

季倩茹,陈静,胡远亮,等. 3 种芽孢杆菌菌剂对黄瓜枯萎病的防效及其作用机制初探[J]. 华中农业大学学报,2020,39(5):101-107.

DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2020.05.014

3 种芽孢杆菌菌剂对黄瓜枯萎病的防效及其作用机制初探

季倩茹¹,陈静¹,胡远亮^{1,2},梁运祥¹,胡咏梅¹

1.华中农业大学生命科学技术学院,武汉 430070; 2.湖北师范大学生命科学学院,黄石 435002

摘要 以含有黄瓜枯萎病病原菌(尖孢镰刀菌)的病土为材料,采用盆栽试验研究巨大芽孢杆菌 B213、多粘类芽孢杆菌 B207 和枯草芽孢杆菌 B204 单独或联合施用对黄瓜枯萎病的防效,并对其作用机制进行初步分析。结果显示:3 种芽孢杆菌单独或组合施用后均可有效抑制黄瓜枯萎病的发生,并显著增加黄瓜植株的生物量,且三菌剂联用>双菌剂联用>单菌剂施用。在黄瓜幼苗移栽后 35 d,与对照组相比,三菌剂联用组黄瓜枯萎病的发病率降低了 79.99%;植株干质量提高了 6.92 倍;植株抗性酶如苯丙氨酸解氨酶、多酚氧化酶、过氧化物酶活性分别提高了 60.02%、28.90%和 108.60%;根际土壤尖孢镰刀菌数量下降了 2 个数量级。该防病促生效果可能与这 3 种芽孢杆菌对病原菌的拮抗作用、溶磷能力以及吡啶乙酸、蛋白酶、几丁质酶和嗜铁素的分泌能力有关。

关键词 芽孢杆菌;黄瓜枯萎病;抗性相关酶;防效;生物防治;拮抗作用;微生物菌剂;混合接种生防菌

中图分类号 S 182 : S 436.421.1⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2020)05-0101-07

黄瓜是我国的种植历史已有 2 000 多年,种植规模和产量都居世界前列。黄瓜枯萎病(cucumber fusarium wilt)是威胁黄瓜的主要土传病害之一,在黄瓜的整个生长过程中均能发生,且以开花结果期发病率最高。其症状为茎基部变为黄褐色,子叶失水缢缩、萎蔫,植株逐渐枯死^[1]。黄瓜枯萎病是由黄瓜专化型尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, FOC)引起的全球性的土传病害,严重影响黄瓜的产量和品质^[2]。该病原菌在任何生长阶段都会通过根或茎侵染宿主植物的维管束系统,破坏养分运输,从而影响养分吸收^[3]。通常枯萎病发病率 10%~30%,严重时可达 50%甚至绝收^[4]。

在现有的枯萎病防治方法中,育种、嫁接等农业防治以及化学药剂喷洒、浸种等措施存在效率低、田间管理难度大、污染环境等缺点,而生物防治既能有效控制病害,又有利于农业的可持续发展,符合现代农业发展新形势,具有广阔的发展前景^[5]。微生物菌剂主要通过竞争、抗生、重寄生和诱导抗性来防治病害。例如,生防菌可通过占据所有可能被病原菌侵染的位点或与病原菌争夺营养物质来减少土壤中病原菌的含量^[6]。研究表明,*Bacillus subtilis* 可产

生对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)有较强抗生抑制作用的抗菌小肽^[7]。生防菌还可先识别目标病原菌,再侵染到病原菌内,通过代谢活动溶解寄主细胞,引起病原菌的死亡^[8]。对植物有益的微生物可通过抑制植物病原体而直接诱导植物的系统抗性,从而间接地保护植物^[9]。

生防菌在植物病害中的防治应用虽已有多年历史,但大多数仍然是基于单一菌剂的研究和应用。混合接种生防菌可能增强生防菌的协同作用,达到持续防治植物病害的效果^[10-11]。与单一菌剂相比,双菌或三菌联用或可更好地降低黄瓜枯萎病的发病率^[12]。目前生物肥产业已呈现出由单一菌种向复合菌种转化的趋势^[13],然而芽孢杆菌菌剂混合施用是否对黄瓜枯萎病具有防病促生、协同增效效果报道并不多见。笔者所在实验室在前期工作中获得了 3 株具有优良特性的芽孢杆菌菌株——巨大芽孢杆菌 B213、多粘类芽孢杆菌 B207、枯草芽孢杆菌 B204,但对其单独或联用的防病促生效果还不明确。本研究以含有黄瓜枯萎病的病原菌(尖孢镰刀菌)的病土为材料,采用盆栽试验,分析这 3 种芽孢杆菌菌剂对黄瓜的防病促生效果,并对其作用机制

收稿日期:2019-12-16

基金项目:国家自然科学基金项目(41601257);中国博士后科学基金项目(2015M580653);农业微生物学国家重点实验室开放课题(AM-LKF201708)

季倩茹,硕士研究生。研究方向:土传病害与农用复合微生物菌剂。E-mail: 506713971@qq.com

通信作者:胡咏梅,博士,副教授。研究方向:根际微生物区系与土传病害防治。E-mail: plum73@163.com

进行初步研究,旨在为进一步开发生防菌及微生物复合肥料提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1) 菌株。巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) B213, 简称 Bm; 多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*) B207, 简称 Bp; 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) B204, 简称 Bs; 尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*), 均由笔者所在实验室保藏。

2) 黄瓜种子。津春 4 号, 购自天津科润农业科技公司。

3) 供试土壤。黄棕壤, 采集自华中农业大学水稻田(30°27'N, 115°05'E, 海拔 30 m, 中亚热带与北亚热带之间的过渡地带)。土壤的基本理化性质: 有机质 5.49%, 碱解氮 140.65 mg/kg, 速效磷 100.64 mg/kg, 速效钾 299.47 mg/kg, pH 7.49。

4) 有机肥料。发酵干鸡粪, 购自河北德沃多肥料公司。养分含量: 有机质 50%, 水分 0.95%, 全氮 1.64%, 全磷 3.72%, 全钾 2.58%。

5) 主要仪器。DL-CJ-2ND 医用型洁净超净工作台, 北京东联哈尔仪器制造公司; LDZX-50FDS 高压蒸汽灭菌器, 上海申安医疗器械厂; PL303 电子分析天平, 梅特勒-托利多仪器公司; 恒温培养箱, 上海索普仪器有限公司; 722S 可见光光度计, 上海精密科学仪器公司; PCR 仪, 美国 BIO-RAD 公司; ZWY-211C 恒温摇床, 上海智城分析仪器公司。

1.2 病土的制备

供试土壤风干后过孔径 0.5 cm 筛备用。将尖孢镰刀菌接种到 PDA 液体培养基中, 于 30 °C、170 r/min 培养 5 d。用 4 层无菌纱布滤去菌丝, 用血球计数板计算滤液中孢子数量, 并用无菌水配制成 4×10^6 cfu/mL 的孢子悬浮液^[14], 按照 50 mL/kg 将其接种在健康土壤中。病土放置 7 d 后备用。

1.3 芽孢杆菌菌剂的制备

将活化后的 3 种芽孢杆菌分别按 1% 比例接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 培养 32~48 h 后离心, 用无菌水重悬菌悬液, 使其中的芽孢达到 1×10^8 cfu/mL。按等体积比分别配制双菌组合菌剂及三菌组合菌剂, 将上述菌悬液分别均匀混入无菌有机肥中, 使芽孢杆菌在有机肥中达到 5×10^7 cfu/g。

1.4 盆栽试验和植物抗性酶测定

盆栽试验共设 8 个处理, 每处理 8 盆, 每盆含 1 kg 土、20 g 有机肥, CK 组不接种菌悬液, 用等体积的无菌蒸馏水替代; Bm 组接种 Bm 菌悬液; Bp 组接种 Bp 菌悬液; Bs 组接种 Bs 菌悬液; BmBp 组接种 Bm 和 Bp 复合菌悬液; BmBs 组接种 Bm 和 Bs 复合菌悬液; BpBs 组接种 Bp 和 Bs 复合菌悬液; BmBpBs 组接种 Bm、Bp 和 Bs 复合菌悬液。

取温室营养钵中 2 叶 1 心的黄瓜幼苗移栽于各处理组的盆中。发病(>20% 的叶片萎蔫)后记录每个处理植株的发病情况并计算发病率。发病率 = 各处理发病植株株数/各处理植株总数 $\times 100\%$ 。移栽后第 35 天, 采用抖根法收集根际土壤^[15], 测量各处理组黄瓜植株的鲜质量、干质量。

1.5 植物抗性酶的测定

参照文献[16]测定新鲜叶片的抗性酶活性, 分别以 $D_{290\text{ nm}}$ 、 $D_{470\text{ nm}}$ 、 $D_{410\text{ nm}}$ 值变化 0.01 为 1 个苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)的酶活力单位, U。

1.6 根际土壤病原菌数量的测定

采用 SYBR 染料法和荧光定量 PCR 测定根际土壤尖孢镰刀菌的数量。尖孢镰刀菌特异性引物为 β -tubulin F: 5'-TACTTCAACGAGGTATGCAT-TAACAG-3' 和 β -tubulin R: 5'-GGTACCAGGCT-CAAGATCGAC-3'^[17]。反应体系(20 μ L)为: Low Rox(购自上海翊圣生物科技公司)10 μ L, 引物 β -tubulin F 和 β -tubulin R 各 0.5 μ L, 模板 DNA 2 μ L, ddH₂O 7 μ L。反应条件: 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 30 s, 38 个循环。

1.7 抑菌效果的测定

采用平板对峙法测定芽孢杆菌的抑菌效果^[18]。在倒有 PDA 培养基的培养皿中央接种一块直径 0.6 cm 的尖孢镰刀菌菌饼, 距菌饼四周 2.5 cm 处用无菌牙签点接供试细菌, 30 °C 培养, 观察并记录抑菌圈的形成, 计算抑菌率。

1.8 吲哚乙酸(IAA)分泌能力的测定

将活化后的菌株分别接种至含 5 mmol 色氨酸的 LB 液体培养基中, (28 $\pm$ 2) °C、170 r/min 摇床培养 2 d, 10 000 r/min 离心 10 min 后, 取上清液 1 mL, 加入 PC 显色剂 4 mL, 静置 30 min 后测定 $D_{530\text{ nm}}$ 值, 带入标准曲线计算菌株产 IAA 的量^[19]。

1.9 溶磷能力的测定

将菌株点接于磷酸钙固体培养基上, (28 $\pm$

2) $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 观察菌株是否形成溶磷圈。用钼锑抗比色法测定上清液中有效 P 含量^[20]。

1.10 产蛋白酶的测定

将活化后的菌株点接于脱脂牛奶固体培养基上, $(28 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 观察菌株周围有无透明圈产生。

1.11 产几丁质酶的测定

分别以几丁质和胶体几丁质为唯一碳源对 3 个菌株进行液体发酵培养, 发酵上清液与胶体几丁质混合, 37°C 恒温水浴 30 min, 加入 3,5-二硝基水杨酸试剂(DNS), 沸水浴 10 min, 通过液体的颜色变化检测是否存在还原糖^[21]。

1.12 产嗜铁素的测定

在 LB 液体培养基中接种活化后的菌株, 30°C 、170 r/min 摇床培养 24 h, 取离心后的上清液和

CAS 显色液按等比例混合, 避光显色 2 h, 观察颜色变化^[22]。

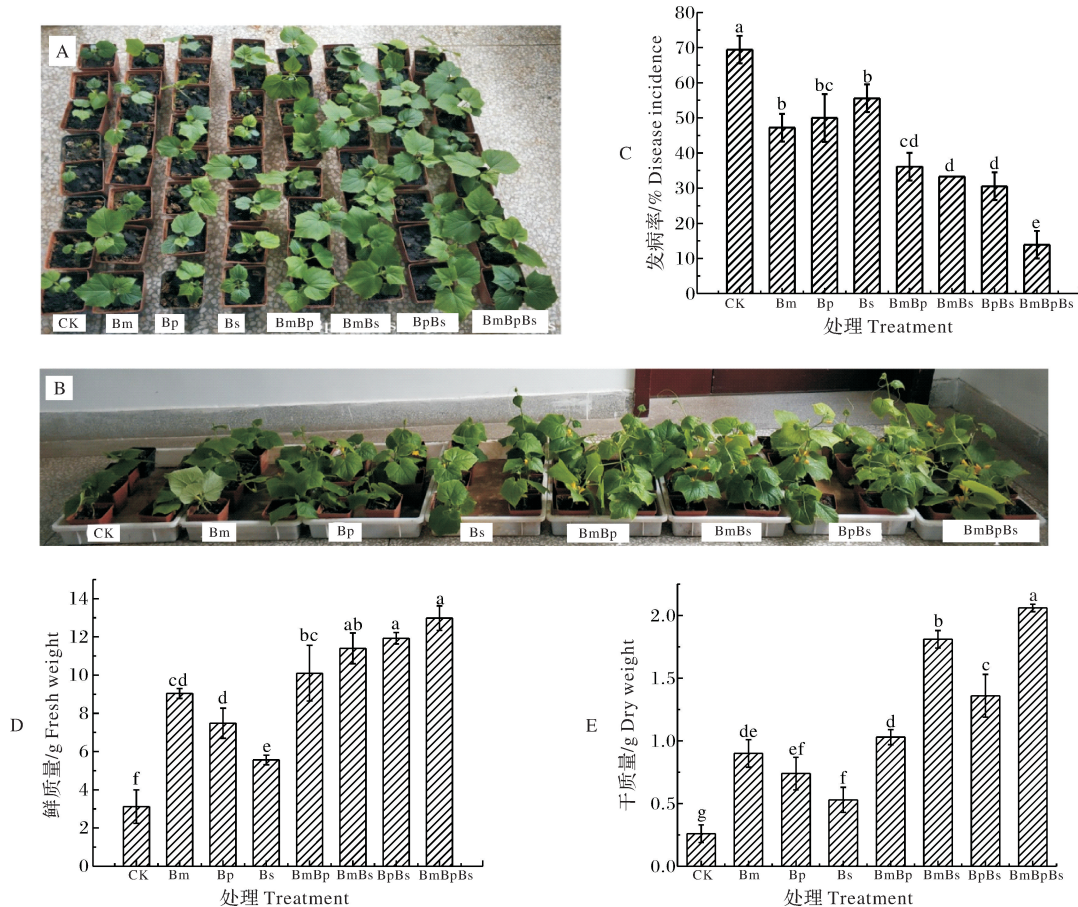
1.13 数据处理

数据的处理在 Excel 2011 中完成, 绘图使用 Origin 8.6 完成, 数据统计分析使用 SPSS 12.0 进行, 样品间的差异采用 one-way ANOVA 单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 芽孢杆菌单独或混合施用对黄瓜枯萎病的防效及生物量的影响

黄瓜幼苗移栽 14 d 后, 芽孢杆菌单独或混合施用组的黄瓜长势均明显好于对照组, 其植株高大, 叶片肥硕, 色泽油亮鲜绿, 而对照组的黄瓜植株矮小, 叶片瘦小, 且部分叶片卷曲生长缓慢, 有患病趋势(图 1A)。



A: 黄瓜幼苗移栽 14 d 后的生长状态; B: 黄瓜幼苗移栽 35 d 后的生长状态; C: 黄瓜枯萎病发病率; D: 黄瓜植株的鲜质量; E: 黄瓜植株的干质量。A: Growth status of cucumber on the 14th day of transplantation; B: Growth status of cucumber on the 35th day of transplantation; C: Incidence of cucumber fusarium wilt; D: Plant fresh weight; E: Plant dry weight. 柱形图中不同小写英文字母为 $P < 0.05$, 下同。Different letters in column charts indicate significant different at $P < 0.05$, the same as below.

图 1 芽孢杆菌单独或混合施用对黄瓜枯萎病的防效及生物量的影响

Fig.1 Effects of *Bacillus* alone or in combination on the control effect of cucumber fusarium wilt and biomass

黄瓜幼苗移栽 35 d 后,对照组的患病植株最多,叶片萎蔫,茎部缢缩有水渍浸出,生长缓慢或基本不生长;而芽孢杆菌菌剂组的黄瓜植株生长迅速,尤其是三菌剂或双菌剂联用组的植株更高、叶片更多,并长出丝蔓(图 1B)。从发病率的角度看,三菌剂联用组(BmBpBs)的黄瓜枯萎病发病率最低(13.89%),对黄瓜枯萎病的防效达 79.99%;双菌剂联用组的植株发病率低于单菌剂施用组;而对照组黄瓜枯萎病的发病率最高,达 69.44%(图 1C)。与对照组相比,三菌剂联用组的促生效果最好,鲜质量和干质量均最大,其中干质量提高了 6.92 倍;双菌剂联用组次之,优于单菌剂组,并显著高于对照组(图 1D 和图 1E),说明这 3 种芽孢杆菌具有协同增效的作用。

2.2 芽孢杆菌单独或混合施用对黄瓜抗性酶及病原菌数量的影响

苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)和多酚氧化酶(PPO)活性可作为植物抗逆和抗病能力的生理指标^[23-25]。由图 2A、B 和 C 可知,与对照组相比,菌剂组黄瓜叶片的 PAL、POD 和 PPO 活性分

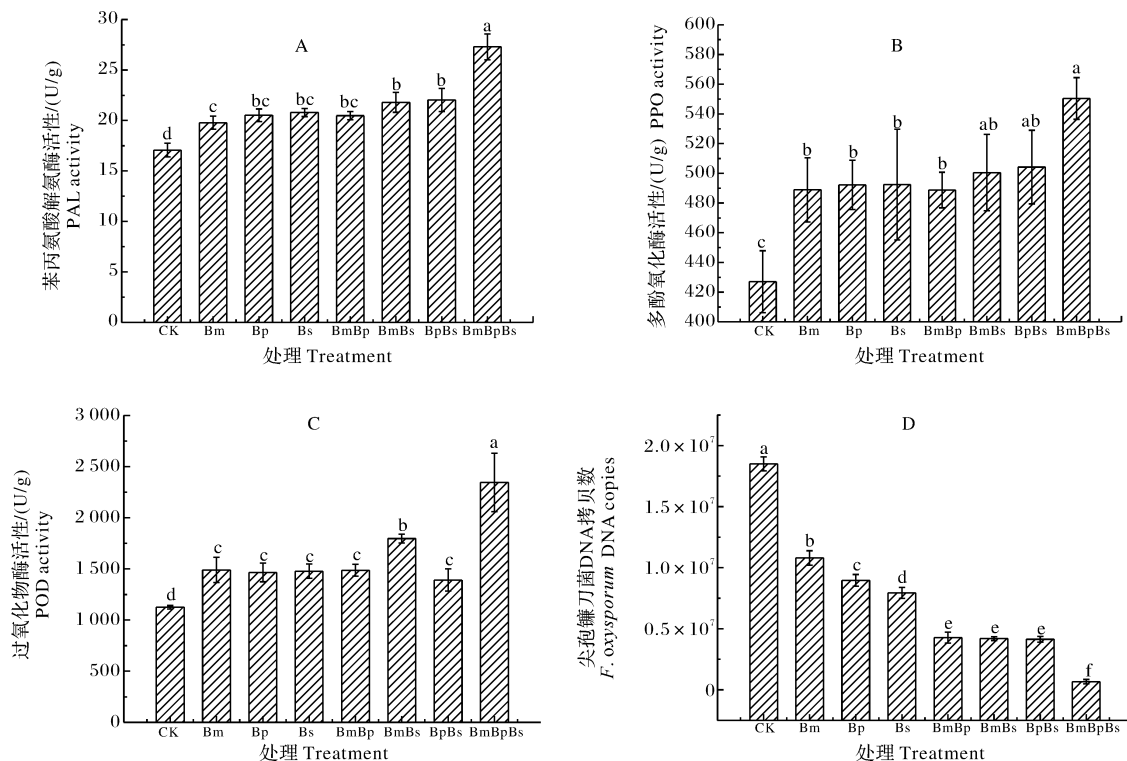
别提高了 15.94%~60.02%、23.76%~108.60% 和 14.44%~28.90%,其中三菌剂联用组的酶活最高,分别为 27.30、2 345.17 和 550.44 U/g。

8 个处理组的根际土壤病原菌 DNA 拷贝数为 $6.6 \times 10^5 \sim 1.85 \times 10^7$,其中对照组的最高,三菌剂联用组的最低(图 2D)。经计算可知,三菌剂联用组的尖孢镰刀菌数量比对照组降低了 2 个数量级;双菌剂联用组和单菌剂施用组的病原菌数量均比对照组降低了 1 个数量级。

2.3 芽孢杆菌的防病促生作用机制分析

1)对尖孢镰刀菌的拮抗作用。接种芽孢杆菌 Bp、Bs 5 d 后,病原菌菌落直径明显变小,菌丝体生长受到抑制且边缘逐渐溶化,呈现明显老化现象(图 3)。Bm、Bp 和 Bs 对黄瓜枯萎病菌的抑制率分别为 2.57%、49.19% 和 48.53%。

2)产吲哚乙酸和溶磷能力。由表 2 可知,芽孢杆菌 Bm、Bp、Bs 均具有分泌 IAA 的能力,其强弱顺序为:Bm>Bp>Bs,说明这 3 株芽孢杆菌均具有促进植物生长的潜力。



A: 叶片苯丙氨酸解氨酶活; B: 叶片过氧化物酶活; C: 叶片多酚氧化酶活; D: 病原菌 DNA 拷贝数。A: Leaf PAL activity; B: Leaf PPO activity; C: Leaf POD activity; D: Pathogenic bacteria DNA copies.

图 2 芽孢杆菌单独或混合施用对黄瓜抗性酶及病原菌数量的影响

Fig.2 Effects of *Bacillus* alone or in combination on the control effect of cucumber resistant enzymes and pathogens

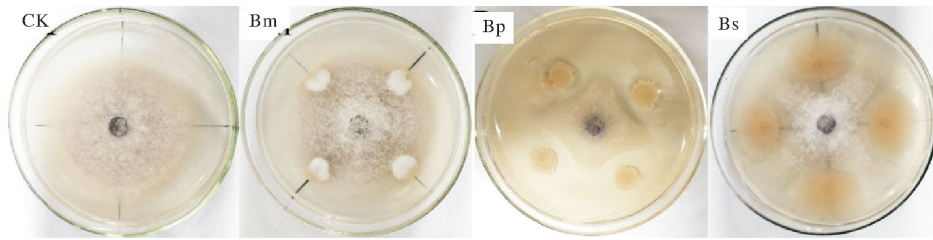


图3 3种芽孢杆菌对尖孢镰刀菌的拮抗作用

Fig.3 Antagonistic effects of three *Bacillus* strains on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*

表2 3种芽孢杆菌产吲哚乙酸和溶磷能力

Table 2 Indoleacetic acid-producing and phosphorus-dissolving capabilities

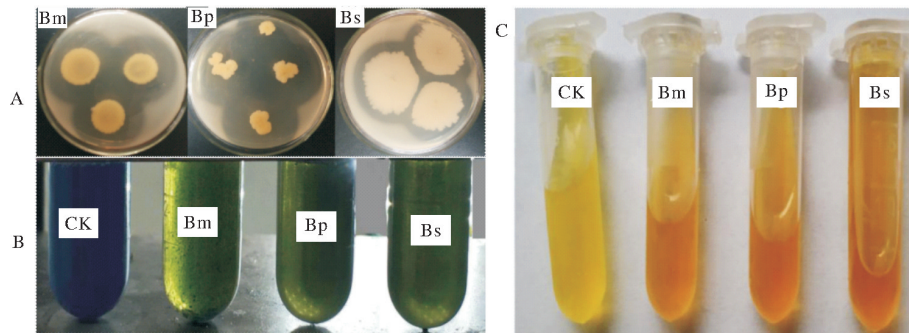
菌株 Strains	IAA/ ($\mu\text{g/mL}$)	溶磷量/(mg/L) Amount of dissolved phosphorus
Bm	46.2	35
Bp	24.8	18
Bs	20.1	29

芽孢杆菌 Bm、Bp、Bs 均具有溶磷能力,其强弱顺序为: Bm>Bs>Bp,说明这3株菌均可将土壤中难溶性磷转化为可供植物吸收利用的磷,从而促进

植物的生长发育。

3)产蛋白酶、嗜铁素和几丁质酶的能力。蛋白酶可能通过降解真菌的细胞壁来达到生防的效果,是芽孢杆菌的抑菌机制之一。由图4A可见,Bm、Bp、Bs菌落周围均可见明显的蛋白水解圈,表明它们均产生了蛋白酶。

嗜铁素是一种重要的生物活性物质。如图4B所示,与CK对比,Bm、Bp、Bs管中有明显的颜色变化,表明这3株菌均有产生嗜铁素的能力。



A:产蛋白酶;B:产嗜铁素;C:产几丁质酶。A:Protease production; B:Ferrophilin production; C:Chitinase production.

图4 3种芽孢杆菌产蛋白酶、嗜铁素和几丁质酶的能力

Fig.4 Protease, ferrophilin and chitinase-producing capabilities

几丁质酶可降解病原真菌的细胞壁来达到抑制尖孢镰刀菌的目的。如图4C所示,以几丁质为唯一碳源的 Bm、Bp、Bs 发酵上清液与胶体几丁质的溶液经沸水浴后,均变为棕红色,说明几丁质被部分水解成了还原糖,表明 Bm、Bp、Bs 均具有产几丁质酶的能力。

3 讨论

目前,随着农业生产越来越规模化、产业化,土传病害问题也随之而来,且在现有耕作制度下,土壤肥料使用不合理、土壤肥力衰退等问题日益突出,十分不利于我国农业发展^[26]。微生物肥料的出现成为必然趋势,使用复合微生物菌剂防治黄瓜枯萎病也进入了大众的视野。有研究证明,由菌株 *Paeni-*

bacillus sp. 300 和 *Streptomyces* sp. 385 按 1:1 或 4:1 的比例混合使用比每种菌株单独使用或按其他比例混合更能显著控制黄瓜枯萎病^[27]。枯草芽孢杆菌 BSD-2、放线菌 S317、木霉 T36 三种生防菌联用也可改善黄瓜的生长状况,有效降低黄瓜枯萎病的发病率^[12]。

本研究通过盆栽试验探讨了微生物菌剂的联用效果,结果表明,芽孢杆菌处理组的黄瓜植株长势、鲜质量、干质量都显著优于对照,并且能有效地抑制黄瓜枯萎病的发生,减少发病率。在这些促生抗病效果上,双菌剂联用优于单菌剂施用,三菌剂联用优于双菌剂联用的效果,这种梯度式的变化揭示了微生物菌剂在联用方面具有一定的规律性和可控性。试验结果还表明,施用复合微生物使植物叶片的 3

种抗性酶活性都有一定程度的提高,且明显抑制了土壤根际病原菌的数量,使土壤微生物群落向更健康的状态发展。

芽孢杆菌具有促进植物生长和提高植物抗逆性的潜能,在土壤生态恢复的过程中,发挥着提高土壤肥力、解磷和解钾的作用^[28]。本研究中菌株 Bm、Bp、Bs 均有产 IAA、几丁质酶、蛋白酶、嗜铁素和溶磷的能力。其中,IAA 可以强化植物根部的生长分化,有利于根系对营养物质的获取^[29],而嗜铁素在植物铁元素调控中潜力巨大^[30],这些生理特性更进一步揭示了黄瓜枯萎病的防控机制,为筛选出更具有优良植物促生作用的菌株提供了思路。

在倡导绿色健康农业的大环境下,生物防治作为一种功能多样、安全有效的措施,其发展前景十分广阔。微生物种类繁多,功能丰富,探究更多微生物的不同组合以及根际土壤中微生态的变化,使土地问题从根本上得到有效治理,是今后发展的方向。

参考文献 References

- [1] 马晓凤. 黄瓜枯萎病综合防控[J]. 西北园艺: 综合, 2019(5): 51-52. MA X F. Comprehensive prevention and control of cucumber wilt[J]. Northwest horticulture, 2019(5): 51-52 (in Chinese).
- [2] OWEN J H. Fusarium wilt of cucumber [J]. Phytopathology, 1955, 45: 435-439.
- [3] SUN Y, WANG M, LI Y, et al. Wilted cucumber plants infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* do not suffer from water shortage [J]. Ann Bot, 2017, 120(3): 427-436.
- [4] HU J L, LIN X G, WANG J H, et al. Arbuscular mycorrhizal fungal inoculation enhances suppression of cucumber fusarium wilt in greenhouse soils[J]. Pedosphere, 2010, 20(5): 586-593.
- [5] 杨侃侃, 刘晓虹, 陈宸, 等. 黄瓜枯萎病研究进展[J]. 湖南农业科学, 2019(6): 121-124. YANG K K, LIU X H, CHEN C, et al. Research progress of cucumber fusarium wilt[J]. Hunan agricultural sciences, 2019(6): 121-124 (in Chinese with English abstract).
- [6] PAULITZ T C. Population dynamics of biocontrol agents and pathogens in soils and rhizospheres[J]. European journal of plant pathology, 2000, 106: 401-413.
- [7] LI X, MA F H, WANG X J, et al. Identification of bio-control bacterial strain KJB04-11 against soybean root rot disease and the produced lipopeptide antibiotics by the strain[J]. Chinese journal of ecology, 2012, 31: 1453-1460.
- [8] ROJANP J, TYAGI R D, PRÉVOST D, et al. *Mycoparasitic trichoderma viride* as a biocontrol agent against *Fusarium oxysporum* f. sp. *adzuki* and *Pythium arrhenomanes* and as a growth promoter of soybean[J]. Crop protection, 2010, 29: 1452-1459.
- [9] PIETERSE C M, ZAMIOUDIS C, BERENDSEN R L, et al. Induced systemic resistance by beneficial microbes [J]. Annual review of phytopathology, 2014, 52: 347-375.
- [10] MEYER S L F, ROBERTS D P. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soil-borne plant-pathogenic fungi[J]. Journal of nematology, 2002, 34: 1-8.
- [11] 陈雪丽, 王光华, 金剑, 等. 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, et al. Biocontrol effect of *Paenibacillus polymyxa* BRF-1 and *Bacillus subtilis* BRF-2 on fusarium wilt disease of cucumber and tomato[J]. Chinese journal of eco-agriculture, 2008, 16: 446-450 (in Chinese with English abstract).
- [12] 麻耀华. 复合微生物防治黄瓜枯萎病作用机制初步研究[D]. 石家庄: 河北师范大学, 2012. MA Y H. Preliminary study on the mechanism of compound microorganisms in controlling cucumber fusarium wilt[D]. Shijiazhuang: Hebei Normal University, 2012 (in Chinese with English abstract).
- [13] 范丙全. 我国生物肥料研究与应用进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2017, 23(6): 1602-1613. FAN B Q. Advances in biofertilizer research and development in China[J]. Journal of plant nutrition and fertilizers, 2017, 23(6): 1602-1613 (in Chinese with English abstract).
- [14] MITSUBOSHI M, KIOKA Y, NOGUCHIK, et al. An evaluation method for the suppression of pathogenic fusarium oxysporum by soil microorganisms using the dilution plate technique[J]. Microbes & environments, 2016, 31: 307-313.
- [15] BLAGODATSKAYA E, BLAGODATSKY S, ANDERSON T H, et al. Microbial growth and carbon use efficiency in the rhizosphere and root-free soil [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(4): e93282 [2019-12-16]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093282>.
- [16] 刘新. 植物生理学实验指导 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2015. LIU X. Plant physiology experimental guidance [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2015 (in Chinese).
- [17] 汲珊珊, 李君文, 安娜, 等. 尖孢镰刀菌 TaqMan 探针荧光定量 PCR 快速检测方法的建立及应用[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(6): 30-33. JI S S, LI J W, AN N, et al. Establishing and applying of TaqMan probe real-time PCR detection of fusarium oxysporum[J]. Journal of modern laboratory medicine, 2012, 27: 30-33 (in Chinese with English abstract).
- [18] KULLNIG C, MACH R L, LORITO M, et al. Enzyme diffusion from *Trichoderma atroviride* (= *T. harzianum* P1) to *Rhizoctonia solani* is a prerequisite for triggering of *Trichoderma ech42* gene expression before mycoparasitic contact[J]. Applied & environmental microbiology, 2000, 66: 2232-2234.
- [19] 李显刚, 王小利, 姚拓, 等. 溶磷菌的溶磷、分泌 IAA 及有机酸特性研究[J]. 土壤通报, 2012, 43(6): 1385-1390. LI X G, WANG X L, YAO T, et al. Characters of solubilizing phosphate, secreting IAA and organic acids of phosphorus-solubilizing bacteria from rhizosphere of lotus corniculatus[J]. Chinese journal of soil science, 2012, 43(6): 1385-1390 (in Chinese with English abstract).
- [20] SMITH K P, GOODMAN R M. Host variation for interactions

- with beneficial plant-associated microbes[J]. Annual review of phytopathology, 1999, 37: 473-491.
- [21] 李华,刘开启,王革.利用还原糖法测定木霉菌产几丁质酶特性[J].仲恺农业工程学院学报, 2003, 16(1): 19-22. LI H, LIU K Q, WANG G. Study on the characteristics of chitinase produced by *Trichoderma* spp. with measuring reducing sugar[J]. Journal of Zhongkai Agrotechnical College, 2003, 16(1): 19-22 (in Chinese with English abstract).
- [22] SEMENIUK E G, STREMOVSKI O A, ORLOVA I V, et al. Biosynthesis of mini-antibodies to human ferritin in plant and bacterial producers[J]. Molecular biology, 2003, 37: 780-786.
- [23] 吴琼,方吴云,王文杰.机械损伤诱导植物苯丙氨酸解氨酶活性研究进展[J].现代农业科技, 2016(1): 157-158. WU Q, FANG W Y, WANG W J. Research advance of wounding induced phenylalanine ammonia-lyase activity in plant[J]. Modern agricultural science and technology, 2016(1): 157-158 (in Chinese with English abstract).
- [24] 张明菊,张浩,朱华国,等.黄萎病对海/陆嫁接棉苗叶片中 H_2O_2 、抗病相关酶活性和GST、PAL基因表达的影响[J].华中农业大学学报, 2020, 39(3): 28-37. ZHANG M J, ZHANG H, ZHU H G. Effects of *Verticillium dahliae* on H_2O_2 content, activities of disease resistance-related enzymes, gene expression of GST and PAL in leaves of upland cotton grafted seedlings[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2020, 39(3): 28-37 (in Chinese with English abstract).
- [25] 王曼玲,胡中立,周明全,等.植物多酚氧化酶的研究进展[J].植物学通报, 2005, 22(2): 215-222. WANG M L, HU Z L, ZHOU M Q, et al. Advances in research of polyphenol oxidase in plants[J]. Chinese bulletin of botany, 2005, 22(2): 215-222 (in Chinese with English abstract).
- [26] 张生来.农业可持续发展中土壤肥料问题研究[J].河南农业, 2019(11): 49, 215. ZHANG S L. Study on soil and fertilizer in sustainable agricultural development [J]. Henan agriculture, 2019(11): 49, 215 (in Chinese).
- [27] SINGH P P, SHIN Y C, PARK C S, et al. Biological control of fusarium wilt of cucumber by chitinolytic bacteria [J]. Phytopathology, 1999, 89: 92-99.
- [28] TAHVONEN T. Microbial control of plant diseases with *Streptomyces* spp. 1[J]. Eppo Bulletin, 2010, 18: 55-59.
- [29] MANO H, MORISAKI H. Endophytic bacteria in the rice plant [J]. Microbes and environments, 2008, 23(2): 109-117.
- [30] 张礼.细茎石斛相关细菌多样性及拮抗促生特性研究[D].南京:南京师范大学, 2014. ZHANG L. Study on the bacterial diversity and antagonistic properties of dendrobium candidum [D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2014 (in Chinese with English abstract).

Control effect of three *Bacillus* strains on cucumber fusarium wilt and its mechanism

JI Qianru¹, CHEN Jing¹, HU Yuanliang^{1,2}, LIANG Yunxiang¹, HU Yongmei¹

1.College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2.College of Life Sciences, Hubei Normal University, Huangshi 435002, China

Abstract The pot experiment with the soil containing pathogens of *Fusarium oxysporum* f. sp. was conducted to study the effects of *Bacillus megaterium* B213, *Bacillus polymyxa* B207, and *Bacillus subtilis* B204 alone or in combination on cucumber fusarium wilt and its mechanism. The results showed that the three microbial agents alone or in combination effectively inhibited the occurrence of cucumber fusarium wilt and significantly increased the biomass of cucumber. The effect of the two microbial agents in combination was better than that of single microbial agent. The effect of the three microbial agents in combination was better than that of the two microbial agents. Compared with the control group, the incidence of cucumber fusarium wilt in the three-agent combination group when cucumber seedlings were transplanted 35 days ago reduced by 79.99%; the dry weight of cucumber plants increased by 6.92 times; the activities of plant resistance enzymes including acid lyase, polyphenol oxidase, and peroxidase increased by 60.02%, 28.90%, and 108.60% respectively; the number of rhizosphere soil *Fusarium oxysporum* decreased by 2 orders of magnitude. The effect of disease prevention and growth promoting may be related to the antagonism on the pathogenic bacteria, the ability to dissolve phosphorus, and the secretory ability of indoleacetic acid, protease, chitinase and ferrophilin of these three *Bacillus* species.

Keywords *Bacillus*; cucumber fusarium wilt; resistance-related enzymes; control effect; biocontrol; antagonism; microbial inoculant; mixed inoculation with biocontrol bacteria

(责任编辑:张志钰)