

文章编号:1003-8701(2013)03-0055-04

灰葡萄孢菌两种发酵粗提物的除草活性研究

韩庆莉¹, 刘丽¹, 谢兰芬², 伍建榕^{1*}

(1. 西南林业大学林学院 / 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 昆明 650224;

2. 云南农业大学植物保护学院, 昆明 650201)

摘要:测定了灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)固体和液体发酵粗提物对小麦、高粱、黄瓜、油菜的幼苗和幼根生长抑制活性。浓度 20 mg/mL 的固、液粗提物对 4 种供试植物的幼苗和幼根的抑制率均达到 100% ;对 4 种植物的幼苗和幼根同时具有抑制作用的最小有效浓度均为 0.62 mg/mL ;相同浓度的粗提物(5 mg/mL) ,液体发酵粗提物对小麦幼苗的抑制作用显著高于固体粗提物 ,而对高粱幼根和黄瓜幼苗的抑制作用却显著低于固体粗提物($p < 0.05$) ,对高粱幼苗、小麦幼根、黄瓜幼根、油菜幼苗和幼根的抑制作用与固体粗提物均无显著差异($p > 0.05$)。综合评价除草活性效果 ,灰葡萄孢菌固体和液体发酵粗提物均有很高除草活性 ,而固体发酵因原料廉价、操作简单具有更为广泛的应用前景。

关键词:灰葡萄孢菌 ;发酵方式 ;粗提物 ;除草活性

中图分类号 :S482.4

文献标识码 :A

Herbicidal Activity of Coarse Extracts form *Botrytis cinerea* Produced by Different Fermentation Methods

HAN Qing-li¹, LIU Li¹, XIE Lan-fen², WU Jian-rong^{1*}

(1. Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province, Southwest Forestry University, Kunming 650224; 2. College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: Two fermentation methods, solid fermentation and liquid fermentation, were used to get *Botrytis cinerea* coarse extracts. The inhibitory effect on the seedlings growth and root length of wheat, sorghum, rape and cucumber of the two coarse extracts were studied. The two coarse extracts inhibited growth of the four tested plants seedlings and roots completely at concentration of 20 mg/mL, and both of the minimum effective inhibitory concentration were 0.62 mg/mL. At the same concentration (5 mg/mL), the inhibition to wheat seeding growth of the liquid extracts was higher than the solid extract. But to cucumber seeding growth and sorghum roots growth, the inhibition was lower than the solid of ($p < 0.05$). There were no difference between two extracts in inhibition to the roots growth of wheat, cucumber, rape and the seeding growth of rape and sorghum ($p > 0.05$). The results indicated the two coarse extracts of *B. cinerea* both have strong herbicidal activity, but the solid has wider development prospect than the liquid because of its inexpensive raw materials and simple of operation.

Keywords: *Botrytis cinerea*; Fermentation method; Coarse extracts; Herbicidal activity

收稿日期:2013-01-11

基金项目:云南省重点学科森林保护学基金(XKZ200905);西南林业大学博士启动基金(111207)

作者简介:韩庆莉(1975-),女,讲师,博士,主要从事微生物农药研究。

通讯作者:伍建榕,女,教授,博士,

E-mail: wujianrong63@yahoo.com.cn

灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)是一种植物病原真菌,属半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目,其次生代谢产物具有除草、抑菌、杀虫等活性^[1-3],可开发为生物农药和植物生长调节剂。但是微生物发酵产生次生代谢产物具有产量低的普遍特性,如要用于实际生产中,则需大量发酵。灰葡萄孢菌活性代谢产物的培养方法上,目前大多用固体 PDA 或液

体 PD 培养基 ,或对其进行优化^[4] ,其培养滤液中活性成分含量很低 ,由于原料的成本 ,不宜进行规模化大量生产 ,所以灰葡萄孢菌的次生代谢产物应用多局限于对植物生理活性研究方面 ,很难应用到实际中^[5-6]。因此探索低成本发酵方式 ,提高活性成分产量十分必要。本研究利用麦麸和谷糠为原料在广口玻璃瓶中固体发酵灰葡萄孢菌 ,将粗提物与液体 PD 发酵粗提物对 4 种植物小麦、高粱、黄瓜、油菜进行除草活性对比研究 ,以其寻求低成本、易操作、更易满足工业化生产要求的发酵方式 ,提高灰葡萄孢菌活性产物的实际利用价值。

1 材料与方法

1.1 供试菌种和生测材料

灰葡萄孢菌(不易产孢菌种)由云南农业大学植物保护学院农药系提供 ; 高粱 (*Sorghum vulgare*)、小麦 (*Triticum aestivum*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、油菜(*Brassica campestris*) 种子均购于种子站。

1.2 固体、液体发酵培养基

(1)固体培养基 :麦麸 300 g ,谷糠 700 g ,水 700 g ,葡萄糖 10 g ,拌匀后分装到 450 mL 的广口玻璃瓶中 ,培养基的装入量为瓶容积的 1/3 ,高压灭菌锅内灭菌^[7]。

(2)液体(PD)培养基 :马铃薯 200 g ,葡萄糖 10 ~ 20 g ,氯霉素 50 mg ,水 1 000 mL ,分装于三角瓶内灭菌 ,培养基的装入量为三角瓶容积的 1/3。

1.3 粗提物的制备

(1)菌种液培养 :用无菌水冲洗下培养 5 d 的斜面 PDA 上的灰葡萄孢菌菌丝 ,制成菌丝悬浮液。取菌丝悬浮液少量接种于三角瓶中的液体培养基中 ,置于摇床上 25℃培养 3 ~ 4 d ,作为菌种液。

(2)固体发酵 :取菌种液接到灭菌的瓶装固体培养基中 ,25℃培养 9 d ,收集菌体和培养基。

(3)液体发酵 :按 1 /5 接种比例取三角瓶中的菌种液接种到已灭菌的 200 mL 三角瓶中的液体培养基中 ,摇床 25℃恒温培养 9 d ,收集发酵液。

(4)粗提物的提取 :用 2 倍培养基体积的乙酸乙酯分别对灰葡萄孢菌液体发酵液和固体发酵培养基进行 3 次浸提 ,分别合并乙酸乙酯层 ,用无水硫酸钠干燥 ,45℃真空旋转蒸发浓缩至浸膏状 ,分别获得固体和液体粗提物^[7]。

1.4 粗提物除草活性测定

用小杯法测除草活性^[7]。小麦、高粱、黄瓜、油菜常被用作除草活性研究中的模式植物 ,本研究精选这 4 种模式植物的种子 (汰除病损 ,空瘪) ,25℃清水中催芽 ,至种子膨胀微露白色芽点。在灭菌烧杯(高 6 cm ,直径 4.5 cm)底各放入小玻璃球 40 粒 ,其上垫一层灭菌圆形滤纸片 ,纸上匀布小麦、油菜、黄瓜、高粱种子 10 粒。用丙酮溶解粗提物 ,用灭菌蒸馏水配成系列梯度浓度 ,每个烧杯加药剂 5 mL ,每浓度 3 次重复。每个浓度设相应量丙酮加蒸馏水为对照。置入 26℃光照培养箱中培养 3 ~ 7 d ,4 d 观测幼苗和幼根的生长情况 ,按下式计算苗长(根长)抑制率 :

苗(或根)抑制率(%)=[对照苗长(或根长)- 处理苗长(或根长)] × 100/ 对照苗长(或根长)

1.5 数据分析

试验结果用均值和标准差表示 ($\bar{x} \pm \Delta$) ,用 SPSS13.0 统计软件中单因素方差分析进行差异性比较 ,设 p<0.05 和 p<0.01。

2 结果与分析

2.1 固体、液体发酵粗提物的除草活性

固体、液体发酵粗提物不同浓度对小麦、高粱、黄瓜、油菜的幼苗和幼根的生长抑制作用分别见表 1、表 2、表 3、表 4。

表 1 灰葡萄孢菌固体、液体发酵粗提物对小麦生长抑制率 %

粗提物浓度(mg/mL)	固体发酵		液体发酵	
	苗长抑制率	根长抑制率	苗长抑制率	根长抑制率
20.00	100.00**	100.00**	100.00**	100.00**
10.00	83.6 ± 4.04**	87.7 ± 4.04**	97.5 ± 4.24**	80.5 ± 3.67**
5.00	67.5 ± 5.05**	73.2 ± 2.64**	90.2 ± 2.08**	67.9 ± 4.58**
2.50	52.4 ± 3.75**	61.7 ± 3.45**	67.5 ± 2.78**	54.6 ± 1.67**
1.25	32.3 ± 2.76**	40.6 ± 1.34**	42.5 ± 2.78**	30.1 ± 1.09**
0.62	21.5 ± 1.72**	29.4 ± 1.08**	32.7 ± 2.87**	18.7 ± 0.87*
0.32	8.12 ± 0.96	20.9 ± 0.98*	24.8 ± 3.14*	7.4 ± 0.21

注 :表中 ** 和 * 分别表示与对照组相比 p<0.01 和 p<0.05 ,无 * 的表示与对照相比无显著差异(p>0.05) ,下同。

表 2 灰葡萄孢菌固体、液体发酵粗提物对高粱生长抑制率

%

粗提物浓度(mg/mL)	固体发酵		液体发酵	
	苗长抑制率	根长抑制率	苗长抑制率	根长抑制率
20.00	100.00**	100.00**	100.00**	100.00 **
10.00	79.9 ± 3.90**	80.4 ± 4.43**	87.3 ± 3.98**	85.9 ± 4.76**
5.00	63.6 ± 2.51**	72.7 ± 1.21**	65.9 ± 1.53**	67.8 ± 1.52**
2.50	43.1 ± 2.78**	59.5 ± 2.45**	49.1 ± 2.15**	57.5 ± 2.46**
1.25	29.6 ± 1.65**	38.5 ± 1.42**	43.6 ± 1.98**	41.3 ± 2.56**
0.62	14.5 ± 0.54*	19.3 ± 0.86*	21.9 ± 0.57*	18.4 ± 1.65*
0.32	3.8 ± 0.23	5.6 ± 0.01	8.4 ± 3.42	7.4 ± 0.57

表 3 灰葡萄孢菌固体、液体发酵粗提物对黄瓜生长抑制率

%

粗提物浓度(mg/mL)	固体发酵		液体发酵	
	苗长抑制率	根长抑制率	苗长抑制率	根长抑制率
20.00	100.00**	100.00**	100.00**	100.00**
10.00	95.5 ± 5.67**	93.7 ± 3.76**	89.5 ± 2.34**	83.6 ± 3.90**
5.00	79.6 ± 5.64**	80.5 ± 3.76**	67.5 ± 3.24**	79.8 ± 2.87**
2.50	67.4 ± 3.67**	69.5 ± 2.67**	51.4 ± 1.24**	64.6 ± 2.98**
1.25	42.1 ± 2.46**	49.4 ± 2.77**	41.3 ± 1.78**	48.4 ± 2.14**
0.62	30.4 ± 2.67**	41.9 ± 2.45**	29.1 ± 1.09**	33.3 ± 1.76**
0.32	12.7 ± 0.24	30.5 ± 1.57**	9.5 ± 0.14	15.1 ± 0.46

表 4 灰葡萄孢菌固体、液体发酵粗提物对油菜生长抑制率

%

粗提物浓度(mg/mL)	固体发酵		液体发酵	
	苗长抑制率	根长抑制率	苗长抑制率	根长抑制率
20.00	100.00**	100.00**	100.00**	100.00**
10.00	87.5 ± 3.98**	80.1 ± 3.56**	87.5 ± 4.01**	80.4 ± 3.78**
5.00	68.6 ± 4.89**	65.7 ± 2.98**	67.4 ± 3.24**	62.3 ± 2.46**
2.50	39.8 ± 2.10**	41.4 ± 2.19**	46.5 ± 3.65**	50.4 ± 2.67**
1.25	21.3 ± 1.87**	21.3 ± 0.17*	39.8 ± 2.11**	36.7 ± 1.35**
0.62	11.4 ± 0.65*	12.4 ± 0.11*	21.0 ± 1.76*	16.4 ± 0.18*
0.32	5.43 ± 0.34	6.8 ± 0.12	13.3 ± 0.11*	6.87 ± 0.21

结果表明 ,灰葡萄孢菌固体、液体粗提物对 4 种植物的幼苗和幼根均有抑制作用。20 mg/mL 的两种粗提物均能够完全抑制 4 种供试植物幼苗和幼根的生长(抑制率 100%)。对小麦幼苗的最小有效抑制浓度固体、液体粗提物分别为 0.62 mg/mL (抑制率 21.5%) 和 0.32 mg/mL (抑制率 24.8%) ,对小麦根最小有效抑制浓度与幼苗正相反 ,分别为 0.32 mg/mL (抑制率 20.9%) 和 0.62 mg/mL(抑制率 18.7%) ;对高粱幼苗、幼根的最小有效抑制浓度固体、液体粗提物均为 0.62 mg/mL ,抑制率在 14.5%至 21.9%间 ;浓度为 0.62 mg/mL 时 ,固体、液体粗提物对黄瓜幼苗、根均有极显著的抑制作用($p<0.01$) ,浓度为 0.32 mg/mL 时 ,液体粗提物对黄瓜幼苗和幼根均无显著抑制

作用($p>0.05$) ,固体、液体粗提物对油菜幼苗的最小抑制浓度分别为 0.62 mg/mL(抑制率 11.4%)和 0.32 mg/mL (抑制率 13.3%) ,对根最小抑制浓度均为 0.62 mg/mL。

2.2 固体、液体发酵粗提物除草活性差异性分析

根据固体、液体发酵粗提物不同浓度对 4 种植物的幼苗和根的抑制效果 ,选取浓度 5.00 mg/mL 的固体、液体粗提物进行除草活性差异性分析 ,结果如表 5 所示。

从表 5 可得 ,液体发酵粗提物对小麦幼苗的抑制作用显著高于固体粗提物($p<0.01$) ,而对高粱的幼根和黄瓜的幼苗的抑制作用却显著低于固体粗提物($p<0.05$) ,对小麦幼根、高粱幼苗、黄瓜幼根、油菜幼苗和幼根的抑制作用与固体粗提物无

表 5 固体、液体粗提物对 4 种植物苗和根的抑制率差异性

%

发酵	小麦		高粱		黄瓜		油菜	
	苗长	根长	苗长	根长	苗长	根长	苗长	根长
方式	抑制率	抑制率	抑制率	抑制率	抑制率	抑制率	抑制率	抑制率
固体	67.5±5.05bB	73.2±2.64aA	63.6±2.51aA	72.7±1.21aA	79.6±5.64aA	80.5±3.76aA	68.6±4.89aA	65.7±2.98aA
液体	90.2±2.08aA	67.9±4.58aA	65.9±1.53aA	67.8±1.52bA	67.5±3.24bA	79.8±2.87aA	67.4±3.24aA	62.3±2.46aA

注：同列数据不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著，不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著。

显著差异((p>0.05)。

3 结论与讨论

微生物固态发酵原料来源广泛，限于在低湿状态下生长的微生物，一般较适合于真菌。固态基质常为大分子化合物，如淀粉、纤维素、半纤维素、果胶、木质素、蛋白质和脂质等，而真菌常能分泌这类化合物的胞外分解物而将这些基质作为碳源及氮源，利用固态发酵的方式来分离和纯化微生物的代谢产物已成为天然产物研究的必要手段^[2,8-9]。

本研究结果表明，利用麦麸、谷糠和葡萄糖组成的固体培养基和马铃薯与葡萄糖组成的液体培养基发酵灰葡萄孢菌得到的粗提物均有很高的除草活性。液体发酵粗提物对小麦幼苗的抑制显著高于固体发酵粗提物，但是对高粱的幼根和黄瓜的幼苗的抑制作用却显著低于固体粗提物，对小麦幼根、高粱幼苗、黄瓜幼根、油菜幼苗和幼根的抑制作用与固体粗提物均无显著差异，综合评价，固体、液体两种发酵方式粗提物的除草活性相当。但是如用于大规模发酵，麦麸、谷糠的成本则要远远低于马铃薯，再结合微生物固体发酵生产流程简短、能耗低、无废水或很少废水等突出优点，灰葡萄孢菌固体发酵获取除草活性物质较液体发酵

具有更大的开发应用前景，值得进一步研究。

参考文献：

[1] L Rebordinos, JM Cantoral, M Prieto, et al.The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea* [J]. *Phytochemistry*, 1996(42):383-387 .

[2] 韩庆莉. 灰葡萄孢菌不同发酵方式次生代谢产物的生物活性[J]. 西南林学院学报, 2006,25(4) :5-8 .

[3] 郑 蒙,徐 扩,董金皋. 灰葡萄孢 BC7-3 菌株除草活性组分的纯化与结构鉴定 [J] . 微生物学报, 2008 ,48(10) :1362-1366 .

[4] 彭文文,张海江,张 建,等. 灰葡萄孢培养滤液中除草活性代谢产物培养条件的优化研究 [J] . 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005 ,33(5) :81-84 .

[5] 王 惠,钮绪燕,张 建,等. 灰葡萄孢 BC4 菌株产生天然脱落酸的研究 [J] . 西北农林科技大学学报 (自然科学版) 2004 ,32 (11) :34-36 .

[6] 周金燕,吴凯宇,雷宝良,等. 葡萄灰孢霉代谢产物的分离及生物活性[J] . 应用与环境生物学报, 2002 ,8(5) :532-534 .

[7] 沈嘉祥,杨美林,马木兰,等. 新型天然烤烟抑芽剂- 恒隆系列的研究() [J] . 云南农业大学学报, 2000 ,15(3) :184-186 .

[8] Li G Y, Li B G, Yang T, et al. Chaetoindicins A-C,three iso-quinoline alkaloids from the fungus *Chaetomium indicum*[J] . *Organie Letters*, 2006, 8(16): 3613-3615 .

[9] Li G Y, Li B G, Yang T, et al.Sesterterpenoids, terretonins A-D, and an alkaloid, asterrelenin, from *Aspergillus terreus* [J] . *Journal of Natural Products*, 2005(68): 1243-1246 .



(上接第 46 页)

[10] 姜 勇,张玉革. 沈阳地区盐渍土的生态分布、特性及改良利用[J] . 土壤通报, 2001 ,32(增刊) :97-101 .

[11] 李 彬,王志春,迟春明. 吉林省大安市苏打碱土含盐量与电导率的关系[J] . 干旱地区农业研究, 2006 ,24(4) :168-171 .

[12] 彭克明. 北京农业大学农业化学(总论)[M] . 北京 :中国农业出版社, 1987 .

[13] 宿庆瑞,李卫孝,迟凤琴. 有机肥对土壤盐分及水稻产量的

影响[J] . 中国农学通报, 2006 ,22(4) :299-301 .

[14] 杨合法,解永丽,范 聚,等. 不同施肥对保护地土壤肥力及作物产量的影响[J] . 中国农学通报, 2006 ,22(9) :250-254 .

[15] 韩晓增,王凤仙,王凤菊,等. 长期施用有机肥对黑土肥力及作物产量的影响[J] . 干旱地区农业研究, 2010 ,28(1) :66-71 .

[16] 宇万太,姜子绍,马 强,等. 施用有机肥对土壤肥力的影响 [J] . 植物营养与肥料科学, 2009 ,15(5) :1057-1064 .