

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*

梁 银 张谷月 王 辰 王世梅[†] 沈其荣

(江苏省固体有机废弃物资源化高技术研究重点实验室(南京农业大学), 南京 210095)

摘 要 鉴定从土壤中分离的一株拮抗放线菌(编号 CT205), 探索其防治植物病害的潜能。通过形态特征、生理生化特征和 16S rRNA 基因序列分析研究菌株 CT205 的分类地位, 采用平板对峙法测定其抗菌活性, 利用连作致病土盆栽试验评价其对黄瓜枯萎病的防治作用。初步鉴定菌株 CT205 为白刺链霉菌(*Streptomyces albospinus*), 菌株 CT205 对供试的枯草杆菌、啤酒酵母、小麦纹枯、土豆青枯等植物病原菌均有不同程度的抑制作用, 其中对黄瓜枯萎病、西瓜枯萎病、烟草疫霉 3 种供试病原真菌的抑制作用较强。盆栽试验表明, 施用放线菌 CT205 对黄瓜生长有一定的促生作用, 对黄瓜枯萎病防治效果为 51.85%, 放线菌 CT205 菌液和有机肥复合制作成生物有机肥, 防治效果达 81.85%。研究表明, 放线菌 CT205 具有潜在的应用价值。

关键词 放线菌 CT205; 鉴定; 黄瓜枯萎病; 土壤微生物; 生物防治

中图分类号 S436.421.1.3; S474.3 **文献标识码** A

黄瓜连作障碍在黄瓜种植区普遍存在, 对黄瓜种植业危害严重, 而枯萎病是黄瓜连作障碍中最主要的因素之一, 尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) 是黄瓜枯萎病的致病菌^[1], 其发病程度与土壤中病原微生物累积数量密切相关^[2], 研究表明土壤中尖孢镰刀菌数量大于 10^3 个 g^{-1} , 即可使黄瓜致病^[3]。农业生产上防治连作障碍(枯萎病)多采用嫁接换根、轮作倒茬、换土及化学药物防治^[4-5]等措施, 但是嫁接换根操作繁琐、成本较高, 城郊老种植区长期倒茬无地可轮作, 换土工作量大, 化学药品毒性大且对枯萎病的防治效果并不理想。因此, 利用安全高效的生防制剂防治黄瓜枯萎病具有重要意义。国内外科技工作者对于枯萎病的生物防治已做了大量的工作, 如 De Cal 等^[6] 研究报道草酸青霉(*Penicillium oxalicum*) 对番茄枯萎病的诱导抗性; Larena 等^[7] 采用固态发酵法制备 *P. oxalicum* 孢子防治番茄枯萎病, 水培试验防效达 49%; Thangavelu 等^[8] 报道用荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) pf10 防治香蕉枯萎病; Sunil 等^[9] 从土壤中分离拮抗鹰嘴豆枯萎病的木霉菌株(*Trichoderma* spp.), 研究 *Trichoderma* spp. 与枯

萎灵(carboxin)混合对枯萎病的防治, 三年的田间试验发现可降低发病率 44.1%~60.3%, 产量增加 42.6%~72.9%。关于枯萎病原菌拮抗放线菌的研究也有报道, 如 Cao 等^[10] 从香蕉中分离出对尖孢镰刀菌有显著拮抗活性的内生玫瑰浅灰链霉菌(*Streptomyces roseogriseolus*), 张文婷等^[11] 从特殊生境中筛选出对植物枯萎病、黄萎病有拮抗作用的放线菌等, 但多数研究停留在拮抗放线菌菌株筛选及室内抗菌活性检测方面, 盆栽试验及田间应用报道相对较少。单纯使用生防菌对枯萎病的防治效率普遍不高, 有文献报道施用有机肥能减缓黄瓜连作障碍的发生^[12], 凌宁等^[13-14] 利用拮抗菌 *Paenibacillus polymyxa* 和哈茨木霉(*T. harzianum*) SQR-T037 与有机肥复合研制成生物有机肥, 防治西瓜枯萎病, 盆栽试验、田间试验效果显著。因此, 为了提高枯萎病的生防效率, 本研究尝试筛选对尖孢镰刀菌有较高拮抗活性的放线菌用于黄瓜枯萎病的防治, 并与有机肥复合成生物有机肥进行盆栽试验评价菌株 CT205 防治黄瓜枯萎病的效果, 以及为研究开发具有实用价值的新型生防制剂及生物有机肥提供材料。

* 国家自然科学基金项目(40871126)资助

[†] 通讯作者: E-mail: smwang@njau.edu.cn

作者简介: 梁 银(1989—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为土壤及环境微生物。E-mail: 2011103075@njau.edu.cn

收稿日期: 2012-08-01; 收到修改稿日期: 2012-11-03

1 材料与方 法

1.1 放线菌菌株 CT205

筛选自南京紫金山麓土壤,保存在江苏省固体废弃物资源化重点实验室。

1.2 菌株 CT205 的初步鉴定

1.2.1 形态特征观察 将放线菌菌株 CT205 在高氏一号斜面上活化,用插片法培养,在光学显微镜及电子显微镜下观察孢子丝及分生孢子的形态。

1.2.2 培养特征及理化特征 测定参照文献^[15-16],将菌株 CT205 接种在葡萄糖天门冬素琼脂、高氏一号、及 PDA 平板上,28℃ 培养 5~7d,观察基质菌丝、气生菌丝形态变化。

1.2.3 菌株 CT205 DNA 的提取 提取菌株 CT205 的 DNA,用细菌 16S rRNA 基因通用引物,5-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3' (*E. coli* 8 to 27), 5-TACCTTGTACGACTT-3' (*E. coli* 1507 to 1492) 进行 PCR 扩增,方法参照 Nikodinovic^[17] 和 Kauffmann^[18] 的相关文献。所得到的 PCR 产物委托南京金斯瑞公司进行序列测定,测定的序列登录 GenBank (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

1.3 菌株 CT205 对微生物拮抗作用测定

指示菌:啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*),枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*),烟草青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*),黄瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*),西瓜枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*),小麦纹枯病菌 (*Rhizoctonia cerealis*),烟草疫霉 (*Phytophthora nicotianae*),实验室保存。

对于单细胞指示菌,取 1 环菌苔溶于 5 ml 无菌水中,涡旋使其均匀,取 0.1 ml 的指示菌液均匀的涂布在平板上,用打孔器打取直径为 5 mm 的放线菌 CT205 菌块,置于平板中央,28℃ 培养 2~3 d,观察抑菌圈大小。对于霉菌,采用平板对峙法测定,将培养好的植物病原真菌及放线菌 CT205 用打孔器打块,将其分别置于 PDA 平板上,对峙培养,试验重复 3 次,28℃ 培养 5~7 d,观察抑菌效果。

1.4 放线菌 CT205 防治黄瓜枯萎病的盆栽试验

1.4.1 黄瓜 (新津研 4 号) 种子育苗 黄瓜种子用 60℃ 温水浸泡,搅拌至室温,取沉淀种子,5% NaClO 处理 3 min,无菌水清洗 3~4 次,保湿,28~30℃ 萌芽 1 天,种子露白播入育苗盘中,长至二叶一心,移栽钵。

1.4.2 盆栽试验 盆栽用土取自南京江宁区麒麟镇黄瓜连作多年的致病土,田间枯萎病的发病率在 70% 以上,盆栽前计数连作土中各类微生物的数量,检测到其中尖孢镰刀菌为 1.9×10^4 cfu g⁻¹。试验设 4 个处理,各个处理由表 1 所示。

表 1 盆栽试验处理

Table 1 Treatments in the pot experiment

处理 Treatment	成分 Composition
对照 CK	连作土
有机肥处理 Organic fertilizer	连作土 + 2% 有机肥
放线菌 CT205 处理 Actinomyces CT205	连作土 + 2% 放线菌悬液 (10^7 cfu ml ⁻¹)
生物有机肥 Bio-organic fertilizer	连作土 + 2% 有机肥 + 2% 放线菌悬液 (10^7 cfu ml ⁻¹)

有机肥由南京农业大学江苏省新天地肥料工程中心提供,且是由 40% 氨基酸有机肥料和 60% 猪粪堆肥组成^[13],氨基酸有机肥是以菜柏为原料,经微生物发酵分解而制成的氨基酸有机肥料,含有机质 442 g kg⁻¹、氨基酸 80 g kg⁻¹、N 4.4%、P₂O₅ 2.3%、K₂O 0.67%、水分 28.5%;猪粪堆肥含有机质 304 g kg⁻¹、N 2.01%、P₂O₅ 3.7%、K₂O 1.1%、水分 28.5%。对照和放线菌处理中分别添加和 2% 有机肥营养成分相当的 N、P、K 化学肥料。5 kg 连作土/钵,30 盆/处理,2 棵苗/盆。生长至 30 天取样计算生物量,考察促生效果。生长至开花期,统计病情指数 0~5 级,考察抗病效果。盆栽试验重复两次,分别于 2011 年 3 月 10 至 2011 年 5 月 30 日及 2012 年 4 月 10 至 2012 年 6 月 30 日在江苏省固体废弃物资源化重点实验室 (江苏宜兴) 的温室进行,常规管理。

1.5 病情指数及防病效果的统计

当黄瓜植株开始发病时,每天观察记录各处理黄瓜发病情况。据文献^[19]的方法将病情指数分为 5 级,分别为 0 级:植株正常生长,不发病;1 级:植株有少于 1/4 的叶片萎蔫;2 级:植株有多于 1/4、少于 2/4 的叶片萎蔫;3 级:植株有多于 2/4、少于 3/4 的叶片萎蔫;4 级:植株完全萎蔫死亡。病情指数的计算公式如下所示:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum (\text{病级株数} \times \text{代表数值})}{\text{株数总和} \times \text{发病最重级的代表数值}} \times 100$$

$$\text{防治效果} = [(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100\%$$

1.6 黄瓜盆栽土中微生物种群数量的测定

盆栽试验结束,取盆栽土体土及根际土计数其

中的细菌、放线菌、真菌及尖孢镰刀菌的数量。土壤微生物计数采用稀释平板法,细菌、放线菌及真菌分别采用牛肉膏蛋白胨、高氏一号及马丁氏培养基,尖孢镰刀菌计数采用 Komada 的选择性培养基^[20]。

2 结果

2.1 放线菌 CT205 的初步鉴定

2.1.1 菌株 CT205 的形态特征观察 通过扫描电镜观察,菌株 CT205 的气生菌丝分枝多,无横隔膜,气生菌丝顶端分化形成松散螺旋状孢子丝(图 1),孢子丝分化形成椭圆形分生孢子,孢子表面有刺状附属物(图 2)。

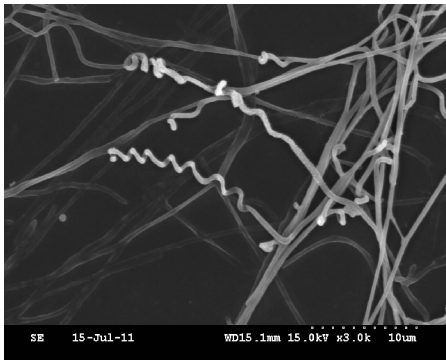


图 1 菌株 CT205 孢子丝形态

Fig. 1 Morphology of the spore fibrillae of Strain CT205 (28°C, 5~7 d)

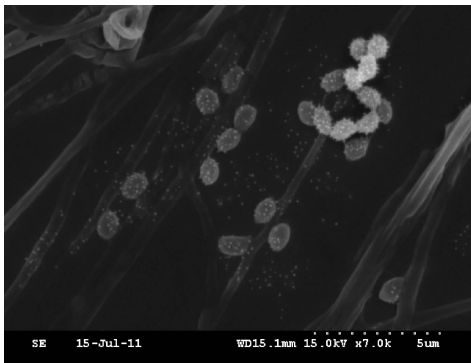


图 2 菌株 CT205 孢子形态

Fig. 2 Morphology of the spore of Strain CT205 (28°C, 5~7 d)

表 2 菌株 CT205 在 3 种培养基上的培养特征

培养基 Medium	基质菌丝 Substrate mycelium	气生菌丝 Aerial mycelium
葡萄糖天门冬素琼脂	淡黄褐色	不丰富,白色至浅黄色
高氏一号	黄褐色	不丰富,浅灰色
PDA	淡黄褐色	丰富,白色至浅灰色

表 3 菌株 CT205 的生理生化特征

特征 Property	结果 Result	特征 Property	结果 Result
明胶液化	+	D-果糖	+
淀粉水解	+	葡萄糖	+
牛奶酪化	+	鼠李糖	+
产生 H ₂ S	+	蔗糖	+
纤维素上生长	-	D-(+)-棉子糖	+
糖的利用		甘露醇	+
D-阿拉伯糖	+	肌醇	+
D-木糖	+		

注:“+”表示阳性;“-”表示阴性 Note:“+” indicates positive and“-” negative

2.1.3 菌株 CT205 16S rRNA 序列测定结果 经过提取菌株 CT205 的 DNA 和 PCR 扩增,得到一条 1 500 bp 左右的条带,其序列登录号为 JN860220,并进行同源性比对,发现与其一致性较高的菌株均属于链霉菌属(*Streptomyces*),与白刺链霉菌(*S. albospinus*)的同源性为 99%,根据菌株的形态特征、理化特征并结合 16S rRNA 序列分析,将放线菌 CT205 初步鉴定为白刺链霉菌。构建的系统进化树见图 3。

2.2 菌株 CT205 对微生物的拮抗作用

用琼脂挖块法,通过比较抑菌圈大小,测定菌株 CT205 对单细胞微生物的抑制作用,发现菌株 CT205 对啤酒酵母(单细胞真菌)、枯草杆菌(G^+)、烟草青枯病菌(G^-),均有较强的抑制作用,抑菌圈直径(平均值)分别为 40 mm、21 mm、30 mm。

采用平板对峙法测定菌株 CT205 对病原真菌的抑制作用,结果发现其对植物病原真菌的抗菌谱广泛,对供试的黄瓜枯萎病菌,西瓜枯萎病菌,小麦纹枯菌,烟草疫霉等病原真菌具有显著的抑制作用,图 4、图 5 所示菌株 CT205 对黄瓜枯萎病菌、烟草疫霉的拮抗作用。

2.1.2 菌株 CT205 培养特征和生理生化特征

菌株 CT205 在三种不同的培养基上表现出不同的培养特性结果如表 2 所示,菌株 CT205 的生理生化特征如表 3 所示。

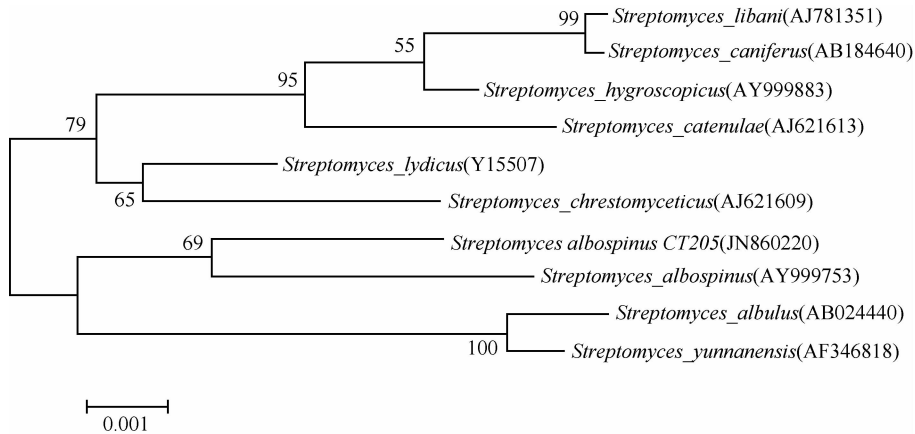


图 3 拮抗菌株 CT205 的 16S rRNA 基因区域的进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of Strain CT205 based on 16S rRNA gene sequence



图 4 菌株 CT205 对黄瓜枯萎病的抑制作用

Fig. 4 Inhibitory effect of Strain CT205 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

图 5 菌株 CT205 对烟草疫霉的抑制作用

Fig. 5 Inhibitory effect of Strain CT205 on *Phytophthora nicotianae*

2.3 放线菌 CT205 对黄瓜枯萎病的防治作用

2.3.1 放线菌 CT205 对黄瓜的促生作用 黄瓜幼苗移植钵钵约一个月测定生物量,每个处理随机取健康植株 3~4 盆(6~8 株),进行毁灭性取样测定生物量。结果见表 4,无论是植株鲜重还是株高,3 种处理方式的促生效果均是生物有机肥 > 有机肥

> 放线菌,只是放线菌处理的植株地下部分较有机肥处理略高,其余指标均是有机肥处理略好于放线菌处理。与对照相比,有机肥、放线菌、生物有机肥处理黄瓜植株的鲜重分别提高了 43.76%、34.51% 和 83.49%,株高分别提高了 56.04%、52.47% 和 69.69%。

表 4 不同处理对黄瓜的促生效果

Table 4 Effects of different treatments on growth of cucumber in the pot experiment

处理 Treatment	全株鲜重 Fresh weight(g)	地上鲜重 Aboveground weight(g)	地下鲜重 Underground weight(g)	株高 Plant height(cm)
对照 CK	20.75b	18.91b	1.45bc	30.32b
有机肥 Organic fertilizer	29.83ab	29.05a	1.30c	47.31a
放线菌 CT205 Actinomycetes CT205	27.91ab	27.42ab	1.92ab	46.23a
生物有机肥 Bio-organic fertilizer	38.05a	34.90a	2.12a	51.45a

注:表中同一列数据含有相同字母者表示差异不显著($p=0.05$, 新复极差检验) Note: The same letter following the data in the same clounn in the table indicates no significant difference ($p=0.05$, Duncant's test)

2.3.2 放线菌 CT205 对黄瓜枯萎病的生防作用

移苗 25 天对照开始陆续发病,每天观察记录各处理黄瓜发病情况,经过观察黄瓜植株初期症状为个别叶片萎焉,后期整株叶片萎焉干枯,病株茎基部呈褐色腐烂,5~6 天全株枯萎,4 种处理发病的先后顺序为:对照 > 有机肥 > 放线菌 > 生物有机肥。观察记录至移苗 40 天,对照植株发病严重时结束盆栽试验,并计算发病率和防治效果。

表 5 所示是发病第 14 天统计的各处理黄瓜的病情指数、发病率、死亡率及防治效果。从表 2 中

可见,对照组、有机肥处理、放线菌处理、生物有机肥处理黄瓜植株的病情指数分别为 74.17、54.17、35.71、13.46,发病率及死亡率逐渐降低,防治效果逐渐提高。3 种处理中施加生物有机肥防治效果最好,防治效果达 81.85%,其次是施加放线菌防治效果 51.85%,施加有机肥防治效果 26.97%。从统计数据可以看出,单纯施加有机肥或拮抗菌均有一定的防治作用,但防治效果较弱,所以田间实际使用时应考虑拮抗菌和有机肥复合。

表 5 不同处理对黄瓜枯萎病的防治效果

Table 5 Effects of different treatments controlling *Fusarium* wilt of cucumber

处理 Treatment	病情指数 Disease index	发病率 Disease incidence (%)	死亡率 Death rate (%)	防治效果 Disease control rate (%)
对照 CK	74.17a	86.67a	70.00a	—
有机肥 Organic fertilizer	54.17b	62.50b	50.00b	26.97c
放线菌 CT205 Actinomycetes CT205	35.71c	39.29c	32.14c	51.85b
生物有机肥 Bio-organic fertilizer	13.46d	19.23d	11.54d	81.85a

注:表中同一列数据含有相同字母者表示差异不显著($P=0.05$, 新复极差检验) Note: The same letters following the data in the same column in the table indicate insignificant difference ($p=0.05$, Duncan's test)

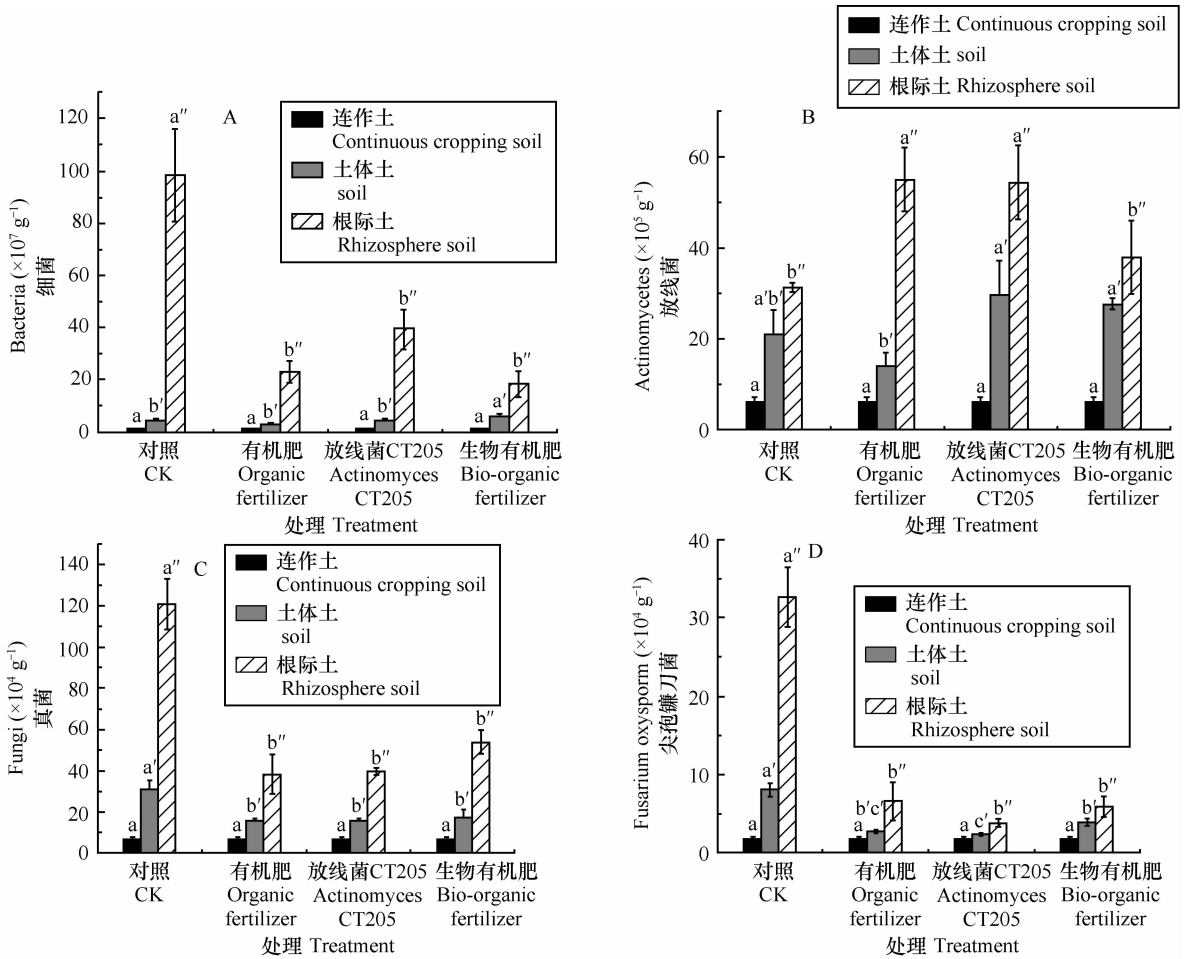
2.4 黄瓜盆栽土壤中微生物种群及数量的变化

尖孢镰刀菌是引起黄瓜枯萎病发生的病原真菌,土壤中尖孢镰刀菌数量的多少直接关系到黄瓜枯萎病的发生及严重程度。盆栽试验结束取样测定土壤中微生物种群及数量的变化,结果如图 5 所示,盆栽前计数连作土壤中的细菌、放线菌、真菌及尖孢镰刀菌的数量分别为 1.0×10^7 、 6.2×10^5 、 6.5×10^4 、 1.9×10^4 个 g^{-1} ,黄瓜盆栽后各处理土壤中的微生物数量均高于盆栽前,且各处理根际土中微生物数量又均高于土体土中的微生物数量。由图 6A 可看出,盆栽前连作土及盆栽后土体土中的细菌数量均在 10^7 ,而根际土的细菌数量明显增加达到了 10^8 ,且对照与 3 个处理之间存在有显著性差异。图 6B 盆栽前连作土放线菌数量为 10^5 ,而盆栽后土体土及根际土中的放线菌数量均增加至 10^6 ,并且在施加放线菌 CT205 的处理中,土体土及根际土的放线菌数量较其他各处理高。图 6C 中连作土中真菌数量为 10^4 ,盆栽后增加至 10^5 ,无论土体土还是根际土,3 个处理中的真菌数量均低于对照,且存在显著性差异。图 6D 中盆栽前连作土中尖孢镰刀菌数量为 1.9×10^4 个 g^{-1} ,种植一季黄瓜后,3 种处理的病原菌数量变化不大,仍然保持在 10^4 ,只是根际土中的病原菌略高于土体土,但是对照

根际土中尖孢镰刀菌数量高达 3.3×10^5 个 g^{-1} ,较 3 种处理根际土中的病原菌高出一个数量级,存在显著差异,且对照土体土中的尖孢镰刀菌数量也显著高于 3 种处理。说明施加有机肥、放线菌和生物有机肥均可以减少土壤尤其是根际土壤中病原菌的数量。

3 讨 论

利用生防菌防治黄瓜枯萎病国内外亦有较多的报道。张璐等^[21]从黄瓜土壤根际筛选出放线菌 SG-126,盆栽试验显示它对黄瓜枯萎病的防治效果为 42.86%,并能显著促进黄瓜的生长发育;Chung 等^[22]研究发现枯草芽孢杆菌 MFA88 对病原菌有广谱杀菌的作用,也能够很好地抑制黄瓜枯萎病的发生;刘金秀等^[23]从土壤中分离拮抗放线菌 XF-7,其发酵液对黄瓜苗期枯萎病的防治效果较为显著。但土传病害受土壤与环境因素的影响较大,针对黄瓜枯萎病使用单一生防菌剂的防治效率普遍不高,且防效稳定性差。本文研究的拮抗菌株 CT205 初步鉴定为白刺链霉菌(*S. albospinus*),对植物病原真菌的抗菌谱广泛,尤其对黄瓜枯萎病原菌——尖孢镰刀菌显示强烈的抑制作用,采集多年连作的致病



注: abc的上标“''”表示非根际土中微生物数的显著性差异分析; ab的上标“''”表示根际土中微生物数的显著性差异分析
 Note: The superscript “''” of abc indicates significant difference between bulk soils in number of microbes by plate count.
 The superscript “''” of ab indicates significant difference between rhizosphere soils in number of microbes by plate count

图 6 不同处理对黄瓜根际和非根际土中微生物平板数的影响 (A. 细菌; B. 放线菌; C. 真菌; D. 尖孢镰刀菌)
 Fig. 6 Effects of different treatments on microorganism density in rhizosphere and bulk soil of cucumber by plate count (cfu g^{-1})
 (A. Bacteria; B. Actinomycetes; C. Fungi; D. *Fusarium oxysporum*)

农田土壤进行黄瓜盆栽试验,更接近农业生产的实际情况。前人对白刺链霉菌的研究报道较少。Elke等^[24]报道 *S. albospinus* Acta 3619 产生抗菌谱较窄的芬尼法霉素 G、H,对丙酸杆菌属的细菌具有活性;郁蕾等^[25]报道从海南省霸王岭热带原始林土壤中分离的一株 *S. albospinus* 15-4-2,从其发酵液中获得5种具有抗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)活性的化合物,为后期寻找抗MRSA的新型药物提供了依据。目前尚无利用该类放线菌对植物病害进行生物防治的报道。

本研究于2011年3月进行第一次盆栽,采用拌土方式施加2%放线菌悬液,该处理的防治效率仅为18.80%,2012年4月第二次盆栽,施用方式改为移苗前的小范围穴施,统计结果显示施用放线菌悬

液的处理防治效率提高至51.85%,可见生防菌剂的施用方式对防治效率影响较大;施用生物有机肥处理的防治效率达到81.85%,并检测到各处理根际土壤中尖孢镰刀菌的数量大幅度降低。研究结果表明 *S. albospinus* CT205 是一株具有较高开发潜力的生防菌。利用生防菌 *S. albospinus* CT205 与有机肥复配制成生物有机肥使用,既可以提高土壤肥力,又可以调节土壤微生物区系,减少病原菌数量,创造一个利于植物生长的生态环境,在防治土传病害、克服连作障碍方面具有诱人的前景。

4 结 论

从土壤中筛选到一株拮抗放线菌株 CT205,经

鉴定为白刺链霉菌 (*Streptomyces albospinus*), 其发酵液对黄瓜枯萎病有一定的防治效果, 且对黄瓜生长具有促生作用。 *S. albospinus* CT205 与有机肥复合成的生物有机肥对黄瓜枯萎病防治效果达 81.85%, 表明 *S. albospinus* CT205 在防治土传病害方面具有潜在的应用价值。

参 考 文 献

- [1] 黄仲生, 黄习军, 杨玉茹, 等. 京郊黄瓜枯萎病病原菌鉴定初报. 植物病理学报, 1984, 14(4): 249—250. Huang Z S, Huang X J, Yang Y Q, et al. Identification of the fungi causing wilt of cucumber plants in the suburbs of Beijing (In Chinese). Acta Phytopathologica Sinica, 1984, 14(4): 249—250
- [2] 申卫收, 林先贵, 张华勇, 等. 不同栽培条件下蔬菜塑料大棚土壤尖孢镰刀菌数量的变化. 土壤学报, 2008, 45(1): 138—142. Shen W S, Lin X G, Zhang H Y, et al. Numbers of *Fusarium oxysporum* in different greenhouse soils (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2008, 45(1): 138—142
- [3] 蓝江林, 苏明星, 葛慈斌, 等. 尖孢镰刀菌的分布与西瓜枯萎病病程的相关性. 中国农学通报, 2007, 23(1): 302—305. Lan J L, Su M X, Ge C B, et al. Relativity between the distribution of *Fusarium oxysporum* and the course of disease of wilt disease of watermelon (In Chinese). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2007, 23(1): 302—305
- [4] 郑良永, 胡剑非, 林昌华, 等. 作物连作障碍的产生及防治. 热带农业科学, 2005, 25(2): 58—62. Zheng L Y, Hu J F, Lin C H, et al. The production of succession cropping obstacles and its prevention and cure steps (In Chinese). Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2005, 25(2): 58—62
- [5] 吕卫光, 张春兰, 袁飞, 等. 嫁接减轻设施黄瓜连作障碍机制初探. 华北农学报, 2000, 15(增刊): 153—156. Lü W G, Zhang C L, Yuan F, et al. Preliminary study on relieving the obstacles of continuous cropping cucumber in greenhouse by inoculating (In Chinese). Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2000, 15(Suppl): 153—156
- [6] De Cal A, Pascual S, Melgarejo P. Involvement of resistance induction by *Penicillium oxalicum* in the biocontrol of tomato wilt. Plant Pathology, 1997, 46: 72—79
- [7] Larena I, Melgarejo P, De Cal A. Production, survival, and evaluation of solid substrate inocula of *Penicillium oxalicum*, a biocontrol agent against *Fusarium wilt* of tomato. Phytopathology, 2002, 92: 863—869
- [8] Thangavelu R, Paaniswami A, Doraiswamy S, et al. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense on induction of defence enzymes and phenolics in banana. Biological Plantarum, 2003, 46(1): 107—112
- [9] Sunil C, Dubey M, Suresh B S. Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris for integrated management of chickpea wilt. Biological Control, 2007, 40: 118—127
- [10] Cao L X, Qiu Z Q, You J L, et al. Isolation and characterization

of endophytic streptomycete antagonists of *Fusarium wilt* pathogen from surface sterilized banana roots. FEMS Microbiology Letters, 2005, 247(2): 147—152

- [11] 张文婷, 张秋丽, 冀媛媛, 等. 特殊生境中植物枯、黄萎病拮抗放线菌的筛选及鉴定. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2011, 39(9): 187—192. Zhang W T, Zhang Q L, Ji Y Y, et al. Screening and identification of antagonistic actinomycetes on *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahlia* from special habitats (In Chinese). Journal of Northwest A & F University: Natural Science Edition, 2011, 39(9): 187—192
- [12] 张树生, 杨兴明, 黄启为, 等. 施用氨基酸肥料对连作条件下黄瓜的生物效应及土壤生物性状的影响. 土壤学报, 2007, 44(4): 689—694. Zhang S S, Yang X M, Huang Q W, et al. Effect of application of amino acid fertilizer on biological properties of cucumber plants and soil microorganisms under continuous mono-cropping (In Chinese). Acta Pedologica Sinica, 2007, 44(4): 689—694
- [13] 凌宁, 王秋君, 杨兴明, 等. 根际施用微生物有机肥防治连作西瓜枯萎病研究. 植物营养与肥料学报, 2009, 15(5): 1136—1141. Ling N, Wang Q J, Yang X M, et al. Control of *Fusarium wilt* of watermelon by nursery application of bio-organic fertilizer (In Chinese). Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2009, 15(5): 1136—1141
- [14] Ling N, Xue C, Huang Q W, et al. Development of a mode of application of bioorganic fertilizer for improving the biocontrol efficacy to *Fusarium wilt*. Biological Control, 2010, 55: 673—683
- [15] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1972. Actinomyces Taxonomic Groups, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Manual of *Streptomyces* identification (In Chinese). Beijing: Science Press, 1972
- [16] 布坎南 R E, 吉本斯 N E. 中国科学院微生物研究所. 译. 伯杰细菌鉴定手册. 第 8 版. 北京: 科学出版社, 1984. Buchanan R E, Gibbons N E. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. trans. Bergey's manual of determinative bacteriology (In Chinese). 8th ed. Beijing: Science Press, 1984
- [17] Nikodinovic J, Barrow E D, Chuck A. High yields preparation of genomic DNA from *Streptomyces*. Biotechniques, 2003, 38(11): 932—936
- [18] Kauffmann I M, Schmitt J, Schmid R D. DNA isolation from soil samples for cloning in different hosts. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64: 665—670
- [19] 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1998. Fang Z D. Plant pathology and entomology research methods (In Chinese). Beijing: China Agriculture Press, 1998
- [20] Komada H. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. Review of Plant Protection Research, 1975, 8: 114—125
- [21] 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. 山东农业科学, 2007(4): 89—92. Zhang L, Du B H, Wei M, et al. Biocontrol effects of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum and their effects on cucumber growth and metabolism (In Chi-

- nese). Shandong Agricultural Sciences, 2007(4): 89—92
- [22] Chung S, Kong H, Buyer J S, et al. Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* ME488 for suppression of soilborne pathogens of cucumber and pepper. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 80(1): 115—123
- [23] 刘金秀, 马正, 申屠旭萍, 等. 黄瓜枯萎病拮抗放线菌筛选及其生防作用鉴定. 园艺学报, 2012, 39(6): 1123—1130. Liu J X, Ma Z, Shentu X P, et al. Isolation and identification of antagonistic actinomycetes and their application in the biocontrol of *Fusarium oxysporum* f. sp. Cucumerinum (In Chinese). Acta Horticulturae Sinica, 2012, 39(6): 1123—1130
- [24] Elke B, Andreas K, Sabaratnam V, et al. Phenelfamycins G and H, new elfamycin-type antibiotics produced by *Streptomyces albospinus* Acta 3619. The Journal of Antibiotics, 2011, 64: 257—266
- [25] 郁蕾, 戴好富, 曾艳波, 等. 白刺链霉菌 15-4-2 中的抗 MRSA 活性成分研究. 中国抗生素杂志, 2012, 37(2): 94—97. Yu L, Dai H F, Zeng Y B, et al. Anti-MRSA constituents from the *Streptomyces albospinus* 15-4-2 (In Chinese). Chinese Journal of Antibiotics, 2012, 37(2): 94—97

IDENTIFICATION AND BIOCONTROL EFFECT OF A STRAIN OF ACTINOMYCETE ANTAGONISTIC TO WILT DISEASE OF CUCUMBER

Liang Yin Zhang Guyue Wang Chen Wang Shimei[†] Shen Qirong

(Jiangsu Provincial Key Lab for Organic Solid Waste Utilization, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Morphological, cultural and physio-biochemical traits and 16S rRNA sequence was analyzed of a strain of actinomycete, separated from the soil of the Zijin Mountain in Nanjing, China and coded as CT205, for identification and orientation in the classification system. The PDA agar plate method was used to determine antifungal activity of Strain CT205 and a pot experiment using pathogenic soil from a field that had been cultivated with cucumber consecutively for year was conducted to investigate the effect of Strain CT205 controlling cucumber *Fusarium* wilt. Based on the 16S rRNA sequence analysis, Strain CT205 was tentatively identified as *Streptomyces albospinus* (99% identity). And the pot experiment showed that the strain inhibited quite effectively *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerinum, *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum, and *Phytophthora nicotianae*, and to a varying extent, *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhizoctonia cerealis*, *Ralstonia solanacearum*. Besides its cucumber *Fusarium* wilt controlling efficiency being 51.85%, the strain promoted somewhat the growth of cucumber. When the strain was prepared with organic manure into complex biomanure, the disease controlling efficiency may reach as high as 81.85%. The findings demonstrate that the strain has certain potential application value.

Key words Antagonistic actinomycetes Strain CT205; Identification; Cucumber wilt disease; Soil microorganism; Biological control

(责任编辑:陈德明)