

诱导番茄抗南方根结线虫的青霉 Snef1216 发酵条件研究

姜美英, 段玉玺*, 陈立杰, 朱晓峰
(沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866)

摘要: 将番茄种子分别用 237 株真菌处理后, 在温室接种南方根结线虫, 从中筛选获得了 1 株具有诱导番茄抗南方根结线虫的青霉 Snef1216。通过单因素试验, 确定了该菌株的最佳摇瓶发酵条件: 培养时间 8 d, 摇瓶转数 150 r/min, pH 9.0, 接种量 20%, 装液量 50 mL (100 mL 三角瓶)。通过 $L_9(3^4)$ 正交试验, 确定该菌株发酵的最佳碳氮源组合为: 蔗糖 5%, 硝酸钠 0.8%, 以及最优的无机盐配比为: KCl 0.04%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.08%, $FeSO_4$ 0.003%。

关键词: 诱导抗性; 发酵条件; 根结线虫; 青霉; 菌体产量

中图分类号: S436.412.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)04-0104-05

Study on the Fermentation of Penicillium Snef1216 Inducing the Resistance of Tomato to Root-knot Nematode

JIAN G Mei-ying, DUAN Yu-xi*, CHEN Li-jie, ZHU Xiao-feng
(Institute of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The resistance of tomato to root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) could be induced by Penicillium Snef1216, which was screened from 237 strains of fungi in glasshouse. Through the mono-factor design, the best culture conditions of Snef1216 in shaking flask were summed up as follows: pH 9.0 before sterilization, fermentation time of 8 d, agitation with 150 r/min, volume of 50 mL in 100 mL, and inoculation volume of 20%. The culture medium was optimized by $L_9(3^4)$ orthogonal experiment. The C/N ratio was composed of 5% saccharose and 0.8% $NaNO_3$, and the optimal inorganic salts ratio was composed of KCl 0.04%, K_2HPO_4 0.2%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.08% and $FeSO_4$ 0.003%.

Key words: Induced resistance; Fermentation; Root-knot nematode; Penicillium; Mycelium yield

番茄是目前保护地生产中种植最为广泛的蔬菜之一, 而南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 病害是近年来我国番茄生产中的一种重要根部病害, 也是蔬菜病害中最具破坏力的病害之一^[1]。这种病害在温室、大棚和露地等番茄的根部都有发生, 特别是在温室条件下四季连续发病, 给蔬菜的产量造成很大的损失。

传统的化学防治具有高毒、易残留的特点, 容易对环境造成危害, 因此, 开发探索植物潜在抗性是病虫害综合防治的一条潜在途径^[2]。植物诱导抗病性具有广谱性以及对环境安全的优点, 已成为植物病虫害防治

的新手段, 越来越受到广泛的关注。可以诱导作物产生系统抗性的因子包括: 真菌、细菌菌丝及代谢物等生物因子^[2-3], β -氨基丁酸、茉莉酸、茉莉酸甲酯、水杨酸等化学因子^[4-5], Co 射线等物理因子。本试验通过用真菌发酵液对番茄种子进行包衣处理, 筛选出具有诱导番茄产生对南方根结线虫抗性的菌株, 并针对该菌株的发酵条件进行研究, 为其工业化生产提供一定的依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 供试真菌: 青霉 Snef1216 等 237 株

收稿日期: 2010-12-07

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(NYHYZX07-050)

作者简介: 姜美英(1985-), 女, 辽宁庄河人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。E-mail: 1112sishuiliunian@163.com

*通讯作者: 段玉玺(1964-), 男, 辽宁海城人, 教授, 博士生导师, 主要从事线虫病害生防和抗线虫资源研究。

E-mail: duanyx6407@163.com

真菌, 由沈阳农业大学北方线虫研究所保存。供试线虫: 南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)。供试植物: 高感南方根结线虫的番茄品种 L-402。

1.1.2 培养基 PDA 培养基: 马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, 琼脂 17g, 蒸馏水 1000mL; 查氏培养基: NaNO₃ 2g, KH₂PO₄ 1g, KCl 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, FeSO₄0.01g, 蔗糖 30g, 琼脂 20g, 蒸馏水 1000mL。

1.2 抗性菌株的筛选

用 237 株真菌菌株的发酵液对番茄种子进行包衣处理, 之后将番茄种子播种在根结线虫发生严重的温室土地中, 在番茄生长 45 d 时进行根结数的调查。以培养基包衣的番茄种子为对照, 通过计算防效, 筛选出对南方根结线虫具有较好诱抗效果的菌株, 每处理设置 3 次重复。

防效=(对照根结数-处理根结数)/对照根结数×100%。

1.3 青霉菌的发酵培养

1.3.1 种子液的培养 将 25℃培养 7d 的青霉菌平板, 用直径为 5mm 的打孔器打 5 个菌饼, 转入装有 100mL 培养基的 250mL 三角瓶中, 25℃、150 r/min 培养 3d。

1.3.2 发酵培养 根据各个处理装液量以及接种量的不同, 将种子液分别以一定的接种量, 接入装有一定培养基的 100mL 三角瓶中, 振荡培养。基础发酵条件: 接种量 10%(V/V), 装液量 50mL(100mL 三角瓶), 摇瓶转数 150 r/min, 25℃振荡培养 7d。

1.4 菌体干质量的测定

将青霉菌发酵液, 用已烘干且称质量的滤纸过滤, 然后用水冲洗至洗液不带有发酵液颜色为止, 于 80℃恒温烘箱中烘至恒质量, 冷却至常温称质量。或者将发酵液以 3500 r/min 离心 15 min 后弃上清液, 菌体用蒸馏水洗涤至无发酵液颜色, 在 60℃恒温烘箱中烘至恒质量, 冷却至常温称质量^[9]。

1.5 发酵培养基的优化

1.5.1 培养基中适宜碳、氮源的选择 采用单因素设计, 在基本液体查氏培养基的基础上进行不同碳、氮源的试验, 即分别用葡萄糖、乳糖、麦芽糖、可溶性淀粉替换原培养基中的蔗糖, 同样分别以蛋白胨、尿素、牛肉膏、硝酸铵替换原培养基中的硝酸钠, 并以原始查氏培养基为对照, 从而确定适宜的碳、氮源, 每个处理 3 次重复。

1.5.2 培养基中各组分含量的优化 根据基本查氏培养基的碳、氮源含量, 分别设置了 5 个碳源含量(0%、1%、2%、3%、4%、5%)和 5 个氮源含量(0%、0.2%、0.4%、0.6%、0.8%、1%), 进行试验, 选择较优的碳源和氮源含量。在单因素试验基础上进行

L₉(3⁴) 正交试验, 对培养基中碳、氮源含量进一步优化, 确定最佳配比。并进行无机盐的正交试验(表 1), 确定最佳的无机盐组合。

表 1 无机盐正交试验的因素水平					%
水平	因素				
	KCl	K ₂ HPO ₄	MgSO ₄ · 7H ₂ O	FeSO ₄	
1	0.04	0.10	0.04	0.001	
2	0.05	0.15	0.06	0.002	
3	0.06	0.20	0.08	0.003	

1.6 发酵条件的优化

使用优化培养基和基础发酵条件, 设置各条件的不同试验水平, 分别对培养时间、pH、摇瓶转数、接种量、装液量进行单因素试验, 测定发酵液的菌体干质量, 筛选出最优化的发酵条件, 每个处理 3 次重复。

1.7 数据的统计分析

所得试验数据利用 Excel 和 SPSS 进行分析。

2 结果与分析

2.1 抗性菌株的筛选结果

通过调查南方根结线虫侵染后番茄的根结数, 计算防效, 筛选出能够诱导番茄对南方根结线虫抗性的真菌菌株青霉 Snef1216。其温室防效在 66.1% 以上, 且重复性较好。

2.2 青霉 Snef1216 发酵的最适碳、氮源

碳源主要通过影响微生物的糖代谢、呼吸、能量、生长以及相关代谢而影响次生代谢产物的合成与分泌^[7]。如图 1 所示, 用可溶性淀粉和蔗糖作为碳源, 菌体生长较好, 产量较高, 分别为 3.58g/L 和 3.86g/L。相对来说, 葡萄糖、乳糖和麦芽糖不是该株真菌的适宜碳源, 其中乳糖最不适宜, 菌体产量仅为 1.52g/L。因此, 确定青霉 Snef1216 的较适宜碳源为蔗糖。

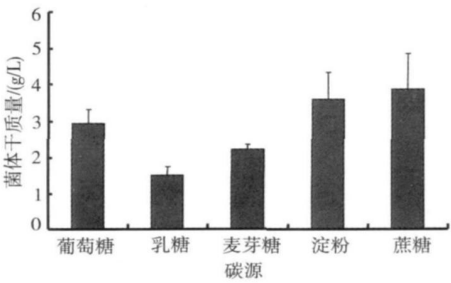


图 1 不同碳源对 Snef1216 菌体产量的影响

从图 2 可以看出, 硝酸钠作为氮源要明显优于其他 4 种氮源, 青霉 Snef1216 菌体产量达到 3.86g/L, 而其他 4 种氮源对菌株发酵水平的作用强弱依次为硝酸铵>蛋白胨>牛肉膏>尿素, 所以确定青霉 Snef1216 发酵生长的适宜碳源为硝酸钠。

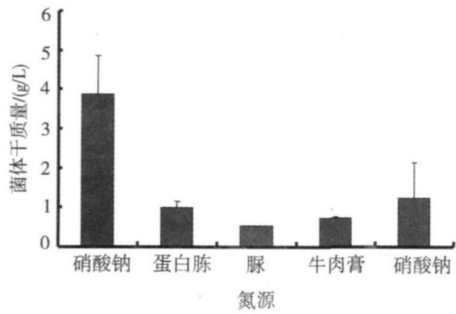


图 2 不同氮源对 Snef1216 菌体产量的影响

2.3 最适的碳、氮源 含量

碳、氮源含量在很大程度上影响发酵的效果,本试验分别设置了 5 个碳源含量和 5 个氮源含量进行试验。由图 3 可见,当碳源含量较低时,菌体干质量与碳源含量呈正相关,由 0 时的 0.64 g/L 增加到 3% 时的最大值 6.34 g/L;当碳源含量达到一定时,菌体产量较稳定并稍有下降,5% 含量时下降到 5.80 g/L,从而确定该菌株发酵的最佳碳源含量为 3%。

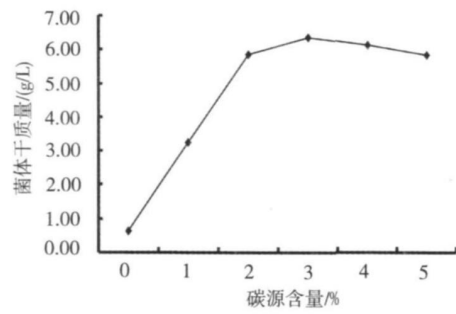


图 3 不同含量碳源对 Snef1216 菌体产量的影响

由图 4 可以看出,氮源含量较低时,随着氮源含量的增加,菌体干质量呈逐渐上升趋势,与碳源对菌体干质量的影响有一定的相似性,由 0 时的 1.00 g/L 增加到 0.6% 时的 7.64 g/L,此时菌体干质量达最大值。碳源含量再升高时,菌体产量稳定并稍有所减少,到 1% 时下降到 7.08 g/L,从而确定该菌株发酵的最佳氮源含量为 0.6%。

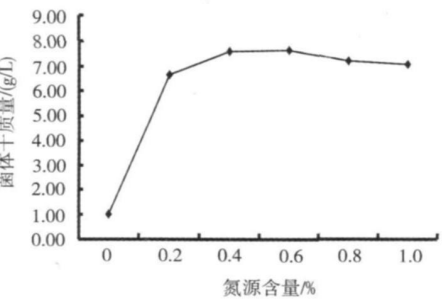


图 4 不同含量氮源对 Snef1216 菌体产量的影响

2.4 碳、氮源组合的优化结果

从单因素试验中挑选出较适宜的 3 个碳源含量 (3%、4%、5%), 3 个氮源含量 (0.4%、0.6%、0.8%), 进行正交试验(表 2), 以确定较好的碳、氮源含量组合。表 3 中, $K_{\max} - K_{\min}$ 大小代表不同因素对发酵培养中菌体干质量的影响程度, 其值越大, 表明影响程度越大。因此, 蔗糖的含量对发酵培养中菌体干质量的影响程度较大, 硝酸钠对菌体干质量的影响程度较小。 K_i 表示在 i 水平下该因素和其他因素不同水平组合时的发酵液中菌体干质量之和, 因此选择较大 K_i 值的水平作为该因素的最佳水平。由表 3 可得出, 发酵培养基中碳氮源的最佳组合为: 蔗糖 5%, 硝酸钠 0.8%。

表 2 碳、氮源正交试验的因素水平

水平	因素	
	蔗糖/ %	硝酸钠/ %
1	3	0.4
2	4	0.6
3	5	0.8

表 3 碳、氮源正交 试验结果

处理编号	蔗糖/ %	硝酸钠/ %	菌体干质量/ (g/ L)
1	3	0.4	1.15
2	3	0.6	1.68
3	3	0.8	1.64
4	4	0.4	2.74
5	4	0.6	0.86
6	4	0.8	2.12
7	5	0.4	2.74
8	5	0.6	2.81
9	5	0.8	3.11
K_1	4.47	6.63	—
K_2	5.72	5.35	—
K_3	8.66	6.87	—
$K_{\max} - K_{\min}$	4.19	1.52	—

2.5 无机盐正交试验结果

无机盐在一定程度上影响微生物次生代谢产物的产量水平。对基础培养基的 4 种无机盐, 各设置 3 个含量梯度, 通过正交试验分析适宜青霉菌 Snef1216 发酵的最佳无机盐配比。由表 4 中 $K_{\max} - K_{\min}$ 值可以看出, 4 种无机盐对发酵培养中菌体干质量的影响大小依次为 $MgSO_4 \cdot 7H_2O > KCl > K_2HPO_4 > FeSO_4$; 根据 K_i 值可得出无机盐的最佳组合为: KCl 0.04%、 K_2HPO_4 0.20%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.08%、 $FeSO_4$ 0.003%。

2.6 发酵条件对青霉 Snef1216 菌体产量的影响

pH、发酵培养时间、摇瓶转数、接种量和装液量 5 种发酵条件不同水平的单因素试验结果如图 5—图 9 所示。

表 4 无机盐正交试验结果

处理编号	KCl / %	K ₂ HPO ₄ / %	MgSO ₄ · 7H ₂ O / %	FeSO ₄ / %	菌体干质量 / (g/L)
1	0.04	0.10	0.04	0.001	2.82
2	0.04	0.15	0.06	0.002	3.26
3	0.04	0.20	0.08	0.003	3.64
4	0.05	0.10	0.06	0.003	3.28
5	0.05	0.15	0.08	0.001	3.32
6	0.05	0.20	0.04	0.002	2.22
7	0.06	0.10	0.08	0.002	3.26
8	0.06	0.15	0.04	0.003	2.70
9	0.06	0.20	0.06	0.001	1.30
K ₁	9.72	9.36	7.74	7.44	—
K ₂	8.82	9.28	7.84	8.74	—
K ₃	7.26	7.16	10.22	9.62	—
K _{max} —K _{min}	2.46	2.20	2.48	2.18	—

pH 对菌体的发酵有很大的影响,不同真菌适宜生长的酸碱环境不同。由图 5 可知,中性以及偏碱性环境利于该菌株的生长,菌体产量在 pH 9.0 时达到最大值 4.02 g/L,在 pH 5.0 时最小,为 2.82g/L,而在 pH 值为 6.0、7.0、8.0、9.0 时差异并不明显,说明该菌株的发酵培养条件以中性偏碱性较为适宜。

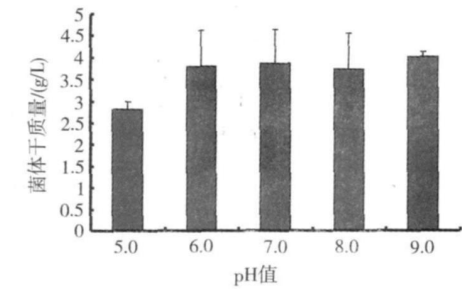


图 5 pH 值对 Snef1216 菌体产量的影响

微生物发酵的目的主要是获得其次生代谢产物,在发酵过程中,初生代谢和次生代谢途径往往交织在一起,分菌体生长期和生产期 2 个阶段。一般来说,次生代谢产物在菌体生产期产率较低,所以掌握发酵时间对发酵产物的获得较为关键^[7]。由图 6 可知,在 5~8d 时,菌体生长速度越来越快,到 8~9d 时生长速度开始缓慢,曲线趋于平缓,因此确定该菌株最适宜的发酵培养时间为 8 d。

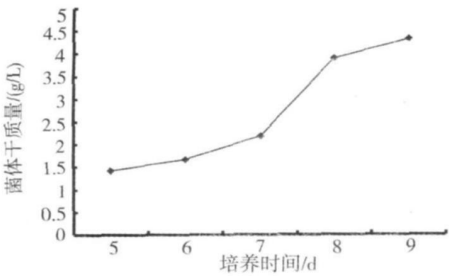


图 6 培养时间对 Snef1216 菌体产量的影响

摇瓶转数直接影响到发酵过程中的溶氧水平等,是发酵过程中优化控制的重要参数。由图 7 可

知,摇瓶转数对菌株 Snef1216 的菌体产量有很大的影响,其中 150 r/min 最适宜该菌株的生长,菌体产量达到最大 5.04 g/L。

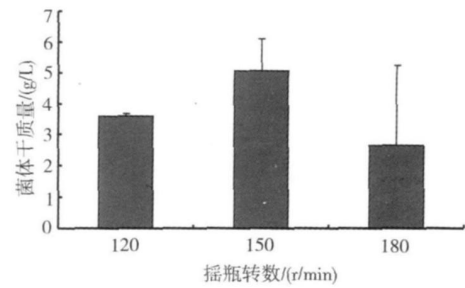


图 7 不同摇瓶转数对 Snef1216 菌体产量的影响

接种量对菌体产量有一定的影响,太小的接种量不利于菌体的生长,接种量太大形成营养等的竞争作用,同样不利于进行大规模的发酵生产。如图 8 所示,随着接种量的增大,菌体干质量呈上升趋势,当接种量在 20% 时,菌体产量达到最大 4.16 g/L,从而确定该菌的最佳接种量为 20%。

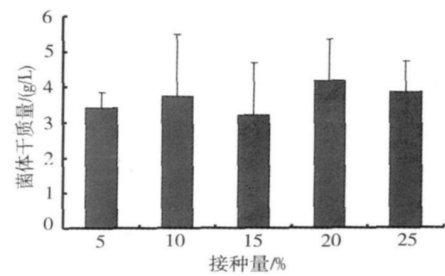


图 8 接种量对 Snef1216 菌体产量的影响

装液量是影响发酵过程中溶氧量的另一个重要参数,直接影响好氧微生物的发酵生产及代谢。从图 9 可以看出,菌体干质量先随着装液量的增加而增加,当装液量达到 50 mL 时菌体干质量达到最大值 2.70 g/L;当装液量再增加时,菌体的产量反而减小,所以确定 50 mL 为青霉 Snef1216 摇瓶发酵的适宜装液量。

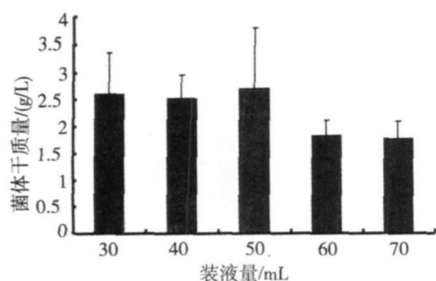


图 9 装液量对 Snf1216 菌体产量的影响

3 结论与讨论

通过对大量菌株进行室内试验, 获得了青霉 Snf1216, 其发酵液处理的番茄对南方根结线虫有较好的抗性, 温室防效在 66.1% 以上, 说明该菌株具有一定的诱抗稳定性, 可判定为有效菌株, 有一定的应用前景。为进一步将其应用于大规模的工业化生产, 进行了该菌株的发酵条件优化研究。

发酵条件对微生物的生长和次生代谢产物产量有重要的影响。优化后的青霉 Snf1216 发酵条件为: 培养时间 8 d, pH 9.0, 摇瓶转数 150 r/min, 接种量 20%, 装液量 50 mL (100 mL 三角瓶); 最优碳、氮源组合为蔗糖 5%, NaNO_3 0.8%; 最优的无机盐配比为 KCl 0.04%, K_2HPO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.08%, FeSO_4 0.003%。

与目前报道的青霉菌发酵条件相比, 本试验中某些培养条件存在一定差异, 但不明显。各种青霉菌适宜的发酵 pH 均在中性偏碱环境下, 如海洋真菌 TS67 适宜 pH 值为 8.0, 扩展青霉为 7.5^[8], 大多数报道中 pH 9.0 不利于菌体生长, 而青霉 Snf1216 的最适宜 pH 为 9.0, 与大多数青霉菌发酵条件不同。不同青霉菌的接种量有较大差异, 一般在 10% ~ 15%, 很少有更大的接种量, 如海洋真菌 TS67 最佳接种量为 8%^[17], 本研究中最优接种量为 20%, 与之前报道有较大区别。摇瓶转数相差不大, 几乎都在 150 ~ 180 r/min 之间。发酵时间差异较大, 最优发酵时间大部分在 4 ~ 7 d, 而本试验中青霉菌的适宜发酵时间为 8 d。装液量的差异明显, 15 ~ 60 mL (100 mL 三角瓶) 均有报道。培养基的组成成分是所有青霉菌发酵条件研究中差异最大的。据报道, 大部分青霉优化培养基的碳源是葡萄糖或甘油, 氮源是蛋白胨或酵母膏, 蔗糖和硝酸钠一般作为基础培养条件, 用二者作为最优碳、氮源的报道很少。

国内外利用生物或非生物因子诱导番茄抗病性的研究已有很多, 如姚振明等^[2]在 2009 年报道了利用青霉菌诱导番茄抗青枯病的研究, 李海燕等^[9]以

南方根结线虫 3 号生理小种和大豆孢囊线虫 4 号生理小种为材料, 研究了丛枝菌根真菌诱导植物耐/抗线虫病的机制。Cohen 等^[10]以 α 、 β 、 γ -氨基丁酸为诱抗剂, 诱导番茄产生对番茄疫病的抗性作用。王新荣等^[11]通过灌根与喷雾 2 种方法对比研究了水杨酸诱导的番茄对根结线虫病的抗性。近年来, 诱导抗性发展非常迅速, 青霉菌、植物生长促生细菌、几丁质等一系列生物或非生物诱抗剂被用来诱导番茄对枯萎病的获得抗性, 已经取得了非常明显的效果^[2]。利用诱抗剂激活番茄潜在的防御机制, 诱导番茄潜在的抗性基因表达, 达到防治根结线虫病的目的, 将是未来番茄根结线虫病害防治的一种重要途径。然而, 关于利用青霉菌诱导番茄产生对南方根结线虫的抗性, 目前还未见报道。

本研究从激发植物的潜在抗病性入手, 利用对线虫没有毒杀作用的青霉菌的次生代谢产物作为诱导因子, 使高感番茄具有抗南方根结线虫的能力, 避免了使用传统农药带来的高毒、高残留问题。青霉 Snf1216 的发酵条件容易控制, 菌体产量稳定, 易于进行大规模工业化生产, 为植保工作者今后进一步将其应用于生产实践提供了条件。目前, 青霉 Snf1216 次生代谢产物的活性成分尚不清楚, 还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Toudgil D L, Blok V C. Apomictic polyphagous root knot nematodes: exceptionally successful and damaging biotrophic root pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 2001, 39: 53-77.
- [2] 姚振明, 李宇. 番茄诱导抗病性研究进展[J]. 现代农业 2009 (4): 17-18.
- [3] 赵继红, 李建中. 灰霉菌菌丝体提取物诱导番茄抗病性的初步研究[J]. 河南农业科学 2003(10): 55-56.
- [4] Cohen Y R. β -aminobutyric acid-induced resistance against plant pathogens[J]. Plant Dis 2002, 86: 448-458.
- [5] Cooper W R, Jia L, Goggin L. Effects of jasmonate-induced defenses on root-knot nematode infection of resistant and susceptible tomato cultivars[J]. Journal of Chemical Ecology, 2005 (9): 1953-1967.
- [6] 朱会霞, 孙金旭. 樟芝真菌发酵条件优化研究[J]. 中国酿造 2008(20): 46-49.
- [7] 李海峰, 王素英. 生防菌青霉 TS67 发酵条件优化研究[J]. 河南农业科学 2007(6): 70-73.
- [8] 袁彩, 林琳, 施巧琴, 等. 扩展青霉碱性脂肪酶基因在毕赤酵母中的高效表达[J]. 生物工程学报 2003, 19(2): 231-234.
- [9] 李海燕, 刘润进, 束怀瑞. 丛枝菌根真菌提高植物抗病性的机制[J]. 菌物系统 2001, 20(3): 435-439.
- [10] Cohen Y, Gisi U. Systemic translocation of ^{14}C -DL-3-aminobutyric acid in tomato plants in relation to induced resistance against *Phytophthora infestans*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1994, 45: 441-456.
- [11] 王新荣, 黄汉坚, 朱孝伟. 水杨酸诱导的番茄对根结线虫病抗性初步研究[J]. 彭友良. 中国植物病理学会 2006 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2006.