

一株西瓜细菌性果斑病生防菌的筛选、鉴定及其培养基优化

王雪妍, 马 焕, 岳丹丹, 张志龙, 李冠杰, 张英涛

(河南省科学院生物研究所有限责任公司 郑州 450008)

摘要: 为发掘对西瓜细菌性果斑病具有高效拮抗作用的生防菌株, 采用初筛和复筛的方法, 从种植西瓜的土壤中分离筛选出一株有较强抑制作用的菌株, 并进行了盆栽试验。对其进行形态学、生理生化及分子生物学鉴定, 同时通过单因素试验和正交试验对其培养基进行了优化。结果表明菌株 HP-24 对病原菌的抑制作用最强, 抑菌圈直径为 2.40 cm, 经鉴定为贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)。盆栽试验结果表明, 菌株 HP-24 对细菌性果斑病的防效达 76.72%。经过优化得到 HP-24 的最佳培养基组成为: 1.0% 的牛肉膏, 1.3% 的麸皮和 0.7% 的氯化钾。在最佳培养基条件下, 发酵液中的活菌数达到 1.17×10^9 CFU · mL⁻¹。研究结果为西瓜细菌性果斑病的生物防治提供了理论依据。

关键词: 细菌性果斑病; 生防菌; 筛选; 鉴定; 培养基优化

中图分类号: S651

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2022)09-009-07

Screening and identification of a biocontrol strain against bacterial fruit blotch of watermelon and optimization of its culture medium

WANG Xueyan, MA Huan, YUE Dandan, ZHANG Zhilong, LI Guanjie, ZHANG Yingtao

(Institute of Biology Co., Ltd., Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450008, Henan, China)

Abstract: In order to discover a biocontrol bacteria that has antagonistic effect on bacterial fruit blotch of watermelon, the soil from a watermelon field was used to isolate and screen with a combination method of primary screening and secondary screening. A strain HP-24 with strong inhibitory effect on the disease was obtained. The control effect of strain HP-24 on bacterial fruit blotch was tested by pot experiment. The strain was identified as *Bacillus velezensis* based on morphology, physiology, biochemistry and molecular biology. The culture medium was optimized by single factor test and orthogonal experiment. The results showed that the HP-24 strain had the strongest inhibitory effect on bacterial fruit blotch, and the diameter of the inhibition zone was 2.40 cm. The results of pot experiments showed that, the control effect of HP-24 strain on bacterial fruit blotch was 76.72%. The optimum culture medium compositions for HP-24 were beef extract 1.0%, bran 1.3%, potassium chloride 0.7%. The number of viable bacterium reached 1.17×10^9 CFU · mL⁻¹ under the optimum medium condition. The strain should be useful for the biological control of bacterial fruit blotch of watermelon.

Key words: Bacterial fruit blotch; Biocontrol bacteria; Screening; Identification; Medium optimization

瓜类细菌性果斑病(bacterial fruit blotch, BFB)是危害葫芦科作物的重要病害之一,也是一类毁灭性细菌病害,其病原菌为西瓜噬酸菌(*Acidovorax citrulli*)。病原菌最初被命名为类产碱假单胞菌西瓜亚种(*Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli*), 1992年 Willems 等将其更名为燕麦噬酸菌西瓜亚种(*A. avenae* subsp. *citrulli*), 2008年更名为西瓜噬酸菌(*A. citrulli*)^[1-4]。细菌性果斑病最早于

1969年美国佛罗里达州被发现,随后在澳大利亚、日本、巴西、土耳其、希腊等国家均有发生的报道^[5-6]。目前,该病害在我国的河南、内蒙古、山东、陕西、甘肃、新疆、海南、广西等地区均有报道,给西瓜、甜瓜产业带来了严重威胁,造成了巨大的经济损失^[7]。

瓜类细菌性果斑病属于种传病害,其病原菌可以在种子中长期存活,具有较强的抗逆能力,给防

收稿日期: 2021-10-15; 修回日期: 2022-06-21

基金项目: 河南省科学院基本科研业务费(200605093); 河南省科学院基本科研业务费(220605075)

作者简介: 王雪妍, 女, 助理研究员, 研究方向为农业应用微生物。E-mail: 1060877396@qq.com

通信作者: 张英涛, 男, 高级工程师, 研究方向为农业应用微生物。E-mail: 2251316831@qq.com

治带来了极大的困难^[8-9]。目前,细菌性果斑病的防治主要集中在种子检疫、抗病品种选育、化学防治和生物防治等方面^[10]。在种子生产上应强化种子的消毒处理,确保种子无菌,应杜绝带菌种子进口。另外,使用抗病品种是防治细菌性果斑病的有效措施,但迄今为止,尚未发现对该病完全免疫或高抗的品种。细菌性果斑病的化学防治通常以药剂防治为主,但实际应用中很难做到科学合理地使用杀菌剂,化学药剂的大量使用不仅会造成环境污染,导致农药残留,而且会使病原菌逐渐产生抗性^[11-12]。与化学防治相比,生物防治具有安全、无污染、对环境友好的优点,是绿色植保的重要内容,日益受到人们的青睐。因此,生物防治已成为植物病害防治的重要内容之一。目前,针对西瓜细菌性果斑病,国内外已报道的生防菌株有荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* (A506)、非致病茵 *Aavenae* subsp. *avenae* (AAA99-2)、荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 工程菌株(染色体整合了 2,4-二乙酰基间苯三酚)、酵母菌 (*Pichia anomala*), 以及芽孢杆菌如解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 等^[13-17]。笔者通过对西瓜根际土壤细菌的分离筛选,得到了一株对细菌性果斑病病原菌具有较好拮抗效果的生防菌株 HP-24,通过形态学、生理生化试验和分子生物学手段对其进行了鉴定,并对其发酵培养基进行了优化,以期为生防菌剂的开发利用提供菌株资源,为细菌性果斑病的防治提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材 料

土样采自河南省周口市太康县西瓜种植田。病原菌(燕麦噬酸菌西瓜亚种)来自中国农业微生物菌种保藏管理中心,菌种编号为 ACCC05732。培养基为营养肉汤培养基(NB 培养基),培养温度为 28℃。

盆栽试验西瓜品种为早佳 8424,种子购自北京万丰农研科技有限公司。NB 培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 3.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水 1000 mL,pH 值 7.3;NA 培养基:蛋白胨 10.0 g,牛肉膏 3.0 g,NaCl 5.0 g,蒸馏水 1000 mL,琼脂 18.0 g,pH 值 7.3;KB 培养基:蛋白胨 20.0 g,甘油 10 mL,K₂HPO₄ 1.5 g,MgSO₄ 7 mL,H₂O 1.5 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1000 mL,pH 值 7.2。

1.2 方 法

1.2.1 土样采集和生防菌初筛 根据种植西瓜品种不同,从瓜田植株根附近分别采集土壤样品(采集时间为 2020 年 8 月 9 日),西瓜品种分别为早佳 8424、黑美人和美都。2020 年 8 月在实验室各取土样 10 g 加入到装有 90 mL ddH₂O 和 10 个玻璃珠(已灭菌)的三角瓶中,180 r·min⁻¹ 振荡 30 min,充分打散土样,制成土壤悬浮液,用 10 倍梯度稀释法依次稀释至 10⁻⁷,再分别从稀释倍数为 10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 的稀释液中取 100 μL 涂布于 NA 平板上,每个稀释浓度 3 次重复,30℃ 恒温培养 24 h 后挑取具有明显差异的菌落,经平板划线纯化,编号后保存备用。

1.2.2 生防菌的复筛 将病原菌在 NB 培养基中活化后制成浓度为 10⁸ CFU·mL⁻¹ 的菌悬液,吸取 2 mL 于 KB 平板上,轻轻晃动平板,使菌液布满整个平板,随后将多余的菌液吸出,于生物安全柜的无菌环境中风干培养基平板表面的菌液。将筛选出的生防菌均匀点种到平板上,每个菌株重复点接 3 次,28℃ 培养 48 h,筛选出具有抑菌圈的菌株。将有拮抗作用的菌株进行多次继代培养,选择拮抗作用稳定且效果最好的菌株。

1.2.3 盆栽防效的测定 采用盆栽西瓜幼苗喷雾法测定菌株 HP-24 的防治效果。选取健康、饱满的西瓜种子进行催芽处理,然后采用常规方法播种于盆钵内(口径 13 cm×18 cm),试验在河南省科学院生物研究所人工环境气候箱中进行。待西瓜幼苗长出 2~3 片真叶后(2022 年 5 月 16 日),将活化好的菌液浓度为 10⁸ CFU·mL⁻¹ 的 HP-24 菌悬液喷施到真叶上,晾干后采用喷雾法接种菌液浓度为 10⁸ CFU·mL⁻¹ 的西瓜细菌性果斑病病原菌,叶片正、反两面要均匀喷施。30℃ 保湿 24 h 后进行常规管理,以喷 KB 液体培养基的处理为对照,观察发病情况。每个处理 3 盆重复,每盆 5 棵苗。7 d 后,观察西瓜幼苗的发病情况,计算病叶率、病情指数及防治效果。

1.2.4 生防菌株的鉴定 形态学观察及生理生化鉴定:将拮抗作用最好的菌株 HP-24 接种于 NA 培养基上,30℃ 培养 24 h 后,观察菌落和菌体形态,并参照《常见细菌鉴定手册》^[18] 进行生理生化鉴定试验。

16S rRNA 基因序列分析:提取菌株的基因组 DNA,采用通用引物 27F/1492R 进行 PCR 扩增,引物为 27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R:5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3',PCR 扩增体系为 25.0 μL,包括 ddH₂O 18.0 μL,10×buffer

2.5 μL , dNTP 1.0 μL , 正向和反向引物各 1.0 μL , 模板 DNA 1.0 μL , *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL 。PCR 反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 4 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后测序, 测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 相似性比对。

系统发育树构建: 测序获得的 16S rRNA 部分序列经 BLAST 同源比对后, 从 GenBank 中获取同源性较高的相邻的种、属的序列, 同时查找相邻种、属中模式种的 16S rRNA 序列, 使用 MEGA 6 软件进行系统发育树构建。

1.2.5 有菌与无菌发酵液的抑菌试验 将菌株 HP-24 接种到 100 mL NB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h, 发酵液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 再用孔径为 0.22 μm 的细菌过滤器过滤上清液, 得到无菌发酵液。在涂布病原菌液的 KB 平板上用无菌打孔器打孔, 向孔内加入带菌发酵液和无菌发酵液各 50 μL 及离心得到的菌体, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 每个处理 3 次重复, 观察抑菌效果。

1.2.6 不同浓度发酵液的抑菌试验 将菌株 HP-24 接种到 100 mL NB 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h 后, 用无菌的 NB 培养基分别稀释 2、4、8 倍。在涂好病原菌液的 KB 平板上用无菌打孔器打孔, 分别向孔内加入不同稀释倍数的发酵液各 50 μL , 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h, 每个处理 3 次重复, 观察抑菌效果。

1.2.7 发酵培养基的优化 碳源的优化: 于 250 mL 三角瓶中配置 100 mL 培养基, 其中蛋白胨 1.0 g、氯化钠 0.5 g, 分别选取牛肉膏、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、乳糖、可溶性淀粉作为碳源, 碳源添加量为 0.3 g, 调节 pH 值为 7.3, 接入种子液 2 mL, 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h, 每个处理 3 次重复, 根据活菌数确定最佳碳源。配置不同浓度的碳源培养基, 其中蛋白胨 1.0 g、氯化钠 0.5 g, 碳源为经优化确定的最佳碳源, 质量分数分别为 0.3%、0.5%、0.7%、0.9% 和 1.1%, 调节 pH 值为 7.3, 接种量为 2%, 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h, 每个处理 3 次重复, 统计活菌数并确定最佳碳源浓度。

氮源的优化: 于 250 mL 三角瓶中配置 100 mL 培养基, 其中牛肉膏 0.3 g、氯化钠 0.5 g, 分别选取蛋白胨、酵母粉、蛋白胨+酵母粉、尿素、麸皮、硫酸铵作为氮源, 氮源的添加量为 1.0 g, 调节 pH 值为 7.3, 接入种子液 2 mL, 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h, 每个处理 3 次重复, 根据活菌数确定最佳氮源。配

置不同浓度的氮源培养基, 其中牛肉膏 0.3 g、氯化钠 0.5 g, 氮源为经优化确定的最佳氮源, 质量分数分别为 0.6%、0.8%、1.0%、1.2% 和 1.4%, 调节 pH 值为 7.3, 接种量为 2%, 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h, 每个处理 3 次重复, 统计活菌数并确定最适氮源浓度。

无机盐的优化: 于 250 mL 三角瓶中配置 100 mL 培养基, 其中牛肉膏 0.3 g、蛋白胨 1.0 g, 分别选取氯化钠、氯化钾、硫酸镁、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾作为无机盐, 无机盐的添加量为 0.5 g, 调节 pH 值为 7.3, 接入种子液 2 mL, 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h, 每个处理 3 次重复, 根据活菌数确定最佳无机盐种类。配置不同浓度的无机盐培养基, 其中牛肉膏 0.3 g、蛋白胨 1.0 g, 无机盐为经优化确定的最佳无机盐, 质量分数分别为 0.3%、0.5%、0.7%、0.9% 和 1.1%, 调节 pH 值为 7.3, 接种量为 2%, 30 $^{\circ}\text{C}$ 180 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 24 h, 每个处理 3 次重复, 统计活菌数并确定最适无机盐浓度。

正交试验: 根据单因素试验结果, 分别选择牛肉膏、麸皮和氯化钾作为发酵培养基的碳源、氮源和无机盐, 以其在单因素试验中确定的浓度为标准, 分别设定 3 个不同的浓度, 用 3 因素 3 水平的正交试验优化培养基的主要成分, 得到最佳的培养基组成成分。

1.3 数据处理

试验结果采用 Excel 2010 和 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 采用 LSD 法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 生防菌的筛选

从周口市太康县种植西瓜的土壤中采用稀释涂板法分离纯化得到 82 个菌株, 通过平板对峙法筛选获得对西瓜果斑病病原菌有拮抗作用的 16 个菌株。对这 16 个菌株采用抑菌圈法测定抑菌效

表 1 菌株抑菌圈大小

菌株编号	抑菌圈直径/cm	菌株编号	抑菌圈直径/cm
HP-10	1.85±0.06 c	BP-15	1.65±0.04 de
HP-24	2.40±0.05 a	BP-21	1.73±0.06 cd
HP-33	0.80±0.06 h	BP-24	1.25±0.06 g
HP-43	1.43±0.03 f	BP-28	0.70±0.03 i
BP-2	1.68±0.08 d	hp-3	1.28±0.05 g
BP-8	1.45±0.05 f	hp-6	1.58±0.08 e
BP-11	1.23±0.03 g	hp-10	1.80±0.03 cd
BP-12	2.03±0.04 b	hp-15	1.25±0.05 g

注: 表中同列不同小写字母表示处理间在 0.05 水平差异显著。下同。

果,结果如表 1 所示,菌株 HP-24 的抑菌效果最好,抑菌圈直径达到 2.40 cm(图 1)。显著高于其他菌株的抑菌圈直径。

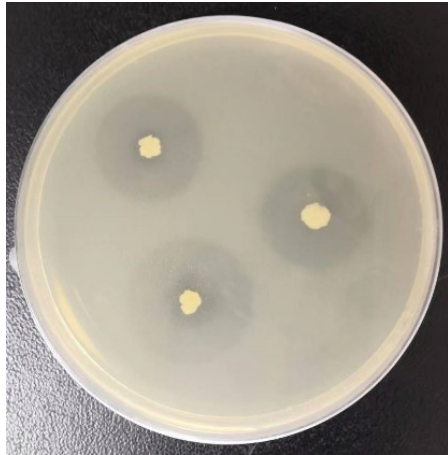


图 1 菌株 HP-24 对西瓜果斑病原菌的抑菌圈

2.2 盆栽防效的测定

盆栽试验结果(表 2)表明,菌株 HP-24 对西瓜细菌性果斑病具有较好的防治效果。在接种细菌性果斑病原菌后 7 d,对照组的病情指数为 62.03,而菌株 HP-24 处理的西瓜苗病情指数为 14.44,与对照组相比,发病率显著降低了 73.01%,其防治效果达 76.72%。

表 2 菌株 HP-24 对西瓜细菌性果斑病的防治效果

处理	发病率/ %	病情指数	防治效果/ %
HP-24 发酵液	23.33 b	14.44 b	76.72
对照组	86.44 a	62.03 a	

2.3 生防菌的鉴定

如图 2 所示,HP-24 菌株的菌落呈白色,近圆形,表面突起有褶皱,不透明,在显微镜下观察呈杆状,产芽孢,芽孢卵圆形。革兰氏染色为阳性,生理生化特性为接触酶阳性,明胶水解阳性,淀粉水解阳性,卵磷脂酶反应阴性,甲基红试验阴性,VP 试验反应阳性,柠檬酸盐利用为阳性。



图 2 菌株 HP-24 菌落形态

将 HP-24 的 16S rRNA 序列通过 BLAST 软件进行同源性比较,选取同源性较高的参考菌株 16S rRNA 序列,通过 MEGA6 软件构建系统进化树。菌株 HP-24 为芽孢杆菌属,且与贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)亲缘关系较近(图 3)。

2.4 有菌与无菌发酵液抑菌效果测定

不同的发酵液对病原菌的抑制效果如图 4 所示,有菌发酵液及菌体对病原菌有抑制作用,而无

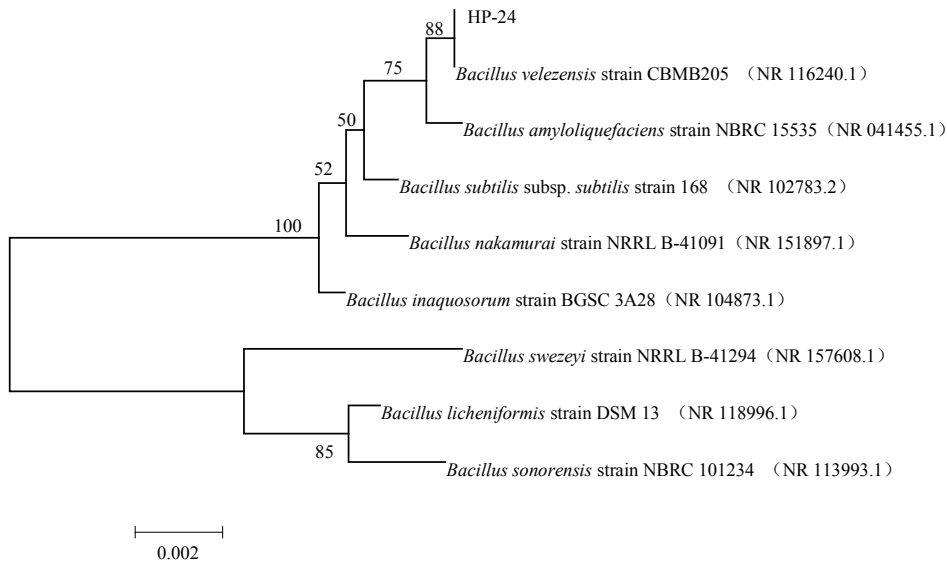


图 3 根据 HP-24 菌株 16S rRNA 序列构建的系统发育进化树

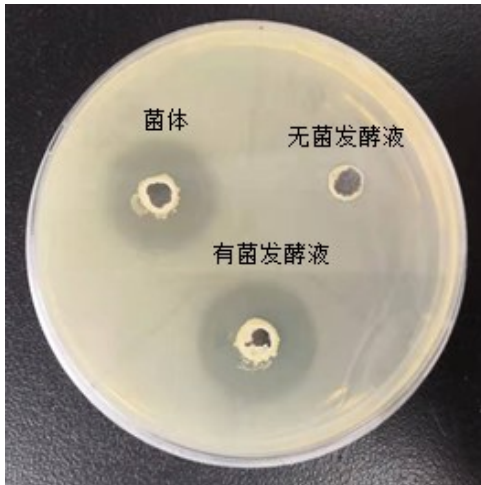


图4 有菌发酵液、无菌发酵液及菌体对病原菌的抑制作用

菌发酵液对病原菌无抑制作用。

2.5 不同浓度发酵液的抑菌效果测定

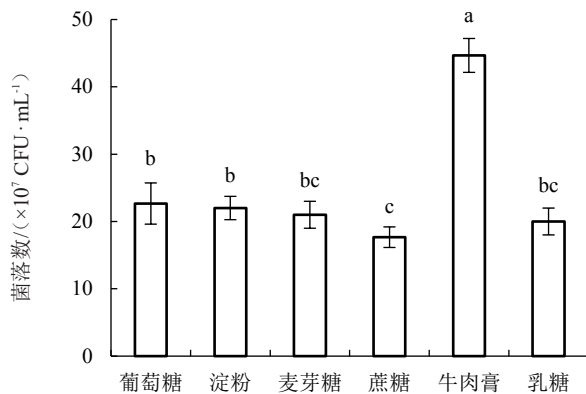
菌株 HP-24 的不同浓度菌液对病原菌的抑制作用如表 3 所示,结果表明高浓度的发酵液抑菌效果最好,随着稀释倍数的增加,抑菌圈直径逐渐变小,说明发酵液菌液浓度越高,抑菌效果越好。

表 3 不同浓度发酵液抑菌圈的大小

稀释倍数	抑菌圈直径/cm
1	2.42±0.03 a
2	2.32±0.03 ab
4	2.24±0.04 b
8	2.05±0.05 c

2.6 培养基的优化

2.6.1 碳源的优化 如图 5 所示,当牛肉膏为唯一碳源时,菌株生长最好,培养 24 h 后活菌数最高,且显著高于其他碳源条件下的活菌数,即最适碳源为牛肉膏。图 6 为当牛肉膏为唯一碳源时,不同浓度



注:图中不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。下同。

图 5 不同碳源对菌株生长的影响

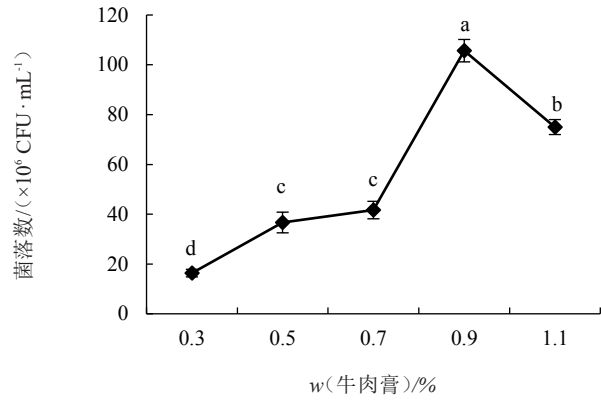


图 6 牛肉膏浓度对菌株生长的影响

的牛肉膏对菌株生长的影响。结果显示,不同浓度的碳源对菌株生长影响差异显著,当牛肉膏的质量分数为 0.9% 时,发酵液中菌落数显著高于其他浓度牛肉膏中的菌落数,即最适碳源为 0.9% 的牛肉膏。

2.6.2 氮源的优化 如图 7 所示,当氮源为麸皮时,发酵液中活菌数最高,且显著高于其他氮源条件下的菌落数。其次是蛋白胨和酵母粉的混合物,蛋白胨和酵母粉的混合物作为氮源时,效果较单一的蛋白胨或酵母粉要好。当氮源为尿素时,菌株发酵液中活菌数最低,即最佳氮源为麸皮。图 8 为麸

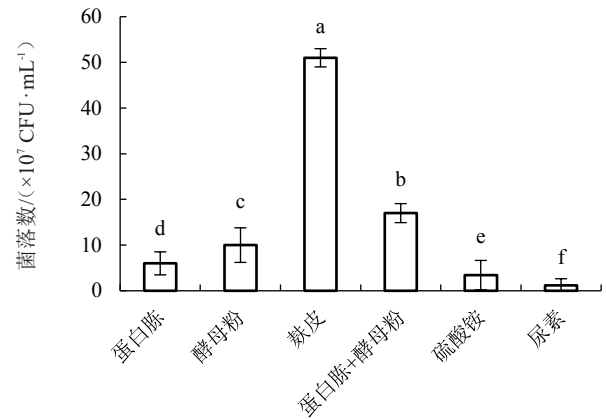


图 7 不同氮源对菌株生长的影响

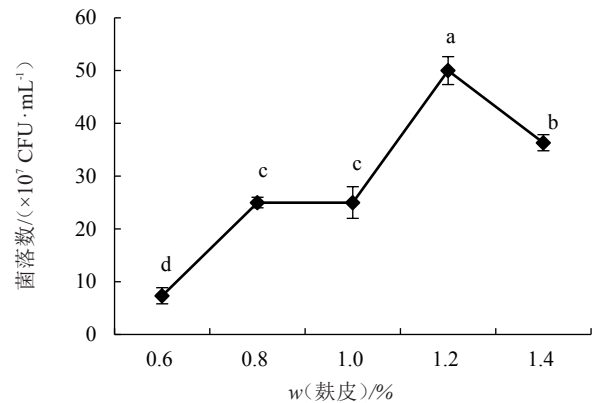


图 8 麸皮浓度对菌株生长的影响

皮为唯一氮源时,不同浓度的麸皮对菌株生长的影响。由图8可以看出,在供试浓度范围内,当麸皮的质量分数为1.2%时,发酵液中的活菌数显著高于其他麸皮浓度,当浓度偏高或偏低时均不利于菌株的生长,即最适氮源为1.2%的麸皮。

2.6.3 无机盐的优化 无机盐优化结果如图9所示,当无机盐为氯化钾时,菌株发酵液中的活菌数最高,且与无机盐为氯化钠、磷酸二氢钾相比活菌数差异显著,即最佳无机盐为氯化钾。图10为当氯化钾为唯一无机盐时,不同浓度的氯化钾对菌株生长的影响。当氯化钾的质量分数为0.7%时,菌株发酵液中活菌数显著高于其他氯化钾浓度,即最适无机盐为0.7%的氯化钾。

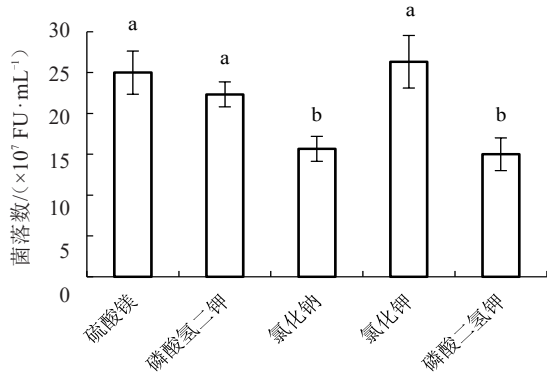


图9 不同无机盐对菌株生长的影响

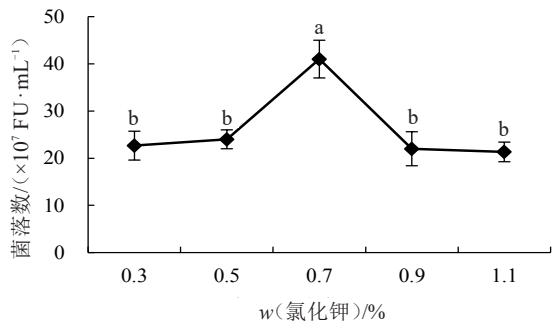


图10 氯化钾浓度对菌株生长的影响

2.6.4 正交试验结果 根据单因素试验结果选择最佳碳源、氮源及无机盐,对影响发酵液菌落数的最适碳源、氮源及无机盐各因素按不同浓度进行正交试验(表4),用3因素3水平的正交试验优化培养基的主要成分,得到最佳培养基组成。

根据正交试验结果比较3种因素的R值可知B>A>C(表5),因此,影响发酵液菌落数多少的主次因素依次为麸皮浓度>牛肉膏浓度>氯化钾浓度。为确定各因素对试验结果的影响,对正交试验进行方差分析。结果如表6所示,牛肉膏、麸皮浓度对发酵液

菌落数的影响显著,氯化钾浓度对菌落数影响不显著。根据正交试验结果得出的最优培养基组成为A3B3C2,即牛肉膏1.0%、麸皮1.3%、氯化钾0.7%。

表4 L₉(3×3)正交试验因素水平

水平	因素		
	A 牛肉膏/%	B 麸皮/%	C 氯化钾/%
1	0.8	1.1	0.6
2	0.9	1.2	0.7
3	1.0	1.3	0.8

表5 正交试验结果

试验编号	A 牛肉膏	B 麸皮	C 氯化钾	菌落数/($\times 10^8$ CFU·mL ⁻¹)
1	1	1	1	4.75 e
2	1	2	3	5.68 d
3	1	3	2	8.18 b
4	2	1	3	5.90 d
5	2	2	2	7.25 c
6	2	3	1	7.30 c
7	3	1	2	7.58 c
8	3	2	1	7.23 c
9	3	3	3	9.63 a
K1	18.61	18.23	19.28	
K2	20.45	20.16	23.01	
K3	24.44	25.11	21.21	
R	5.83	6.88	3.73	

注:K1表示因素列第1个水平各试验的结果和;K2表示因素列第2个水平各试验的结果和;K3表示因素列第3个水平各试验的结果和;R表示极差。

表6 正交试验结果方差分析

项目	平方和	自由度	均方	F	p
截距	448.028	1	448.028	4 456.017	0.000**
A 牛肉膏	5.922	2	2.961	29.448	0.033*
B 麸皮	8.396	2	4.198	41.751	0.023*
C 氯化钾	2.320	2	1.160	11.536	0.080
残差	0.201	2	0.101		

注:R²=0.988;*表示在0.05水平显著相关;**表示在0.01水平极显著相关。

2.6.5 正交试验结果验证 当培养基组成为牛肉膏1.0%、麸皮1.3%、氯化钾0.7%时,在30℃180r·min⁻¹条件下,培养24h后测菌落数为1.17×10⁹CFU·mL⁻¹。

3 讨论与结论

在现代农业生产过程中,随着环境污染、农药残留以及抗药性等问题的产生,生物防治技术在农业病虫害防治中的应用越来越受到青睐^[19]。目前,许多有益微生物已应用于植物病害的生物防治中,而植物根际中的微生物在植物的生长发育和抵御病害的过程中起着重要重用,具有巨大的开发价值。国内外关于植物根际微生物防治植物病害的报道很

多^[20-23]。芽孢杆菌在自然界中广泛存在,是植物病害生物防治中应用较为普遍的生防细菌。其中贝莱斯芽孢杆菌作为芽孢杆菌属的一个新种,与枯草芽孢杆菌和解淀粉芽孢杆菌亲缘关系密切,目前已有利用贝莱斯芽孢杆菌防治花生白绢病、棉花枯萎病、辣椒疫霉病、西瓜枯萎病等多种植物病害的报道^[24-25]。然而,未见有利用贝莱斯芽孢杆菌防治细菌性果斑病的报道。本试验筛选到一株对西瓜细菌性果斑病致病菌具有抑制作用的贝莱斯芽孢杆菌 HP-24,为细菌性果斑病的生物防治提供了新的菌种资源。芽孢杆菌的防病机制一般包括代谢产物含抗菌物质、寄生于病原菌与之竞争营养和空间、诱导植物产生系统抗病性等^[26]。谢心悦等^[27]研究发现解淀粉芽孢杆菌 BJ-10 的无菌发酵液稀释 5 倍后对甜瓜细菌性果斑病的防效仍能达到 87.5%。而笔者研究发现贝莱斯芽孢杆菌 HP-24 的无菌发酵液对细菌性果斑病病原菌无抑制作用,菌株 HP-24 所产生的抑菌物质可能为胞内代谢产物;此外,生防菌与病原菌之间进行营养和空间的竞争,也会导致对病原菌的抑制作用,产生抑菌圈,具体的抑制机制有待进一步研究。

笔者结合平板对峙试验和盆栽试验,筛选到西瓜细菌性果斑病的拮抗菌株贝莱斯芽孢杆菌 HP-24。该菌对西瓜细菌性果斑病病原菌的抑菌圈直径可达到 2.40 cm,盆栽防效为 76.72%,可作为西瓜细菌性果斑病的生物防治菌株。另对生防菌株 HP-24 的培养基进行优化,得到菌株最优培养基组成为牛肉膏 1.0%、麸皮 1.3%、氯化钾 0.7%,优化后的菌株 HP-24 培养基组成可显著提高发酵液中的活菌数量,为后期生防菌的工业化生产提供了参考。

综上所述,贝莱斯芽孢杆菌 HP-24 在防治西瓜细菌性果斑病方面具有极大的潜力,可以为细菌性果斑病的防治提供菌株资源。同时,发酵培养基的优化也为生防菌剂的后续开发提供了技术支撑。

参考文献

- [1] 赵廷昌,孙福在,王兵万,等.哈密瓜细菌性果斑病病原菌鉴定[J].植物病理学报,2001,31(4):357-364.
- [2] SCHAAD N W, SOWELL G J, GOTH R W, et al. *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* subsp. nov.[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1978, 28(1): 117-125.
- [3] WILLEMS A, GOOR M, THIELEMANS S, et al. Transfer of several phytopath of genic pseudomonas species to *Acidovorax* as *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* subsp. nov., *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, *Acidovorax avenae* subsp. *cattleyae* and *Acidovorax konjaci*[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1992, 42(1): 107-119.
- [4] SCHAAD N W, POSTNIKOVA E, SECHLER A, et al. Reclassification of subspecies of *Acidovorax avenae* as *A. avenae* (Manns 1905) emend., *A. cattleyae* (Pavarino, 1911) comb. nov., *A. citrulli* (Schaad et al., 1978) comb. nov., and proposal of *A. oryzae* sp. nov. [J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31(6/8): 434-446.
- [5] SHIRAKAWA T, KIKUCHI S, KATO T, et al. Occurrence of watermelon bacterial fruit blotch in Japan[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 2000, 66(3): 223-231.
- [6] HOLEVAM C, KARAFIAC D, GLYNOS P E, et al. *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* newly reported to cause bacterial fruit blotch of watermelon in Greece[J]. Plant Pathology, 2010, 59(4): 797.
- [7] 谢慧婷,李战彪,秦碧霞,等.广西甜瓜细菌性果斑病原鉴定及 16S rDNA 序列分析[J].南方农业学报,2016,47(10):1698-1703.
- [8] RANE K K, LATIN R X. Bacterial fruit blotch of watermelon: association of the pathogen with seed[J]. Plant Disease, 1992, 76(5): 509-512.
- [9] 魏林,梁志怀,唐炎英,等.西甜瓜细菌性果斑病为害特点及其绿色防治措施[J].长江蔬菜,2020(3):49-50.
- [10] 蔡馥宇,关巍,乔培,等.瓜类细菌性果斑病研究新进展[J].中国瓜菜,2017,30(11):1-5.
- [11] 郭陈会.新疆籽瓜细菌性果斑病发生及综合防治[J].农业科技通讯,2017(5):263-264.
- [12] 李强,杨玉文,孙柏欣,等.瓜类及蔬菜等植物病原细菌抗铜机制研究进展[J].中国瓜菜,2014,27(3):5-9.
- [13] FESSEHAIE A, WALCOTT R R. Biological control to protect watermelon blossoms and seed from infection by *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*[J]. Phytopathology, 2005, 95(4): 413-419.
- [14] WANG X D, LI G Q, JIANG D H, et al. Screening of plant epiphytic yeasts for biocontrol of bacterial fruit blotch (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*) of Hami melon[J]. Biological Control, 2009, 50(2): 164-171.
- [15] 武芳,李勇,路兆军,等.6株拮抗菌对哈密瓜细菌性果斑病的大田防效[J].种业导刊,2019(12):19-24.
- [16] 王晓东.防治哈密瓜细菌性果斑病拮抗酵母菌的筛选及其生防机理研究[D].武汉:华中农业大学,2009.
- [17] 贾慧慧,谢心悦,潘园园,等.芽孢杆菌 BJ-6 的鉴定及对甜瓜细菌性果斑病的防治[J].微生物学报,2020,60(5):982-991.
- [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,2001.
- [19] 焦梓洲.生物防治技术在农业病虫害防治中的应用分析[J].种子科技,2020,38(3):85-86.
- [20] CHENNIAPPAN C, NARAYANASAMY M, DANIEL G M, et al. Biocontrol efficiency of native plant growth promoting rhizobacteria against rhizome rot disease of turmeric[J]. Biological Control, 2019, 129: 55-64.
- [21] 高苇,杨利娟,刘春艳,等.西瓜枯萎病拮抗菌株的筛选与鉴定[J].中国瓜菜,2021,34(1):19-23.
- [22] 胡启国.5种木霉对番茄灰霉病拮抗作用的测定[J].吉林农业,2012(4):66-67.
- [23] 纠敏,李晶晶,李伟山,等.大豆疫霉病病原生防放线菌的筛选、鉴定及生防效果[J].江苏农业学报,2021,37(5):1137-1142.
- [24] 曹伟平,陆晴,鹿秀云,等.花生果腐病拮抗菌贝莱斯芽孢杆菌 Hsg1949 鉴定与防效[J].中国生物防治学报,2021,37(4):761-770.
- [25] 崔文会,炊春萌,孙雪,等.贝莱斯芽孢杆菌对果蔬土传病害的抑菌效果研究[J].工业微生物,2020,50(5):15-20.
- [26] 马佳,李颖,胡栋,等.芽孢杆菌生物防治作用机理与应用研究进展[J].中国生物防治学报,2018,34(4):639-648.
- [27] 谢心悦,贾慧慧,杨海清,等.芽孢杆菌 BJ-10 的鉴定及其抑菌活性与防病作用[J].北京农学院学报,2020,35(2):1-5.