

拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌的抑菌活性研究

祁之秋, 王英姿, 夏天敏, 李兴海, 谷祖敏, 程根武, 纪明山

(沈阳农业大学 植物保护学院 辽宁 沈阳 110161)

摘要: 在离体条件下, 测定了拮抗细菌 R26 对灰葡萄孢菌的抑制作用, 结果表明, R26 发酵滤液能抑制灰葡萄孢菌丝生长, EC_{50} 值为 $10.63 \mu\text{L}/\text{mL}$; 经 R26 发酵滤液 ($40 \mu\text{L}/\text{mL}$) 处理后, 灰葡萄孢菌体形态发生明显变化; R26 发酵滤液能抑制灰葡萄孢菌孢子萌发, 并能抑制芽管伸长, 当浓度达 $80 \mu\text{L}/\text{mL}$ 时, 对灰葡萄孢菌产孢量的抑制率达 57.51%。

关键词: 拮抗细菌; 灰葡萄孢菌; 抑菌活性

中图分类号: S949.32 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)12-0080-03

The Antagonistic Activity of Fermented Filtrate of Bacteria Isolate R26 to *Botrytis cinerea*

QI Zhi-qiu, WANG Ying-zi, XIA Tian-min, LI Xing-hai,

GU Zu-min, CHENG Gen-wu, JI Ming-shan

(College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China)

Abstract: The fermented filtrate of bacteria isolate R26 could inhibit the mycelium growth of *Botrytis cinerea* with an EC_{50} of $10.63 \mu\text{L}/\text{mL}$. The morphology of *Botrytis cinerea* mycelia was changed obviously after treated with R26 fermented filtrate ($40 \mu\text{L}/\text{mL}$). Spore germination and tube elongation were inhibited by R26 fermented filtrate. The inhibition rate of spore production reached to 57.51% when the *Botrytis cinerea* was treated with fermented filtrate at $80 \mu\text{L}/\text{mL}$.

Key words: Antagonistic bacteria; *Botrytis cinerea*; Antagonistic activity

番茄灰霉病是由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)引起的一种世界性病害。该病发病范围广、速度快、重病田病果率可达 80% 以上。随保护地番茄栽培面积的扩大, 灰霉病的发生日渐严重, 给棚室蔬菜生产造成严重损失。灰霉病防治一直以化学药剂为主, 但化学药剂长期使用引起的抗药性、农药残留及环境污染问题受到人们越来越多的关注^[1-3]。近年来, 人们通过大量筛选和利用抗灰霉病的有益生物及其代谢产物, 使生物防治日益成为控制该病的一条重要而有效的途径。拮抗细菌(*Bacillus* spp.) R26 是沈阳农业大学植物保护学院农药科学教研室

从土壤中分离, 对灰葡萄孢菌菌丝生长具很好活性的芽孢杆菌^[4]。本试验系统研究拮抗细菌 R26 发酵滤液对番茄灰霉病菌的抑菌活性, 旨在为实现拮抗细菌 R26 对番茄灰霉病的生物防治提供借鉴作用。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

拮抗细菌 R26: 从土壤中分离得到, 对灰葡萄孢菌有拮抗作用; 灰葡萄孢菌: 由沈阳农业大学植物保护学院农药科学教研室提供。

收稿日期: 2007-07-30

基金项目: 辽宁省教育厅资助项目(20060782); 沈阳农业大学青年基金资助项目(2005051)

作者简介: 祁之秋(1971-), 女, 黑龙江宝清人, 讲师, 主要从事农药教学与研究工作。

1.2 试验方法

1.2.1 拮抗细菌 R26 发酵滤液制备^[4] 将拮抗细菌 R26 挑至 YSP 培养基(酵母浸膏 5g, 蔗糖 20g, 蛋白胨 10g, 蒸馏水 1000mL)中, 28℃, 150r/min 振荡培养 24h。将 R26 培养液按 1 : 50 接种至 NYBD 发酵培养基(牛肉浸膏 8g, 酵母浸膏 5g, 葡萄糖 10g, 蒸馏水 1000mL)中, 28℃, 150r/min 振荡培养 48h 扩繁, 发酵液经 4000r/min 离心 30min, 上清液用细菌滤器过滤(滤膜孔径 0.22μm), 即得发酵滤液。

1.2.2 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌菌丝生长的影响 将拮抗细菌 R26 发酵滤液分别按 1 : 200, 1 : 150, 1 : 100, 1 : 50, 1 : 25, 1 : 12.5 的比例倒入冷却至 40℃左右的 PDA 培养基中混匀, 倒平板, 即制得浓度分别为 5.00, 6.67, 10.00, 20.00, 40.00, 80.00μL/mL 含 R26 的发酵滤液的 PDA 平板。接入灰葡萄孢菌菌丝块(Ø=5mm), 25℃恒温培养, 3~4d 后测定菌落直径。3 次重复, 以不添加发酵滤液为对照。

1.2.3 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌丝形态的影响 100mL 三角瓶中装 PD 培养基(50mL), R26 发酵滤液按 1 : 50 的比例接入, 接种灰葡萄孢菌菌丝块(Ø=5mm), 每瓶 3 个, 28℃, 150r/min 振荡培养 4d, 显微镜下观察菌丝形态。以不添加发酵滤液为对照, 3 次重复。

1.2.4 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌孢子萌发的影响 将 R26 发酵滤液分别配成 2, 4, 10, 20 倍的稀释液即浓度为 500, 250, 100, 50μL/mL。取 PDA 平板上已产孢的灰葡萄孢菌, 用无菌水配制孢子悬浮液(10⁴ 个/mL), 取 20μL 滴加在凹玻片上, 再滴加 20μL 不同稀释倍数的 R26 发酵滤液, 混匀后置于 25℃下培养 12h, 以无菌水处理为对照, 每处理 4 次重复, 每次镜检 200 个孢子, 计算灰葡萄孢菌孢子萌发率。

1.2.5 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌产孢量的影响 R26 发酵滤液按 1 : 12.5, 1 : 25, 1 : 100, 1 : 200 的比例倒入冷却至 40℃左右的 PDA 培养基中混匀, 即制得浓度分别为 80, 40, 10, 5μL/mL 含 R26 的发酵滤液培养基, 倒平板, 于平板中央接灰葡萄孢菌菌丝块(Ø=5mm), 置 25℃培养至产孢, 以不加发酵滤液为对照。每平板距菌落边缘相等处挑取 5 个菌碟(Ø=1cm)放入空的灭菌培养皿中, 加 1mL 无菌水, 冲洗孢子后计数, 每处理 4 次重复, 比较不同浓度的 R26 发酵滤液对灰葡萄孢

菌产孢量的影响。

2 结果与分析

2.1 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌菌丝生长的影响

从表 1 可知, 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌菌丝生长有明显抑制作用。当拮抗细菌 R26 发酵滤液在 10.00~80.00μL/mL 时, 随处理浓度增加, 灰葡萄孢菌菌丝生长受到的抑制作用增强, 当发酵滤液为 80.00μL/mL 时, 抑制率可达 85.00%; 而当发酵滤液为 5.00~10.00μL/mL 时, 尽管不同浓度的发酵滤液对灰葡萄孢菌菌丝生长的抑制相差不明显, 但抑制率仍接近 45%。计算可得拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌菌丝生长的 EC₅₀ 为 10.63μL/mL。

表 1 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌菌丝生长的影响

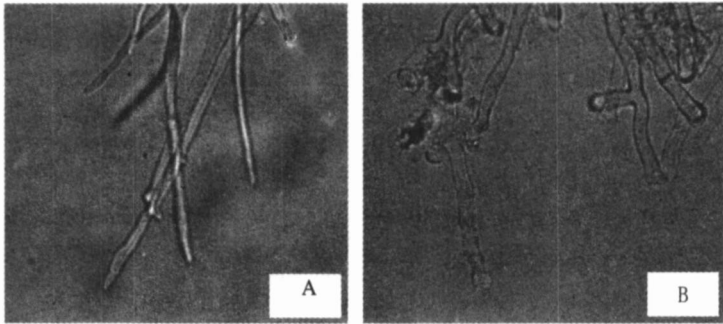
发酵滤液浓度 (μL/mL)	平均直径 (mm)	抑制率 (%)	回归方程	EC ₅₀ (μL/mL)	r
5.00	43.60	41.60	y=0.9479x + 4.0268	10.63	0.943
6.67	39.80	46.60			
10.00	41.80	44.00			
20.00	33.00	55.80			
40.00	26.40	64.60			
80.00	11.20	85.00			
ck	74.60	—			

2.2 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌丝形态的影响

通过显微观察发现, 经 R26 发酵滤液处理的番茄灰葡萄孢菌菌丝形态与对照有明显差异(图 1)。处理后的灰葡萄孢菌菌丝体节间缩短、变粗, 顶端膨大, 分支多; 对照的菌丝细长, 分支少, 间节长, 顶端渐尖。

2.3 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌孢子萌发的影响

从表 2 可以看出, 拮抗细菌 R26 发酵滤液能抑制灰葡萄孢菌孢子萌发, 并随发酵滤液浓度增大, 对孢子萌发的抑制作用增强。当 R26 发酵滤液浓度为 50μL/mL 时对孢子萌发的抑制效果不大明显, 其校正萌发抑制率只达到 14.21%, 但孢子萌发后的芽管生长受抑制; 当发酵滤液浓度为 100μL/mL 时, 其校正萌发抑制率也只 20.98%, 但当发酵滤液浓度为 250μL/mL 时, 其校正萌发抑制率能达到



A: 对照; B: 处理

图 1 拮抗细菌发酵滤液对灰葡萄孢菌菌丝形态的影响

96.41%，病菌孢子基本不萌发，说明该浓度对孢子萌发的抑制作用比较明显。

表 2 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌孢子萌发的影响

发酵滤液浓度 ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	萌发数 (个)	萌发率 (%)	孢子校正萌发 抑制率(%)	芽管长度
50	161.50	80.75	14.21	+++
100	148.75	74.38	20.98	++
250	6.75	3.38	96.41	+
500	0.00	0.00	100	—
ck	188.25	94.13	—	+++++

注：“+”表示芽管长度，“+”越多表示芽管越长

2.4 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌产孢量的影响

从表 3 可以看出，拮抗细菌 R26 发酵滤液浓度为 5~40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时，对灰葡萄孢菌孢子形成的抑制作用较小，与对照无显著差别；当浓度增大至 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 时，抑制率达 57.51%，孢子萌发受到明显抑制。这说明拮抗细菌 R26 发酵滤液在较高浓度时能抑制灰葡萄孢菌孢子形成，浓度较低时几乎没有抑制作用。

表 3 拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌孢子产量的影响

发酵滤液浓度($\mu\text{L}/\text{mL}$)	孢子数($\times 10^5$ 个/ mL)	抑制率(%)
5	6.57 A a	1.35
10	6.23 A a	6.46
40	6.35 A a	4.65
80	2.83 B b	57.51
ck	6.66 A a	—

3 讨论

生物防治中拮抗细菌的利用是当今植物病害防治十分活跃的研究领域之一，并已显示出良好的应用前景。在利用拮抗细菌进行生物防治过程中，抗菌物质在病原菌不同生长阶段显示活性对工业化生产十分重要。拮抗细菌 R26 对灰霉病菌菌丝生长、孢子萌发和产生及菌丝形态均产生不同程度的影响，对防治属多循环病害的番茄灰霉病十分有利。本试验仅在离体条件下，测定了拮抗细菌 R26 发酵滤液对灰葡萄孢菌的抑制作用，对番茄灰霉病的防治效果如何仍需在活体上进一步测定，同时，可进一步提取抗菌物质，确定其活性强弱。

参考文献

[1] 丁中 刘峰 慕六义. 不同抗性灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 对不同作用机制杀菌剂的敏感性研究[J]. 农药学报 2001, 3(4): 59—63.

[2] Bollen G J Scholten C. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen[J]. Neth J Pl Path, 1971, 77: 83—90.

[3] 齐爱勇, 魏东盛, 刘大群, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌的筛选[J]. 中国农学通报, 2006 22(6): 311—313.

[4] 李俊 纪明山, 刘浩强, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌 R26 抗菌物质产生条件的研究[J]. 沈阳农业大学学报, 2004 35(2): 105—108.