具防病并提高植物耐旱功能的小链霉菌 HS57 的筛选

牛红杰， 荆玉玲， 郭荣君*， 李世东

（中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193）

摘要 本研究旨在寻找防治黄瓜枯萎病并提高植物抗逆能力的多功能菌株。从连作田健康黄瓜根际土中分离筛选到 1 株放线菌 HS57。平板对峙法测定菌株 HS57 对尖孢镰刀菌、茄病镰刀菌和立枯丝核菌的抑制作用，平皿对扣共培养法测定其挥发性物质对尖孢镰刀菌的抑制作用，温室盆栽法测定其对黄瓜枯萎病的防病效果及对小麦耐旱能力的影响，结合菌株形态特征和 16S rRNA 基因序列分析对其进行鉴定。结果表明，菌株 HS57 可抑制 3 种病原菌生长，其中对尖孢镰刀菌的抑制率为 52.4%；其挥发性物质对尖孢镰刀菌的抑制率为 32.1%。浓度为 10^7 个/mL 的 HS57 孢子悬浮液浸种对黄瓜枯萎病的防效最好，为 51.0%；小麦种子经浓度为 10^7、10^8 个/mL 的 HS57 孢子悬浮液浸种，麦苗经连续 7 d 缺水处理后再浇水，比对照恢复得更好。初步鉴定 HS57 菌株为小链霉菌 *Streptomyces parvus*，是一株非常有潜力的多功能菌株。

关键词 小链霉菌； 黄瓜枯萎病； 防病； 耐旱能力

中图分类号： S 476.1 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2019224

Screening of *Streptomyces parvus* HS57 with the biocontrol function and ability to enhance the plant's tolerance to water shortage stress

NIU Hongjie， JING Yuling， GUO Rongjun*， LI Shidong

（*Institute of Plant Protection*, *Chinese Academy of Agricultural Sciences*, *Beijing* 100193, *China*）

Abstract The purpose of this study is to find a multifunctional strain to control cucumber wilt disease and enhance the plant's tolerance to unfavorable conditions. An actinomycete strain HS57 with strong antagonistic effect on *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum* (Foc) was isolated from the rhizosphere soil of the healthy cucumber plants. The inhibitive activity of strain HS57 on mycelial growth of *F. oxysporum*, *F. solani* and *Rhizoctonia solani* was determined by using pair-culturing method. In addition, the effect of its volatiles on Foc growth was determined by using an up-down co-culturing method with the plates separately inoculated with HS57 and Foc. The efficacy of strain HS57 in suppressing cucumber wilt disease and its ability to improve the wheat tolerance to water shortage stress were tested in the greenhouse by seed soaking with different concentrations of HS57 spores. Strain HS57 was identified based on the morphological characteristics and 16S rRNA gene sequence analysis. The results showed that strain HS57 inhibited the mycelial growth of *F. oxysporum*, *F. solani* and *R. solani*. Among the three fungi, *F. oxysporum* was suppressed with an inhibitive rate of 52.4%. Moreover, the volatiles produced by strain HS57 also had a good ability to inhibit *F. oxysporum* growth with an inhibitory rate of 32.1%. In the greenhouse assay, strain HS57 showed good control efficacy (51.0%) against cucumber fusarium wilt at the concentration of 10^7 spores/mL. Seed treatments with 10^7 and 10^8 spores/mL of strain HS57 also enhanced the wheat tolerance to water shortage stress, demonstrated by better recovery of the seedlings than the control after 7 d-non-irrigation and re-irrigation. Strain HS57 was identified as *Streptomyces parvus* based on its morphological characteristics and its 16S rRNA gene sequence analysis. As a multifunctional strain, HS57 showed a great potential for practical application.

Key words *Streptomyces parvus*； cucumber fusarium wilt； disease control； water shortage tolerance

收稿日期： 2019-04-29 **修订日期**： 2019-07-07

基金项目： 国家重点研发计划(2016YFD0201000)；中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(S2018XM10)；内蒙古自治区科技重大专项(zdzx2018009)

* 通信作者 E-mail：guorj20150620@126.com

黄瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌黄瓜专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*（Foc）引起的典型土传病害，在我国及全球黄瓜种植区普遍发生[1]。我国黄瓜枯萎病常年发病率为 10%～30%，严重时可达 80%～90%，甚至导致绝产，该病已成为制约我国黄瓜生产的重要因素之一[2]。黄瓜枯萎病在黄瓜整个生育期内均可发生，尤以开花结果期最为严重，防治较为困难。目前生产上主要以预防为主，选用抗病品种，采用轮作或嫁接等栽培管理措施，并配合使用化学农药等方法，达到综合防治该病害的目的[3]。化学农药长期使用会导致抗药性产生、药物残留、污染环境等问题，而且针对维管束类病害目前并没有特别有效的化学农药。嫁接在一定程度上可控制病害的发生，但会造成黄瓜口感的下降；抗病品种防治黄瓜枯萎病虽经济有效[4]，但长期种植会导致枯萎病菌致病力上升[5]，可能导致抗性丢失，重新选育新的抗病品种所需时间较长，致使抗性品种在黄瓜枯萎病的防治上存在一定局限性[6]；而生物防治安全友好，无残留、无污染、无毒害，更加符合现代农业可持续发展的思路。

国内外学者开展了利用生防微生物防治黄瓜枯萎病的研究。目前已经报道具有生防作用的生防微生物主要有木霉 *Trichoderma* spp.、芽胞杆菌 *Bacillus* spp.、假单胞菌 *Pseudomonas* spp. 和链霉菌 *Streptomyces* spp.。Chen 等[7]、Cao 等[8]研究发现枯草芽胞杆菌 B579、SQR9 对病原菌有抑制作用。刘爱荣等[9]研究表明，哈茨木霉对 Foc 的抑制率可达 66.7%～85.8%；10^8 个/mL 的孢子悬浮液在田间试验防效可达 50%。Li 等[10]鉴定了 3 株对尖孢镰刀菌有抑制作用的木霉，分别为 *T. asperellum* 525，*T. harzianum* 610 和 *T. pseudokoningii* 886，盆栽试验表明3 株木霉对黄瓜枯萎病的防效均超过 78%，还能提高黄瓜品质和产量。路丹丹等[11]从龟裂链霉菌 M527 发酵液中分离到活性化合物龟裂杀菌素；盆栽试验表明，施用 17.56 mg/L 的龟裂杀菌素溶液 14 d 和 21 d 对黄瓜枯萎病的防治效果分别为 78.3%和 70.6%。上述研究取得了一定的效果，而生产中常遇到干旱或水涝等恶劣天气，严重影响作物产量，获得可提高作物防病能力以及应对短时间旱涝胁迫能力的多功能生防菌株，对实际生产具有重要的意义。

本研究从河北廊坊采集了连作黄瓜田健康黄瓜根际土，并进行了拮抗菌的分离，旨在发现可更好定殖于连作土壤的生防菌。经分离筛选获得一株对黄瓜枯萎病菌 Foc 有较好抑制作用的放线菌 HS57，经鉴定为小链霉菌 *S. parvus*。平板对峙、平板对扣共培养显示菌株 HS57 能抑制尖孢镰刀菌菌丝的生长，该菌株不仅对黄瓜枯萎病具有较好的防病效果，还可以增强小麦耐干旱能力，是一株具有防病抗旱功能的多功能菌株，具有很大的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试作物品种

黄瓜枯萎病感病品种‘中农 6 号’，购于中蔬种业科技（北京）有限公司；小麦无抗病基因品种‘铭贤 169’，由中国农业科学院植物保护研究所小麦病害课题组惠赠。

1.1.2 供试菌株

菌株 HS57 分离自中国农业科学院植物保护研究所廊坊中试基地的健康黄瓜根际土，保存于本实验室；尖孢镰刀菌黄瓜专化型 *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、茄病镰刀菌 *F. solani*，均由本实验室保存；青枯劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 由中国农业科学院植物保护研究所冯洁老师惠赠；果胶杆菌 *Pectobacterium* spp. 由中国农业大学张力群老师惠赠。

1.1.3 供试培养基

固体培养基：高氏一号培养基[12]、HV 培养基[13]、NA 培养基[14]、PDA 培养基、WA-N 培养基[15]、ISP2 培养基[16]、刚果红培养基[17]。

液体培养基：Armstrong 液体培养基[18]。

种子液：GYMM[19]、SNGY[20]、PDB。

发酵液：MA1[20]、MA2[21]、M1：可溶性淀粉 15 g、牛肉膏 2 g、葡萄糖 1 g、酵母粉 3 g、蛋白胨 2 g、$CaCO_3$ 3 g、蒸馏水 1 000 mL，pH 7.2。

1.1.4 供试土壤

采集自中国农业科学院植物保护研究所温室外菜地，过 2 mm 网筛，备用。

1.2 方法

1.2.1 菌株 HS57 的分离

2017 年 6 月，从中国农业科学院植物保护研究所廊坊基地连作数年的健康黄瓜根际采集土样，带回实验室保存于 4℃备用。土样过 2 mm 的网筛，于避光处自然风干 5～9 d，取风干后土样 10 g 于装有 90 mL 无菌水和玻璃珠的三角瓶中，置于 15℃、180 r/min摇床中振荡 45 min，然后进行系列梯度稀释，吸取 100 μL 均匀涂布于添加有 50 mg/L 放线菌

酮和 20 mg/L 的萘啶酮酸的高氏一号和 HV 培养基平板上,28℃培养箱中培养。3 d 后挑取颜色、形状外观不同的单菌落,多次划线纯化。

1.2.2 菌株 HS57 拮抗性测定

对病原真菌的拮抗性测定:平板对峙法[22],先将直径 8 mm 的不同放线菌菌块分别接种在距培养皿中心 3 cm 处,28℃培养 24 h 后,将病原菌接种于 PDA 平板中央。对病原细菌的拮抗性测定:先将菌体浓度为 10^8 cfu/mL 的病原细菌涂布于 NA 平板,立即将直径为 8 mm 的放线菌菌块分别接种在距培养皿中心 3 cm 处,试验重复 3 次,置于 28℃培养箱培养 3～7 d,观察抑菌效果。

1.2.3 菌株 HS57 产挥发性物质的抑菌作用

将放线菌 HS57 接种在高氏一号培养基上,28℃培养 5 d。将 1/2 PDA 培养基上新鲜培养的病原菌 Foc 打成直径为 8 mm 菌块,置于倒有 WA-N 培养基的皿盖上后,与生长放线菌 HS57 的皿底对扣,两层封口膜密封,20℃共培养 7 d。十字交叉法测量菌落直径(mm),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×100%。

1.2.4 菌株 HS57 分解纤维素能力的检测

将生长状况良好的放线菌 HS57 点接于刚果红培养基,28℃培养 7 d,观察是否产生水解圈,测量水解圈直径 D(cm),菌落直径 d (cm),并计算 D/d 值。

1.2.5 菌株 HS57 的生长及培养特性

将菌株 HS57 分别接种于高氏一号培养基、PDA 培养基、ISP2 培养基,分别观察其在不同培养基上的生长速度、菌丝形态、颜色、有无色素产生。将菌株 HS57 分别接种于种子液 GYMM、SNGY 和 PDB 中,28℃、180 r/min 培养 20 h,以 5%的接种量分别转接到发酵培养基 MA1、MA2、M1 中,28℃、180 r/min 培养,观察生长情况及产孢所需时间,血球计数板计产孢量。

1.2.6 温室盆栽防病试验

将培养好的 HS57 发酵液过 500 目灭菌网筛,血球计数板计数,制备放线菌孢子悬浮液,备用。将病原菌 Foc 接种于 Armstrong 培养液中,振荡培养 3 d后过 3 层无菌擦镜纸,血球计数板计数,制备孢子悬浮液,备用。试验设置为 5 个处理:CK1:无菌水浸种处理,CK2:浓度为 10^5个/mL 的病原菌孢子悬浮液浸种处理,T1、T2 和 T3 分别为 10^5个/mL 的病原菌孢子悬浮液与 10^6、10^7 和 10^8个/mL 的放线菌 HS57 孢子悬浮液混和浸种处理。挑选籽粒饱满,有光泽且生长一致的黄瓜种子,置于 68℃烘箱中3 h,用 3%NaClO 浸泡 3 min,无菌水冲洗 6 遍。用上述孢子液浸种 30 min,播种于育苗基质。每处理 3 个重复,每重复 10 株苗。温室昼夜温度范围控制在 25℃/30℃,出苗后光照周期设置为 L//D=16 h//8 h。在播种 3 周时调查和记录各个处理黄瓜的病株数、发病症状,计算发病率、病情指数和防治效果[23]。

1.2.7 小麦耐干旱试验

自然土过 10 目网筛,取一部分灭菌,将其与另一部分未灭菌的土按 3:1混匀备用。将小麦种子经 3%NaClO 浸泡 3 min,无菌水冲洗 6 遍,在不同浓度的放线菌孢子液中浸种 30 min,播种于混匀的自然土。共设置 4 个处理,分别为:CK,无菌水浸种处理;T1、T2 和 T3 分别为 10^6、10^7 和 10^8个/mL 的放线菌孢子液浸种处理。每处理 6 个重复,每重复 10 粒种子。播种 7 d 后调查出苗率;播种后至 15 d 维持土壤含水量为 20%,15 d 后进行缺水处理。缺水处理 7 d 后,植株严重萎蔫,停止缺水处理,重新浇水,浇水后观察小麦苗恢复情况。

1.2.8 菌株 HS57 的初步鉴定

形态学观察:将菌株 HS57 接种在高氏一号培养基上,采用插片法[24]于 28℃培养 5～7 d,光学显微镜下观察孢子丝及分生孢子形态。16S rRNA 基因序列分析:参照天根试剂公司细菌基因组 DNA 提取试剂盒(TIANamp Bacteria DNA Kit)提取菌株 HS57 的 DNA,用细菌 16S rRNA 基因通用引物 27F:5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′,1492R:5′-TACGGYTACCTTGTTACGACTT -3′进行扩增,方法参照文献[25]。所得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并送至上海生工生物公司进行测序,测定的序列登录 NCBI 进行序列比对。

1.3 数据处理与分析

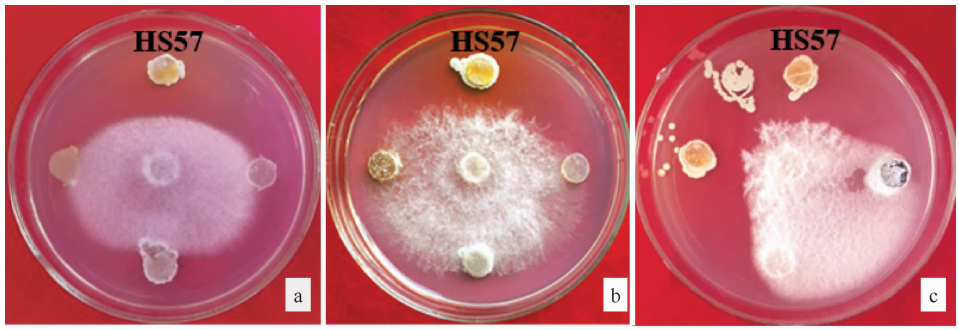
采用 Excel 对数据进行整理;采用 SPSS 20.0 中的 Duncan 氏新复极差法对数据进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株 HS57 的分离和拮抗性测定

通过稀释涂布平板,挑取单菌落,划线纯化得到不同的放线菌菌株。采用平板对峙法筛选到 1 株对尖孢镰刀菌有抑制作用的菌株 HS57,其抑菌带宽为 18.3 mm,抑菌率为 52.4%;对立枯丝核菌和茄病镰刀菌的拮抗带宽分别为 13.3 mm 和 19.8 mm(图

1)，抑制率分别为 39.2%和 52.9%；但对病原细菌青枯劳尔氏菌和果胶杆菌无抑制作用。菌株 HS57 无菌发酵滤液对尖孢镰刀菌菌丝生长的抑制作用较弱，抑制率为 19.9%(图 2)。



a、b、c分别为菌株HS57对尖孢镰刀菌、立枯丝核菌、茄病镰刀菌的拮抗效果
a, b, and c indicate the antagonistic activity of strain HS57 on the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Rhizoctonia solani* and *Fusarium solani*

图 1 菌株 HS57 对 3 种病原真菌的平板抑制效果

Fig. 1 Antagonistic activity of strain HS57 on the growth of three pathogenic fungi on PDA

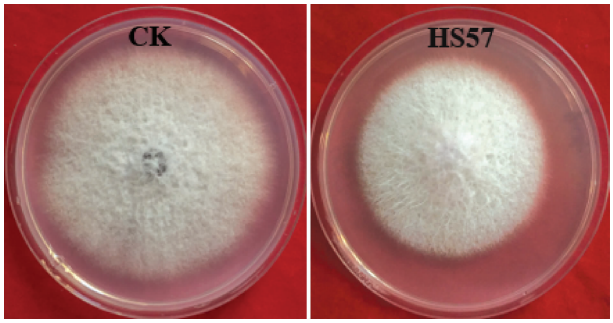


图 2 菌株 HS57 无菌发酵滤液对 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 菌丝生长的抑制作用

Fig. 2 The inhibitive activity of cell-free fermentation filtrate of strain HS57 against the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

2.2 菌株 HS57 产挥发性物质的抑菌作用

平皿对扣共培养试验结果表明，菌株 HS57 产生的挥发性物质能抑制尖孢镰刀菌菌丝生长(图 3)。与对照相比，菌株 HS57 产生的挥发性物质对病原菌菌丝生长的抑制率为 32.1%。

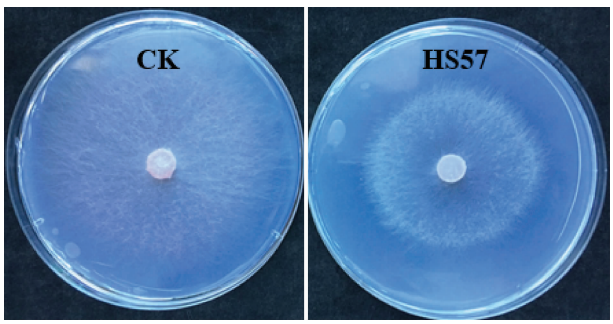


图 3 菌株 HS57 产生的挥发性物质抑制病原菌菌丝生长

Fig. 3 Inhibition of the growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* by the volatiles produced by strain HS57

2.3 菌株 HS57 分解纤维素能力检测

菌株 HS57 可分解纤维素(图 4)，其纤维素水解圈直径 D 为 3.2 cm，菌株 HS57 菌落直径 d 为 1.1 cm，D/d 值为 2.88。

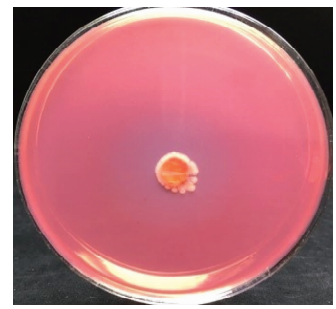


图 4 菌株 HS57 水解纤维素能力

Fig. 4 Cellulose hydrolysis ability of strain HS57

2.4 菌株 HS57 的生长及培养特性

菌株在高氏一号合成培养基、PDA 培养基、ISP2 培养基上均能生长，在前 2 种培养基上生长良好，气生菌丝丰富；在高氏培养基上菌落为白色至浅黄色，在 PDA 培养基上菌落为浅黄色至灰黄色；在 ISP2 培养基上生长稍差，气生菌丝不丰富，白色至浅黄色；其基内菌丝在 3 种培养基上均无色，且不产生色素。28℃条件下培养，生长迅速，3～5 d 即大量产孢。

菌株 HS57 由种子液 GYMM 和 PDB 转接到发酵液 MA1、MA2 和 M1 时均不能产孢，而由种子液 SNGY 转接到上述 3 种发酵培养液时，仅在 MA1 和 M1 中产孢，在 M1 培养液中产孢最快，3 d 时即可大量产孢，产孢量为 1.76×10^9 个/mL(表 1)；但在 MA1 培养液中需要 9 d 才产孢。

2.5　菌株 HS57 对黄瓜枯萎病的防治效果

试验结果(表 2)表明,不同浓度放线菌 HS57 孢子液浸种处理的黄瓜种子出苗率与对照组无差异,病原菌浸种处理种子出苗率低于对照。各处理间病情指数差异显著,其中 HS57 孢子液浓度为 10^7 个/mL 时发病率最低,病情指数最小,防治效果最好,可达 51.0%。

表 1　不同发酵液对菌株 HS57 菌丝生长和产孢的影响

Table 1　Effects of different fermentation broths on mycelial growth and sporulation of strain HS57

发酵液 Fermentation broth	外观特征 Characteristics of appearance	菌丝量 Biomass of mycelium	镜检菌丝生长和产孢情况 Observation of mycelial growth and spore formation	产孢量/ $\times10^9$ 个•mL^{-1} Sporulation
MA1	前期金黄色,5 d 后棕黄色,瓶壁有白色菌丝团	菌丝丰富	9 d 时孢子量大,部分孢子已萌发,孢子呈小长方块状	0.9
MA2	前期金黄色,5 d 后棕黄色,瓶壁有白色菌丝团	菌丝量一般	菌丝丰富	未产孢
M1	金黄色	菌丝量最大	3 d 时明显产孢,孢子量大	1.76

表 2　不同孢子浓度的 HS57 浸种对黄瓜枯萎病的防治效果[1)]

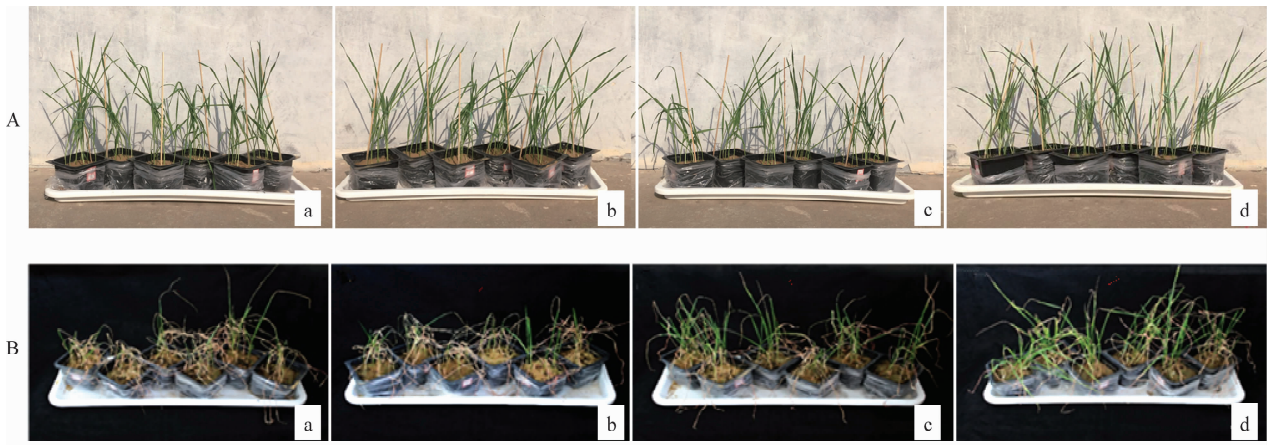
Table 2　Efficacy of seed soaking with different concentrations of HS57 spores against cucumber fusarium wilt

处理 Treatment	出苗率/% Germination rate	病情指数 Disease index	发病率/% Disease incidence	防治效果/% Control efficacy
T1	(90.2±7.07)ab	(58.69±3.42)b	77.61	23.13
T2	(92.2±3.92)ab	(37.39±3.97)d	57.38	51.03
T3	(88.2±5.88)ab	(52.04±4.95)c	74.04	31.85
CK1	(96.1±1.96)a	—	—	—
CK2	(76.8±5.88)b	(76.35±2.80)a	86.80	—

1) 表中数据为平均值±标准差。同列中不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。
CK1:黄瓜种子用无菌水浸泡 30 min;CK2:黄瓜种子在 10^5 个/mL 的尖孢镰刀菌黄瓜专化型 (Foc) 孢子液中浸泡 30 min;T1、T2、T3:黄瓜种子在浓度为 10^5 个/mL 的 Foc 孢子液和浓度分别为 10^6、10^7 和 10^8 个/mL 的菌株 HS57 孢子液的混合液中浸泡 30 min。
The data in the table are the means±standard deviation. The different letters in the same column indicate that the difference was significant at $P<0.05$ by the Duncan's test.
CK1: Cucumber seeds are soaked in sterile water for 30 min; CK2: Cucumber seeds are soaked in spore suspension of the pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* (10^5 spores/mL) for 30 min; T1, T2, T3: Cucumber seeds are soaked in the mixture of Foc spore suspension (10^5 spores/mL) and strain HS57 spore suspension at the concentration of 10^6, 10^7 and 10^8 spores/mL, respectively.

2.6　放线菌 HS57 对小麦耐旱能力的影响

经不同浓度 HS57 孢子液处理的小麦,在苗期缺水处理后再浇水,麦苗的恢复能力不同。10^7 个/mL 和 10^8 个/mL 浸种处理比 10^6 个/mL 处理和清水对照更耐干旱,表现为干旱处理后萎蔫干黄的叶片部分恢复变绿,如图 5A、5B 所示,表明该菌株处理后可使小麦更耐旱。



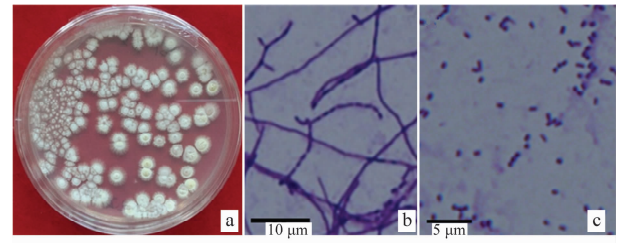
A为缺水处理前各处理小麦生长状况;B为7 d缺水处理后再浇水2 d后的小麦恢复状况;a为无菌水浸种对照;b、c和d为放线菌HS57孢子悬浮液浸种处理,浓度分别为10^6、10^7和10^8个/mL
A demonstrates the wheat growth status before water stress treatment; B demonstrates the resilience of wheat growth status after 7-day water shortage stress and 2-day post-irrigation ; a, Seeds soaked with sterile water as the control; b, c, d, Seeds soaked with spores of strain IIS57 at the concentration of 10^6, 10^7 and 10^8 spores/mL, respectively

图 5　放线菌 HS57 浸种处理对小麦耐旱能力的影响

Fig. 5　Effects of seed soaking with actinomycete HS57 on wheat tolerance to water shortage stress

2.7 菌株 HS57 的初步鉴定

菌株 HS57 在高氏一号培养基上生长形态如图 6 a。光学显微镜观察，菌株 HS57 的气生菌丝多分枝，无横隔膜，气生菌丝顶端分化呈松散螺旋状孢子丝，孢子呈短杆状(图 6 b、c)。采用 16S rRNA 基因扩增引物从菌株 HS57 的基因组 DNA 中扩增到一条约 1 500 bp 左右的条带，序列提交到 GenBank(登录号：MG551267)；与 NCBI 数据库中相似序列同源比对，发现其 16S rRNA 基因序列与小链霉菌 *Streptomyces parvus* 的同源性为 99.86%。采用邻接法(neighbor-joining method，NJ)构建系统发育进化树(图 7)，菌株 HS57 与 *S. parvus* 聚在同一分支。根据形态特征结合 16S rRNA 基因序列分析，将放线菌 HS57 初步鉴定为 *S. parvus*。



a: 菌落形态; b: 孢子丝形态; c: 孢子形态
a: Colony morphology; b: Spore chain morphology; c: Spore morphology

图 6 菌株 HS57 在高氏培养基上的菌落形态、孢子丝及孢子形态(100×)

Fig. 6 Morphology of the colony, spore chain and spore of strain HS57 on Gauze's medium(100×)

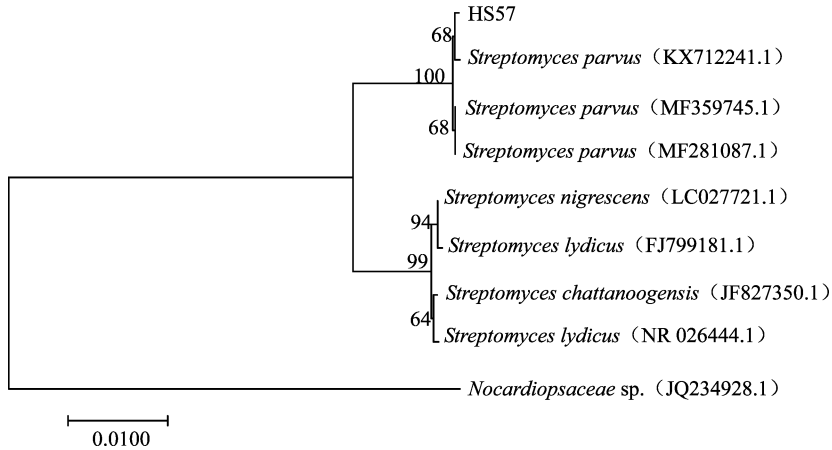


图 7 基于 16S rRNA 基因序列的邻接法构建 HS57 菌株的系统发育进化树

Fig. 7 The neighbor-joining tree of strain HS57 based on 16S rRNA gene sequences

3 讨论

放线菌能产生丰富的次级代谢产物，作为重要的生防资源，具有广阔的应用前景。国内外利用放线菌防治黄瓜枯萎病的研究已有报道。张璐等[26]从黄瓜根际土壤筛选的放线菌 SG-126 对黄瓜枯萎病的防治效果为 42.86%，能显著促进黄瓜的生长发育，同时提高黄瓜叶片保护酶活性和叶绿素含量，降低电解质渗透率；梁银等[27]从土壤中分离出的拮抗链霉菌对黄瓜枯萎病的防效为 51.58%。但是目前这些菌株都尚未商品化。其中重要原因是生防菌应用于田间可能不适应田间土壤条件，特别是连作田，因此挖掘更多的生防菌资源是一项重要的任务。为此，本研究开展了黄瓜连作田中拮抗菌的分离筛选工作，并获得 1 株对黄瓜枯萎病具有良好拮抗效果的 *S. parvus* 菌株 HS57，温室防效可达 51.0%。虽然前人对小链霉菌曾有一些研究，但大部分研究集中在对植物病毒[28]、医学耐药菌株[29]、植物细菌病害[30]的抑制作用以及代谢产物[31]方面，有关小链霉菌对植物真菌病害的研究尚未见报道。菌株 HS57 的获得丰富了黄瓜枯萎病的生防菌资源。

在筛选生防菌时，除考虑菌株的拮抗效果外，生防菌在土壤中的快速繁殖和定殖是其发挥生防潜力的重要前提条件，因此筛选生防菌时需考虑菌株的生长速度。菌株 HS57 在常用的高氏一号、PDA、ISP2 等放线菌培养基上均可快速生长，说明该菌株生长迅速，具备在土壤中快速占位的潜力。此外，生防菌的工业化生产性能也是需要我们注意的一个因素，很多生防效果非常好的菌株常因规模化生产存在一定难度而得不到推广和应用。菌株 HS57 在文献报道的放线菌发酵培养基 MA1、MA2 中不产孢或产孢很慢。经筛选，我们获得了发酵培养基 M1，菌株 HS57 在 M1 中培养 3 d 即可大量产孢，比一般的放线菌的发酵周期短[32]，而且经过进

一步优化后,48 h 即可完成发酵(已申请专利,申请号:201810017582.2),具有可规模化生产的潜力,有利于该菌株的商品化。除上述特点外,菌株 HS57 还具有提高植物耐旱能力和降解纤维素的能力,具有应用于有机肥或与其他载体混和使用的潜力。

综上所述,小链霉菌 HS57 是一株非常有潜力的多功能菌株,具有很大的应用潜能。后续将开展生防菌在植物根际土壤中的定殖及其防病机理研究,以便更好地促进小链霉菌 HS57 的应用。

参考文献

[1] ZHOU Xingang, WU Fengzhi. Dynamics of the diversity of fungal and *Fusarium* communities during continuous cropping of cucumber in the greenhouse [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2012, 80(2): 469-478.

[2] 郭晋云, 胡晓峰, 李勇, 等. 黄瓜枯萎病对黄瓜光合和水分生理特性的影响[J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(1): 79-83.

[3] 林璐璐. 黄瓜枯萎病的研究[J]. 农业灾害研究, 2011, 1(2): 23-29.

[4] 徐彦刚, 贺振, 李瑞, 等. 黄瓜枯萎病研究进展[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(6): 1-6.

[5] HUANG Xiaoqing, SUN Manhong, LU Xiaohong, et al. Serial passage through resistant and susceptible cucumber cultivars affects the virulence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* [J/OL]. Microbiology Open, 2019, 8(2): e00641. DOI: 10.1002/mb03.641.

[6] 毛爱军, 张峰, 张丽蓉, 等. 不同黄瓜材料对枯萎病的抗性评价[J]. 华北农学报, 2008, 23(2): 214-216.

[7] CHEN Fang, WANG Min, ZHENG Yu, et al. Quantitative changes of plant defense enzymes and phytohormone in biocontrol of cucumber Fusarium wilt by *Bacillus subtilis* B579 [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 26(4): 675-684.

[8] CAO Yun, ZHANG Zhenhua, LING Ning, et al. *Bacillus subtilis* SQR 9 can control *Fusarium* wilt in cucumber by colonizing plant roots [J]. Biology and Fertility of Soils, 2011, 47(5): 495-506.

[9] 刘爱荣, 陈双臣, 陈凯, 等. 哈茨木霉对黄瓜尖孢镰刀菌的抑制作用和抗性相关基因表达[J]. 植物保护学报, 2010, 37(3): 249-254.

[10] LI Mei, MA Guangshu, LIAN Hua, et al. The effects of *Trichoderma* on preventing cucumber fusarium wilt and regulating cucumber physiology [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2019, 18(3): 607-617.

[11] 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.

[12] 赵珂. 攀西地区药用植物内生及根际放线菌的多样性与抗菌活性研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2010.

[13] 夏广欣. 土壤放线菌的筛选、鉴定及其发酵产物的活性研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学, 2012.

[14] 韩如月, 李睿瑞, 杨帆, 等. 一株水稻根内生拮抗细菌 SM13 的分离及鉴定[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1030-1040.

[15] GARBEVA P, DE BOER W. Inter-specific interactions between carbon-limited soil bacteria affect behavior and gene expression [J]. Microbiology Ecology, 2009, 58(1): 36-46.

[16] SHIRLING E B, GOTTLIEB D. Methods for characterization of Streptomyces species [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1966, 16(3): 313-340.

[17] 廖敏. 四川阿坝地区药用植物内生拮抗放线菌的筛选及其防病促生机制研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2016.

[18] 黄晓庆. 连作土壤中黄瓜枯萎病菌的致病力变化规律及强、弱致病力菌株的转录组分析[D]. 北京:中国农业科学院, 2018.

[19] 赵韵宇, 孙伟, 彭崇胜, 等. 海洋放线菌 *Streptomyces variabilis* strain 6-1 次级代谢产物的研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(26): 5001-5004.

[20] 刘亮山, 林茂松, 鄢小宁, 等. 生防链霉菌 JH108-2 的发酵培养基优化[J]. 植物病理学报, 2006, 36(3): 259-266.

[21] 黄隽, 林甲檀, 周敏, 等. 吸水链霉菌 HS023 *milF* 基因敲除构建产 5-酮米尔贝霉素基因工程菌[J]. 微生物学报, 2015, 55(1): 107-113.

[22] 金鑫. 稻瘟病生防菌 Af1、Af4 的初步研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2010.

[23] 高毓晗. 产 surfactin 枯草芽胞杆菌 168 重组菌株构建及其对黄瓜枯萎病的控制作用[D]. 北京:中国农业科学院, 2015.

[24] 韩秀芳. 土壤放线菌分离菌株的分类鉴定与拮抗性筛选[D]. 北京:北京理工大学, 2015.

[25] WEISBURG W G, BARNS S M, PELLETIER D A, et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(2): 697-703.

[26] 张璐, 杜秉海, 魏珉, 等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的生防效果及其对植株生长代谢的影响[J]. 山东农业科学, 2007(4): 89-92.

[27] 梁银, 张谷月, 王辰, 等. 一株拮抗放线菌的鉴定及其对黄瓜枯萎病的生防效应研究[J]. 土壤学报, 2013, 50(4): 810-817.

[28] 田兆丰, 刘伟成, 刘霆, 等. 小链霉菌 Yn168 发酵产物抗植物病毒活性的研究[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(4): 569-572.

[29] 康银花, 王旻. 抗 MRSA 小链霉菌 NIM521 发酵工艺的优化[J]. 药物生物技术, 2008, 15(3): 208-211.

[30] 孙建龙, 于基成, 刘秋, 等. 响应面法优化小链霉菌产抗生素发酵条件[J]. 沈阳农业大学学报, 2012, 43(2): 168-172.

[31] 田兆丰, 刘霆, 吴慧玲, 等. 小链霉菌 Yn168 抗病毒活性组分的分离及其稳定性研究[J]. 华北农学报, 2015, 30(2): 124-127.

[32] 路春玲, 王杰, 王立刚, 等. 产蓝色色素放线菌的分离鉴定及发酵工艺条件优化[J]. 药物生物技术, 2014, 21(6): 550-553.

(责任编辑:田　喆)