植物营养与肥料学报 2013,19(1):223-231
Plant Nutrition and Fertilizer Science doi: 10.11674/zwyf.2013.0127

拮抗菌强化的生物有机肥对西瓜枯萎病的防治作用

王小慧[1],张国漪[1],李 蕊[1],卢颖林[2],冉 炜[1*],沈其荣[1]
(1 南京农业大学江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室,南京 210095;
2 广州甘蔗糖业研究所,广州 510316)

摘要: 由西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)引起的西瓜枯萎病是导致西瓜生产毁灭性损失的土传病害,当前对该病尚无有效的防治措施。为了探索该病的生物防治效果,本研究从土壤中分离筛选西瓜枯萎病的拮抗菌,制成生物有机肥,通过温室盆栽试验检验防病效果,并对与拮抗相关的拮抗菌葡聚糖酶进行分子生物学检测。从不同土壤中分离纯化到对西瓜枯萎病菌有潜在拮抗作用的细菌 172 株,通过平板对峙法筛选出抑菌率在 60% 以上的拮抗细菌 13 株,从中挑选出 2 株抑菌率最高的菌株 Cy5 和 CR38,分别用其与已腐熟的有机肥制成生物有机肥 BIO5 和 BIO38。盆栽试验结果表明,BIO5 在防病和促进西瓜生长方面表现优于 BIO38。与对照相比,BIO5 和 BIO38 对西瓜枯萎病的相对防治率分别为 75% 和 25%。BIO5 处理植株的株高、地上部鲜重、地上部干重分别比对照增加 64.8%、63.0% 和 50%。施用生物有机肥还能显著改变根际土壤的微生物组成。BIO5 处理根际土壤的细菌和枯草芽孢杆菌数量分别比对照增加 48.5% 和 61.1%,真菌和尖孢镰刀菌的数量比对照分别下降 52.1% 和 70.2%。分子生物学分析表明,菌株 Cy5 属于 *Paenibacillus jamilae* 菌株,并含有类似于 *P. polymyxa* 的 β-1,3-1,4-葡聚糖酶。本研究结果说明,拮抗菌强化的生物有机肥对西瓜枯萎病有防治潜力。

关键词: 西瓜枯萎病;拮抗细菌;生物防治;类芽孢杆菌
中图分类号: S436.5;S141 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-505X(2013)01-0223-09

Control of watermelon fusarium wilt by using antagonist-enhanced biological organic fertilizers

WANG Xiao-hui[1], ZHANG Guo-yi[1], LI Rui[1], LU Ying-lin, RAN Wei[1*], SHEN Qi-rong[1]
(*1 Jiangsu Provincial Key Lab for Organic Solid Waste, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;*
2 Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou 510316, China)

Abstract: Fusarium wilt of watermelon caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* is a destructive soil-borne disease in watermelon production. However, no effective method has been developed to control the disease. For exploration of a biological control method against the wilt, antagonistic bacteria were isolated, screened and used to make biological organic fertilizers, which were further tested for their disease-control effectiveness by a greenhouse pot experiment. The antagonism related β-1,3-1,4-glucanase was also detected by a molecular biological procedure. A total of 172 strains were isolated from rhizosphere soils of different fields. Among the strains, 13 strains had the inhibition rates more than 60% in antagonistic plates and two strains Cy5 and CR38 with the highest inhibition rates were used to make biological organic fertilizers, i.e. BIO5 and BIO38, respectively, for greenhouse pot experiments. The results showed that BIO5 microbial composition in performed better than BIO38 in control of the disease and promotion of the growth of watermelon. The relative control rates of BIO5 and BIO38 were 75% and 25%, respectively, as compared with the control. The averages of height, fresh weight and dry weight of the plants

收稿日期: 2012-03-22 **接受日期:** 2012-09-26
基金项目: 国家科技部"973"项目(2011CB100503)资助;广东省教育部产学研结合项目(2010B090400431)资助。
作者简介: 王小慧(1987—),女,江西南康人,硕士研究生,主要从事微生物肥料研究。E-mail:wangxiaohui413@163.com.
* 通信作者 E-mail: ranwei@njau.edu.cn

in the treatment of BIO5 were increased by 64.8%, 63.0% and 50%, respectively, in comparison with the control. BIO5 also significantly improved rhizosphere soil of watermelon. BIO5 increased the numbers of bacteria and *bacillus subtilis* in rhizosphere soil of watermelon by 48.5% and 61.1%, respectively, and decreased the numbers of fungi and *F. oxysporum* by 52.1% and 70.2% respectively, as compared with the control. Molecular analysis showed that strain Cy5 belonged to *Paenibacillus jamilae* and contained β-1,3-1,4-glucanase similar to that of *P. polymyxa*. We concluded that the antagonist-enhanced biological organic fertilizer had control potential against Fusarium wilt of watermelon.

Key words: Fusarium wilt of watermelon; antagonistic bacteria; biological control; *Paenibacillus jamilae*

西瓜枯萎病是由西瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)引起的,是导致西瓜生产毁灭性损失的土传病害。随着市场对西瓜需求量的增长,西瓜种植面积逐年扩大,传统的轮作防病措施难以实行,导致西瓜枯萎病日趋严重。据在京郊各区的调查结果,一般病株率在10%~20%,重者达80%~90%,重茬地甚至造成绝产[1-2]。因此,寻找一种安全有效的防治西瓜枯萎病的方法迫在眉睫。

西瓜枯萎病的常规防治方法有轮作和套作、嫁接、施用化学农药和采用抗病品种等。轮作和套作是农业生产上常见的防治多种植物病害发生的有效措施,但由于病原菌的厚垣孢子能在土壤中存活10年左右,而且我国生产者的平均耕地面积小,实施过程难度大,轮作和套作的效果不十分明显[3]。嫁接大多用南瓜作砧木,但无法解决种子携带病原菌的问题,而且西瓜嫁接时根腐病发生几率大幅增加[4-5]。多年来高毒农药的使用也使得该病原菌产生了严重的抗药性,同时引起土壤、水体和大气等环境污染,导致农副产品中农药残留增加,直接危害人类的健康及生存。抗病育种的研究在实际中也遇到很多困难,如西瓜遗传基础狭窄、品种资源匮乏的限制[3]。近年来,人们致力于寻找有效的替代方法,比如生物防治,因其具有对环境友好、无污染、见效快等优点被认为是综合防治西瓜枯萎病的措施之一,对生态平衡和可持续农业的发展具有特别重要的意义。

利用拮抗微生物防治土传病害已有多年的研究并有一定规模的应用,芽孢杆菌是土壤和植物微生态的优势微生物种群,具有很强的抗逆能力和抗菌防病作用,许多性状优良的天然分离株已成功地应用于植物病害生物防治[6]。利用微生物有机肥防治土传病害不仅可以向植物根际施入特异性生防菌,抑制病原菌生长繁殖,防止土传病害的发生,而且有机肥能提供丰富的营养,促进生防菌在土壤和植物根际定殖,大大提高其生防效果[7],因此生产中人们已经开始利用枯草芽孢杆菌[8]、短小芽孢杆菌[9]、解淀粉芽孢杆菌和吉氏芽孢杆菌[10]等来防治土传病害。葡聚糖是构成真菌细胞壁的主要成分之一,葡聚糖酶可以降解真菌的细胞壁,具有抗真菌和植物病原菌的活性[11],因而筛选出既能降解病原菌细胞壁,又能给植物增加养分的拮抗菌对生产显得尤为重要。类芽孢杆菌可产生具有抗菌活性的蛋白质,且大多数为核糖体合成的细胞壁降解酶类,如β-1,3-葡聚糖酶,该酶可水解β-1,3-葡聚糖中的β-1,3-糖苷键,从而抑制植物病原真菌的生长与增殖,诱导植物产生系统抗性[12-13]。还能通过固氮和溶磷作用为宿主植物提供营养成分[14],促进植株生长。

本研究通过从健康土样中分离筛选对西瓜枯萎病病原菌有不同生防效果的菌株,经平板对峙和抑菌谱实验挑取2株用于制备微生物有机肥,研究其在温室盆栽条件下的生防效果,最终获得一株在西瓜苗期能高效拮抗枯萎病的菌株,同时分析其潜在的防治机理,包括拮抗菌对土壤微生物区系的改善和β-葡聚糖酶基因的检测与克隆,以期为西瓜枯萎病专用微生物有机肥在生产上的有效施用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

分离拮抗菌的土样分别采自江苏南京美龄宫、南京农业大学校内菜园、金坛市连续15年秸秆还田地块和施用蚯蚓粪的田间土壤的作物根际,土壤样品采集后低温保存带回实验室,4℃冰箱保存待用。营养钵育苗采用江苏宜兴陆平村的健康水稻土,未

种植过西瓜。盆栽试验土样采自江苏连云港西瓜枯萎病发病严重的大棚(第 2 年死亡率达 100%),采取表层 0—30 cm 砂土,保持土壤湿润,封闭在袋中。用稀释平板法计出连作土壤中尖孢镰刀菌的数量达 10^4 cfu/g(按干土计算)。

西瓜品种为感病品种早佳 84 - 24,由新疆昌吉州西亚种子有限责任公司生产。

供试病原菌株有西瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *niveum*)、棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、甜瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *melonis*)、香蕉枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cubense*)、烟草疫霉(*Phytophthora parasitica* var. *nicotiana*),均为本实验室保存菌种。

1.2　培养基

尖孢镰刀菌选择培养基:KH_2PO_4 1.0 g,KCl 0.5 g,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g,Fe-Na-EDTA 0.01 g,L - 天门冬酰胺 2.0 g,D - 半乳糖 20.0 g,蒸馏水 1000 mL(121 ℃灭菌、20 min)。

抗生素类物质:二硝基苯(75% WP)1.0 g,牛胆汁 0.5 g,$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 1.0 g,硫酸链霉素 0.3 g。培养基用 10% 磷酸调节 pH 至 3.8 ±0.2。

枯草芽孢杆菌培养基:NaCl 33.0 g,葡萄糖 0.8 g,放线菌酮 4.5 mg,多粘菌素 22.5mg,V_8 汁 326 mL,用蒸馏水定容至 1000 mL,pH 5.2。

改良 LB 液体培养基即在普通 LB 培养基中加入 0.5% 的蔗糖。

β - 葡聚糖培养基:蛋白胨 1.0 g,牛肉浸膏 0.5 g,NaCl 0.5 g,β - 葡聚糖 0.005 g,刚果红 0.01 g ,pH 7.0。

PDA 培养基、LB 培养基、NA 培养基、高氏一号培养基和马丁氏培养基配方见参考文献[15]。

1.3　拮抗细菌的分离与纯化

称取土样 10 g 加入装有 90 mL 无菌水的三角瓶中(内装玻璃珠若干),30℃、170 r/min 振荡 30 min,静止后取土壤悬液稀释至 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5} 均匀涂布于 PDA 培养基,每个梯度设 3 个重复。将西瓜枯萎病病原菌(LD)保藏种进行活化,用打孔器(直径 5mm)在菌落边缘区域打孔制成菌片,转接至已涂布有土壤稀释液的 PDA 平板中央,25℃ 培养 72 h,用无菌接种针挑取有拮抗效果的菌落于 NA 培养基进行划线纯化。采用对峙法将单菌落点接在距病原菌菌片 20 mm 处,每皿接种 2 个菌株,对角线为同一菌株(此为 1 个重复),每株病原菌做 3 个重复同时设空白对照(不接菌)。28℃ 培养 6 d,测量抑菌带和抑菌圈直径。

1.4　抑菌谱试验

取本实验室保藏的不同病原菌菌株进行活化,用灭菌打孔器(直径 5 mm)在菌落边缘区域打孔制成菌片,转接至 PDA 平板中央,28℃ 培养 24 h,采用对峙法将抑菌效果较好的菌株点接在距病原菌菌片 20 mm 处,每皿接种 2 个菌株,对角线为同一菌株,每株病原菌做 3 个重复,同时设空白对照(不接菌)。25℃ 培养 6 d,测量病原菌的菌落直径、抑菌圈直径,计算抑菌率。

抑菌率(%) =(对照病原菌直径 - 与拮抗菌对峙的病原菌直径)/对照病原菌直径 ×100

1.5　温室盆栽拮抗试验

1.5.1 生物有机肥制备　根据江苏新天地生物肥料有限公司制备拮抗土传病害微生物有机肥工艺,分别将 2 种功能菌 CR38 和 Cy5 的菌株悬浮液按 20% (V/W)的量加入到腐熟好的有机肥(以猪粪与氨基酸有机肥按质量比 1∶1 混合制成。菜粕氨基酸有机肥料,含有机质 442g/kg、氨基酸 80 g/kg、N 44 g/kg、P_2O_5 35 g/kg、K_2O 6.7 g/kg,水分 28.5%。猪粪堆肥含有机质 534g/kg、N 36 g/kg、P_2O_5 47g/kg、K_2O 11 g/kg、水分 28.5%)中,发酵堆肥制成生物有机肥 BIO38、BIO5。

1.5.2 营养钵育苗的盆钵试验设计　按干土重量的 2% 施肥,共设 3 个处理:1)健康土壤 + 未接入功能菌的有机肥(简称营养钵 CK);2)健康土壤 + 生物有机肥 BIO38(简称营养钵 BIO38);3)健康土壤 + 生物有机肥 BIO5(简称营养钵 BIO5)。

西瓜种子用 5% NaClO 溶液消毒 2 min,再用无菌水冲洗 3 遍,于 28℃ 培养箱避光催芽露白。播种于一次性小杯中,进行营养钵育苗。每个杯子中加入 300 g 健康土壤,每个处理重复 25 次,播种前将肥料与土壤要充分混匀。营养钵苗期试验于 2011 年 4 月 25 日至同年 5 月 10 日(15 d)在温室进行。

1.5.3 盆栽试验设计　按干土重量的 0.5% 施肥,共设 3 个处理:1)连作土壤 + 营养钵 CK + 未接入功能菌的有机肥(CK 对照);2)连作土壤 + 营养钵 BIO38 + 生物有机肥 BIO38(BIO38);3)连作土壤 +

营养钵 BIO5 +生物有机肥 BIO5(BIO5)

每个盆钵装 5 kg 西瓜枯萎病发病严重的连作土壤,每个处理重复 25 次,所有处理施肥总量相等。待营养杯中的西瓜幼苗第 2 片真叶彻底展开,将幼苗连同杯中土壤一起移入大盆钵中,常规水肥管理。盆栽种植 20 d 后,计算发病率和防治效果,分级标准[16]根据植株整株叶片、茎梗、枯萎或坏死的面积而定: 0 = 0%,1 = 1 ~ 33%,2 = 30% ~ 66%,3 = 67% ~ 100%,4 = 全株死亡。病情指数(DSI) = Σ(病害的级别 × 该级别的植株数)/供试植株数;发病率 = 发病株数/重复数 × 100%; 防治率 = (对照发病率 - 处理发病率)/对照发病率 × 100%。

采集各处理发病程度接近的植株测定西瓜株高及生物量。抖落所有粘在西瓜植株根系上的土壤后,将根称重,按每克根加 9 mL 无菌水的比例放入事先装有玻璃珠的试管中,再将试管放置在涡旋仪上涡旋 5 min,洗脱在无菌水中的土壤即为根际土壤,分别采用 NA 培养基、枯草芽孢杆菌选择性培养基、高氏一号培养基、马丁氏培养基、尖孢镰刀选择性培养基对其中的细菌、芽孢杆菌、放线菌、真菌、尖孢镰刀菌进行稀释平板计数。各种微生物的数量以烘干基计算。

1.6 菌株 Cy5 的 β - 葡聚糖酶活定性检测和基因分析

将 Cy5 接种在 β - 葡聚糖培养基平板上,每个平板点接 2 个单菌落,重复 3 次,30℃ 培养 3 d。观察其在 β - 葡聚糖培养基上产生水解圈的情况,同时测量水解圈的直径大小,用于定性分析指示 Cy5 菌株产 β - 葡聚糖酶的能力。采用 PCR 法检测拮抗菌 β - 葡聚糖酶的基因。提取细菌的 DNA,以其为模板扩增拮抗基因。PCR 扩增引物[17] F 端为 5 - TTGCGAATGTGTTCTGGGAACC - 3,R 端为 5 - TACTAATTGCTCGTATATTTTACCCA - 3,目的片段大小为 600 bp。PCR 反应体系为: 模板 DNA 1 μL,上游、下游引物各 1 μL,dNTP 2 μL,10 × PCR 反应缓冲液 2.5 μL,$MgCl_2$ 2.5 μL,Taq 酶(Promega)0.3 μL,ddH_2O 14.7 μL。反应条件: 95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 1 min,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 33 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测,再将产物经试剂盒纯化后送金斯瑞生物科技有限公司进行测序。测序结果在 GenBank 中进行同源性比较,采用 MEGA version 4.1 软件进行系统发育分析。

1.7 菌株 Cy5 的鉴定

菌株的常规形态观察、革兰氏染色和生理生化鉴定参照文献[18]。菌株的 16S rDNA 序列分析: 提取细菌的总 DNA[19],然后采用细菌的 16S rDNA 通用引物进行 PCR 体外扩增。PCR 扩增引物 F 为 5' - AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG - 3',R 为 5' - AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA - 3'[20],由金斯瑞生物科技有限公司合成。PCR 反应体系为: 模板 DNA 1 μL,上游、下游引物各 1 μL,dNTP 4 μL,10 × PCR 反应缓冲液 5 μL,$MgCl_2$ 5 μL,Taq 酶(Promega)0.5 μL,ddH_2O 32.5μL。反应条件: 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s,54℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,共 32 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物经试剂盒(Axyprep DNA Gel Extraction Kit Axygen Biosciences)纯化后 pMD19 - T- vector 连接。16℃ 连接 10 h,转化 E. coli DH5α,经蓝白斑筛选,随机挑选阳性克隆,酶切质粒 DNA 验证后,送金斯瑞生物科技有限公司进行测序。测序结果在 NCBI 分子生物学数据库中进行同源性检索。选择 15 条相近的序列(同源性在 99% 以上),采用 MEGA version 4.1 软件进行系统发育分析。

1.8 数据统计分析

利用 Microsoft Excel 作图,数据统计分析采用 SPSS11.5 统计软件,不同处理间差异显著性检验采用邓肯氏新复极差法,显著性水平为 $P \leq 0.05$。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌株的筛选结果

从 4 份根际土壤中分离纯化到对西瓜枯萎病菌有潜在拮抗作用的细菌有 172 株。通过平板对峙法复筛获得抑菌圈直径 > 1cm,抑菌率在 60% 以上拮抗细菌有 13 株,占所有菌株的 7.56%; 其中 Cy5、CR38 的抑菌带宽度 ≧ 4 mm,抑菌圈直径 > 2 cm,对病原菌菌丝的生长有较强抑制作用(表 1)。

2.2 拮抗菌株 Cy5 与 CR38 对其它病原菌的抗性

为了研究筛选获得拮抗菌株的生防潜力,采用对峙生长法对其抗菌谱进行测定。结果显示 Cy5 与 CR38 对供试病原菌有较好的拮抗效果(表 2)。其中对香蕉枯萎病菌,甜瓜枯萎病菌,棉花黄萎病菌的

表 1　分离菌株对西瓜枯萎病病原菌生长抑制作用

Table 1　Antagonism reaction of strains against the pathogen of watermelon wilt

菌株 Strains	抑菌带宽度 Width of inhib. zone (mm)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (cm)	菌株 Strains	抑菌带宽度 Width of inhib. zone (mm)	抑菌圈直径 Inhibition zone diameter (cm)
SL1	1.3 ±0.6 g	1.5 ±0.2 d	J8	3.5 ±0.5 bcd	2.0 ±0.1 b
SL10	0 h	1.3 ±0.1 d	J37	3.3 ±0.3 bcde	2.0 ±0.2 b
Cy5	4.7 ±0.3 a	2.4 ±0.1 a	J38	3.3 ±0.6 bcde	2.0 ±0.2 b
Cy16	3.0 ±1.0 cde	1.8 ±0.2 bc	H-1	1.9 ±0.4 fg	1.9 ±0.3 bc
Cy17	2.5 ±0.1 ef	1.4 ±0.1 d	H-6	2.7 ±0.8 def	1.6 ±0.2 cd
CR38	4.0 ±0.0 ab	2.4 ±0.2 a	QY37	3.7 ±0.3 bc	1.9 ±0.1 b
QY8	3.7 ±0.6 bc	2.0 ±0.2 b			

注(Note):同列数据后不同字母表示差异达 5% 显著水平 Different letters in a column mean significantly different at the 5% level.

表 2　拮抗菌株对不同病原菌的拮抗效果

Table 2　Angatonistic bacteria inhibition against different pathogens

病原菌 Pathogens	CR38		Cy5	
	抑菌圈直径(cm) Inhibition zone diameter	抑制率(%) Inhibition rate	抑菌圈直径(cm) Inhibition zone diameter	抑制率(%) Inhibition rate
香蕉枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *cubense*	2.5	59	3.0	50
甜瓜枯萎病菌 *F. oxysporum* f. sp. *melonis*	2.2	49	2.7	57
棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae*	—	62	—	55
烟草疫霉菌 *P. parasitica* var. *nicotian*	—	—	3.2	56

抑菌圈直径 > 2 cm,抑制率都在 50% 以上。棉花黄萎病菌生长速度非常缓慢,第 10 d,抑菌带 > 5 mm,因没有形成抑菌圈而无法测量。Cy5 对烟草疫霉菌抑制率为 50%,而 CR38 对烟草疫霉菌没有抑制作用。

2.3　拮抗菌株 Cy5 与 CR38 对西瓜枯萎病的生防效果

温室盆栽试验结果表明,菌株 Cy5 与 CR38 对西瓜枯萎病都有一定的防治效果。到收获期 CK 处理的发病率为 64%,BIO38 处理的发病率为 48%,BIO5 为 16%。BIO5 处理的生防效果达 75%,而 BIO38 处理的生防效果只有 25%。与 CK 对照相比,BIO5 处理植株的株高、地上部鲜重、地上部干重都达到显著水平,分别增加 64.8%、63.0%、50%。BIO38 处理的株高比 CK 对照增加 54.9%,地上部鲜重,地上部干重都没有达到显著水平(表 3)。

施用不同菌株二次发酵的微生物有机肥对根际土壤微生物影响不同(表 4)。与 CK 相比,BIO5 处理根际土壤的细菌和枯草芽孢杆菌数量均显著增加,真菌与尖孢镰刀菌的数量有所下降,放线菌变化不大;BIO38 处理根际土壤的枯草芽孢杆菌和放线菌的数量明显多于对照,其它三种微生物没有明显差异。BIO5 处理根际土壤的细菌和枯草芽孢杆菌数量分别比 CK 增加 48.5% 和 61.1%;真菌和尖孢镰刀菌的数量分别下降 52.1%、70.2%,而放线菌的数量没有显著差异。BIO38 处理根际土壤的枯草芽孢杆菌和放线菌的数量分别比 CK 增加 41.3% 和

表3 微生物有机肥对西瓜枯萎病的生防效果和对植株生长的影响

Table 3 The effect of bio-organic fertilizer on control efficiency watermelon wilt and plant growth of water melon seedling

处理 Treatments	发病率 Disease incidence rate (%)	生防率 Control effectiveness (%)	株高 Plant height (cm)	鲜重 Fresh weight (g/plant)	干重 Dry weight (g/plant)
CK	64		9.1 ±0.8 b	2.7 ±0.3 b	0.6 ±0.1 b
BIO38	48	25	14.1 ±1.0 a	2.8 ±0.3 b	0.6 ±0.1 b
BIO5	16	75	15 ±2.0 a	4.4 ±0.9 a	0.9 ±0.2 a

注(Note)：同列数据后不同字母表示差异达5%显著水平 Values followed by different letters in a column mean significantly different at the 5% level.

表4 施用微生物有机肥对根际土壤微生物的影响(cfu/g, soil)

Table 4 Effects of bio-organic fertilizer on soil microbial population of watermelon rhizosphere

处理 Treatments	细菌 Bacteria ($\times10^7$)	枯草芽孢杆菌 Bacillus subtilis ($\times10^5$)	放线菌 Actinomycete ($\times10^6$)	真菌 Fungi ($\times10^4$)	尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* ($\times10^3$)
CK	5.1 ±0.5 b	8.1 ±1.8 b	13.4 ±2.5 b	9.6 ±0.6 a	51.1 ±7.4 a
BIO38	5.2 ±1.2 b	11.4 ±1.0 a	17.6 ±0.5 a	8.9 ±0.5 a	51.6 ±7.6 a
BIO5	9.9 ±1.1 a	13.0 ±1.2 a	14.3 ±2.1 ab	4.6 ±0.4 b	15.2 ±2.7 b

注(Note)：同列数值后不同字母表示差异达5%显著水平 Values followed by different letters in the same column mean significant at the 5% level.

31.3%，而细菌、真菌、尖孢镰刀菌的数量变化不明显。

2.4 菌株 Cy5 的鉴定

在NA平板上，30℃生长24 h后的Cy5菌落呈乳白色，不透明，表面湿润，边缘光滑且粘稠。在水琼脂的菌落很薄，常呈阿米巴状扩展。镜检为杆状，革兰氏 G^+，产芽孢、椭圆型。菌株的生理生化特征如下：发酵葡萄糖、果糖、阿拉伯糖、甘露糖、麦芽糖、木糖、纤维二糖、棉子糖、乳糖和甘露醇产酸，能水解淀粉，能利用尿素。苯丙氨酸反应、葡萄糖酸盐、柠檬酸盐利用和硝酸盐还原反应均为阴性。产糊精实验，V－P (Voges-Proskauer)反应、甲基红(M.R)反应均为阳性。菌株Cy5的生理生化特征与 *Paenibacillus jamilae* 生理生化特征基本一致。16S rDNA序列分析表明，Cy5与 *P. jamilae* 的相似性最高，初步认为其为 *P. jamilae*，在NCBI上序列登陆号为JQ323092(图1)。

2.5 菌株 Cy5 的 β－葡聚糖酶定性检测和基因分析

通过平板试验法检测发现，Cy5可在含β－葡聚糖平板上产生很明显的水解圈，平均直径为2.5 cm(图2)。以基因组DNA为模板进行PCR扩增，扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后，发现有一条介于500～750 bp之间的特异性条带，与预计大小一致。该序列与已登陆的多粘芽孢杆菌(AY164457)(*P. polymyxa* AY164457)的β－1,3－1,4－glucanase同源性达99%。

3 讨论

人们过分追求高产、优质和高效而改变传统的种植制度导致的生态失衡是当前土传病害加剧发生的主要原因[21]。尤其是西瓜、甜瓜等在连作一年后就会发生枯萎病[22]。尖孢镰刀菌是一种典型的土壤习居菌，属于兼性寄生菌，寄主范围广。至今已报道的尖孢镰刀菌专化型有80多种[23]，其中瓜类枯萎病菌有8个专化型。幼苗期其它专化型可侵害非自身寄主，发生交叉感染，如尖孢镰刀菌甜瓜专化型可侵染西瓜植株引起枯萎现象[24]。因此，在西瓜枯萎病的生物防治中，必须要筛选到同时抑制多种病原真菌才能提高防治效果。菌株Cy5与CR38不仅对西瓜枯萎病菌有较强的抑制作用，同时对香蕉枯萎病菌、甜瓜枯萎病菌和棉花黄萎病菌都有拮抗

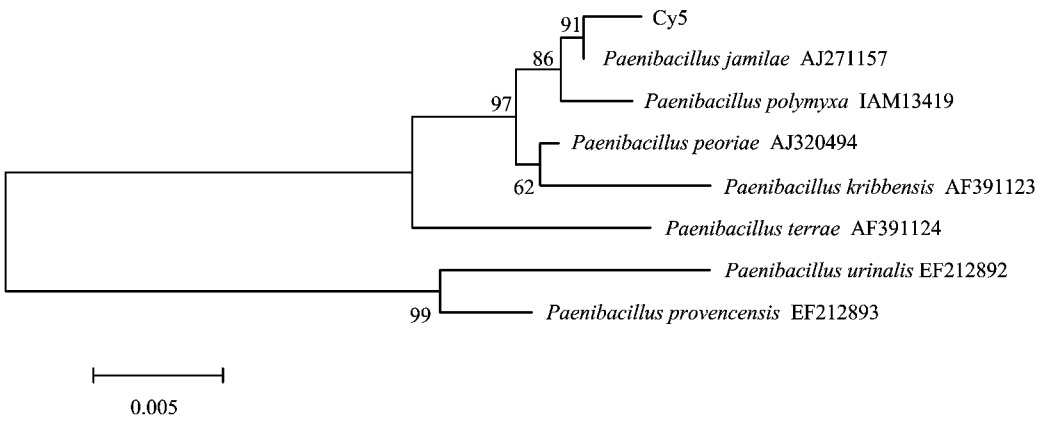

图 1　16S rDNA 序列构建菌株 Cy5 系统进化树状图

Fig. 1　Phylogenetic tree of 16S rDNA gene of strains Cy5

[注(Note):每个分支上的数字代表 Bootstrap 值,标尺代表菌株的遗传距离 The numbers at branches indicate bootstrap values and the scale means genetic distance.]

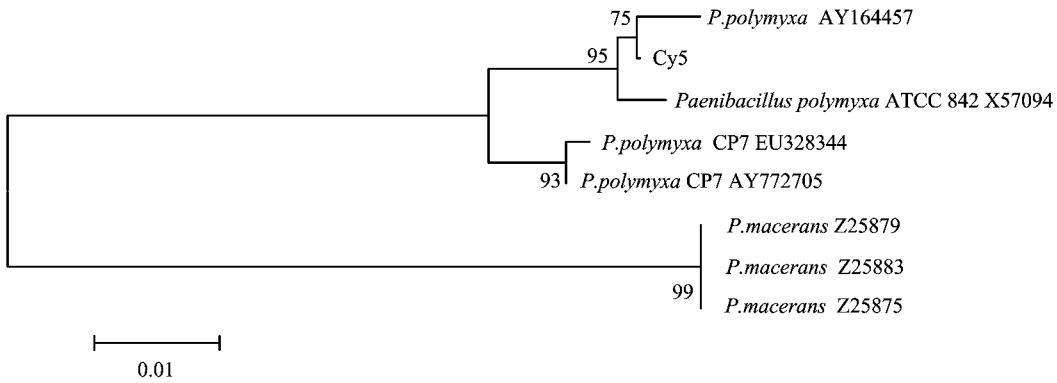

图 2　Cy5 的 β-葡聚糖酶基因系统进化树状图

Fig. 2　Phylogenetic tree of β-glucanase gene of strains Cy5

[注(Note):每个分支上的数字代表 Bootstrap 值,标尺代表菌株的遗传距离 The numbers at branches indicate bootstrap values and the scale means genetic distance.]

效果。Cy5 还对烟草疫霉也有作用,说明菌株 Cy5 有较大的生防潜力。

土壤微生物是土壤中最活跃的肥力因子之一,在土壤生态系统中占重要位置,对土壤结构的改善和养分积累、转化以及维持和促进植物生长起重要作用[25]。根际有非常复杂的微生物群体,其中包括病原菌和有益微生物等。细菌是土壤物质转化的主要动力,在土壤中占绝对优势。放线菌产生抗生素和激素类物质,有利于抑制有害微生物的生长。真菌虽在物质分解中也起重要作用,但一些真菌与土传病害有关。所以土壤中细菌、放线菌数量与土壤养分含量及作物产量呈显著正相关,而真菌数量与养分含量之间相关性较差[26]。在连作生态系统中,原有的微生物群体之间的平衡被打破,取而代之的是有益细菌数目减少,真菌不断增加[27]。因此,在防治土传病害的过程中,不仅要减少土传病原菌和真菌的数量,而且要提高有益细菌和放线菌的数量,使微生物区系向着健康和谐的方向发展。本实验从根际分离到 2 株拮抗细菌在西瓜枯萎病苗期防治表现出不同的效果,从温室效果来看,拮抗菌 Cy5 在防病促生方面的作用优于 CR38。BIO5 处理的防治率高达 75%,具有对植株生长的促进作用十分明显。BIO5 处理根际土壤的细菌和枯草芽孢杆菌数量均比 CK 对照显著增加,而真菌和尖孢镰刀菌的数量

大幅下降。BIO38 处理根际土壤的枯草芽孢杆菌和放线菌的数量也显著增加,但真菌和尖孢镰刀菌的数量与 CK 对照没有明显变化,说明增施用菌株 Cy5 发酵好的微生物有机肥有使连作土壤的微生物区系朝着更健康发展的潜力。

β-1,3-1,4-葡聚糖酶可以降解真菌的细胞壁,显示抗真菌和植物病原菌的活性,对其研究已引起了广泛的关注。姚乌兰等[13]从多粘类芽孢杆菌 WY110 的分泌物中分离得到了 β-1,3-1,4-葡聚糖酶,并验证了此酶具有抗稻瘟病菌活性;文凤云等[28]发现重组 β-1,3-1,4-葡聚糖酶对香蕉炭疽病菌、荔枝炭疽病菌、出芽短梗霉以及尖孢镰刀菌菌丝生长具有很强的抑制作用。刘玉岭等[29]认为重组溶菌酶 L27 没有抑菌活性,而重组 β-1,3-1,4-葡聚糖酶则有轻微的抑菌活性,但两个重组蛋白的混合物却比单一组分的抗菌活性高,表现协同作用。本试验分离到的 Cy5 菌株具有促生抗病作用,同时还能产生多粘类芽孢杆菌的 β-1,3-1,4-葡聚糖酶,该蛋白是拮抗菌发酵液中抗真菌活性组分或其中之一[28],对真菌生长抑制的活性作用提示其可作为农业抗病虫害新型药物进行开发研究。此外,β-1,3-1,4-葡聚糖酶还是一种极具经济价值的工业用酶,该酶在饲料工业上可有效提高动物对饲料的利用率和饲料营养的吸收效率[30],在啤酒生产中加入该酶可解决 β-葡聚糖引起的大麦难降解、黏度大的问题,以提高啤酒的质量与稳定性[31-32],说明 β-1,3-1,4-葡聚糖酶具有广泛的应用前景。

参考文献:

[1] 臧君彩,罗维德,孟昭萍,等. 西瓜枯萎病发生危害与综合防治[J]. 植物保护,2001,27(5):48-49.
Zang J C, Luo W D, Meng Z P *et al*. Occurrence, damage and comprehensive control of watermelon blight[J]. Plant Prot., 2001, 27(5): 48-49.

[2] 郑琦,毕扬,云晓敏,等. 西瓜枯萎病的研究进展及其防治[J]. 中国植保导刊,2007,27(2):11-13.
Zheng Q, Bi Y, Yun X M *et al*. Research progress on watermelon blight and its control[J]. China Plant Prot., 2007, 27(2): 11-13.

[3] 谢兴刚,王果萍,周小梅,等. 西瓜枯萎病防治现状与展望[J]. 山西农业科学,2007,35(4):64-67.
Xie X G, Wang G P, Zhou X M *et al*. Advances in control of watermelon wilt disease[J]. J. Shanxi Agric. Sci., 2007, 35(4): 64-67.

[4] Armengol J, Jose C M, MoyaM J *et al*. *Fusarium solani* f sp. *cucurbitaerace*, a potential pathogen of grafted watermelon production[J]. Spain Bull. OEPP, 2000, 30(2): 179-183.

[5] 纪莉景,王连生,栗秋生,等. 西瓜枯萎病菌分离及致病力测定[J]. 河北农业科学,2010,14(8):137-149.
Ji L J, Wang L S, Li Q S *et al*. Isolation and pathogenicity determination of watermelon wilt[J]. J. Heibei Agric. Sci., 2010, 14(8): 137-149.

[6] 陈中义,张杰,黄大昉. 植物病害生防芽抱杆菌抗菌机制与遗传改良研究[J]. 植物病理学报,2003,33(2):97-103.
Chen Z Y, Zhang J, Huang D P. Research progress on antimicrobial mechanism and genetic engineering of *Bacillus* for plant diseases biocontrol[J]. Acta Phytopath. Sin., 2003, 33(2): 97-103.

[7] Nam C G, Jee H J, Kim C H. Studies on biological control of Phytophthora blight of red- pepper Ⅱ Enhancement of antagonistic activity by soil amendment with organic materials[J]. Korean J. Plant Path., 1988, 4: 313-318.

[8] 陈雪丽,王光华,金剑,吕宝林. 多粘类芽孢杆菌 BRF-1 和枯草芽孢杆菌 BRF-2 对黄瓜和番茄枯萎病的防治效果[J]. 中国生态农业学报,2008,16(2):446-450.
Chen X L, Wang G H, Jin J, Lv B L. Biocontrol effect of *Paenibacillus polymyxa* BRF-1 and *Bacillus subtilis* BRF-2 on fusarium wilt disease of cucumber and tomato[J]. Chin. J. Eco-agric., 2008, 16(2): 446-450.

[9] 梅新兰,赵青云,谭石勇,等. 辣椒疫病拮抗菌株筛选、鉴定及其防效[J]. 应用生态学报,2010,21(10):2652-2658.
Mei X L, Zhao Q Y, Tan S Y *et al*. Screening, identification, and biocontrol effect of antagonistic bacteria against *Phytophthora*[J]. Chin. J. Appl. Ecol., 2010, 21(10): 2652-2658.

[10] 朱震,陈芳,肖同建,等. 拮抗菌生物有机肥对番茄根结线虫的防治作用[J]. 应用生态学报,2011,22(4):1033-1038.
Zhu Z, Chen F, Xiao T J *et al*. Controlling effect of antagonist bioorganic fertilizer on tomato root-knot nematode[J]. Chin. J. Appl. Ecol., 2011, 22(4): 1033-1038.

[11] Bom I J, Dielbandhoesing S K, Harvey K N *et al*. A new tool for studying the molecular architecture of the fungal cell wall: one-step purification of recombinant Trichoderma β-(1-6)-glucanase expressed in Pichia pastoris[J]. Biochem. Biophys. Acta, 1998, 1425: 419-424.

[12] 杨少波,刘训理. 多粘类芽孢杆菌及其产生的生物活性物质研究进展[J]. 微生物学通报,2008,35(10):1621-1625.
Yang S B, Liu X L. Research advances in *Paenibacillus polymyxa* and their bioactive substances[J]. Microbiol., 2008, 35(10): 1621-1625.

[13] 姚乌兰,王云山,韩继刚,等. 水稻生防菌株多粘类芽孢杆菌 WY110 抗菌蛋白的纯化及其基因克隆[J]. 遗传学报,2004,31(9):878-887.
Yao W L, Wang Y S, Han J G *et al*. Purification and cloning of an antifungal protein from the rice diseases controlling bacterial strain *Paenibacillus polymyxa* WY110[J]. Acta Genet. Sin., 2004, 31(9): 878-887.

[14] Khan Z, Kim S G, Jeon Y H *et al*. A plant growth promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* strain GBR - 1, suppresses root-knotnematode[J]. Bioresour. Technol., 2008, 99: 3016-3023.

[15] 沈萍，范秀荣，李广武. 微生物学实验[M]. 北京：高等教育出版社，1999. 69-82.
Shen P, Fan X R, Li G W. Laboratory experiments in microbiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1999. 69-82.

[16] Hervas A, Trapero - cassas J L, JimeNez - Diaz R. Induced resistance against fusarium wilt of chickpea by nonpathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cieris* and nonpathogenic isolates of *F. oxysporum* [J]. Plant Dis., 1995, 79: 1110 -1116.

[17] 李卫芬，陆平，周绪霞. 多粘芽孢杆菌β-葡聚糖酶特性及其基因克隆[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版)，2004，30(3)：331-335.
Li W F, Lu P, Zhou X X. Properties and clonin g of β-glucanase from *Bacillus polymyx*[J]. J. Zhejiang Univ. (Agric. & Life Sci.), 2004, 30(3): 331-335.

[18] 东秀珠，蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京：科学出版社，1999. 353-387.
Dong X Z, Cai M Y. Manual of systematic and deter minative bacteriology[M]. Beijing: Science Press, 1999. 353-387.

[19] Sanbrook J, RussellD W. 分子克隆实验指南[M]. 北京：科学出版社，2002. 32-102.
Sanbrook J, RussellD W. Molecular cloning [M]. Beijing: Science Press, 2002. 32-102.

[20] Wilson K H, Blitchington R B, Green R C. Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chainreaction[J]. Clin. Microbiol., 1990, 28: 1942-1946.

[21] 李世东，缪作清，高卫东. 我国农林园艺作物土传病害发生和防治现状及对策分析[J]. 中国生物防治学报，2011，27(4)：433-440.
Li S D, Miao Z Q, Gao W D. Challenges, opportunities and obligations in management of soilborne plant diseases in China [J]. Chin. J. Biol. Control, 2011, 27(4): 433-440.

[22] 张万民，朴春树，洪晓燕，张丹. 辽宁省保护地蔬菜土传病害主要发生种类及区域分布[J]. 中国植保导刊，2011，31(9)：33-35.
Zhang W M, Pu C S, Hong X Y, Zhang D. The variety and areal distribution of soil borne disease in vegetable under structure in Liaoning province[J]. China Plant Prot., 2011, 31(9): 33 -35.

[23] 刘波，朱育菁，周涵韬，等. 农作物枯萎病的研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版)，2004，43：47-58.
Liu B, Zhu Y J, Zhou H T *et al*. Review on achievement to Fusarium wilt disease in agricultural crops[J]. J. Xiamen Univ. (Nat. Sci.), 2004, 43: 47-58.

[24] 王燕华. 上海地区西瓜枯萎病病原菌鉴定[J]. 上海农业学报，1988，4(1)：25-29.
Wang Y H. Identification of watermelon wilt disease in Shanghai aera[J]. Acta Agric. Shanghai, 1988, 4(1): 25-29.

[25] 骆世明，彭少麟. 农业生态系统分析[M]. 广州：广东科学技术出版社，1996.
Luo S M, Peng S L. Agricultural ecological system analysis[M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1996.

[26] 王超，吴凡，刘训理，等. 不同肥力条件下烟草根际微生物的初步研究[J]. 中国烟草科学，2005，(2)：12-14.
Wang C, Wu F, Liu X L *et al*. Tobacco rhizosphere microorganism in different fertility of soil[J]. Chin. Tobacco Sci., 2005, (2): 12-14.

[27] 张慧，杨兴明，冉炜，等. 土传棉花黄萎病拮抗菌的筛选及其生物效应[J]. 土壤学报，2008，45(6)：1095-1101.
Zhang H, Yang X M, Ran W *et al*. Screening of bacteria antagonistic against soil-bone cotton verticillium wilt and their biological effects on the soil-cotton system [J]. Acta Pedol. Sin., 2008, 45(6): 1095-1101.

[28] 文凤云，廖富蘋，林健荣，等. 多粘类芽孢杆菌 CP7 β-1，3-1，4-葡聚糖酶基因的克隆、表达及应用[J]. 中国农业科学，2010，43(22)：4614-4623.
Wen F Y, Liao F P, Lin J R *et al*. Cloning, expression and application of β-1, 3-1, 4-glucanase gene from *Paenibaccillus polymyxa* CP7[J]. Sci. Agric. Sin., 2010, 43(22): 4614 -4623.

[29] 刘玉岭. 芽抱杆菌抗菌蛋白 lytic enzyme L27 和 beta-1，3-1，4-glucanase 抗菌协同作用研究[D]. 重庆：西南大学硕士学位论文，2007.
Liu Y L. Antimicrobial activity synergism between *Baeillus* lytic enzyme L27 and beta-1, 3-1, 4-glucanase[D]. Chongqing: MS thesis, Southwest University, 2007.

[30] 王圆，张朝晖，王蓓，等. 细菌产 β-1，3-1，4-葡聚糖酶的结构、功能及应用的研究进展[J]. 饲料工业，2005，26(2)：18-20.
Wang Y, Zhang C H, Wang B *et al*. Bacterial 1, 3-1, 4-β-glucanases: structure, function and application [J]. Feed Industry, 2005, 26(2): 18-20.

[31] 毕静. β-葡聚糖酶在啤酒生产中的应用研究[J]. 中国酿造，2011，(9)：105-106.
Bi J. Application of β-glucanase in beer production[J]. China Brewing, 2011, (9): 105-106.

[32] 张洁，蔡敬民，吴克，等. β-葡聚糖酶的研究与应用前景[J]. 安徽农业科学，2003，31(5)：895-896.
Zhang J, Cai J M, Wu K *et al*. Research and application of β-glucanase[J]. J. Anhui Agric. Sci., 2003, 31(5): 895-896.