

网络出版时间:2013-08-26 17:30

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20130826.1730.008.html>

番茄灰霉病菌拮抗菌 D6 和 D10 发酵条件的优化及其抑菌效果

邓振山¹, 侯改成¹, 孙志宏¹, 李 军², 韦革宏³

(1 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000; 2 延安市微生物研究所, 陕西 延安 716000;

3 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 【目的】优化番茄灰霉病菌拮抗菌的发酵条件, 初步探究其抑菌效果, 为番茄灰霉病菌的生物防治提供潜在的资源菌。【方法】以前期从大蒜鳞茎中筛选出的拮抗菌 D6 和 D10 为研究试材, 以接种量、温度、摇床转速和装液量为考察因素, 设计四因素三水平正交试验, 对 D6 和 D10 的发酵条件进行优化, 并研究优化条件下 D6 和 D10 的无菌滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用。【结果】D6 和 D10 的最佳摇床培养条件分别为, D6: 接种量 4%, 温度 22 ℃, 转速 180 r/min, 装液量 50 mL; D10: 接种量 4%, 温度 26 ℃, 转速 150 r/min, 装液量 75 mL。当 D6 的无菌滤液质量分数达到 15% 时, 其抑制率最高达到 85.33%; 当 D10 的无菌滤液质量分数达到 10% 时, 其抑制率最高达到 70.67%。在 121 ℃ 时, D6 无菌滤液的热稳定性较好, 而 D10 的无菌滤液却失去了生物活性。【结论】在优化条件下培养的 D6 和 D10 无菌滤液对番茄灰霉病菌有一定的抑制作用, D6 的无菌滤液热稳定性较好。

[关键词] 番茄灰霉病菌; 拮抗内生菌; 无菌滤液; 抑菌效果

[中图分类号] Q93; S436.412.1⁺3

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2013)09-0073-05

Optimized fermentation conditions of antagonistic strains D6 and D10 and their inhibitory effect to *Botrytis cinerea*

DENG Zhen-shan¹, HOU Gai-cheng¹, SUN Zhi-hong¹, LI Jun², WEI Ge-hong³

(1 Life Science Department, Yan'an University, Yan'an, Shaanxi 716000, China; 2 Yan'an Institute of Microbiology, Yan'an, Shaanxi 716000, China; 3 College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】This study optimized the fermentation conditions of antagonistic strains to *Botrytis cinerea*, and explored their inhibitory effect preliminarily. 【Method】D6 and D10 strains were isolated from the garlic bulb in earlier stage. Inoculum density, culture temperature, shaker revolution and loading volume as investigated factors, 4 factors and 3 levels of orthogonal experimental were designed for optimized fermentation conditions of D6 and D10. Their optimum shaker cultivation conditions and germfree fermented filtration inhibitory effect on *B. cinerea* mycelial growth were investigated. 【Result】The obtained optimum shaker cultivation conditions were: D6 inoculum density 4%, culture temperature 22 ℃, shaker revolution 180 r/min and loading volume 50 mL and D10: inoculum density 4%, culture temperature 26 ℃, shaker revolution 150 r/min, and loading volume 75 mL. Highest inhibitory rates were up to 85.33% with the filtrate concentration of 15% and 70.67% with the filtrate concentration of 10%. When the temperature was 121 ℃, the filtration of D6 was stable, while D10 lost biological activity. 【Conclusion】Germ-

[收稿日期] 2012-11-06

[基金项目] 陕西省科技统筹创新工程项目(2012CGX7); 陕西省高水平大学建设专项(2012SXTS03)

[作者简介] 邓振山(1969—), 男, 陕西黄陵人, 讲师, 博士, 主要从事植物病害综合防治和环境微生物研究。

E-mail: zhenshandeng214@yahoo.com.cn

free fermented filtrations of D6 and D10 had a striking inhibitory effect to *B. cinerea*. D6 showed good thermal stability and should be further studied.

Key words: *Botrytis cinerea*; endophytic antagonistic bacteria; germfree fermented filtrate; inhibitory effect

番茄灰霉病是一种世界性的重要病害,广泛危害茄果类和瓜类等蔬菜,主要造成果实腐烂,是危害番茄的严重病害。该病自 20 世纪 80 年代开始在我国发生并蔓延,近年来,番茄灰霉病日趋严重,已成为制约番茄生产的主要因素之一^[1]。目前化学农药仍是防治该病害的主要措施,但长期使用不仅诱发病原菌产生抗药性,增加了番茄灰霉病的防治成本,而且易伤害非靶标生物,污染环境,严重破坏生态平衡^[2]。生物农药以其无毒、无害、无污染,不易产生抗药性,保持生态平衡等优点,成为国内外学者研究的焦点。随着健康意识的增强和对无公害蔬菜的需求增加,人们通过大量筛选和利用抗植物病原真菌的有益微生物及其代谢产物,使生物防治日益成为控制植物病原真菌的一条重要而有效的途径。宋兴舜等^[3]报道,大蒜素对番茄病菌具有良好的抑制效果;尉婷婷等^[4]报道,大蒜鳞茎粗提液对番茄灰霉病有很好的抑制效果;宋卫国等^[5]研究认为,大蒜素对番茄灰霉病菌具有良好的抑制效果,但其提取工艺复杂,成本较高,不易推广。

延安大学生命科学学院微生物实验室前期从大蒜鳞茎中已经分离出 63 株内生菌,其中有 22 株对番茄灰霉病菌有一定的抑制作用,其中菌株 D6 和 D10 对番茄灰霉病菌的抑菌活性较强,其抑制率分别为 77.5%和 70.2%^[6],但有关这 2 种拮抗菌的最优发酵条件及其无菌滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用等相关研究还未涉及。鉴于此,本研究以拮抗菌 D6 和 D10 为材料,以抑制率为指标,接种量、温度、摇床转速和装液量为因素,优化 D6 和 D10 的发酵条件,并初步探索优化条件下 2 种拮抗菌无

菌滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用,以及无菌滤液的热稳定性,以期为番茄灰霉病的生物防治提供潜在的资源菌。

1 材料与方法

1.1 材 料

拮抗菌:供试 D6 和 D10 菌株为前期从大蒜鳞茎中分离而得^[6]。

供试植物病原菌:番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*),由西北农林科技大学植物保护学院鉴定并惠赠。

供试培养基:(1)NA 固体培养基。牛肉膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2,121 ℃灭菌 25 min;(2)PDA 培养基。马铃薯 200 g,葡萄糖 20.0 g,琼脂 18.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 自然,115 ℃灭菌 25 min;(3)NA 液体培养基。牛肉膏 3.0 g,氯化钠 5.0 g,蛋白胨 10.0 g,蒸馏水 1 000 mL,pH 7.2,121 ℃灭菌 25 min。

1.2 方 法

1.2.1 拮抗菌发酵条件优化的试验设计 为了使拮抗菌 D6 和 D10 对番茄灰霉病菌有较好的抑制效果,采用单因子试验和正交试验确定其发酵的最优条件。依据影响抑制效果的主要因素(由预试验结果得出),选择接种量(A)、温度(B)、摇床转速(C)和装液量(D)为考察因素,每个因素设置 3 个水平,选用 $L_9(3^4)$ 正交试验确定番茄灰霉病菌发酵的最优条件,各试验因素及水平见表 1。

表 1 番茄灰霉病菌拮抗菌 D6 和 D10 发酵条件优化的 $L_9(3^4)$ 正交试验方案

Table 1 Schemes of orthogonal experimental for optimized fermentation conditions of antagonistic bacteria to *B. cinerea*

水平 Level	接种量/% Inoculum density	温度/℃ Culture temperature	摇床转速/(r·min ⁻¹) Shaker revolution	装液量/mL Loading volume
	A	B	C	D
1	2	18	150	50
2	4	22	180	75
3	6	26	210	100

1.2.2 拮抗菌无菌滤液的制备 将在 4 ℃下保存的 D6 和 D10 菌种转接到 NA 固体培养基中活化 3 次后,接种到 NA 液体培养基中,将 D6 和 D10 分别在温度为 22 ℃、转速 180 r/min 和温度为 26 ℃、转

速 150 r/min 的摇床中培养 48 h 后,分别装入 50 mL 离心管,用低温高速冷冻离心机 12 000 r/min 离心 3 次,每次 15 min,取上清液,用一次性针孔式微孔滤器(0.22 μm,50 mm,水系,混合纤维)过滤,

即得无菌滤液^[7],4℃保存备用。

1.2.3 拮抗菌无菌滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长的影响 将优化条件下制备的无菌滤液加入到定量的已融化(45℃)的 PDA 培养基中,使质量分数分别达到 2%,4%,6%,8%,10%,12%和 15%,充分混匀,倒入 15 mL 灭菌的 9 cm 培养皿中,待培养基冷却后在平板中央接种 5 mm 的番茄灰霉病菌菌饼,以无菌 PDA 培养基处理为空白对照,每处理重复 3 次,25℃恒温培养 24 h 后,用十字交叉法测量番茄灰霉病菌菌落直径,计算抑制率,抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。

1.2.4 无菌滤液的热稳定性 将 D6 和 D10 的无菌滤液经 40,60,80,100 和 121℃高压灭菌分别处理 25 min,冷却至室温,取无菌滤液加入定量的 PDA 培养基中,使其终质量分数达到 6%,充分混匀,倒入 15 mL 灭菌培养皿中,待培养基冷却后,采

用平板打孔法,在平板中央接种 5 mm 的番茄灰霉病菌菌饼,以 24℃无菌滤液为对照,每个处理重复 3 次,25℃恒温培养^[8] 24 h 后,用十字交叉法测量番茄灰霉病菌菌落的直径,计算抑制率。

1.3 数据处理
试验数据采用 Excel 2007 进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌 D6 和 D10 发酵条件的优化

由表 2 可以看出,D6 和 D10 的无菌滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长均有一定的抑制作用,D6 的抑制率最大可以达到 64.2%,D10 的抑制率最大可以达到 66.0%。分析正交试验结果可知,D6 发酵的最优条件组合是 A₂B₂C₃D₁,即接种量 4%,温度 22℃,摇床转速 180 r/min 和装液量 50 mL;D10 发酵的最优条件组合是 A₂B₃C₁D₂,即接种量 4%,温度 26℃,摇床转速 150 r/min 和装液量 75 mL。

表 2 番茄灰霉病菌拮抗菌 D6 和 D10 发酵条件优化的 L₉(3⁴)正交试验结果

Table 2 Orthogonal experimental result of optimized fermentation conditions of antagonistic bacteria to <i>B. cinerea</i>						
试验编号 Test number	接种量/% Inoculum density A	温度/℃ Culture temperature B	摇床转速/(r·min ⁻¹) Shaker revolution C	装液量/mL Loading volume D	抑制率/% Inhibitory rate	
					D6	D10
1	1	1	1	1	26.5	43.9
2	1	2	2	2	31.8	44.3
3	1	3	3	3	42.0	45.6
4	2	1	2	3	38.5	41.3
5	2	2	3	1	64.2	46.7
6	2	3	1	2	45.2	66.0
7	3	1	3	2	55.2	48.5
8	3	2	1	3	35.8	50.2
9	3	3	2	1	49.4	56.1

2.2 D6 和 D10 无菌滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长的影响

由表 3 可以看出,拮抗菌无菌滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长有一定的抑制作用,在一定范围内,随无菌滤液质量分数的增加菌落直径减小,而菌丝生长的抑制率相应提高。当 D6 的无菌滤液质量分数

达到 15%时,番茄灰霉病菌菌丝生长几乎完全受到了抑制,其抑制率高达 85.33%;当 D10 的无菌滤液质量分数达到 10%时,其抑菌率高达 70.67%,继续增大无菌滤液质量分数,其抑菌率变化不大,这可能与此无菌滤液中有效成分的生物活性有关。

表 3 D6 和 D10 不同质量分数无菌滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制效果

Table 3 Effect of germfree fermented filtration on <i>B. cinerea</i> mycelium growth				
无菌滤液质量分数/% Concentration	菌落直径/cm Diameters of colony		抑制率/% Inhibitory rate	
	D6	D10	D6	D10
0 (CK)	7.50±0.03 a	7.50±0.03 a	0.00	0.00
2	6.63±0.09 ab	4.90±0.16 c	11.60	34.67
4	4.60±0.06 c	4.20±0.02 c	38.70	44.00
6	2.40±0.03 d	2.70±0.03 d	68.00	64.00
8	2.10±0.06 de	2.50±0.03 d	72.00	66.70
10	1.87±0.03 e	2.20±0.06 d	74.70	70.67
12	1.20±0.05 ef	2.20±0.00 d	84.00	70.67
15	1.10±0.06 f	2.20±0.00 d	85.33	70.67

注:同列数据后标不同小写字母者表示差异显著(P<0.05)。下表同。
Note:Different lowercase letters in same column indicate significant difference (P<0.05). The same below.

2.3 D6 和 D10 无菌滤液的热稳定性

由表 4 可以看出,D6 和 D10 的无菌滤液经不同温度处理后,对照组的菌落直径分别为 2.41 和 2.72 cm,且随温度升高,D6 和 D10 的抑制率较对照组均有所下降。与对照相比,D6 无菌滤液的菌落直径随温度的升高而增大,121 ℃ 下菌落直径为 6.68 cm,这可能是由于无菌滤液中含有抑菌非蛋白

物质,且此抑菌物质对热具有较好的稳定性;在 40 ℃ 时抑制率为 49.4%,随温度的升高抑菌效果不断提高,到 121 ℃ 时抑制率为 63.9%,说明温度对无菌滤液的影响较小。D10 经不同温度处理后,抑菌效果也存在显著差异,但 121 ℃ 下抑制率为 0,菌落长满了整个平板,表明此抑制物质可能因高温失去生物活性。

表 4 番茄灰霉病菌拮抗菌 D6 和 D10 无菌滤液的热稳定性
Table 4 Stability of germfree fermented filtration after thermal treatment on *B. cinerea*

处理温度/℃ Temperature	菌落直径/cm Diameters of colony		抑制率/% Inhibitory rate	
	D6	D10	D6	D10
24(CK)	2.41±0.04 a	2.72±0.04 a	100.0	100.0
40	3.60±0.12 ab	2.84±0.06 a	49.4	4.0
60	4.72±0.07 b	5.11±0.05 bc	48.9	46.8
80	5.55±0.02 bc	6.20±0.08 c	56.6	56.1
100	6.15±0.03 c	6.53±0.04 cd	60.8	58.3
121	6.68±0.05 d	9.00±0.00 e	63.9	0.0

3 结论与讨论

内生菌具有多种生物学功能,能产生多种生物活性物质,内生菌对植物病害防治具有潜在的应用和开发价值^[9-10],因此植物内生菌作为一类新的微生物资源,成为当前研究的重点之一^[11-12]。本研究表明,当 D6 的无菌滤液质量分数达到 15%时,番茄灰霉病菌菌丝生长几乎完全受到抑制,其抑制率最高达到 85.33%;D10 的无菌滤液质量分数为 10%时,抑制率最高达到 70.67%。这与徐大勇等^[7]的研究结果,即“无菌滤液可以抑制番茄灰霉病菌菌丝生长,且浓度越高,抑制能力越强;当无菌滤液质量分数为 20%时,可完全抑制番茄灰霉病菌菌丝的生长”基本一致。D6 的无菌滤液经 121 ℃ 处理后仍然有抑菌活性,说明无菌滤液中可能存在抑菌的大分子物质,且有较好的热稳定性,能引起系统免疫,而 D10 中的抑菌物质因高温失去生物活性,说明该物质的热稳定性可能较差。本试验只测定了 D6 和 D10 的无菌滤液对番茄灰霉病菌菌丝生长的影响,未涉及到分生孢子的萌发和产生以及菌丝形态的研究,缺乏对其抑菌机制的探索,整个试验只停留在理论研究上,对于这 2 株菌株在番茄植株内的定殖能力和防病效果还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

[1] 李保聚,朱国仁,赵奎华,等. 番茄灰霉病在果实上的侵染部位及防治新技术 [J]. 植物病理学报,1999,29(1):63-67.
Li B J,Zhu G R,Zhao K H,et al. Infection gates of grey mould of tomato fruits and a new technique for its controlling [J]. Ac-

ta Phytopathologica Sinica,1999,29(1):63-67. (in Chinese)
[2] 彭好文,黎起秦,林 伟. 生物防治研究及其应用概况 [J]. 广西农业生物科学,2004,23(2):170-174.
Peng H W,Li Q Q,Lin W. Research on biological control and its applications [J]. Journal of Guangxi Agricultural and Biological Science,2004,23(2):170-174. (in Chinese)
[3] 宋兴舜,宋凤杰,于广建,等. 大蒜素对番茄 3 种真菌病害的影响 [J]. 东北农业大学学报,2004,35(4):395-398.
Song X S,Song F J,Yu G J,et al. Effect of the garlic allicin on three kinds of fungal diseases [J]. Journal of Northeast Agricultural University,2004,35(4):395-398. (in Chinese)
[4] 尉婷婷,程智慧,冯武煊. 大蒜鳞茎粗提物对番茄灰霉病的抑菌和防治效果 [J]. 西北农业学报,2010,19(6):176-180.
Wei T T,Cheng Z H,Feng W H. Inhibition and control effects of garlic bulb crude extracts on *Botrytis cinerea* in tomato [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2010,19(6):176-180. (in Chinese)
[5] 宋卫国,李宝聚,刘开启. 大蒜化学成分及其抗菌活性机理研究进展 [J]. 园艺学报,2004,31(2):263-268.
Song W G,Li B J,Liu K Q. Advances in research on chemical components in garlic (*Allium sativum*) and mechanism of their inhibitory reaction with pathogens in plants [J]. Acta Horticulturae Sinica,2004,31(2):263-268. (in Chinese)
[6] 邓振山,马娜娜,徐文梅,等. 大蒜鳞茎中抗番茄灰霉病菌内生菌的筛选及其防治效果 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2012,40(5):50-56.
Deng Z S,Ma N N,Xu W M,et al. Screening endophytic bacteria strains of anti-*Botrytis cinerea* from the garlic bulb and their control effect [J]. Journal of Northwest A&F University:Natural Science Edition,2012,40(5):50-56. (in Chinese)
[7] 徐大勇,李 峰. 番茄灰霉病菌拮抗内生细菌的筛选、鉴定及其活性 [J]. 生态学杂志,2012,31(4):994-999.
Xu D Y,Li F. Screening,identification,and bioactivity of an en-

dophytic bacterium from tomato against *Botrytis cinerea* [J]. Chinese Journal of Ecology,2012,31(4):994-999. (in Chinese)

[8] 陈 曼,李 赤,邱逸斯,等. 富贵竹黑腐病拮抗菌 H5 的抑菌机制及相关特性研究 [J]. 微生物学通报,2008,35(4):529-532.

Chen M,Li C,Qiu Y S,et al. Antagonistic mechanisms and related properties of strain H5 against black-rot disease of *Dra-caena sanderiana* [J]. Microbiology China,2008,35(4):529-532. (in Chinese)

[9] Adhikari Tika B,Joseph C M,Yang C,et al. Evaluation of bac-teria isolated from rice for plant growth promotion and biologi-cal control of seedling disease of rice [J]. Canadian Journal of Microbiology,2001,47:916-924.

[10] Howitt R L J,Beever R E,Pearson M N,et al. Genome char-acterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, botrytis vi-rus, reveals high amino acid identity to genes from plant pot-ex-like viruses [J]. Archives Virology,2006,151:563-579.

[11] 操海群,岳永德,花日茂,等. 植物源农药研究进展 [J]. 安徽农业大学学报,2000,27(2):40-44.

Cao H Q,Yue Y D,Hua R M,et al. Advance in pesticide of medical herbs [J]. Journal of Anhui Agricultural University,2000,27(2):40-44. (in Chinese)

[12] 孙力军,陆兆新. 植物内生菌抗菌活性物质研究进展 [J]. 食-品与发酵工业,2005,31(2):78-82.

Sun L J,Lu Z X. Advance on antibiotics produced by endo-phytes [J]. Food and Fermentation Industries,2005,31(2):78-82. (in Chinese)

(上接第 72 页)

[12] 肖复明,范少辉,汪思龙,等. 毛竹(*Phyllostachy pubescens*)、杉木(*Cunninghamia lanceolata*)人工林生态系统碳贮量及其分配特征 [J]. 生态学报,2007,27(7):2794-2801.

Xiao F M,Fan S H,Wang S L,et al. Carbon storage and spa-tial distribution in *Phyllostachy pubescens* and *Cunninghamia lanceolata* plantation ecosystem [J]. Acta Ecologica Sinica,2007,27(7):2794-2801. (in Chinese)

[13] 石亚娟,刘宏轩,王凌珍. 山毛桃种子品质鉴定与育苗 [J]. 防-护林科技,2005(增刊):71-72.

Shi Y J,Liu H X,Wang L Z. *Prunus davidiana* seed quality accreditation appraisal and seedling cultivation technology [J]. Protection Forest Science and Technology,2005(S1):71-72. (in Chinese)

[14] 王 蕾,张景群,王晓芳,等. 黄土高原两种人工林幼林生态系-统碳汇能力评价 [J]. 东北林业大学学报,2010,38(7):75-78.

Wang L,Zhang J Q,Wang X F,et al. Carbon sink in two young plantations in Loess Plateau [J]. Journal of Northeast Forestry University,2010,38(7):75-78. (in Chinese)

[15] Zhao M F,Xiang W F,Peng C H,et al. Simulating age-related changes in carbon storage and allocation in a Chinese fir plant-ationgrowing in southern China using the 3-PG model [J]. Forest Ecology and Management,2009,257:1520-1531.

[16] 刘占德,刘增文. 沙棘柠条的生物量及立地因子分析 [J]. 西-北农业学报,1994,3(2):92-96.

Liu Z D,Liu Z W. Study on biomass of *Hippophae rhamoides* L. and *Caragana microphylla* L. on Loess Plateau [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,1994,3(2):92-96. (in Chinese)

[17] 何亚龙,李 刚,龙凌云,等. 黄土丘陵沟壑区不同群落类型对-土壤特性及生物量的影响 [J]. 西北林学院学报,2011,26(6):1-7.

He Y L,Li G,Long L Y,et al. Effects of different vegetation types on soil characteristics and plant biomass in the Loess Hilly Region [J]. Journal of Northwest Forestry University,2011,26(6):1-7. (in Chinese)

[18] 陈伏生,张园敏,胡小飞,等. 丘陵陡坡荒山灌木草丛及其造林-地生态系统碳库的分配格局 [J]. 水土保持学报,2012,26(1):151-155.

Chen F S,Zhang Y M,Hu X F,et al. The pattern of ecosys-tem carbon stock in steep slope wild shrubs and neighboring forest plantations in Hilly Red Soil Area [J]. Journal of Soil and Water Conservation,2012,26(1):151-155. (in Chinese)

[19] Jobbagy E G,Jackson R B. The vertical distribution of soil or-ganic carbon and its relation to climate and vegetation [J]. Ec-ological Application,2002,10(2):423-436.