

放线菌 K13 最适培养条件及其对草莓灰霉病菌的抑制作用

徐 斌¹,陈银凤²,张 云¹,魏利辉³,张 青⁴,陈夕军^{1*}

(1.扬州大学 园艺与植物保护学院,江苏 扬州 225009; 2.扬州市邗江区植保站,江苏 扬州 225008;
3.江苏省农业科学院 植物保护研究所,江苏 南京 210014; 4.江苏省太湖地区农业科学研究所,江苏 苏州 215155)

摘要:为实现对草莓灰霉病的生态防控,利用对峙培养法,从土壤中分离得到1株对草莓灰霉病菌具有强拮抗活性的放线菌 K13,该菌对多种植物病原菌生长具有抑制作用。K13 菌株产生抗菌物质的最佳条件为:在初始 pH 值 8.0 的高氏一号培养液中,28 ℃ 下持续振荡培养 6 d。K13 能显著抑制草莓灰霉病菌菌丝的生长,采用菌落直径法测定抑制率为 55.93%;其还能够抑制草莓灰霉病菌产孢、孢子萌发和芽管伸长,培养滤液 2 倍稀释时抑制率分别可达 72.53%、65.43% 和 59.83%。显微观察显示,该拮抗放线菌可引起草莓灰霉病菌菌丝扭曲、畸形、断裂,甚至解离。以上结果表明,放线菌 K13 对草莓灰霉病菌的生长发育具有较强的抑制作用,可用于生防菌剂的研发。

关键词:拮抗放线菌 K13; 培养条件; 抑制作用; 抑菌谱; 草莓灰霉病菌; 抑菌机制

中图分类号: S436.63;S476 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)12-0070-05

The Optimum Culture Condition of Actinomycete K13 and Its Inhibition on the Pathogen of Strawberry Gray Mold

XU Bin¹,CHEN Yinfeng²,ZHANG Yun¹,WEI Lihui³,ZHANG Qing⁴,CHEN Xijun^{1*}

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2. Hanjiang District Plant Protection Station, Yangzhou 225008, China; 3. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 4. Taihu Region Institute of Agricultural Sciences in Jiangsu Province, Suzhou 215155, China)

Abstract:To realize the ecological control of strawberry gray mold, strain K13, one antagonistic actinomycete strain against the pathogen *Botrytis cinerea*, was isolated from the soil by confrontation culture, which could significantly inhibit the growth of many plant pathogenic fungi. The optimal condition of producing antifungal substance by K13 was inoculating the strain into Gause's medium with the initial pH value of 8.0 at 28 ℃ with continuous shaking culture for 6 d. Results showed that K13 could inhibit the hypha growth of *B. cinerea*, with the inhibition rate of 55.93% using colony diameter method. It could also inhibit the spore bearing, spore germination and germ-tube elongation of *B. cinerea*, and the inhibition rates were 72.53% ,65.43% and 59.83% respectively when the culture filtrate was diluted by two folds. Microscopic observation indicated that the actinomycete filtrates could make the fungus hypha distortion, deformation, fracture and even disintegration. All these mean that K13 can inhibit the growth and development of *B. cinerea* strongly and has the potential of being developed into bio-control agents.

Key words:antagonistic actinomycete K13; culture condition; inhibition; inhibitory spectrum; *Botrytis cinerea*; inhibitory mechanism

收稿日期:2015-06-29
基金项目:江苏省农业科技自主创新资金项目[2015(CX)1037];农业部公益性行业(农业)专项(201403032)
作者简介:徐 斌(1989-),男,江苏镇江人,在读硕士研究生,研究方向:植物病害防控。E-mail:495383610@qq.com
* 通讯作者:陈夕军(1974-),男,江苏阜宁人,副教授,博士,主要从事植物病害防控研究。E-mail:xjchen@yzu.edu.cn

由灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 引起的灰霉病是设施果蔬最重要的病害之一,该病菌可侵染茄果、浆果和叶菜类等果蔬,在草莓上发生尤为严重^[1]。灰霉病在草莓各生育期均可发生,以开花后为甚,是造成烂果的主要原因。一般年份造成减产 10% ~ 30%,严重时达 50% 以上,极大阻碍了草莓产业的可持续发展^[2]。目前,控制果蔬灰霉病仍以化学农药为主,但田间大多数菌株对常用药剂均已产生了抗性^[1],且随着农药公害、农药残留等问题的日趋严重,运用生防技术防治灰霉病成为研究者们关注的热点^[3-8]。

放线菌是一类广泛分布于自然界,能产生多种抗生物质的拮抗微生物。自 Cohn 于 1872 年首次发现放线菌至今,已经有近 70 个属 1 700 种左右放线菌被报道,其中在植物病害防治中起主要作用的为链霉菌属及其相关类群^[9-11],它们通过抗生作用、竞争作用、捕食作用和重寄生作用降低病原菌的致病性和侵染效率^[12],也可以在寄主植物组织内通过诱导其产生抗性或抑菌物质,影响病菌的生长、繁殖并导致病菌死亡^[13]。本研究从草莓根际土壤中分离得到 1 株对草莓灰霉病菌具强拮抗活性的生防放线菌 K13,并对其最佳培养条件和抑菌机制进行了初步研究,旨在为进一步研发生防菌剂产品提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

拮抗放线菌 K13:分离自扬州市草莓根际土壤。

植物病原真菌:草莓灰霉病菌、番茄早疫病菌、水稻纹枯病菌、水稻恶苗病菌、稻瘟病菌、小麦全蚀病菌、小麦赤霉病菌、小麦根腐病菌、棉花枯萎病菌、棉红粉病菌、苹果轮纹病菌和苹果炭疽病菌均由扬州大学植物病理学实验室保存。

1.2 放线菌 K13 拮抗活性测定

对峙培养法:将植物病原真菌移至 PDA (马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 17 g、水 1 000 mL) 平板表面一侧,待菌落直径长至 2.0 cm 左右时,在另一侧划线接种放线菌,2 ~ 3 d 后测量抑菌带大小,以不接放线菌的平板作对照。

菌落直径法:将放线菌 K13 涂布于高氏一号培养基(可溶性淀粉 20 g、KNO₃ 1.0 g、NaCl 0.5 g、K₂HPO₄ · 3H₂O 0.5 g、MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g、FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g、琼脂 20 g、水 1 000 mL, pH 值 7.2 ~ 7.4) 平板,待菌株长满平板时,用打孔器打孔,取 5 块菌丝块(Ø = 6 mm)接入 150 mL 高氏培养液中,120 r/min、28 °C 条件下培养 6 d。10 000 r/min 离心 5 min 去菌体,上清液过细菌滤器。将滤液以 1:5 的比例加入 PDA 中倒平板,冷却后在平板中央接入植

物病原菌,以加入等体积高氏一号培养液的平板作对照,每处理重复 3 次。待对照菌落接近长满平板时测量各处理菌落直径,计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%。$$

1.3 放线菌 K13 培养条件测定

1.3.1 培养温度 在 250 mL 三角瓶中装入 150 mL pH 值 8.0 的高氏一号培养液,灭菌后,接入 5 块 K13 菌丝块(Ø = 6 mm)。分别于 18、22、25、28、32 °C 条件下,120 r/min 持续振荡培养 6 d。

1.3.2 培养时间 在 250 mL 三角瓶中装入 150 mL pH 值 8.0 的高氏一号培养液,灭菌后,接入 5 块 K13 菌丝块(Ø = 6 mm)。28 °C、120 r/min 持续振荡条件下分别培养 3、6、9、12、15、18 d。

1.3.3 pH 值 在 250 mL 三角瓶中装入 150 mL 初始 pH 值 5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0 的高氏一号培养液,灭菌后,接入 5 块(Ø = 6 mm) K13 菌丝块。28 °C、120 r/min 持续振荡条件下分别培养 6 d。

1.3.4 光照条件 在 250 mL 三角瓶中装入 150 mL pH 值 8.0 的高氏一号培养液,灭菌后,接入 5 块 K13 菌丝块(Ø = 6 mm)。28 °C、120 r/min 持续振荡条件下分别光照 0、12、24 h/d,培养 6 d。

1.3.5 振荡条件 在 250 mL 三角瓶中装入 150 mL pH 值 8.0 的高氏一号培养液,灭菌后,接入 5 块 K13 菌丝块(Ø = 6 mm)。28 °C、120 r/min 条件下设每隔 6、12、24 h 振荡 1 次,静止和持续振荡 5 个处理,培养 6 d。

1.3.6 继代培养 将分别转管 5、10、15、20 代的 5 块 K13 菌丝块(Ø = 6 mm)接种至装有 150 mL pH 值 8.0 的高氏一号培养液中,28 °C、120 r/min 条件下持续振荡培养 6 d,以原始菌株作对照。

以上每处理重复 3 次,以菌落直径法测定各处理对草莓灰霉病菌的抑制率。

1.4 放线菌 K13 对草莓灰霉病菌生长发育的影响测定

1.4.1 对病菌产孢能力的影响 将草莓灰霉病菌接种于 PDA 平板中央,待菌落直径达 4 ~ 5 cm 时,移去菌落边缘空白培养基,使各处理菌落直径相同。分别用稀释 2、5、10、50、100 倍的放线菌 K13 培养滤液 20 mL 淹没真菌菌落 10 min,倒去滤液。28 °C、黑光灯(20 W, 30 cm)照射条件下培养 5 d 至孢子产生,每平板用 10 mL 无菌水将孢子洗下,经 4 层纱布过滤后,用血球计数板在显微镜下计数,计算产孢抑制率。每处理重复 3 次,以空白培养液处理作对照。

1.4.2 对病菌孢子萌发及芽管生长的影响 将草莓灰霉病菌孢子悬浮液(1×10^6 个/mL)与放线菌 K13 培养滤液混合,使滤液最终被稀释 2、5、10、50、100 倍,吸取各混合液 50 μL 置于凹玻片中央,28 °C 下培养。

每处理重复 3 次,以加空白培养液作对照。当对照孢子萌发率达到 80% 以上时,显微镜下计数各处理孢子萌发率并测量芽管长度,计算抑制率。

1.5 放线菌 K13 对草莓灰霉病菌菌丝形态的破坏作用测定

将 5 块草莓灰霉病菌菌丝块 (Ø = 6 mm) 和 20 mL 放线菌 K13 培养滤液同时接入 100 mL PDB 培养液 (马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、水 1 000 mL) 中, 28 ℃、120 r/min 条件下振荡培养 24 h 后,取培养液中病菌菌丝于显微镜下观察。

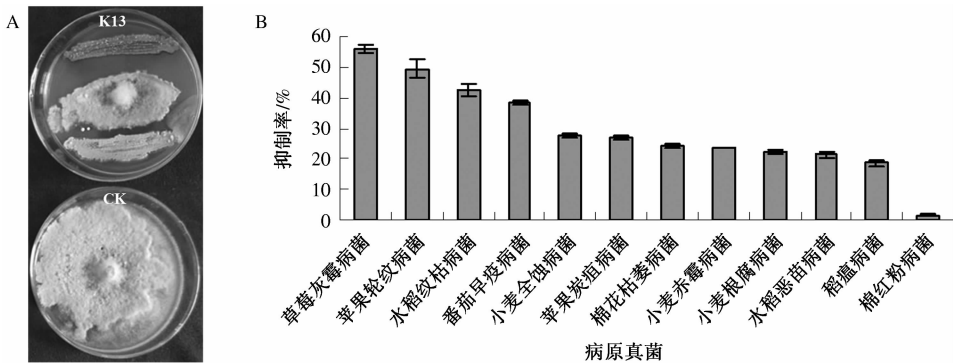
1.6 统计分析

数据采用 DPS v6.55 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 放线菌 K13 的抑菌谱

从图 1 可看出,放线菌 K13 对多种植物病原真菌具有拮抗活性,在供试的 12 种病菌中,其对草莓灰霉病菌的拮抗效应最强,当培养滤液与培养基 1:5 混合时,其对草莓灰霉病菌生长的抑制率可达 55.93%,采用对峙培养法测定其抑菌带宽为 1.21 cm。该菌株对苹果轮纹病菌生长的抑制作用次之,抑制率为 49.83%;而对棉红粉病菌生长的抑制率最低,仅为 1.76%。



A:对峙培养法测定 K13 对草莓灰霉病菌的抑菌作用; B:菌落直径法测定 K13 的抑菌谱
图 1 放线菌 K13 对植物病原真菌的抑制作用

2.2 放线菌 K13 的最佳培养条件

从图 2—7 可以看出,放线菌 K13 在初始 pH 值 8.0 的高氏一号培养液中,28 ℃、持续振荡条件下培养 6 d 产生的拮抗物质活性最强,对草莓灰霉病菌的抑制率在 55% 左右,是否光照与继代对拮抗菌的拮抗活性无明显影响。

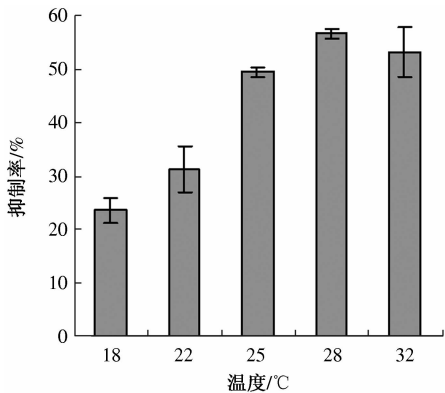


图 2 不同培养温度条件下放线菌 K13 的拮抗活性

2.3 放线菌 K13 培养滤液对草莓灰霉病菌生长发育的影响

放线菌 K13 培养滤液可显著抑制草莓灰霉病菌的产孢能力、孢子萌发和芽管伸长,且浓度越高,抑制率越大。在稀释 2 倍时,其对草莓灰霉病菌产孢能力、孢子萌发和芽管伸长的抑制率分别达 72.53%、

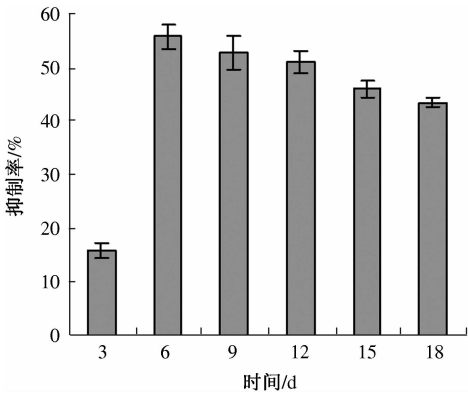


图 3 不同培养时间条件下放线菌 K13 的拮抗活性

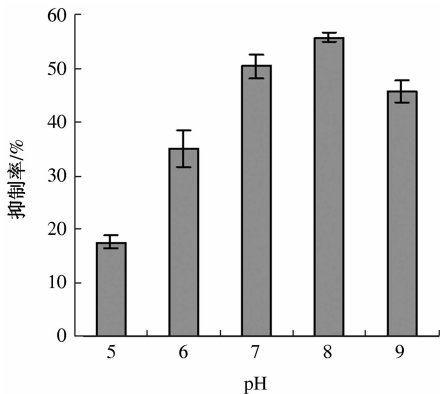


图 4 不同 pH 值条件下放线菌 K13 的拮抗活性

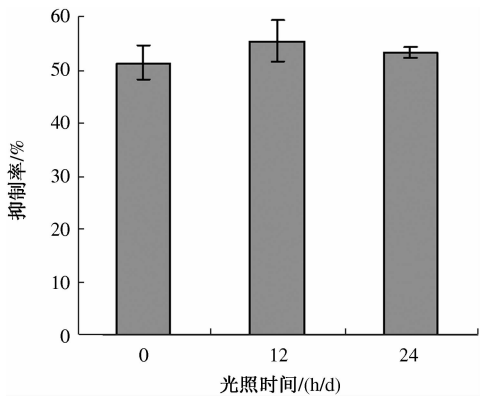


图 5 不同光照条件下放线菌 K13 的拮抗活性

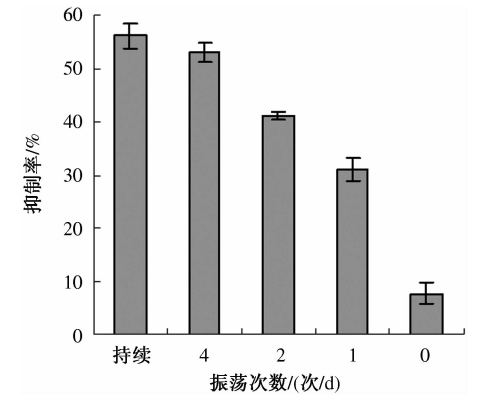


图 6 不同振荡条件下放线菌 K13 的拮抗活性

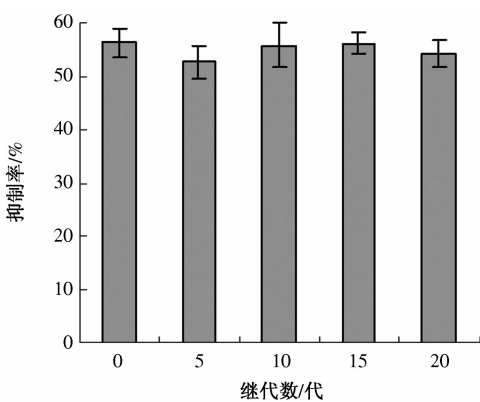


图 7 不同继代数放线菌 K13 的拮抗活性

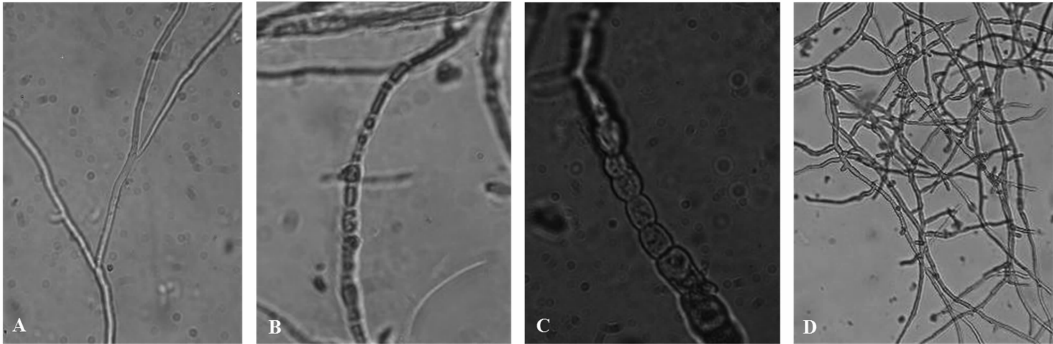
表 1 不同稀释度放线菌 K13 培养滤液对草莓灰霉病菌生长发育的抑制率 %

稀释倍数	产孢能力	孢子萌发率	芽管长度
2	72.53a	65.43a	59.83a
5	60.70b	53.20b	47.93b
10	52.30b	48.77b	43.70b
50	32.13c	18.70c	29.30c
100	12.27d	4.17d	15.43d

注:同列不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著。

2.4 放线菌 K13 培养滤液对草莓灰霉病菌菌丝形态的破坏作用

经放线菌 K13 培养滤液处理后,草莓灰霉病菌菌丝出现明显异常。部分菌丝原生质浓缩、菌丝肿胀收缩成串珠状,且形成大量短小分枝,甚至出现菌丝细胞壁破坏、细胞解离的现象(图 8)。



A:正常菌丝; B:原生质浓缩; C:菌丝肿胀收缩成串珠状; D:短小丛枝
图 8 放线菌 K13 培养滤液对草莓灰霉病菌菌丝的破坏作用

3 结论与讨论

植物根际存在大量拮抗微生物,许多学者通过分离、纯化获得了多种对植物病原真菌、细菌和线虫具拮抗作用的生防真菌、细菌与放线菌,其中部分已经被研制成制剂在生产上加以应用^[14-18]。目前在草莓灰霉病生防研究和应用中的微生物主要为木霉^[19]、酵母^[20-21]和黏帚霉^[22]等真菌以及枯草芽孢杆菌、假单孢菌等细菌^[23],有关放线菌在草莓灰霉

病防控上的应用研究还较少^[24]。本研究从草莓根际土壤中分离的拮抗放线菌 K13 对灰霉病菌菌丝生长、产孢和孢子萌发均有很好的抑制作用,且其发酵产物可破坏草莓灰霉病菌菌丝体的形态,具有进一步研发成生防菌剂的潜能,但其田间实际防效和生物持效性还有待进一步研究。

放线菌的发酵是一个非常复杂的过程,受许多环境因素的影响。除了培养基成分、微量元素外,培养时间、初始 pH 值、温度、通气量、光照,甚至继代

数都对其抗性物质的产生有显著影响。一般情况下,发酵前期,由于营养充足,菌株繁殖较快,抗生素的产量亦较大;到了后期,由于营养的消耗,菌体增长慢,且细胞开始自溶,有害代谢物使菌体处于相对不利的环境中,从而影响了抗菌物质的产生^[25]。本研究表明,放线菌 K13 在初始 pH 值 8.0 的高氏一号培养液中,28℃下持续振荡培养 6 d,拮抗物质活性最高。

参考文献:

- [1] Leroch M, Plesken C, Weber R W S, *et al.* Gray mold populations in German strawberry fields are resistant to multiple fungicides and dominated by a novel clade closely related to *Botrytis cinerea* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79(1): 159-167.
- [2] 张猛. 植物源杀菌剂 20% 丁香酚水乳剂对草莓灰霉病的田间防治效果 [J]. *江苏农业科学*, 2015, 43(1): 132-133.
- [3] Kim J H, Lee S H, Kim C S, *et al.* Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 formulation [J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2007, 17(3): 438-444.
- [4] Cota L V, Maffia L A, Mizubuti E S G, *et al.* Biological control of strawberry gray mold by *Clonostachys rosea* under field conditions [J]. *Biological Control*, 2008, 46(3): 515-522.
- [5] Donmez M F, Esitken A, Yildiz H, *et al.* Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria [J]. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 2011, 21(4): 758-763.
- [6] Vos C M, De Cremer K, Cammue B P, *et al.* The toolbox of *Trichoderma* spp. in the biocontrol of *Botrytis cinerea* disease [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(4): 400-412.
- [7] 杜立新, 冯书亮, 王容燕, 等. 拮抗 BS-208 菌株对番茄灰霉病诱导抗性的初步研究 [J]. *华北农学报*, 2005, 20(6): 84-87.
- [8] 岳东霞, 许长蒿, 张要武, 等. 酵母多糖的制备及诱导黄瓜对灰霉病抗性的研究 [J]. *华北农学报*, 2001, 16(3): 127-130.
- [9] Remya M, Ramasamy V. Isolation and characterization of marine antagonistic actinomycetes from west coast of India [J]. *Medicine and Biology*, 2008, 15(1): 13-19.
- [10] Elamvazhuthi P, Subramanian M. Antagonistic activity of actinomycetes from Jeypore paddy soil against selective phytopathogenic fungi [J]. *Journal of Modern Biotechnology*, 2013, 2(3): 66-72.
- [11] Sreevidya M, Gopalakrishnan S, Melo T M, *et al.* Biological control of *Botrytis cinerea* and plant growth promotion potential by *Penicillium citrinum* in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. *Biocontrol Science and Technology*, 2015, 25(7): 739-755.
- [12] 祁碧菽, 杨文香, 刘大群, 等. 链霉菌对玉米弯孢霉菌抑制作用的初步研究 [J]. *河北农业大学学报*, 2000, 23(3): 76-79.
- [13] 贾雨, 贾丽苑, 黄建新. 放线菌对植物病害的防治作用及应用 [J]. *西安文理学院学报: 自然科学版*, 2012, 15(3): 6-10.
- [14] Liang X J, Zhang T T, Qiao J Q, *et al.* Screening and identification of antagonistic bacteria against soil-borne disease of tomato [J]. *Agricultural Science and Technology*, 2015, 16(3): 530-536.
- [15] 李冬琴, 谭益民, 路宗岩, 等. 杉木炭疽病拮抗菌 AM53 菌剂的研制及其林间防效 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2015, 44(2): 154-158.
- [16] Mukhtar T, Hussain M A, Kayani M Z. Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra [J]. *Phytopathologia Mediterranea*, 2013, 52(1): 66-76.
- [17] Pattanapitpisais P, Kamlandharn R. Screening of chitinolytic actinomycetes for biological control of *Sclerotium rolfsii* stem rot disease of chilli [J]. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2012, 34(4): 387-393.
- [18] Abdallah M E, Haroun S A, Gomah A A, *et al.* Application of actinomycetes as biocontrol agents in the management of onion bacterial rot diseases [J]. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 2013, 46(15): 1797-1808.
- [19] 田连生, 王伟华, 石万龙, 等. 利用木霉防治大棚草莓灰霉病 [J]. *植物保护*, 2000, 26(2): 47-48.
- [20] 黄蓉. 防治草莓灰霉病酵母菌株筛选及防病机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2011.
- [21] 秦晓杰, 许皎皎, 索娜, 等. 草莓灰霉病拮抗酵母菌的筛选鉴定及对采后草莓品质的影响 [J]. *食品工业科技*, 2012, 33(21): 330-335, 339.
- [22] Peng G, Sutton J C. Effectiveness of honey bees for applying the biocontrol agent *Gliocladium roseum* to strawberry flowers to suppress *Botrytis cinerea* [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1992, 14(2): 117-129.
- [23] 李娜, 戴美学. 草莓内生细菌的分离及草莓灰霉病菌拮抗菌的筛选鉴定 [J]. *植物保护*, 2010, 36(4): 70-74.
- [24] 申光辉, 张志清, 秦文, 等. 灰霉病菌拮抗放线菌的筛选鉴定及对草莓的防腐保鲜效果 [J/OL]. *食品科学*, 2015-04-24. <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20150424.1349.057.html>.
- [25] 刘翠娟, 段琦梅, 安德荣. 抗真菌拮抗放线菌的筛选及摇床发酵条件的优化 [J]. *微生物学杂志*, 2004, 24(4): 12-14.