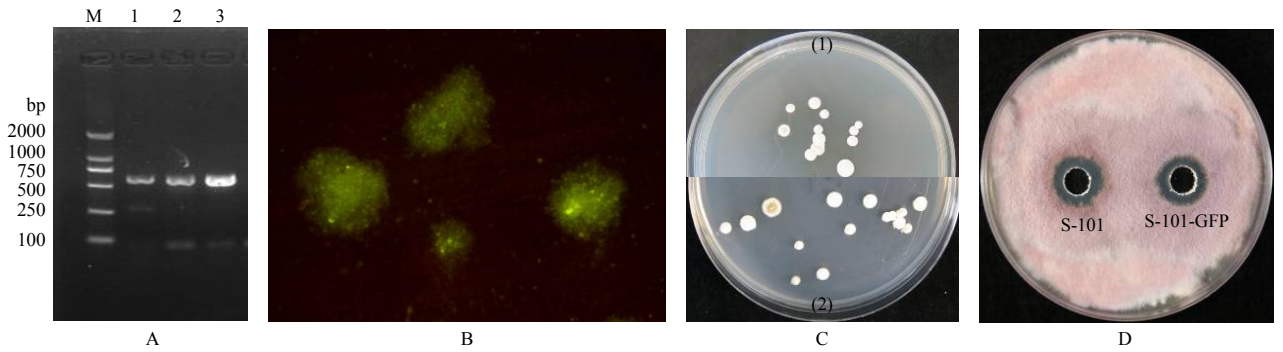
含有表达载体 pIB139-*gfp* 的 *E. coli* ET12567 接合转移到菌株 S-101 中后,通过对含有阿伯拉抗性 PDA 培养基上筛选得到的转化子进行 PCR 验证得到 729 bp 的条带(图 4A),与预期的大小片段一致,同时用荧光显微镜对转化子进行荧光检测,在蓝光激发后可以观察到绿色荧光(图 4B),经检测说明 *gfp* 基因已转入菌株 S-101 中并成功表达,并命名为菌株 S-101-GFP,进一步对菌株 S-101-GFP 与野生型菌株 S-101 进行形态和抑菌活性的比较,表明 GFP 标记菌株形态和抑菌活性均没有发生变化(图 4C、D)。

2.5 菌株 S-101-GFP 定殖能力分析

随着定殖天数的增加,标记菌数量由 1×10^8 cfu/g 逐渐减少到 1×10^6 cfu/g, 0~14 d 标记菌株下降较快, 21~28 d 下降较慢, 28~35 d 趋于稳定 (1×10^6 cfu/g) (图 5A)。用切片法把黄瓜的根部切开于载玻片上,在荧光显微镜下观察到绿色荧光(图 5B)。

3 讨论

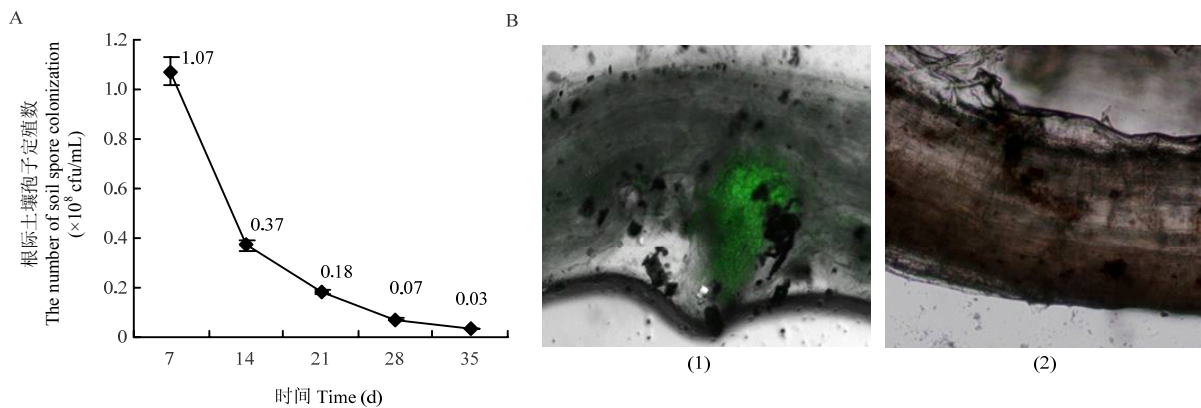
链霉菌能够产生多种抗生素,广泛应用于医疗卫生与农业^[22]。但是,目前人们能够分离到的链霉菌仅占土壤中总放线菌资源的 13%左右^[23]。可见,建立有效的链霉菌分离方法是发现链霉菌新的种属和新活性物质产生菌的重要途径之一。而如何从自然界微生物类群中分离出活性高,并且具有高效拮抗作用的链霉菌是目前生物防治研究中的最关键的一步。曹艳茹等^[24]从海拔较高,温度较低的大香格里拉地区采集的土样中,采用甘油-门冬酰胺琼脂培养基上加入 50 mg/L 浓度的重铬酸钾, 4 °C 培养 30 d 后分离获得多种耐



A: 菌株 S-101-GFP 的 PCR 检测 PCR detection of strain S-101-GFP; B: 菌株 S-101-GFP 荧光检测 Fluorescence detection of strain S-101-GFP; C: (1) 菌株 S-101-GFP Strain S-101-GFP; (2) 野生型菌株 S-101 Wild strains of S-101; D: 野生型菌株 S-101 与菌株 S-101-GFP 对黄瓜枯萎的抑菌活性 Antifungal activity of wild type S-101 and S-101-GFP on cucumber wilt

图 4 菌株 S-101-GFP 的检测及其与野生型菌株 S-101 的比较

Fig. 4 Detection of strain S-101-GFP and comparison with wild type strain S-101



A: 菌株 S-101 在不同时期根际土壤孢子定殖数量的动态变化 The dynamic change of the number of spores in the rhizosphere soil of strain S-101 in different periods; B: (1), 菌株 S-101-GFP GFP labeled strains of S-101; (2), 野生型菌株 S-101 Wild strains of S-101

图 5 S-101-GFP 在黄瓜根部的定殖

Fig. 5 Colonization of S-101-GFP in cucumber root

冷链霉菌。江翠翠等^[25]研究发现, 将采集的土壤样品在 28 °C 自然风干 10 d 后, 用化学分散剂 (1%胆酸钠、 Na^+ 离子交换树脂和 PEG) 制备土壤悬浮液, 在 40 °C, 加入 6%酵母膏和 0.05%磷酸缓冲液 (浓度为 5 mmol/L) 振荡 1 h 后, 平板分离到的链霉菌数量最多。研究表明, 分离链霉菌时加入抑制剂可减少杂菌的污染, 其中加入一定量的重铬酸钾、制霉菌素和萘啶酮酸分离效果最好^[26]。浓度梯度稀释法是分离链霉菌最常用的方法, 虽然稀释倍数越大, 分离得到的链霉菌越少, 导致分离的链霉菌种类较少, 但此方法操作简单、方便快捷、效率高。本文采用土壤浓度梯度稀释法和平板对峙法, 从青海湖附近植被根系土壤里的微生物中筛选出对尖镰孢菌黄瓜专化型有拮抗作用的链霉菌。其中, 菌株 S-101 的抑制效果最佳, 并且对多种植物病原真菌表现出抑菌作用。本文从菌株 S-101 的形态特征、培养特征、16S rDNA 序列分析等几个方面进行鉴定, 鉴定其与 *S. luridus* 的相似性最高。

利用生物防治技术防治病害是即安全又无污染, 利用以菌治菌的方法达到黄瓜枯萎病的防治, 是最为理想的方法。目前, 在黄瓜枯萎病的生物防治应用中最为广泛的有木霉属、假单胞菌属、芽胞杆菌属和链霉菌属等^[27]。陈香等^[28]研究发现, 蜡样芽胞杆菌 *Bacillus cereus* 发酵菌液对黄瓜枯萎病有较强的抑菌活性, 防治效果达到 50.46%。谷祖敏等^[29]采用拌土法接种长枝木霉 *Trichoderma longibrachiatum* THLJ 对黄瓜枯萎病的防治达 67.05%。本文通过盆栽试验发现, 菌株 S-101 发酵液对黄瓜枯萎病有显著的防治效果, 防效达 57.11%。链霉菌的发酵过程是一个复杂的过程, 主要受培养基成分、pH、温度、通气量等因素的影响。因此下一步对菌株 S-101 进行发酵培养条件的优化, 提高活性成分的含量, 及其进一步研究盆栽试验的接

种方法, 为今后的生防工作提供依据。

目前, 对黄瓜根围的定殖研究主要集中在木霉属和芽胞杆菌属^[30,31], 关于链霉菌的黄瓜根际定殖研究较少, 生防菌能否在作物根围定殖是其能否发挥生防作用的关键因素。利用 *gfp* 基因标记生防菌株, 对生防菌的生存及定殖能力能够有效的进行追踪。本文对重组菌株 S-101-GFP 在黄瓜中的定殖水平进行了荧光观察和定殖数量的分析, 结果表明, 菌株 S-101-GFP 能有效定殖黄瓜根部, 随着定殖天数的增加, 菌株 S-101-GFP 孢子在土壤中定殖数量会逐渐减小。张炳欣等^[32]分析铜绿假单胞菌株 *Pseudomonas aeruginosa* 标记菌株 CR56 RL4 黄瓜根部定殖动态时发现, 在接种后 18 d, 突变菌株种群数量由初接种量的 4.88×10^7 cfu/粒下降到 1.81×10^7 cfu/株; 在播后 28 d, 种群数量下降到 8.87×10^6 cfu/株, 与本文结果基本相符合。可能随着时间的延长, 植物分泌的有些物质改变了土壤环境, 导致菌株 S-101-GFP 的定殖数量下降, 或菌株 S-101-GFP 与土壤中的微生物之间存在定殖位点的抢占和营养竞争, 从而使定殖数量减少, 具体原因有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 莽春霞. 烟草靶斑病生防链霉菌的鉴定、作用机理及应用研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [2] 蒋欣陶, 赵奎华, 刘长远, 等. 葡萄霜霉病菌拮抗放线菌 QH94 的筛选及鉴定[J]. 沈阳农业大学学报, 2015, 46(3): 303-308.
- [3] Hooi-Leng S, Woan-Fei L J, Nathorn C, et al. Fermentation conditions that affect clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*: a systematic review[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7(4): 1-20.
- [4] Lee L H, Zainal N, Azman A S, et al. *Streptomyces pluripotens* sp. nov. a bacteriocin-producing streptomycete that inhibits methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2014, 64(9): 3297-3306.
- [5] Ara I. Antiviral activities of *streptomycetes* against tobacco mosaic virus (TMV) in datura plant: evaluation of different organic compounds in their metabolites[J]. *African Journal of Biotechnology*, 2012, 11(8): 2130-2138.
- [6] Hooi-Leng S, Nurul-Syakima A M, Wai-Fong Y, et al. Evaluation of antioxidative and cytotoxic activities of *streptomyces pluripotens* musc 137 isolated from mangrove soil in malaysia[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(12): 1-11.
- [7] Teng-Hern T L, Hooi-Leng S, Wai-Fong Y, et al. Investigation of antioxidative and anticancer potentials of *streptomyces* sp. mum256 isolated from malaysia mangrove soil[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(11): 1-12.
- [8] 贺建武, 陈奇辉, 刘祝祥, 等. 波赛链霉菌合成萜环类抗肿瘤抗生素研究进展[J]. 中国抗生素杂志, 2011, 36(3): 161-164.
- [9] 李萍, 马莉, 奚家勤, 等. 放线菌 BJLSH9 菌株兼抗线虫及烟草疫霉菌的生防活性及其杀线虫代谢产物鉴定[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2012, 34(5): 590-595.
- [10] 王燕, 宗兆锋, 程联社. 放线菌在植物病害生物防治中的应用[J]. 杨凌职业技术学院学报, 2005, 4(3): 21-23.
- [11] 梁春浩. 葡萄霜霉病生防放线菌 PY-1 鉴定及抑菌活性物质结构解析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [12] 邓永杰. 放线菌 JY-22 抑菌机理及抑菌物质初步分离[D]. 重庆: 西南大学, 2017.
- [13] Barakate M, Ouhdouch Y, Oufdou K, et al. Characterization of rhizospheric soil *streptomycetes* from Moroccan habitats and their antimicrobial activities[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(1): 49-54.
- [14] 梁春浩, 臧超群, 安福涛, 等. 葡萄霜霉病菌拮抗放线菌 PY-1 发酵条件优化[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(6): 921-929.
- [15] 刘慧, 吴慧玲, 刘伟成, 等. 不同荧光蛋白基因标记利迪链霉菌[J]. 科技导报, 2014, 32(12): 15-18.
- [16] Hallberg K, Holm C, Hammarstrom K J, et al. Ribotype diversity of actinomyces with similar intraoral tropism but different types of N-acetyl- β -d-galactosamine binding specificity[J]. *Molecular Oral Microbiology*, 2010, 13(3): 188-192.
- [17] 姜怡, 曹艳茹, 王茜, 等. 波罗的海放线菌的多样性[J]. 微生物学报, 2011, 51(11): 1461-1467.
- [18] 黄冰纷, 陈俊梅, 李文鹏, 等. 松材线虫生防放线菌的筛选、鉴定及其毒性因子初步研究[J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(4): 99-106.
- [19] Nikodinovic J, Barrow K D, Chuck J A. High yields preparation of genomic DNA from *Streptomyces*[J]. *Biotechniques*, 2003, 35(5): 932-934.
- [20] Kauffmann I M, Schmitt J, Schmid R D. DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64: 665-670.
- [21] 张春秋, 马光恕, 廉花, 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.
- [22] Nan Z, Zhen S, Xie Y. Identification and characterization of antifungal active substances of *Streptomyces hygrosopicus* BS-112[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(8): 1443-1452.

- [23] Zhu L L, Liu Y P, Zheng P, *et al.* Screening and identification of a strain of *actinobacillus succinogenes* producing succinic acid by anaerobic fermentation[J]. *Microbiology*, 2007, 34(1): 80-84.
- [24] 曹艳茹, 姜怡, 徐丽华. 大香格里拉土壤放线菌组成分析及生物活性测定[J]. *微生物学报*, 2009, 49(1): 105-109.
- [25] 江翠翠, 赵云峰, 司美茹. 选择性分离放线菌的土壤处理方法研究[J]. *济宁学院学报*, 2010, 31(6): 44-48.
- [26] 杨海英. 抑制剂对土壤放线菌分离的影响[J]. *湖北农业科学*, 2008, 47(4): 435-437.
- [27] 牛红杰. 黄瓜枯萎病生防放线菌的分离筛选及其发酵工艺研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2019.
- [28] 陈香, 唐彤彤, 孙星, 等. 对黄瓜枯萎病具防效的海洋源芽孢杆菌 Y3F 的鉴定[J]. *微生物学通报*, 2017(10): 2370-2379.
- [29] 谷祖敏, 毕卉. 长枝木霉 THLJ 菌株防治黄瓜枯萎病影响因素分析[J]. *农药*, 2016(1): 58-60.
- [30] 贺字典, 武春成, 沈江洁, 等. 棘孢木霉菌肥对黄瓜枯萎病的防治效果及对连作黄瓜根际土壤微生物种群的影响[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(3): 528-535.
- [31] 张莹, 秦宇轩, 尚庆茂, 等. 解淀粉芽孢杆菌 L-H15 的促生与抗病特性研究[J]. *农业机械学报*, 2017(12): 284-291.
- [32] 楼兵干, 张炳欣, Ryder M. 铜绿假单胞菌株 CR56 在黄瓜和番茄根围的定殖能力[J]. *浙江大学学报(农业与生命科学版)*, 2001, 27(2): 183-186.