管利,苏洁文,彭晨,等.对黄瓜专化型枯萎病拮抗菌株的筛选与鉴定[J].山西农业大学学报(自然科学版),2025,45(2):60-70.
Guan L, Su J W, Peng C, et al.Screening and identification of antagonistic strains against cucumber *Fusarium* wilt[J].Journal of Shanxi Agricultural University(Natural Science Edition), 2025,45(2):60-70.
doi: 10.13842/j.cnki.issn1671-8151.202407048

对黄瓜专化型枯萎病拮抗菌株的筛选与鉴定

管利[1],苏洁文[1],彭晨[1],孙星[2*],方泽民[1]

(1.安徽大学 生命科学学院,安徽 合肥 230601;2.滁州学院 生物与食品工程学院,安徽 滁州 239000)

摘　要:[目的]筛选出对黄瓜枯萎病具有拮抗作用的细菌。[方法]从黄海海域的海泥中筛选出一株能抑制尖孢镰孢黄瓜专化型枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)的拮抗菌株,经形态学观察和分子生物鉴定菌株H5-9Z为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*),并对其作为黄瓜枯萎病生防菌的潜力进行了研究。[结果]拮抗菌株H5-9Z抑菌效果最好,其发酵菌液抑菌率为82.67%,无菌滤液抑菌率为77.87%,抑菌效果明显。胞外活性物质在紫外线和金属离子的条件下抑菌直径均无明显改变;pH在5.0、7.0、9.0、11.0都有较好的抑菌活性,当pH越靠近中性条件下抑菌效果越好;当温度高于70 ℃时失去抑菌活性,表明该菌株不耐高温。盆栽试验结果表明,菌株H5-9Z的发酵液对黄瓜枯萎病有一定的拮抗作用(57.65%)。探究发现菌株H5-9Z的主要抑菌化合物分子质量范围在33~95 kDa之间。[结论]分离得到的短小芽孢杆菌H5-9Z具有作为生物防治剂的潜力,可以用于黄瓜枯萎病生物防治方面的研究。

关键词:拮抗菌; 黄瓜枯萎病菌; 分离鉴定; 生物活性; 生物防治
中图分类号:Q93　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1671-8151(2025)02-0060-11

Screening and identification of antagonistic strains against cucumber *Fusarium* wilt

Guan Li[1], Su Jiewen[1], Peng Chen[1], Sun Xing[2*], Fang Zemin[1]

(*1.School of Life Sciences, Anhui University, Hefei 230601, China; 2.School of Biology and Food Engineering, Chuzhou University, Chuzhou 239000, China*)

Abstract: [Objective] This study was aimed to screen the bacterial strains with antagonistic effects against cucumber *Fusarium* wilt. [Methods] A strain capable of inhibiting *F. oxysporum*, the pathogen causing cucumber *Fusarium* wilt, was isolated from sea mud in the Yellow Sea. The strain H5-9Z was identified as *Bacillus pumilus* through morphological observation and molecular biology. The potential of this strain as a biocontrol agent against cucumber *Fusarium* wilt was further investigated. [Results] The antagonistic strain H5-9Z exhibited the best inhibitory effect, with an inhibition rate of 82.67% for its fermentation broth and 77.87% for its sterile filtrate, demonstrating significant antifungal activity. The extracellular active substances showed no significant change in inhibition diameter under UV light or in the presence of metal ions; The strain maintained good antibacterial activity at pH levels of 5.0, 7.0, 9.0, and 11.0, with optimal inhibition observed under neutral pH conditions. However, the strain lost its inhibitory activity at temperatures above 70 ℃, indicating its sensitivity to high temperatures. The results of pot experiment showed that the fermentation broth of strain H5-9Z exhibited a certain level of antagonistic activity against cucumber *Fusarium* wilt (57.65%). Further investigation identified that the molecular weight range of the main antibacterial compounds produced by strain H5-9Z was between 33 and 95 kDa. [Conclusion] The isolated *B. pumilus* H5-9Z demonstrated potential as a biocontrol agent and can be further explored for its application in the biological control of cucumber *Fusarium* wilt.

收稿日期:2024-07-17　　**修回日期**:2024-08-23
基金项目:安徽省科技厅自然科学基金面上项目(2108085MC87)
作者简介:管利(ORCID:0009-0006-3576-7908),硕士研究生,研究方向:微生物应用,E-mail:guanli@163.com
*通信作者:孙星(ORCID:0000-0001-7289-4400),副教授,博士,研究方向:海洋微生物应用,E-mail:xsun@chzu.edu.cn

Keywords: Antimicrobial activity, Cucumber wilt pathogen, Isolation and identification, Biological, Biological control

黄瓜在中国是一种非常重要的蔬菜作物,具有显著的经济和食用价值[1]。在种植黄瓜的过程中,枯萎病、霜霉病和白粉菌是诱发黄瓜发病的3种最主要病原菌[2]。在中国,黄瓜不同种植区域都有枯萎病发生。在连作模式下,黄瓜枯萎病发生率会变得更高,发生率一般在30%~90%,导致黄瓜产量的巨大损失[3-4]。镰刀菌[5]是一种感染黄瓜维管束的形式特化菌,其引起的枯萎病会导致茎基坏死病变、叶片枯萎,最终导致整株枯萎,甚至死亡[6-7]。黄瓜枯萎病极难控制,同时可以在土壤中长期存在,因此很难通过使用杀虫剂来消除[8]。现有的防治方法以化学防治为主,如青枯立克、多菌灵、恶霉灵等化学药剂[9]。农业防治方法包括对种子进行消毒、施足底肥、合理的轮作、高垄栽培或者采用嫁接技术。虽然化学农药在防治上会有一定的效果,但会带来环境污染,使土壤板结化。而农业防治上所需要的技术手段又过于苛刻。使用生物防治是控制黄瓜枯萎病的另一种方法,定殖在根际的微生物可以通过抗生作用、竞争作用、溶菌作用及诱导抗病性等多种防病机制拮抗病原菌[10]。这些微生物可以通过多种机制参与生物防治,包括脂肽的产生、水解酶(例如几丁质酶、纤维素酶、葡聚糖酶)产生、微生物挥发性有机化合物产生[11]。

海洋是生命的发源地,其生物多样性远远大于陆地生态系统[12]。海洋环境具有高盐、高压、低温等特点,海洋微生物因能产生具有特殊效果的生物活性物质而独树一帜,是药物、保健食品和生物材料的巨大宝库。近年来,研究人员发现了许多海洋微生物可以产生具有各种影响的天然活性物质[13-14]。例如,新型杀菌剂可以抑制革兰氏阴性铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌;蒽醌和肉桂酸可以用来对抗人类癌症细胞[15-16]。研究表明,海洋中存在着大量的对黄瓜枯萎病具有抑制作用的细菌。陈香等[17]从连云港海域分离出对黄瓜枯萎病具有良好防治效果的海洋源芽孢杆菌Y3F。李伟等[18]分离出来的枯草芽孢杆菌3512A对黄瓜枯萎病的田间防效达到70%以上。

近年来研究发现,假单胞菌属和芽孢杆菌属是黄瓜枯萎病的主要生物防治细菌。木霉属(*Trichoderma spp.*)主要是生物防治真菌[19]。在对黄瓜枯萎病的防治研究中发现,菌株具有拮抗作用的原因之一是能分泌代谢活性物质,如蛋白质,环脂肽等[20]。而拮抗菌的作用强弱主要跟其分泌的代谢产物的量有关,特别是其中含活性抑菌物质的含量;其发酵条件,培养基成分也是重要的影响条件。生防菌在抑菌过程中一般通过竞争底物来发挥作用[21]。同时拮抗菌株产生的代谢物,可使致病菌细胞破裂内容物流出[22]。

本研究以尖孢镰孢黄瓜专化型枯萎病菌作为致病菌,从黄海滩涂的海泥中筛选出来的细菌为供试菌,分离筛选出具有较好拮抗作用的菌株,并通过建立系统发育树,鉴定其种属,分析其抑菌结果。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　致病菌株

尖孢镰孢黄瓜专化型黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*)编号为:CICC 2532购自中国工业微生物菌种保藏管理中心。

1.1.2　菌株筛选来源

海泥采自连云港黄海海域滩涂,经过梯度稀释可得。

1.1.3　培养基

LB培养基和2216E培养基用于拮抗菌株的分离与筛选;PDA培养基用于病原真菌的活化及培养[23]。

1.2　目标菌株的分离筛选

用移液管吸取2 mL海泥样品放入50 mL的2216E液体培养基中,28 ℃振荡培养2 h。将菌悬液到10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5},分别吸取60 μL进行LB平板涂布,28 ℃培养24 h,挑取表面光滑的菌落划线保存在4 ℃冰箱。采用平板对峙法[24],将尖孢镰刀菌接入PDA中央,将拮抗菌接入距平板中心2.5 cm处,以接种2216E培养液作为对照组,28 ℃培养箱培养3、5和7 d。试验重复3次,分别记录抑菌直径,计算抑菌率。抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-5)×100%[25]。根据抑菌率筛选出最好的菌株。

1.3 拮抗菌株的鉴定

1.3.1 形态学和生理生化鉴定

在2216E平板上将筛选菌株划线,在28 ℃隔水式培养箱内培养24 h,观察所筛选菌株的形状、大小、颜色等形态特点,并进行革兰氏染色,采用试剂盒(常德比克曼生物科技有限公司)。

1.3.2 16S rRNA序列分析

将菌株送至通用生物(安徽)公司进行测序。16S rRNA的PCR扩增。将纯化得到的菌株在2216E液体培养基中,28 ℃、180 r/min恒温恒湿培养摇床中培养20 h后,取200 μL菌液在100 ℃沸水中煮10 min,1200 r/min离心10 min,得到上清液为RNA。以此RNA为模板,进行PCR扩增。PCR反应体系:模板RNA 1 μL、上下游引物各0.5 μL、ddH_2O 40 μL、2×*Taq* PCR MasterMix 25 μL。PCR反应条件:94 ℃预变性180 s、94 ℃变性30 s、55 ℃退火30 s、72 ℃延伸45 s,循环30次;72 ℃终延伸300 s。PCR引物为细菌16SrRNA通用引物,反向引物为1492R(5′-TACGGCTACCTTGTT-ACGACTT-3′),正向引物27F(5′-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3′)。测序结果通过NCBI网站的BLAST检索系统对测序结果进行同源系列比对分析,对高度相似的序列进行分析。使用MEGA-X软件运用邻近法构建系统发育树并分析。

1.3.3 菌株H5－9Z抑菌能力测定

以H5-9Z作为拮抗菌株,制备菌悬液。从平板中挑取一环菌株接种到10 mL的2216E培养液中,28 ℃、180 r/min振荡培养24 h为一级培养种子液。将一级培养种子液吸取60 μL接种到100 mL的2216E培养液中培养,28 ℃、180 r/min振荡培养24 h。菌株H5-9Z的无菌滤液制备:将H5-9Z的菌悬液于4 ℃、8000 r/min的条件下离心30 min,弃沉淀得上清液并用0.22 μm的滤膜过滤。吸取100 μL H5-9Z的无菌滤液在已接种黄瓜枯萎病致病菌的PDA平板上。同时,以同样的操作H5-9Z的菌悬液,以无菌的2216E液体培养基为对照,重复3次。在28 ℃的培养箱中培养24 h,采用十字交叉法[26]测量3、5和7 d抑菌直径。

1.3.4 胞外活性物质稳定性测定

将菌株H5-9Z在2216E液体培养基中28 ℃培养24 h,将发酵液4 ℃、8000 r/min离心30 min得上清液,上清液0.22 μm滤膜过滤备用。等比例滤液分别在30、50、70和90 ℃条件下静置30 min,评估温度稳定性。用0.01 mol/minHCl和NaOH调节pH分别为3.0、5.0、7.0、9.0、11.0和13.0,评估pH稳定性。将0.01 mol/min的K^+、Na^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{3+}等比例加入5份滤液中室温静置3 h,评估金属离子稳定性。同等4份滤液分别在紫外线下照射1、2、3和4 h,评估紫外线稳定性(紫外线强度为4 W/m^2)。采用平板对峙法测定滤液的抑菌活性(方法同上),CK组为无菌滤液不做任何处理,培养时间均为5 d,以上每组操作重复3次。

1.3.5 菌株H5－9Z与致病菌菌丝体的互作关系

采用双培养法,在PDA平板两侧等距接种H5-9Z和致病菌,共培养5 d,CK组接种致病菌其他不做处理。取抑制带旁的菌丝与正常菌丝进行扫描电镜对比,观察菌丝体形状。

1.3.6 灌根法测定菌株H5－9Z发酵液对黄瓜枯萎病的生防效果

将菌株H5-9Z在2216E培养基中培养24 h,培养及处理条件同(1.3.4)。将20 μL尖孢镰刀菌接种在100 mL的PDB培养基中,28 ℃、180 r/min培养24 h。将三叶期的黄瓜幼苗移栽到无菌土壤盆中,待幼苗生长稳定后,试验分为4组,每组15盆:A组加30 mL清水作为对照;B组加30 mL无菌PDB培养基;C组加10 mL尖孢镰刀菌和20 mL无菌PDB培养基;D组加10 mL尖孢镰刀菌和20 mL的H5-9Z发酵液。培养至20 d后,观测茎粗、株高、鲜重、总根长、叶色、根色及病情指数[27]。病情指数=100×∑(发病苗数×发病程度)/(总株数×最高发病程度);发病率=发病株数/总株数×100%;防治有效性=(对照组发病率-处理组发病率)/对照组发病率×100%。

1.3.7 抗生素的分离

将装有300 mL的2216E培养基三角烧瓶(500 mL)灭菌处理,接种菌株H5-9Z,培养条件及离心条件同1.3.4,上清液过0.22 μm滤膜。在硫酸铵饱和度为40%、50%、60%、和70%(质量分数)的条件下,缓慢加入并搅拌30 min,从上清液中沉淀出抗生素。继续搅拌30 min,用12 000 r/min离心20 min,溶解在磷酸盐缓冲液(0.05 mol/L,pH 8.0)中,在同一缓冲液中透析24 h,更换4次,除去硫酸铵。试验中使用的透析袋的截留分子量(MWCO)分别3500和14 000 Da。透析后将抗生

素溶液用聚乙二醇浓缩至原始体积。透析后的粗制抗生素过30 kDa的超滤管,用上述方法测定粗抗生素对尖孢镰刀菌的抗菌活性,并以未透析的粗抗生素为对照。

1.3.8　数据的处理

使用Excel 2019进行数据统计,使用SPSS 25.0进行分析,Origin 2018软件绘图,MAGA-X建立发育树。

2　结果与分析

2.1　拮抗菌株的筛选

经过初筛,得到8株(表1)对黄瓜专化型枯萎病菌具有明显抑制作用的拮抗菌。进行复筛后,其中,H5-9Z(图1A)和N1-21H(图1B)抑菌作用高于较其它菌株,在7 d时抑菌率分别为82.67%和60.22%(表1),故将H5-9Z作为目标菌株。

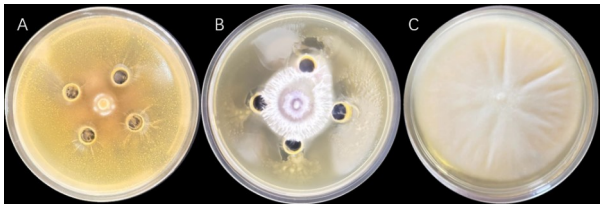
表1　对黄瓜专化型枯萎病菌具有抑菌作用的拮抗菌株筛选

Table 1　Screening of antagonistic strains with antibacterial effects on cucumber specialized *F. oxysporum*

菌株 Strains	3 d		5 d		7 d	
	病原菌直径/mm Colony size	抑菌率/% Inhibition rate	病原菌直径/mm Colony size	抑菌率/% Inhibition rate	病原菌直径/mm Colony size	抑菌率/% Inhibition rate
N1－13H	32.12±1.00b	10.57±3.30de	49.99±0.77ab	12.09±1.50ef	69.74±1.48b	10.28±2.05e
N3－19H	34.17±0.69a	6.81±2.98e	51.24±0.86a	9.65±1.68f	73.62±0.46a	4.91±0.64f
H5－9Z	16.03±0.58e	63.65±1.90b	16.88±0.39f	76.80±0.76a	17.51±0.64f	82.67±0.88a
N1－21H	10.31±0.15f	82.50±0.50a	24.50±0.72e	61.89±1.41b	33.71±0.90e	60.22±1.25b
S5－24Z	30.89±0.64c	14.64±2.11d	48.11±0.64c	15.77±1.25d	67.44±0.67c	13.47±0.92d
N3－20H	28.81±0.25d	21.49±0.83c	49.38±0.42bc	13.29±0.81de	70.58±0.40b	9.12±0.55e
N5－12Z	28.56±0.22d	22.32±0.71c	46.12±0.70d	19.66±1.37c	65.42±087d	16.26±1.20c
S4－16Z	29.24±0.75d	20.07±2.47c	49.24±1.10bc	13.57±2.14de	66.19±1.28cd	15.20±1.78cd

注:同列字母表示同一时间不同菌株差异显著($P<0.05$)。

Note:Letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$) among different bacterial strains at the same time.



A:H5－9Z抑菌效果;B:N1－21H抑菌效果;C:CK

A: H5－9Z antibacterial effect; B: N1－21H antibacterial effect; C: CK

图1　菌株H5－9Z、N1－21H抑菌作用

Fig.1　Antibacterial effect of strains H5-9Z and N1-21H

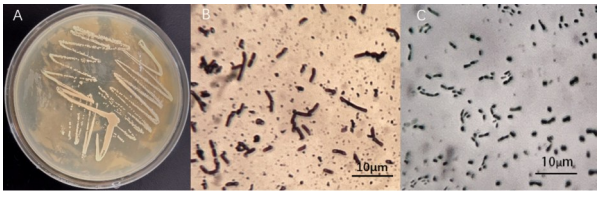
2.2　拮抗菌的鉴定

2.2.1　菌株H5－9Z生理生化及形态特征鉴定

H5-9Z其菌落近圆形,表面光滑湿润呈淡黄色,形状呈杆状(图2),革兰染色结果H5-9Z为革兰氏阳性细菌。结合菌株H5-9Z的生理生化测定(表2),初步鉴为芽孢杆菌属(*Bacillus* spp.)。

2.2.2　16S rRNA基因分子鉴定

在GenBank数据库对菌株H5-9Z进行BLAST相似性比对,并进行发育树分析。结果显示,菌株H5-9Z与*Bacillus pumilus* strain L14(OR607844.1)为同一分支,进化距离最近(图3),



菌株H5－9Z在A:2216培养基下生长状态;B:革兰氏染色下的形态特征(1000×);C:光学显微镜下的形态学特征(1000×)

The growth status of strain H5－9Z in A:2216 medium; B: Morphological characteristics under Gram staining (1000×); C: Morphological features under an optical microscope (1000×)

图2　菌株H5－9Z的形态学特征

Fig.2　Morphological characteristics of strains H5-9Z

结合其生理生化特性,菌株H5-9Z鉴定为短小芽孢杆菌。并将菌株H5-9Z序列提交至GenBank获得登录号是PQ060413。

2.2.3　菌株H5－9Z的发酵液与无菌滤液抑菌对比

菌株H5-9Z具有很好的抑菌效果,随着时间的增加抑菌效果越发明显,培养至7 d后发酵液抑菌效果达到82.67%(表1)。对于无菌滤液的抑菌率而言,随着时间的增加抑菌率也在增加,抑菌率达到77.87%(图4)。菌株H5-9Z的菌悬液及

表2 菌株H5－9Z生理生化试验结果

Table 2 Physiological and biochemical experimental results of strain H5－9Z

试验项目 Experimental project	菌株H5－9Z Strain H5－9Z	短小芽孢杆菌F1[28] *Bacillus pumilus* F1
淀粉水解 Starch hydrolysis	＋	＋
甲基红试验 Metgyl red test	＋	＋
柠檬酸利用 Citrate utilization	＋	－
明胶液化 Hydrolysis of gelatin	＋	＋
V－P试验 Voges－Proskauertest	＋	＋
吲哚试验 Indole test	－	－
蔗糖发酵 Sucrose fermentation	－	－
耐盐试验 2%NaCl salttolerance	＋	＋
耐盐试验 5%NaCl salttolerance	＋	－
耐盐试验 7%NaCl salttolerance	＋	－

注:“＋”和“－”分别表示阳性和阴性。

Note:"＋"and"－"represent positive and negative, respectively.

其胞外活性产物对黄瓜枯萎病致病菌都具有很好的抑制作用。

2.2.4 不同条件下对菌株H5－9Z胞外活性物质的影响

胞外活性物质的稳定性试验结果(图5)表明,温度在70 ℃的条件下抑菌直径发生改变,表明胞外活性物质不耐受高温条件。菌株H5-9Z原菌液pH为8.0,在pH为3.0和13.0的条件下失去抑菌活性,表明其在强酸强碱性条件下失去了生物活性,越靠近中性条件下活性越好。在不同金属和紫外线条件下对活性物质的稳定性没有明显的影响。这一结果有助于为后续能否上发酵罐做准备。因为K^+、Na^+、Ca^{2+}、Mg^{2+}、Fe^{3+}等为土壤常见金属离子,也为后续盆栽试验做好准备。

2.2.5 菌株H5－9Z对致病菌菌丝体影响

双培养试验结果显示,在菌株H5-9Z的抑菌作用下,致病菌在H5-9Z处停止生长,与CK组对比表明拮抗菌株对致病菌具有明显的抑菌作用。扫描电镜结果显示,与致病菌的正常菌丝形态相比(图6A),被H5-9Z抑制的致病菌菌丝变得松散(图6B)、扭曲和粘连(图6C),菌丝体发生内聚折叠(图6D)。

2.2.6 菌株H5－9Z发酵液灌根的生防效果

菌株H5-9Z发酵液对尖孢镰刀菌抑制作用,通过灌根试验可以得出。加入H5-9Z发酵液后,植株能正常生长(表3),发病率明显降低,防治效果为57.65%,同时病情指数达38.33(表4)。而未加入H5-9Z发酵液组植株出现明显的枯黄、萎蔫及烂根的现象(图7),发病率到达95.67%,

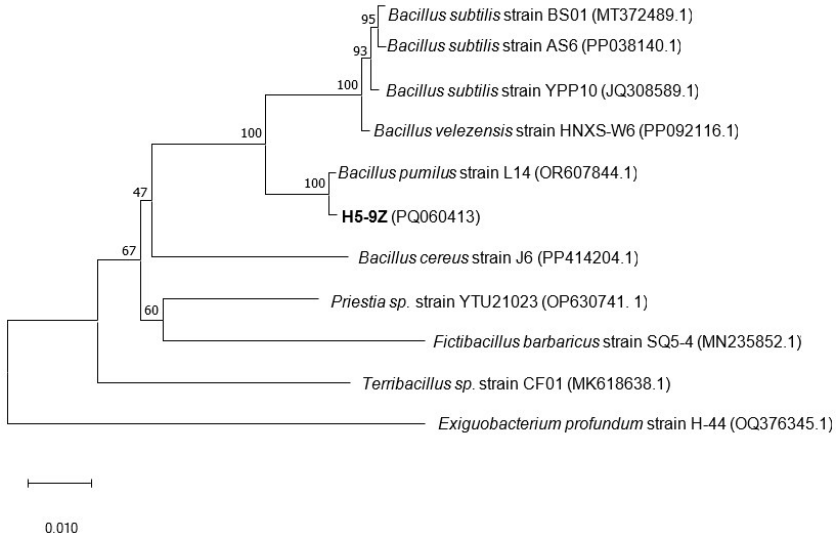
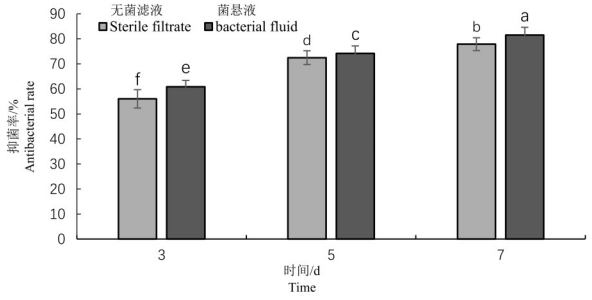


图3 采用邻接法对菌株H5－9Z的系统发育树构建

Fig.3 Construction of phylogenetic tree of strain H5-9Z by adjacency method



不同小写字母表示同一菌株各处理间差异显著($P<0.05$)

The different lowcase letters significant differences($P<0.05$)

图4　菌株H5－9Z的菌悬液和无菌滤液抑菌作用

Fig.4　Bacteriostasis of bacterial suspension and aseptic filtrate of strain H5-9Z

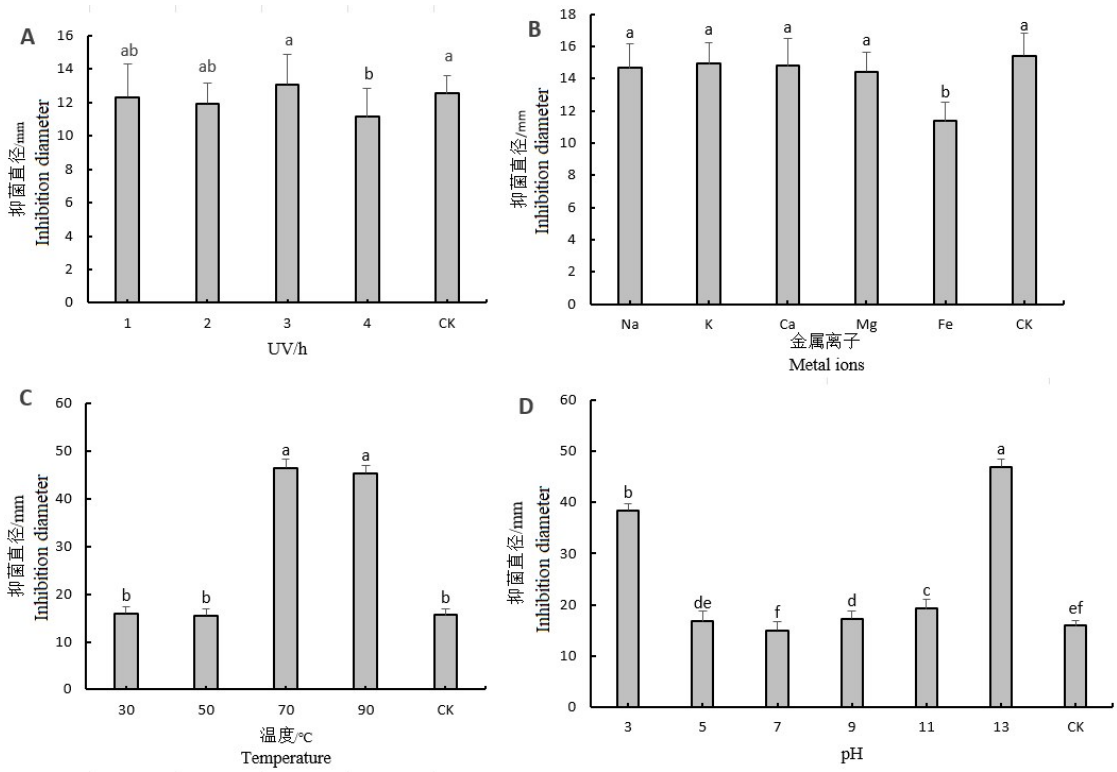
病情指数为80.01(表4)。以上研究表明,菌株H5-9Z对黄瓜枯萎病具有良好的抑菌作用。

2.2.7　抗生素的分离

当硫酸铵饱和度为50%(质量分数)时,沉淀具有抑菌效果。抑菌效率随硫酸铵饱和度的升高而增加,在硫酸铵饱和度为70%(质量分数)时达到最大值(图8)。用MWCO/3500 Da和14 000 Da透析袋透析的抗生素粗液的抗菌活性与对照无显著差异(图9、图10)。结果表明,抗生素的相对分子质量在33 kDa以上。

3　讨论与结论

由于与生俱来的耐高盐、高压、高温及干旱的特性,芽孢杆菌属已成为理想的生防菌筛选对象。因其能够产生多种活性物质,得到广泛应用。在生防菌剂中,芽孢杆菌属最多,枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)[29]、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)[30]、多粘芽孢杆菌(*B. polymyxa*)和蜡样芽孢杆菌(*B. cereus*)[31]等是报道最多的几种菌。唐彤彤等[32]筛选的海洋源赤杆菌属YH-07对番茄枯萎病具有生防效果,其防治效果在50%以上。而虞凡枫等[33]从敦煌盐碱地区中筛选的内生芽孢杆菌A7-3-14对黄瓜枯萎病具有很好的拮抗作用,其防治效果更是达到了69.77%。张美君等[34]从蚯蚓粪中筛选出来的一株解淀粉酶芽孢杆菌WQ-5对黄瓜枯萎病具有抑制作用,通过优化培养条件其

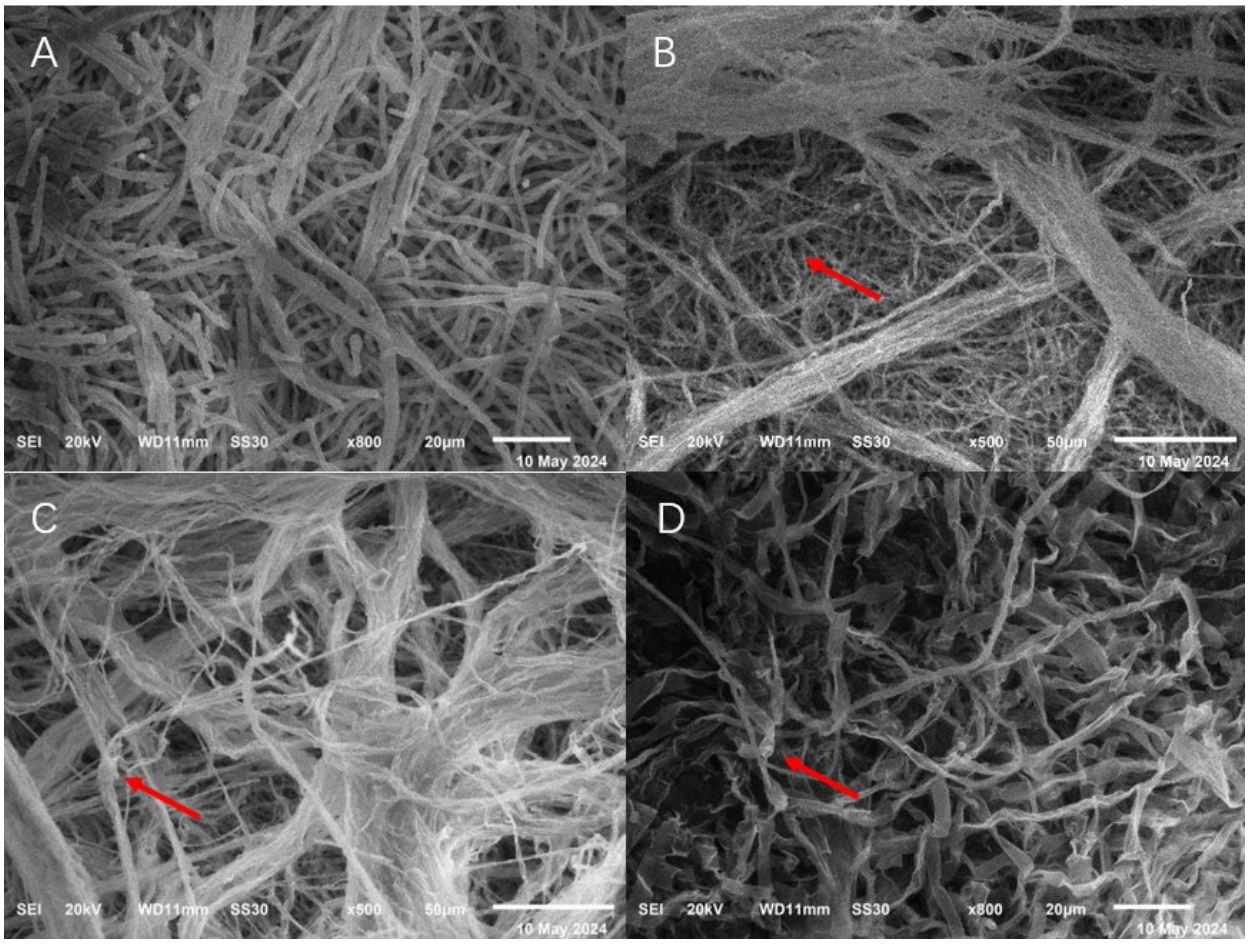


A:不同时间紫外光照射的抑菌率;B:不同金属离子的抑菌率;C:不同温度的抑菌率;D:不同pH的抑菌率;不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

A: The antibacterial rate of UV irradiation at different times; B: Antibacterial rates of different metal ions; C: Antibacterial rates at different temperatures; D: Antibacterial rates at different pH levels; Different letters represent significant differences in the treatment($P<0.05$)

图5　不同条件下菌株H5-9Z胞外活性物质的抑菌率

Fig.5　The antibacterial rate of extracellular active substances of strain H5-9Z under different conditions



A:FOC的正常菌丝,800×;B:松散的菌丝结构,500×;C:扭曲和粘性的菌丝500×;D:内聚折叠,800×

A:Normal hyphae of FOC, 800 ×; B: Loose mycelial structure, 500×; C: Twisted and sticky hyphae 500×; D: Cohesive folding, 800×

图6 菌株H5-9Z对尖孢镰刀菌的菌丝体形态的影响

Fig.6 Effect of strain H5-9Z on the mycelial morphology of *F.* oxysporum

表3 接种发酵液后各组幼苗生长状态

Table 3 Growth status of seedlings in each group after inoculation with fermentation broth

分组 Groups	株高/cm Plant height	茎粗/mm Stem thickness	总根长/cm Total root length	地上鲜重/g Fresh weight of aboveground	地下鲜重/g Fresh weight of underground	地上干重/g Dry weight of aboveground	地下干重/g Dry weight of underground
A	13.16±0.82b	4.53±0.64a	4.18±0.51b	2.31±0.29a	0.33±0.11a	0.17±0.015a	0.040±0.083ab
B	12.93±0.75b	4.39±0.52a	4.20±0.53b	2.32±0.36a	0.32±0.089a	0.16±0.019a	0.036±0.011b
C	13.24±0.93ab	2.24±0.36b	3.85±0.36b	1.16±0.28b	0.19±0.037b	0.12±0.017b	0.035±0.0027c
D	13.93±0.61a	4.81±0.38a	4.67±0.46a	2.60±0.41a	0.37±0.098a	0.17±0.016a	0.044±0.093a

注:同列的不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: The letters in the same column indicate significant differences($P<0.05$).

抑菌率提高了30.39%,种子萌发率提高了150%,发病率降低了20%。而本研究筛选的短小芽孢杆菌H5-9Z发酵液对黄瓜枯萎病抑菌率达82.67%,无菌滤液抑菌率达到77.87%,抑菌作用明显。研究表明,枯草芽孢杆菌可以分泌几种抗真菌代谢物,例如枯草菌素、表面活性素[35]和蛋白质[36],在植物的定殖过程中可以很好的发挥效果,这是生防菌株能否在植物根际或根部有效定殖的关键一步[37],植物促生根际细菌的有效定殖有助于成功抑制植物病原体。在定殖后,生防菌产生的胞外活性物质是否稳定是至关重要的,这是生防菌与土著菌竞争的重要手段[38]。在对短小芽孢杆菌

表4　菌株H5－9Z对黄瓜枯萎病的防治效果

Table 4　Control effect of strain H5－9Z on cucumber wilt disease

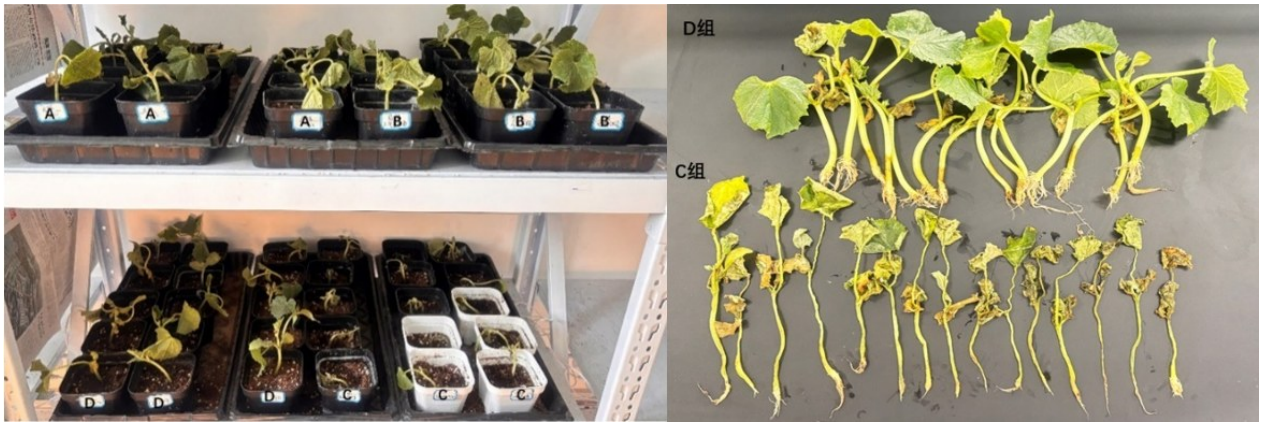
分组 Groups	病情指数 Disease index	发病率/% incidence rate	防治效果/% Prevention and control effect
A	41.11±1.84b	66.67±1.16bc	—
B	41.67±2.29b	73.33±1.55ab	—
C	80.01±1.51a	95.67±2.54a	—
D	38.33±2.89b	46.67±1.15c	57.65±4.07a

注:每列的不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note:The letters in the same column indicate significant differences ($P<0.05$).

SQR-N43研究过程中发现,菌株SQR-N43可以引起红曲霉菌丝变形、胞质空泡增大和胞质渗漏,同时在根表面上形成了生物膜,稳定了菌群并增加了拮抗剂的活性形式[39]。枯草芽孢杆菌B29菌株产生一种相对分子质量为42.3 kDa的蛋白质,该蛋白质对尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、串珠镰刀菌和核盘菌的菌丝生长具有抑制作用[40]。伊利诺拟青霉KJA-424产生3种能抑制立枯丝核菌菌丝的几丁质酶,其相对分子质量分别为63、54和38 kDa[41]。Botton等[42]报道了短小芽孢杆菌MSH产生的一种化合物对毛霉科和曲霉有抑制作用,该化合物的相对分子质量范围为500～3000 Da。短小芽孢杆菌HY1菌株产生的伊枯草菌素的相对分子质量为1 043.4 Da[43]。

本试验室以抑制黄瓜枯萎病为目的,从海泥中分离筛选的菌株H5-9Z对黄瓜枯萎病的抑菌效果最好。为了进一步研究其潜在的应用价值,经生理生化特征分析,及16S rRNA序列分析,通过NCBI数据库比较,菌株H5-9Z为短小芽孢杆菌(*Bacillus pumilus*)。通过抑菌试验可得发酵液抑菌率达到82.67%,无菌滤液抑菌率达到77.87%,结果表明,菌株H5-9Z产生的胞外活性物质在抑制黄瓜枯萎病时起到重要的作用。同时对其胞外活性物质进行了探究试验,发现活性物质不耐受高温条件,且对紫外线和金属离子不敏感,在中性条件和碱性条件下都有较好的生物活性,这使得可以在碱性土壤中应用,并为后续的盆栽试验做了准备。在扫描电镜观察中发现,菌株H5-9Z对致病菌的抑菌机制可能与阻止菌丝生长有关,使致病菌菌丝体异常,从而形成抑制区,使其失去侵袭能力。同时,通过盆栽试验可得,在含有H5-9Z发酵液时的防治效果为57.65%,发病率为46.67%,病情指数为38.33,通过观察幼苗的生长状态可以看出具有较强的抗病能力。本研究进一步对抑菌化合物进行探究过程中发现,在初步使用超滤管及透析袋(3500 Da和14 000 Da)进行透

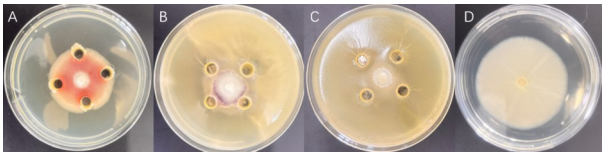


A:清水,B:无菌PDB,C:FOC,D:FOC+菌株H5－9Z发酵液

A:Clear water, B:Sterile PDB, C:foc, D:foc+fermentation broth of strain H5－9Z

图7　黄瓜枯萎病盆栽防效

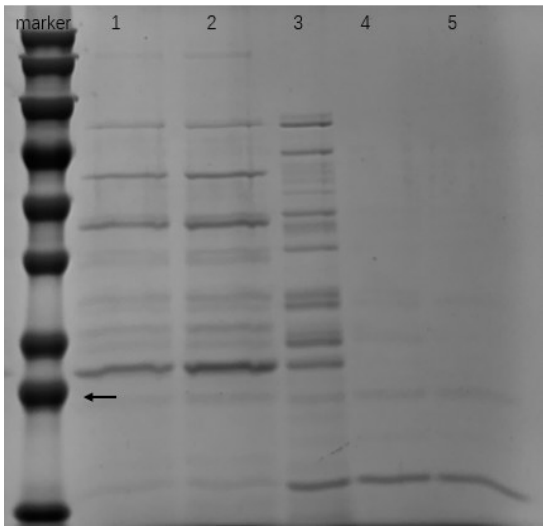
Fig.7　Pot experiment on the control effect of cucumber wilt disease



A:50%;B:60%;C:70%;D:CK

图8　不同浓度硫酸铵沉淀后的抑菌效果

Fig.8　Antibacterial effect of ammonium sulfate precipitation at different concentrations

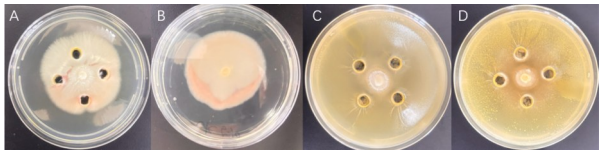


1和2为透析分离后33 kDa以上的抗生素;3为未分离的透析液;4和5为透析分离后33 kDa以下的抗生素。箭头标记处为33 kDa

Lane 1 and 2 are antibiotics with a molecular weight of 33 kDa or more after dialysis separation. 3 is the unseparated dialysate. 4 and 5 are antibiotics with a molecular weight of less than 33 kDa after dialysis separation. The marker indicated by the arrow is 33 kDa

图9 SDS-PAGE分析

Fig.9 SDS-PAGE analysis chart



A:33 kDa以下的透析液;B:CK组;C:33 kDa以上的透析液;D:未分离的透析原液

A: Dialysis fluid below 33 kDa; B: CK; C: Dialysis fluid with a molecular weight of 33 kDa or higher; D: Unsolved dialysis solution

图10 不同分子量抗生素抑菌效果

Fig.10 Antibiotic inhibition test with different molecular weights

析浓缩后,发现主要的抑菌化合物分子质量范围在33~95 kDa,在后续试验中将对该化合物进行纯化分离。通过以上试验探究,菌株H5-9Z对黄瓜枯萎病具有良好的生防作用,为后续的应用开发提供了可能性。

参 考 文 献

[1]Fareed G, Atiq M, Abbas M, et al. *In vitro* and *in vivo* management of *Fusarium* wilt of cucumber (FWC) through various chemicals[J]. Advances in Zoology and Botany, 2015, 3(4): 169-174.

[2]曹清河,万红建,陈劲枫. 黄瓜霜霉病抗性研究进展[J]. 中国瓜菜,2007,20(1):27-30.
Cao Q H, Wan H J, Chen J F. Progress on downy mildew resistance in cucumber[J]. China Cucurbits and Vegetables, 2007, 20(1): 27-30.

[3]Gai J Y, Wang J K. Identification and estimation of a QTL model and its effects[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 97(7): 1162-1168.

[4]冯芳君,罗利军,李荧,等. 水稻InDel和SSR标记多态性的比较分析[J]. 分子植物育种,2005,3(5):725-730.
Feng F J, Luo L J, Li Y, et al. Comparative analysis of polymorphism of InDel and SSR markers in rice[J]. Molecular Plant Breeding, 2005, 3(5): 725-730.

[5]Zheng X Y, Yang J J, Lou T X, et al. Transcriptome profile analysis reveals that *CsTCP14* induces susceptibility to foliage diseases in cucumber[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(10): 2582.

[6]周红梅,毛爱军,张丽蓉,等. 黄瓜枯萎病接种方法及抗性遗传的研究[J]. 华北农学报,2010,25(4):186-190.
Zhou H M, Mao A J, Zhang L R, et al. Research on inoculation method and the inheritance of resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum on cucumber[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(4): 186-190.

[7]Zhou X G, Wu F Z, Wang X Z, et al. Progresses in the mechanism of resistance to *Fusarium* wilt in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. Journal of Northeast Agricultural University (English Edition), 2008, 3: 1-6.

[8]Sun Y M, Li Y R, Li Y, et al. Nitrate mediated resistance against *Fusarium* infection in cucumber plants acts via photorespiration[J]. Plant, Cell & Environment, 2021, 44(10): 3412-3431.

[9]王俊红. 黄瓜枯萎病的危害与防治技术[J]. 农业科技通讯,2020(3):271-272.
Wang J H. Harm and control techniques of cucumber *Fusarium* wilt[J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2020(3): 271-272.

[10]中华人民共和国农业农村部公告第351号[J].中华人民共和国农业农村部公报,2020,(12):96-98.
Ministry of agriculture and rural areas Announcement No. 351 of the People's Republic of China[J]. Bulletin of ministry of agriculture and rural affairs of the People's Republic of China, 2020(12): 96-98.

[11]Dobrzyński J, Jakubowska Z, Kulkova I, et al. Biocontrol of fungal phytopathogens by *Bacillus pumilus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2023, 14: 1194606.

[12]Blowes S A, Supp S R, Antão L H, et al. The geography of biodiversity change in marine and terrestrial assemblages[J]. Science, 2019, 366(6463): 339-345.

[13]Xu W, Gao Y H, Gong L F, et al. Fungal diversity in the deep-sea hadal sediments of the Yap Trench by cultivation and high throughput sequencing methods based on ITS rRNA gene[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2019, 145: 125-136.

[14]Yu L B, Tang X X, Wei S P, et al. Two novel species of the family *Bacillaceae*: *Oceanobacillus piezotolerans* sp. nov. and *Bacillus piezotolerans* sp. nov., from deep-sea sediment samples of Yap Trench[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2019, 69(10):

3022-3030. [PubMed]

[15]Akhter N, Pan C Q, Liu Y Q, et al. Isolation and structure determination of a new indene derivative from endophytic fungus *Aspergillus flavipes* Y-62 [J]. Natural Product Research, 2019, 33(20): 2939-2944.

[16]Parthasarathy R, Chandrika M, Yashavantha Rao H C, et al. Molecular profiling of marine endophytic fungi from green algae: assessment of antibacterial and anticancer activities [J]. Process Biochemistry, 2020, 96: 11-20.

[17]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,2017,44(10):2370-2379.
Chen X, Tang T T, Sun X, et al. Identification of marine bacillus isolate Y3F suppressing *Fusarium* wilt of cucumber [J]. Microbiology China, 2017, 44(10): 2370-2379.

[18]李伟,胡江春,王书锦. 海洋细菌3512A对黄瓜枯萎病的防治及促进植株生长的效应[J]. 沈阳农业大学学报,2008,39(2):182-185.
Li W, Hu J C, Wang S J. Growth-promotion and biocontrol of cucumber *Fusarium* wilt by marine *Bacillus subtilis* 3512A [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2008, 39(2): 182-185.

[19]Morrison J, McCarthy U, McHale A P. Cellulase production by *Talaromyces emersonii* CBS 814.70 and a mutant UV7 during growth on cellulose, lactose and glucose containing media [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1987, 9(7): 422-425.

[20]杨秀荣,刘水芳,孙淑琴,等. 生防细菌防治土传病害的研究进展[J]. 天津农业科学,2008,14(4):38-42.
Yang X R, Liu S F, Sun S Q, et al. Research development on preventing soil-borne disease with anti-bacteria [J]. Tianjin Agricultural Sciences, 2008, 14(4): 38-42.

[21]东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京:科学出版社,2001,62(63):364-386.
Dong X Z, Cai M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria [M]. Beijing: Science Press, 2001, 62(63): 364-386.

[22]Sanchez B M, Espinosa E, Villordo E, et al. Trichoderma spp. Native strains molecular identification and in vitro antagonistic evaluation of root phitopathogenic fungus of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cv [J]. Montcalm Agrociencia, 2017, 51(1): 63-79.

[23]杨革. 微生物学实验教程[M]. 北京:科学出版社,2004:42-67.
Yang G. Microbiology experiment course [M]. Beijing: Science Press, 2004: 42-67.

[24]刘邮洲,陈志谊,梁雪杰,等. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定[J]. 中国生物防治学报,2012,28(1):101-108.
Liu Y Z, Chen Z Y, Liang X J, et al. Screening, evaluation and identification of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici and *Ralstonia solanacearum* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(1): 101-108.

[25]孙广宇,宗兆锋. 植物病理学实验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2002:142-143.
Sun G Y, Zong Z F. Experimental techniques of plant pathology [M]. Beijing: China Agricultural Press, 2002: 142-143.

[26]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 & Biotechnology, 2012, 28(9): 2919-2927.

[27]周红梅,董从娟,张海英,等. 黄瓜抗枯萎病基因连锁分析和定位[J]. 分子植物育种,2015,13(9):1980-1986.
Zhou H M, Dong C J, Zhang H Y, et al. SSR molecular markers and localization of the gene foc-4 linked to the resistance to *Fusarium* wilt of cucumber [J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(9): 1980-1986.

[28]樊继强. 生防芽孢杆菌的筛选及其抗菌物质的分离纯化与鉴定[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2016.
Fan J Q. Screening of biocontrol *Bacillus* and isolation, purification and identification of its antimicrobial substances [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2016.

[29]郝慧娟,刘洪伟,尹淑丽,等. 枯草芽孢杆菌BSD-2的GFP标记及其在黄瓜上的定殖研究[J]. 华北农学报,2016,31(4):106-111.
Hao H J, Liu H W, Yin S L, et al. GFP-marking and colonization on cucumber of *Bacillus subtilis* BSD-2 [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2016, 31(4): 106-111.

[30]崔宁. 拮抗细菌的分离鉴定及其对苦瓜枯萎病生防潜力的研究[D]. 泰安:山东农业大学,2017.
Cui N. Isolation and identification of antagonistic bacteria and their biocontrol potential against *Fusarium* wilt of bitter gourd [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2017.

[31]祝久香. 黄瓜枯萎病拮抗细菌的筛选、发酵及生防机理研究[D]. 长沙:中南林业科技大学,2019.
Zhu J X. Screening, fermentation and biocontrol mechanism of antagonistic bacteria against cucumber *Fusarium* wilt [D]. Changsha: Central South University of Forestry & Technology, 2019.

[32]唐彤彤,孙星,董元华,等. 对番茄枯萎病具防效的海洋源赤杆菌YH-07的发酵条件探究[J]. 中国生物防治学报,2018,34(5):753-761.
Tang T T, Sun X, Dong Y H, et al. Optimization of fermentation conditions for *Erythrobacter* sp. YH-07 suppressing *Fusarium* wilt of tomato [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2018, 34(5): 753-761.

[33]虞凡枫,赵进,孙铭悦,等. 黄瓜枯萎病拮抗芽孢杆菌A7-3-14的筛选及鉴定[J]. 北方园艺,2022(3):41-46.
Yu F F, Zhao J, Sun M Y, et al. Screening and identification of antagonistic *Bacillus* A7-3-14 in cucumber *Fusarium* wilt [J]. Northern Horticulture, 2022(3): 41-46.

[34]张美君,吴庆,尹翠,等. 尖镰孢黄瓜专化型枯萎病菌拮抗菌的筛选、鉴定及培养条件优化[J]. 生物技术通报,2020,36(9):125-136.

Zhang M J, Wu Q, Yin C, et al. Screening and identification of an antagonistic strain against *Fusarium oxyporum* f. sp. cucumerinum and optimization of culture conditions [J]. Biotechnology Bulletin, 2020, 36(9): 125-136.

[35]Akhtar M S, Shakeel U, Siddiqui Z A. Biocontrol of *Fusarium* wilt by *Bacillus pumilus* Pseudomonas alcaligenes, and Rhizobium sp. on lentil[J]. Turkish Journal of Biology, 2010, 34(1): 1-7.

[36]Hu P, Zhou G H, Xu X L, et al. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rDNA-DGGE[J]. Food Control, 2009, 20(2): 99-104.

[37]勾宇春,王宗抗,张志鹏,等. 植物根际促生菌作用机制研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2023,29(2):495-506.
Gou Y C, Wang Z K, Zhang Z P, et al. Advance in role mechanisms of plant growth-promoting rhizobacteria [J]. Journal of Applied and Environmental Biology, 2023, 29(2): 495-506.

[38]Badri D V, Vivanco J M. Regulation and function of root exudates [J]. Plant, Cell & Environment, 2009, 32(6): 666-681.

[39]Huang X Q, Zhang N, Yong X Y, et al. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43 [J]. Microbiological Research, 2012, 167(3): 135-143.

[40]Li J, Yang Q, Zhao L H, et al. Purification and characterization of a novel antifungal protein from *Bacillus subtilis* strain B29 [J]. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, 2009, 10(4): 264-272.

[41]Jung W J, An K N, Jin Y L, et al. Biological control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using chitinase-producing *Paenibacillus illinoisensis* KJA-424 [J]. Soil Biology and Biochemistry, 2003, 35(9): 1261-1264.

[42]Bottone E J, Peluso R W. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report [J]. Journal of Medical Microbiology, 2003, 52(Pt 1): 69-74.

[43]Cho K M, Math R K, Hong S Y, et al. Iturin produced by *Bacillus pumilus* HY1 from Korean soybean sauce (kanjang) inhibits growth of aflatoxin producing fungi[J]. Food Control, 2009, 20(4): 402-406.

(编辑:吕俊俐)