

# 卡伍尔链霉菌拮抗灰葡萄孢菌最佳发酵条件研究

夏蕾<sup>1</sup>, 杨大海<sup>1</sup>, 孙浩翔<sup>1</sup>, 谭笑<sup>1</sup>, 刘柱杉<sup>1</sup>, 张维东<sup>1</sup>, 温嘉伟<sup>1</sup>, 邹晓威<sup>2\*</sup>

(1. 吉林省农业科学院农村能源与生态研究所, 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院植物保护研究所, 长春 130033)

**摘要:**由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)引起的蔬菜灰霉病是大棚蔬菜常见的严重病害之一,对于该病目前鲜有应用放线菌进行生物防治的研究报道。链霉菌对植物病原菌有拮抗作用,因此可用来作为生防菌开发利用。本研究利用发酵菌液进行平板拮抗试验,确定卡伍尔链霉菌对灰霉病菌有良好的拮抗作用,并进一步对卡伍尔链霉菌产生最大抗菌物质的发酵条件进行测定。结果表明,最佳发酵培养基为基础培养基,最佳接种量为5%~6%,最佳发酵温度为28℃,最佳发酵pH值为6~8,最佳发酵培养时间为9~11 d,最佳碳源为蔗糖,最佳氮源为硝酸铵。

**关键词:**灰霉菌;卡伍尔链霉菌;拮抗;生物防治

中图分类号:Q93

文献标识码:A

文章编号:2096-5877(2024)05-0041-05

## Study on the Optimal Antagonistic Conditions of *Streptomyces cavourensis* against *Botrytis cinerea*

XIA Lei<sup>1</sup>, YANG Dahai<sup>1</sup>, SUN Haoxiang<sup>1</sup>, TAN Xiao<sup>1</sup>, LIU Zhushan<sup>1</sup>, ZHANG Weidong<sup>1</sup>, WEN Jiawei<sup>1</sup>, ZOU Xiaowei<sup>2\*</sup>

(1. Energy and Ecology Institute, Jilin Academy of Agricultural Science, Changchun 130033; 2. Plant Protection Institute, Jilin Academy of Agricultural Science, Changchun 130033, China)

**Abstract:** Vegetable gray mold caused by *Botrytis cinerea* is one of the most common and serious diseases of greenhouse vegetables. There are few reports on biological control of this disease by actinomycetes. *Streptomyces* have antagonistic effects on plant pathogens, so they can be used as biocontrol bacteria for development and utilization. In this study, the liquid fermentation of *Streptomyces cavourensis* was employed to determine the antagonistic effect against *B. cinerea* via plate confrontation assay, furthermore, the fermentation conditions under which the *S. cavourensis* produced the maximum antibacterial substances were determined. The results showed that the best fermentation medium was basal medium, the best inoculum size was 5%~6%, the best fermentation temperature was 28℃, the best fermentation pH value was 6~8, the best fermentation culture time was 9~11 d, the best carbon source was sucrose, and the best nitrogen source was ammonium nitrate.

**Key words:** *Botrytis cinerea*; *Streptomyces cavourensis*; Antagonism; Biological control

灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)又称为灰霉菌,其寄主范围广泛,可侵染草莓、辣椒、番茄等200多种作物,诱发其产生灰霉病,主要表现在植株猝倒、落叶、花腐、果实腐烂等,给农业带来巨大经济损失。由于灰葡萄孢菌繁殖快、遗传变异大、适合度高,目前我国主要以筛选抗病品种及依赖不断更新组合的化学药剂对灰霉病进行防

治<sup>[1-2]</sup>,生物农药极少应用。但化学药剂不仅会造成严重污染,同时增加病原菌的抗药性,导致防治效果下降。生物防治方法无污染,更安全,是目前科研的主要方向,也是最有应用前景的防治方法。关于利用细菌和真菌作为生防菌控制灰霉病的研究已有报道,如付莉媛等<sup>[3]</sup>利用生防芽孢杆菌防治葡萄灰霉病。李素平等<sup>[4]</sup>利用一种自溶性产酶溶杆菌生物防治番茄灰霉病效果显著。高媛等<sup>[5]</sup>利用复合芽孢杆菌制剂对人参灰霉病进行防治,效果明显。方佩等<sup>[6]</sup>利用1株海洋芽孢杆菌对黄瓜灰霉病进行防治,效果明显。Eald等<sup>[7]</sup>发现哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)和绿色木霉(*T. viride*)具有防治葡萄灰霉病的效果。王超仪<sup>[8]</sup>设

收稿日期:2024-02-28

基金项目:吉林省农业科技创新工程项目(CXGC2021ZY020)

作者简介:夏蕾(1982-),女,副研究员,博士,从事植物病理学研究。

通信作者:邹晓威,女,硕士,副研究员,E-mail: zouxiaowei2008@126.com

计并构筑了三种可以响应灰霉菌病原微环境的环境友好型杀菌剂纳米平台,用于灰霉菌的防控。

卡伍尔链霉菌(*Streptomyces cavourensis*)不仅可以促进植物生长,有效提高抗病、耐逆等性能<sup>[9]</sup>,还能够产生农用抗生素,可以用于防治辣椒、黄瓜等植物的真菌病害<sup>[10]</sup>。研究表明,来源深海的卡伍尔链霉菌能产生巴弗洛霉素,是研发农药和医药的良好母体<sup>[11]</sup>。同时,卡伍尔链霉菌对土壤中重金属有吸附作用,从而降低植物体对金属的积累<sup>[12]</sup>。目前,以葡萄灰霉菌为靶标的生防放线菌的筛选与研究相对较少,本研究以灰葡萄孢菌为靶标病原菌,利用平板拮抗试验确定卡伍尔链霉菌对灰霉菌的拮抗作用,以此为依据,进一步优化卡伍尔链霉菌的发酵条件,以期为蔬菜灰霉病的生物防治及生防产品开发提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

灰霉菌是在感染灰霉病的番茄病叶中分离获得,卡伍尔链霉菌是在健康杨树叶片中分离获得。二者均通过形态和分子两种鉴定方法确定种名。

灰霉菌和卡伍尔链霉菌均保存在吉林省农业科学院生物防治实验室。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 平板拮抗试验

##### 1.2.1.1 菌液发酵法

将卡伍尔链霉菌制备成浓度为 $3 \times 10^6$  cfu/mL的孢子悬浮液,以1%接种量将孢子悬浮液接种于G1液体培养基中,28℃、180 r/min摇培5 d。发酵液经0.45 μm滤膜过滤后,与PDA培养基以1:4比例混合倒入平板中,冷凝后将灰霉菌菌饼(直径=0.7 cm)接种于平板中央位置,5次重复。以加入等量体积的无菌水作对照,置于25℃培养箱中培养观察。

##### 1.2.1.2 平板对峙法

将卡伍尔链霉菌与灰霉菌菌饼(直径=0.7 cm)接种于同一PDA培养皿中,对峙培养,5次重复。以只接种灰霉菌菌饼做对照,置于25℃培养箱中培养观察。

#### 1.2.2 卡伍尔链霉菌最佳发酵培养基的筛选

##### 1.2.2.1 最佳发酵培养基的筛选

将孢子悬浮液以1%接种量分别接种于G1、PD、LB、CS和基础发酵液体培养基中,28℃、180 r/min摇培5 d。发酵滤液的制备及接种方法同

1.2.1.1。当对照平板长至培养皿1/3处时,开始测量并计算抑菌率。

##### 1.2.2.2 最佳发酵碳源的筛选

用麦芽糖、蔗糖、乳糖、D-果糖取代基础培养基中的葡萄糖,以1%接种量分别接种于各培养基中,28℃、180 r/min摇培5 d。发酵滤液的制备及接种方法同1.2.1.1。当对照菌饼长至培养皿1/3处时,开始测量并计算抑菌率。

##### 1.2.2.3 最佳发酵氮源的筛选

用尿素、硝酸钾、硝酸钠、硝酸铵取代基础培养基中的蛋白胨。以1%接种量分别接种于各培养基中,28℃、180 r/min摇培5 d。发酵滤液的制备及接种方法同1.2.1.1。当对照菌饼长至培养皿1/3处时,开始测量并计算抑菌率。

#### 1.2.3 卡伍尔链霉菌最佳发酵条件的筛选

##### 1.2.3.1 最佳发酵时间的筛选

将孢子悬浮液以1%接种量接种于上述已优化的培养基中,28℃、180 r/min分别摇培1 d、3 d、4 d、5 d、6 d、7 d、8 d、9 d、10 d、11 d、13 d、15 d,发酵滤液的制备及接种方法同1.2.1.1。当对照菌饼长至培养皿1/3处时,开始测量并计算抑菌率。

##### 1.2.3.2 最佳发酵温度的筛选

将孢子悬浮液以1%接种量接种于上述已优化的培养基中,180 r/min分别置于10℃、15℃、20℃、25℃、28℃、30℃、35℃摇床中发酵培养5 d,发酵滤液的制备及接种方法同1.2.1.1。当对照菌饼长至培养皿1/3处时,开始测量并计算抑菌率。

##### 1.2.3.3 最佳发酵pH值的筛选

采用上述已优化的培养基,用1 mol/L HCl和NaOH将溶液pH值调整为4、5、6、7、8、9、10、11,将孢子悬浮液以1%接种量接种,28℃、180 r/min摇培5 d。发酵滤液的制备及接种方法同1.2.1.1。当对照菌饼长至培养皿1/3处时,开始测量并计算抑菌率。

##### 1.2.3.4 卡伍尔链霉菌最佳接种量的筛选

将浓度为 $3 \times 10^6$  cfu/mL的孢子悬浮液按装液量的1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%接种上述已优化的培养基中,28℃、180 r/min摇培5 d。发酵滤液的制备及接种方法同1.2.1.1。当对照菌饼长至培养皿1/3处时,开始测量并计算抑菌率。

## 2 结果与分析

### 2.1 平板拮抗试验

通过培养基添加发酵菌液抑菌及平板对峙试

验,可确定卡伍尔链霉菌对灰霉病菌有明显抑制作用。7 d后的观察结果显示,当对照长至平板2/3处时,接种含有发酵菌液的灰霉菌只长至平板的1/4处,几乎没有生长(图1)。平板对峙也可看出,对照已经长满平板,对峙平板产生明显拮抗带,宽度可达2 cm(图2)。



图1 放线菌发酵液抑菌试验

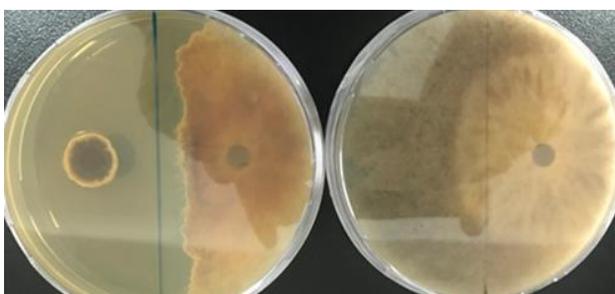


图2 平板对峙试验

## 2.2 最佳发酵培养基筛选

卡伍尔链霉菌在供试5种培养基中产生的抗

菌物质差异明显。结果表明,基础培养基的抑菌效果最好,抑菌率可达63%;G1次之,抑菌率为58%;而PD培养基抑菌效果最差,抑菌率仅为16%。以此结果,选出最佳发酵培养基为基础培养基(图3)。

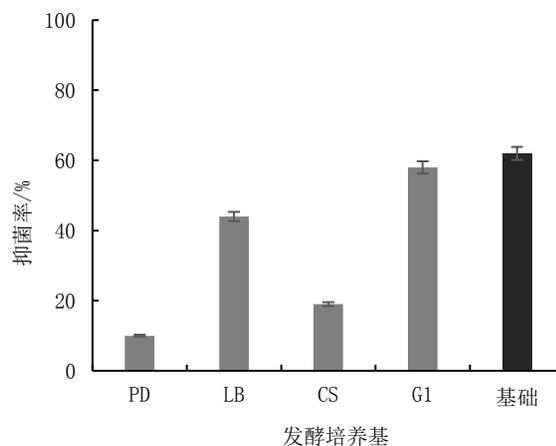


图3 不同发酵培养基

## 2.3 最佳发酵碳源及氮源的筛选

以原始基础培养基为对照,通过变换不同的碳、氮源,进一步筛选出最优培养基配方。试验结果显示,最佳氮源为硝酸铵,抑菌率为48%;而当氮源为尿素时,对灰霉病菌几乎没有抑制作用(图4A)。最佳碳源为蔗糖,抑菌率为51%;抑菌率最低为D-果糖,抑菌率仅为27%(图4B)。

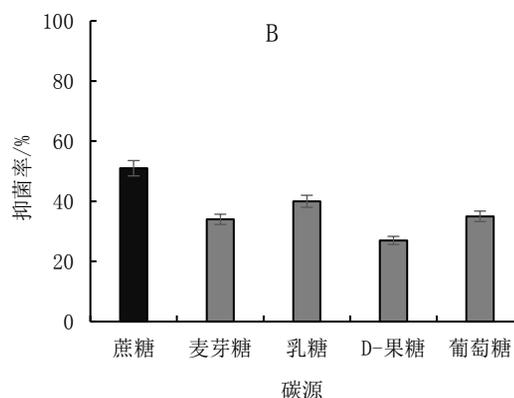
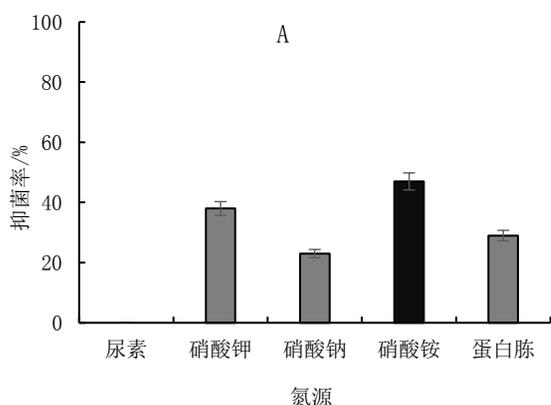


图4 最佳氮源及最佳碳源的筛选

## 2.4 最佳发酵条件的筛选

### 2.4.1 最佳发酵时间

培养不同天数的发酵液产生的抑菌效果随时间增长呈现上升趋势,培养11 d时抑菌率达到最大值,为75%。9~13 d内抑菌效果无明显变化,而后随着发酵时间的延长,抑菌率开始稍有下降(图5A)。

### 2.4.2 最佳发酵温度

卡伍尔链霉菌在10~35℃温度范围内均可产

生抑菌物质。随着温度的逐渐升高,抑菌率也呈明显上升趋势,当温度达到28℃时对灰霉病菌的抑菌效果最好,抑菌率可达65%,而随着发酵温度继续升高,抑菌率逐渐下降,35℃时仅为12%(图5B)。

### 2.4.3 最佳接种量

培养液产生的抑菌效果随接种量的增加呈现上升趋势,当接种量为1%~4%时,抑菌率趋于平

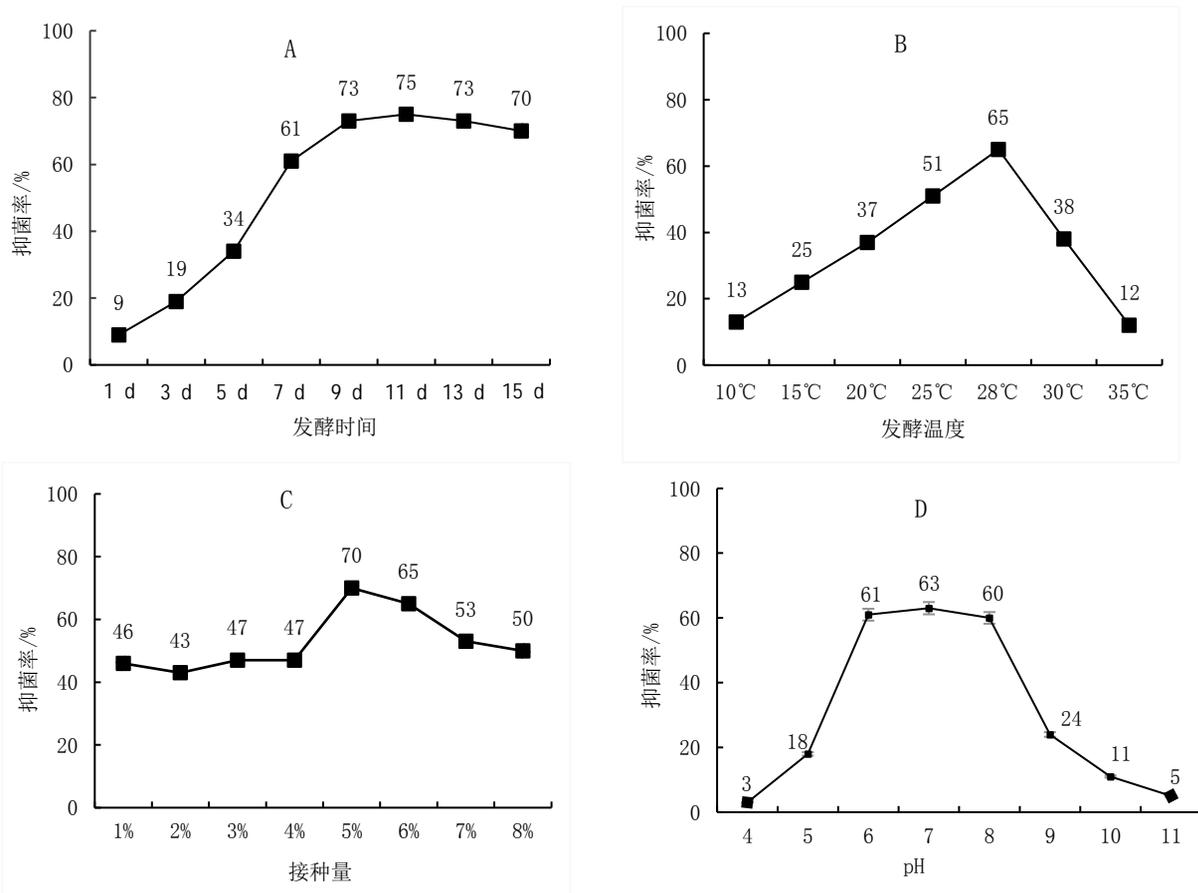


图5 最佳发酵条件

稳,都在45%左右,而当接种量达到5%时,抑菌率最高,为70%,而后又随着接种量的增加逐渐下降(图5C)。

#### 2.4.4 最佳发酵pH值

卡伍尔链霉菌在pH 4~11范围内均能产生抑菌物质。试验结果显示,pH为6~8时抑菌效果最好,且无明显差异,抑菌率可达到62%左右。而pH为4时,抑菌率最低,仅为3%左右。pH为11时,抑菌率为5%左右。说明偏酸和偏碱的环境不利于抑菌物质的产生(图5D)。

### 3 讨论

放线菌是生物活性次级代谢产物的优良生产者,远远高于细菌和真菌。能够用于植物病害生物防治的放线菌主要集中在链霉菌属及其相关类群<sup>[13]</sup>。如不吸水链霉菌公主岭新变种(*Streptomyces ahly-grossopicus gongzhulingensis*)是一种有广谱抑菌作用的生物防治放线菌,对玉米大斑病菌、番茄炭疽病菌、水稻稻瘟病菌等多种植物病原真菌有很好的抑制作用<sup>[14]</sup>。放线菌可通过在宿主植物组织内定殖诱发其产生抗病性或者产生抑菌物质,从而影响病原菌的生长繁殖,达到防治

病害的目的,也可通过抗生作用、竞争作用等降低病原菌的致病性以及侵染效率,导致致病性下降<sup>[15]</sup>。适宜的发酶条件更能诱发拮抗物质的产生。1980年Scher等<sup>[16]</sup>初次报道了土壤pH值在生物防治中的重要作用,之后又有人报道了环境pH值能够调控微生物次生代谢物的产生<sup>[17-18]</sup>。本研究结果表明,无论是经过发酶还是平板直接对抗,卡伍尔链霉菌对灰霉病菌都有很好的拮抗作用。猜测是卡伍尔链霉菌通过产生抗菌物质达到抑菌作用。而最佳发酶条件研究结果表明,在不同的培养条件下所产生的抗菌物质的量完全不同,PD及CS完全不适宜卡伍尔链霉菌抗菌物质的产生,而基础培养基则表现出明显优势,说明丰富的营养条件适合抗菌物质的产生;适宜的pH范围在6~8,高于或者低于这个范围时,其产生的抗菌物质明显受到影响,说明高酸或高碱的环境对抗菌物质的产生有很大的影响;而卡伍尔链霉菌产生抗菌物质的时间范围较广,10 d左右抑菌率达到最大值,当达到一定峰值后就趋于平衡,变化不明显;5%的接种量所产生的抑菌率最大,抑菌率随着接种量的增加而稍有下降的趋势,说明抗菌物质在定量的发酶液里产生的抗菌物质是

稳定的,不随着时间或接菌量的增加而增加。

本研究的目的是确定卡伍尔链霉菌对灰霉病菌的拮抗作用,并对其发酵条件进行优化。从目前的研究结果来看,对卡伍尔链霉菌的研究将有利于发现新的代谢物与新特征的酶,从其中的一些次生代谢产物中可能发现具有新的分子结构或对有害生物有新作用靶标的化合物,从而开发出新的生物源农药产品,这些将对未来的农业病害防治具有重要意义。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 付羽佳,白晶晶,孙丹丹,等. 29个草莓品种对灰霉病的抗性评价及叶片生理指标差异[J]. 东北农业科学, 2022, 47(2): 82-87.
- [ 2 ] 王秋萍,吴小毛,龙友华,等. 甘蓝灰霉病防治药剂筛选及田间应用[J]. 东北农业科学, 2021, 46(4): 43-46.
- [ 3 ] 付莉媛,蔡瑞杰,冯志敏,等. 葡萄灰霉病生防芽孢杆菌的筛选与防效评价[J]. 中国生物防治学报, 2022, 38(2): 440-446.
- [ 4 ] 李素平,袁玲,迟少艺,等. 一种自溶性产酶溶杆菌菌株 LE16对温室番茄灰霉病的抑制作用[J]. 微生物学报, 2022, 62(10): 3871-3885.
- [ 5 ] 高媛,孟祥才,刘秀波,等. 防治人参黑斑病与灰霉病的复合芽孢杆菌制剂[J]. 东北林业大学学报, 2022, 50(2): 106-109.
- [ 6 ] 方佩,罗远婵,田黎,等. 1株海洋芽孢杆菌对黄瓜灰霉病的防治效果及防治机制研究[J]. 江苏农业科学, 2022, 50(2): 91-96.
- [ 7 ] Elad Y. *Trichoderma harzianum* T39 Preparation for Biocontrol of Plant Diseases—Control of *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Cladosporium fulvum*[J]. Biocontrol Science and Technology, 2010, 10(4): 499-507.
- [ 8 ] 王超儀. 三种天然产物杀菌剂递送体系的构建及其抑制灰霉菌活性的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2022.
- [ 9 ] Morrissey J L P, Dow J M, Mark G L, et al. Are microbes at the root of a solution to world food production Rational exploitation of interactions between microbes and plants can help to transform agriculture[J]. EMBO Reports, 2004, 5(10): 922-926.
- [ 10 ] 谭悠久,彭祎,黄永春. 土壤放线菌的选择性分离及其代谢产物抗菌活性评价[J]. 植物保护, 2011, 37(1): 120-123.
- [ 11 ] 鲍秀艳,姚雪春,史美君,等. 卡伍尔氏链霉菌 NA4生物合成巴弗洛霉素前体甲氧基丙二酰 ACP来源的研究[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(1): 9-16.
- [ 12 ] 李文华. 卡伍尔链霉菌 TJ430 和荧光假单胞菌 P32 的吸附机理及对水稻稻积累特性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2018.
- [ 13 ] 阮继生,刘志恒,梁丽糯,等. 放线菌研究与应用[M]. 北京: 科学出版社, 1990: 10-12.
- [ 14 ] 张云月,周艳宏,高月波,等. 杀虫真菌在玉米内的定殖及公主岭霉素对其定殖率影响的研究[J]. 东北农业科学, 2023, 48(2): 95-98.
- [ 15 ] 祈碧菽,杨文香,刘大群. 放线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.
- [ 16 ] Scher F M, Baker R. Mechanism of biological control in a *Fusarium*-suppressive soil[J]. Phytopathology, 1980, 70: 412-417.
- [ 17 ] Keller N P, Nesbitt C, Sarr B, et al. pH regulation of terigmato-cystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. [J]. Phytopathology, 1997, 87: 643-648.
- [ 18 ] Espeso E A, Tilburn J, Arst H N J, et al. pH regulation is a major determinant in expression of a fungal penicillin biosynthetic gene[J]. EMBO Journal, 1993, 12: 3947-3956.

(责任编辑:王 昱)