

# 伽师甜瓜猝倒病生防放线菌的筛选

赵娟<sup>a</sup>, 薛泉宏<sup>b</sup>, 唐明<sup>c</sup>

(西北农林科技大学 a. 生命科学学院, b. 资源环境学院, c. 林学院, 陕西 杨凌 712100)

**【摘要】**【目的】分离、鉴定引起伽师甜瓜(*Cucumis melo* L.)猝倒病的病原菌,筛选可用于甜瓜猝倒病生物防治的拮抗性放线菌。【方法】采用组织分离法分离伽师甜瓜猝倒病的病原菌,用琼脂块法和无菌发酵滤液抑菌性试验筛选拮抗瓜果腐霉的生防放线菌,搭片法观察生防放线菌菌丝与瓜果腐霉菌丝间的相互作用。【结果】伽师甜瓜猝倒病的病原菌为瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*);筛选出 7 株对瓜果腐霉具有显著拮抗性的生防放线菌,其中 8 号放线菌对瓜果腐霉的拮抗环宽度为 13.3 mm,其无菌发酵滤液对瓜果腐霉的抑菌率在培养 120 h 时高达 88.3%。【结论】7 株生防放线菌对由瓜果腐霉引起的伽师甜瓜猝倒病均有显著抑制作用;7 株生防菌可通过产生抗菌物质或缠绕、消解菌丝的方式抑制瓜果腐霉生长。

**【关键词】** 甜瓜;猝倒病;瓜果腐霉;生物防治;拮抗性放线菌

**【中图分类号】** S652;S476.1

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2009)05-0144-05

## Screening of antagonistic actinomycetes against 'Jiashi' *Cucumis melo* L. damping-off

ZHAO Juan<sup>a</sup>, XUE Quan-hong<sup>b</sup>, TANG Ming<sup>c</sup>

(a. College of Life Science; b. College of Resources and Environment; c. College of Forestry,  
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study was to isolate and identify the pathogen causing *Cucumis melo* L. damping-off, as well as screen antagonistic actinomycetes of *Pythium aphanidermatum*. 【Method】 Tissue-isolating method was used to isolate the pathogen, antagonistic actinomycetes of *Pythium aphanidermatum* was screened through both agar block method and axenic fermentation extract experiment, and the method of building pieces on plate was adopted in observing the mutual effects between antimicrobial actinomycetes and *Pythium aphanidermatum*. 【Result】 The phytopathogenic fungus *Pythium aphanidermatum* was isolated; 7 strains of antagonistic actinomycete, which had obvious inhibitory effects on *Pythium aphanidermatum* were screened. The inhibitory ring of No. 8 strain was 13.3 mm, and reached 88.3% when cultivated for 120 h. 【Conclusion】 7 antimicrobial strains had strong inhibitory effects on the growth of *Pythium aphanidermatum*, which caused 'Jiashi' *Cucumis melo* L. damping-off, by producing antibiotic and mutual effect between mycelia, such as winding and decomposition.

**Key words:** *Cucumis melo* L.; damping-off; *Pythium aphanidermatum*; biological control; antagonistic actinomycetes

伽师甜瓜(*Cucurbitaceae melo var. saccharinus* Naud.)属晚熟厚皮甜瓜,是新疆的名优特产,其以

肉厚、质脆、味甜、汁浓、耐贮运而享誉国内外<sup>[1]</sup>。随着伽师甜瓜产业化发展,连作障碍愈来愈明显,土

\* [收稿日期] 2008-07-16

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(30630054)

[作者简介] 赵娟(1985—),女,陕西临潼人,在读硕士,主要从事微生物资源利用研究。E-mail: zhaajuan850309@yahoo.com.cn

[通信作者] 薛泉宏(1957—),男,陕西白水人,教授,主要从事微生物生态与资源利用研究。E-mail: xuequanhong@nwsuaf.edu.cn

传病害则是导致连作障碍的一个重要原因。猝倒病是甜瓜苗期常见的土传病害,可造成烂种、烂芽及幼苗猝倒,该病约占幼苗死亡率的80%<sup>[2]</sup>。化学农药<sup>[3]</sup>对猝倒病等土传病害有一定效果,但却带来了环境污染、微生态平衡破坏等一系列问题,农药的重复使用也会使一些病原菌产生抗药性<sup>[4]</sup>。生物防治能有效解决这一难题,并且避免化学防治的负面效应,因而具有良好的研究和应用前景。张震等<sup>[5]</sup>通过平皿对峙培养筛选出3株拮抗性细菌,在盆栽试验中对黄瓜猝倒病的防效为75.6%~40.7%。目前,国内外关于瓜类猝倒病的生物防治研究主要集中在生防细菌<sup>[6-9]</sup>和生防真菌方面<sup>[10]</sup>,对生防放线菌在瓜类,尤其在甜瓜猝倒病防治上的报道很少。本研究以发病伽师甜瓜幼苗上分离出的瓜果腐霉为靶标菌,筛选能够拮抗瓜果腐霉和枯萎菌的生防放线菌,以为伽师甜瓜猝倒病和枯萎病生物防治提供专性放线菌菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试植株 伽师甜瓜发病幼苗,采自陕西杨凌航天育种中心伽师甜瓜大棚。

1.1.2 供试放线菌 皿内拮抗试验用76株放线菌,由西北农林科技大学微生物资源研究室提供。搭片及无菌发酵滤液试验用7株放线菌,根据皿内拮抗试验结果挑选获得。

1.1.3 培养基 瓜果腐霉分离、纯化和保存用PDA培养基。瓜果腐霉和放线菌培养分别用PDA培养基和黄豆粉培养基<sup>[11]</sup>。上述培养基去掉琼脂即为液体培养基。

### 1.2 方法

1.2.1 瓜果腐霉的分离与鉴定 采用组织分离法<sup>[12]</sup>,从伽师甜瓜发病幼苗上分离病原菌,通过回接试验验证。PDA平板上培养病原菌,观察菌落形态特征,通过埋片、显微镜观察其菌丝和孢囊结构,对病原菌进行初步鉴定<sup>[13]</sup>。

1.2.2 供试生防放线菌对瓜果腐霉和西瓜枯萎菌的皿内拮抗作用 将制备好的瓜果腐霉和西瓜枯萎菌悬液均匀涂布于PDA平板上,打孔器切取活化好的直径为7 mm的放线菌琼脂块,置PDA平板上,28℃培养3 d,十字交叉法测量拮抗圈直径。按下式计算拮抗环宽度:

$$\text{拮抗环宽度/mm} = \frac{(\text{拮抗圈直径} - \text{琼脂块直径})}{2}$$

根据拮抗环宽度、透明度、放线菌产孢量及其对西瓜枯萎病的拮抗性,从76株放线菌中挑选出7株拮抗菌用于后续试验。

### 1.2.3 生防放线菌与瓜果腐霉菌丝间的相互作用

采用搭片法<sup>[11]</sup>,在培养基中接种瓜果腐霉和生防放线菌,28℃培养,分别于培养的3,6 d取出盖玻片,菌丝生长面朝上放置于干净载玻片上,40倍显微镜下观察菌丝间的相互作用。

### 1.2.4 生防放线菌无菌发酵滤液对瓜果腐霉的抑制作用

用竹签分别挑取适量1.2.2中筛选出的7株放线菌,接种到装有100 mL黄豆粉液体培养基的300 mL三角瓶中,28℃、150 r/min摇床振荡培养10 d。发酵液4 000 r/min离心5 min后,用0.22 μm灭菌微孔滤膜过滤除菌<sup>[14]</sup>,得无菌滤液,将滤液与冷却至50℃左右的PDA培养基按1:4体积比混合倒平板,以无菌滤液PDA培养基为对照。用9 mm打孔器切取培养好的瓜果腐霉菌饼,置于PDA平板中央,每处理设3个重复,28℃培养5 d,每隔24 h测量1次菌落直径(D,十字交叉法测量,取平均值),并计算相应抑菌率。

$$\text{抑菌率/\%} =$$

$$\frac{(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径})}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$$

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌的分离纯化及鉴定

根据柯赫原则,对引起伽师甜瓜猝倒病的病原菌进行回接验证及形态观察鉴定,结果表明,引起伽师甜瓜猝倒病的病原菌属霜霉目,腐霉科,腐霉属,瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)。该菌在PDA平板上菌落呈放射状,气生菌丝呈灰白色,菌丝发达,分枝繁茂;显微镜下孢囊手指状或肥大而有瓣状分歧,菌丝无隔膜(图1)。

### 2.2 生防放线菌对瓜果腐霉和西瓜枯萎菌的皿内拮抗作用

在76株放线菌中,有12株放线菌对瓜果腐霉有显著拮抗性,通过形态、培养特征及埋片显微镜观察,12株放线菌均为链霉菌属(*Streptomyces* sp.) (表1)。其中8号和22号生防放线菌对瓜果腐霉的抑制作用最强,拮抗环宽度分别为13.3和13.8 mm,拮抗环完全透明且产孢量比较高。结合这12株生防菌对西瓜枯萎菌的拮抗作用及其产孢量(表1),从中筛选出8、36、38、41、63、66、68号7株生防菌用于后续试验。

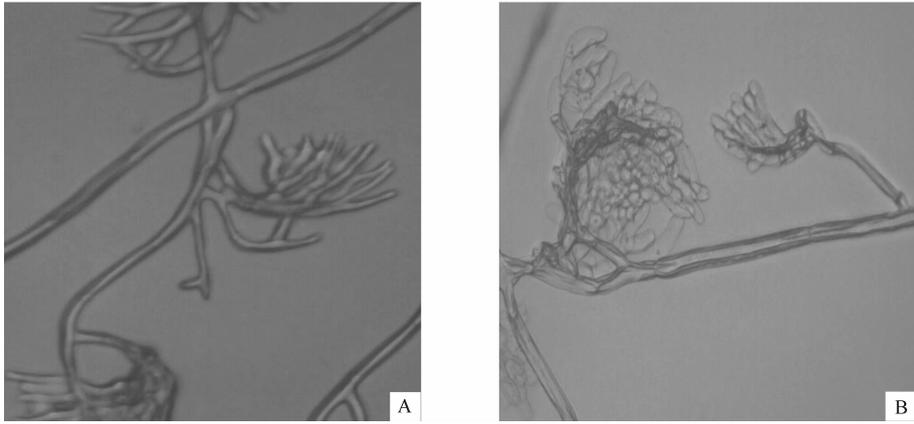


图 1 不同时期瓜果腐霉菌丝(A)及孢囊的结构(B)(×40)

Fig. 1 The mycelium (A) and sporangium (B) of *Pythium aphanidermatum* in different periods (×40)

表 1 12 株生防放线菌对瓜果腐霉和西瓜枯萎菌的血内拮抗环宽度及暂定分类

Table 1 The widths of inhibitory rings of 12 antagonistic actinomycetes to the two pathogens in Petri dish

菌株编号 No	瓜果腐霉 <i>Pythium aphanidermatum</i>		西瓜枯萎菌 <i>Fusarium oxysporum</i>		产孢量 Spore production	暂定分类 Provisional classify
	拮抗环宽度/mm Inhibitory zone width	透明度 Diaphaneity	拮抗环宽度/mm Inhibitory zone width	透明度 Diaphaneity		
1	7.3±0.25	++	6.5±0.29	++	+++	<i>Streptomyces</i> sp.
8	13.3±0.25	+++	0.0	+++	+++	<i>Streptomyces</i> sp.
22	13.8±0.25	+++	0.0	+++	++	<i>Streptomyces</i> sp.
28	6.0±0.50	+++	0.0	+++	++	<i>Streptomyces</i> sp.
36	8.8±0.25	+++	3.0±0.30	++	+++	<i>Streptomyces</i> sp.
38	11.3±0.25	++	2.5±0.24	+++	++	<i>Streptomyces</i> sp.
41	8.5±0.00	+++	4.0±0.42	++	++	<i>Streptomyces</i> sp.
50	8.0±0.00	+++	2.0±0.24	+++	++	<i>Streptomyces</i> sp.
63	9.3±0.75	++	2.0±0.49	++	++	<i>Streptomyces</i> sp.
66	8.5±1.00	+++	1.5±0.29	+++	++	<i>Streptomyces</i> sp.
68	6.5±0.50	+++	1.0±0.21	+++	+++	<i>Streptomyces</i> sp.
69	8.3±0.70	++	0.0	++	+++	<i>Streptomyces</i> sp.

注: ++表示拮抗环较透明或产孢量较大; +++表示拮抗环彻底透明或产孢量大。

Note: ++ represents high diaphaneity or good spore-producing strains; +++ represents higher diaphaneity or better spore-producing strains.

## 2.3 生防放线菌对瓜果腐霉菌丝的抑制作用

皿内培养 6 d, 可观察到除 38 号放线菌外, 其他 6 株放线菌与瓜果腐霉相遇时, 其菌丝均可缠绕在

瓜果腐霉菌丝上生长, 并使其消解(图 2); 36 号放线菌可使瓜果腐霉菌丝膨大(表 2)。

表 2 生防放线菌对瓜果腐霉菌丝的抑制作用(6 d)

Table 2 Inhibitory effects of antagonistic actinomycetes on the mycelium of *Pythium aphanidermatum* (6 d)

作用方式 Way of action	菌株编号 Strain No.						
	8	36	38	41	63	66	68
缠绕 Winding	+	+	—	+	+	+	+
消解 Rupture	+	+	—	+	+	+	+
膨大 Swell	—	+	—	—	—	—	—

注: +表示观察到该作用方式; —表示未观察到该作用方式。

Note: + represents observed; — represents not observed.

## 2.4 生防放线菌无菌发酵滤液对瓜果腐霉的抑制作用

由表 3 可以看出, 7 株供试放线菌的无菌发酵

滤液对瓜果腐霉均有抑制作用, 即 7 株生防放线菌均能产生抗菌物质, 抑制瓜果腐霉生长。8 号放线菌无菌发酵滤液对瓜果腐霉的抑菌率远高于其他 6

株放线菌,且随时间的延长呈递增的趋势;63 号放线菌的抑菌作用仅次于 8 号放线菌;38、41、63、68

号放线菌的抑菌率均随时间的延长呈先增加后减少的趋势,并在 48~72 h 达到最高。

表 3 7 株生防放线菌无菌发酵滤液对瓜果腐霉的抑菌率

Table 3 The inhibitory rates of *Pythium aphanidermatum* with the treatments of 7 axenic fermentation extract

菌株编号 No.	24 h		48 h		72 h		96 h		120 h	
	D/cm	抑菌率/% Inhibitory rate	D/cm	抑菌率/% Inhibitory rate	D/cm	抑菌率/% Inhibitory rate	D/cm	抑菌率/% Inhibitory rate	D/cm	抑菌率/% Inhibitory rate
CK	14.2 a	—	34.8 a	—	51.7 a	—	70.0 a	—	81.0 a	—
8	9.5 c	33.2 a	9.5 f	72.7 a	9.5 h	81.7 a	9.5 f	86.4 a	9.5 f	88.3 a
36	12.0 b	15.7 b	33.8 a	2.9 f	50.6 b	2.2 g	66.0 b	5.6 e	79.0 b	2.5 f
38	13.7 a	3.7 c	23.7 d	31.8 c	43.8 d	15.3 e	63.8 bc	8.9 de	77.8 b	4.0 ef
41	11.7 b	18.0 b	26.1 c	25.0 d	42.2 e	18.4 d	61.8 c	11.7 d	75.8 c	6.4 d
63	11.6 b	18.7 b	20.6 e	40.7 b	29.3 g	43.4 b	46.5 e	33.5 b	61.6 e	23.8 b
66	12.0 b	15.7 b	31.5 b	9.3 e	49.3 c	4.7 f	64.0 bc	8.6 de	76.3 c	5.8 de
68	12.3 b	13.6 b	22.9 d	34.1 c	39.5 f	23.7 c	58.2 d	16.8 c	73.3 d	9.5 c

注:同列数据后标不同字母者表示差异显著( $P < 0.05$ )。

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

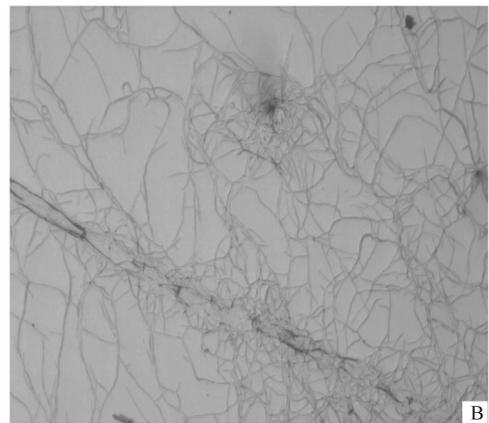
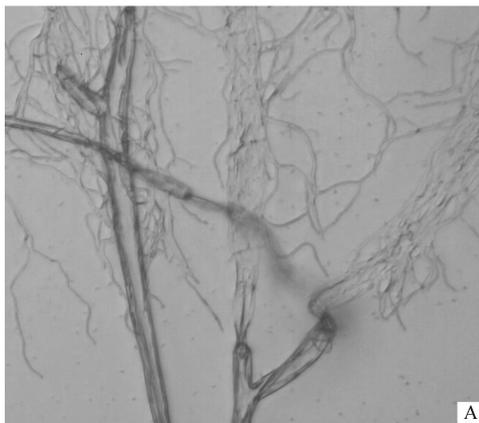


图 2 生防放线菌对瓜果腐霉菌丝的抑制作用( $\times 40$ )

A. 8 号生防菌; B. 41 号生防菌

Fig. 2 Inhibitory effects of antagonistic actinomycetes on the mycelium of *Pythium aphanidermatum* ( $\times 40$ )

A. No. 8 actinomycete; B. No. 41 actinomycete

### 3 讨论

近年来,土传病害已成为制约伽师甜瓜产业发展的重要因素。伽师县对甜瓜土传病主要采用以南瓜等作为砧木嫁接防治<sup>[15]</sup>,但该病仍未得到有效控制。瓜果腐霉为腐霉属真菌,可引起大豆番茄及一些葫芦科作物(如黄瓜)发生猝倒、根腐等病害。曹荣花等<sup>[16]</sup>研究表明,分离自芦苇的拮抗性内生真菌 *C. aboriginum* Mülwlc6 可成功定殖于黄瓜苗的根部,预先接种该菌能有效抑制瓜果腐霉在黄瓜根部组织细胞内的扩展和定殖;该菌对瓜果腐霉引起的黄瓜苗期猝倒病有良好的防效,接种 1 次内生菌防治效果为 44.29%,接种 2 次生防效果高达 88.49%。陈晓斌等<sup>[7]</sup>从黄瓜健壮幼苗根围分离筛选

出 5 株能抑制瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum*) 和终级腐霉 (*Pythium ultimum*) 的根围促生菌 (PGPR);盆栽试验表明,这 5 株生防细菌在促进黄瓜苗生长的同时也降低了发病率,与对照相比差异均达显著水平。

本试验筛选出的 7 株生防放线菌,对瓜果腐霉均表现出良好的拮抗性,其中 8 号放线菌的拮抗效果尤为明显,可作为盆栽试验和生防机制研究的首选供试菌株。除 8 号生防放线菌外,其他 6 株生防放线菌对西瓜枯萎菌亦表现出一定的拮抗性。38 号放线菌在搭片中未对瓜果腐霉表现出抑制作用,但其无菌发酵滤液具有很好的抑菌效果,说明 38 号放线菌产生的抗菌物质能抑制瓜果腐霉生长。其他 6 株放线菌在搭片中通过缠绕、消解菌丝及产生抑

菌物质等作用方式抑制瓜果腐霉生长;其拮抗效果表现为多种方式协同作用。

司美茹等<sup>[17]</sup>指出,根据体外平皿试验筛选得到生防菌株能否在供试作物根组织中有效定殖,直接影响拮抗菌的生防活性。本试验获得的生防放线菌能否用于实际生产,还需盆栽和田间试验验证,对入选生防放线菌的拮抗机理和促生作用还需进一步研究。由于伽师甜瓜在整个生长期会受多种病害的侵袭,为保证伽师甜瓜的产业化和可持续发展,后续研究应在猝倒病生物防治的基础上,对尖孢镰刀菌引起的甜瓜枯萎病等进行深入研究,以求通过生物防治控制甜瓜连作障碍。

## 4 结 论

伽师甜瓜猝倒病由瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum*) 引起。7 株生防放线菌在平皿内对瓜果腐霉均具有明显的拮抗性,且除 38 号放线菌外,均可通过缠绕、消解菌丝等方式抑制瓜果腐霉生长,其中 8 号放线菌的生防效果尤为明显。7 株生防放线菌可通过产生抑菌物质等方式抑制瓜果腐霉的生长。

## [参考文献]

- [1] 徐胜利,陈青云,陈小青,等. 嫁接栽培伽师甜瓜抗枯萎病能力及其增产效应 [J]. 园艺学报, 2005, 32 (3): 521-523.  
Xu S L, Chen Q Y, Chen X Q, et al. Effect of grafting on 'Jiashi' musk melon yield and its resistance to *Melon Fusarium Wilt* [J]. Acta Horticulturae Sincia, 2005, 32 (3): 521-523. (in Chinese)
- [2] 邹一平,黄玉凤,严高生. 大棚甜瓜苗期病害的诊断分析与防治策略 [J]. 宜春学院学报, 2003, 25(2): 60-63.  
Zou Y P, Huang Y F, Yan G S. Diagnosis and control on seedling stage disease of musk melon in green-house [J]. Journal of Yichun University, 2003, 25(2): 60-63. (in Chinese)
- [3] 刘彦良,慕卫,刘峰,等. 霜霉威对黄瓜苗期猝倒病的控制作用研究 [J]. 现代农药, 2007, 6(1): 44-47.  
Liu Y L, Mu W, Liu F, et al. Studies on the control of propamocarb against *Pythium aphanidermatum* and damping-off on cucumber seedling [J]. Modern Agrochemicals, 2007, 6 (1): 44-47. (in Chinese)
- [4] 梁文平,郑斐能,王仪,等. 21 世纪农药发展的趋势: 绿色农药与绿色农药制剂 [J]. 农药, 1999, 38(9): 1-2.  
Liang W P, Zheng F N, Wang Y, et al. The trend of 21st century agrochemicals; green agrochemicals and green agrochemical formulations [J]. Pesticides, 1999, 38(9): 1-2. (in Chinese)
- [5] 张震,张炳欣,喻景权. 黄瓜土传病害拮抗菌分离鉴定及其生物活性测定 [J]. 浙江农业学报, 2004, 16(3): 151-155.  
Zhang Z, Zhang B X, Yu J Q. Identification and bioactive assay of antagonistic bacteria to control soil-borne diseases of cucumber [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2004, 16 (3): 151-155. (in Chinese)
- [6] 梁建根,张炳欣,陈振宇,等. 促生菌 CH1 诱导黄瓜对猝倒病抗性的研究 [J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 283-288.  
Liang J G, Zhang B X, Chen Z Y, et al. Studies on the resistance to cucumber damping-off induced by plant growth-promoting rhizobacteria CH1 [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(2): 283-288. (in Chinese)
- [7] 陈晓斌,张炳欣,楼兵干,等. 根围促生菌对黄瓜幼苗的促生效应和防病作用 [J]. 浙江大学学报: 农业生命科学版, 1999, 25 (6): 578-582.  
Chen X B, Zhang B X, Lou B G, et al. Effect of plant growth promoting rhizobacteria on disease control of cucumber seedlings [J]. Journal of Zhejiang Agricultural University: Agric & Life Sci Edition, 1999, 25(6): 578-582. (in Chinese)
- [8] 楼兵干,张炳欣, Maarten R, 等. 黄瓜苗期猝倒病生物防治 [J]. 植物保护学报, 2002, 29(2): 109-113.  
Lou B G, Zhang B X, Maarten R, et al. Biological control of seedling damping-off of cucumber [J]. Journal of Plant Protection, 2002, 29(2): 109-113. (in Chinese)
- [9] 马迎新,刘曙光,高克祥,等. 根际细菌 *Serratia plymuthica* HRO-C48 的生防作用初探 [J]. 云南农业大学学报, 2007, 22 (1): 49-53.  
Ma Y X, Liu X G, Gao K X, et al. Preliminary study on biocontrol potential of rhizobacterium *Serratia plymuthica* HRO-C48 [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2007, 22(1): 49-53. (in Chinese)
- [10] 程根武,纪明山,陈捷,等. 黄瓜苗期猝倒病的生物防治 [J]. 沈阳农业大学学报, 1999, 30(3): 394.  
Cheng G W, Ji M S, Chen J, et al. Biological control of seedling damping-off of cucumber [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 1999, 30(3): 394. (in Chinese)
- [11] 程丽娟,薛泉宏,来航线,等. 微生物学实验技术 [M]. 西安: 世界图书出版社, 2000: 383-384.  
Cheng L J, Xue Q H, Lai H X, et al. Experimental techniques of microbiology [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2000: 383-384. (in Chinese)
- [12] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 124.  
Fang Z D. Plant disease research method [M]. Beijing: China Agriculture Publishing Corporation, 1998: 124. (in Chinese)
- [13] 魏景超. 真菌鉴定手册 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 30-34.  
Wei J C. Fungus identify handbook [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1979: 30-34. (in Chinese)
- [14] 赵斌,何少江. 微生物学实验 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 46-48.  
Zhao B, He S J. Microbiology experiments [M]. Beijing: Science Press, 2002: 46-48. (in Chinese)