

文章编号: 1674-7054(2019)03-0258-06

放线菌 KN37 菌株代谢物对番茄灰霉病的防治

邵胜楠, 张安琪, 巴尔那·库马尔, 张国强

(石河子大学农学院 / 新疆绿洲农业病虫害治理与植保资源利用重点实验室, 新疆 石河子 832003)

摘要: 采用离体和活体试验, 研究 KN37 菌株代谢物对番茄灰霉病的防治效果, 并利用分子手段对 KN37 菌株进行了初步鉴定。结果表明, 放线菌 KN37 菌株代谢物可强烈抑制番茄灰霉病菌的菌丝生长和孢子萌发, 对细菌性斑点病菌、番茄早疫病菌和油菜菌核病菌的抑制率达到 90% 以上, 且对葡萄灰霉病具有较好的防治效果。由此可见, 放线菌 KN37 菌株代谢物具有较好的开发潜力。

关键词: 番茄灰霉病, 灰葡萄孢, 微生物源农药, 菌株代谢物

中图分类号: S 432.4 **文献标志码:** A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.03.009

番茄灰霉病是由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)引起的一种重要的世界性番茄病害, 该病害主要危害果实, 造成果实腐烂, 也可危害叶、茎和花, 造成严重减产, 产量损失高达 20% ~ 50%^[1]。番茄灰霉病可通过气流、雨水、昆虫等方式进行多次侵染, 而且发病后传播速度很快, 对保护地番茄生产威胁极大。该病害已在全国各地普遍发生, 且呈上升趋势, 已成为番茄设施栽培的主要危害因素^[2]。目前, 防治番茄灰霉病以化学农药为主, 如代森锰锌、嘧霉胺、异菌脲、腐霉利等。这些药剂长时间、大剂量地使用, 对环境和食品安全产生了大量负面影响, 同时还产生了严重的抗药性^[3-4]。微生物的代谢产物是一个巨大的天然产物资源库, 从中筛选新农活性物质是一条相对便捷的道路^[5]。而且微生物源农药相对于化学农药具有低成本、高活性、低毒、环保等特点, 因此以微生物天然产物为基础, 开发新型微生物源农药, 可有效解决番茄灰霉病的危害。因此, 本课题组深入挖掘了新疆高寒地区的放线菌资源, 从中发现了具有较好抑菌活性的放线菌 KN37。本研究主要对放线菌 KN37 菌株代谢物的抑菌谱进行了广泛测定, 同时利用离体法和活体法系统研究了菌株代谢物对番茄灰霉病的防治效果, 旨在为 KN37 菌株的进一步研究与开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试放线菌 放线菌 KN37, 分离自新疆喀纳斯地区, 保存于石河子大学农学院植保系农药实验室。

1.2 供试病原菌 番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、番茄细菌性斑点病菌(*Pseudomonas syringae*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、黄瓜黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)、稻瘟病菌(*Phyricularia grisea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、立枯病菌(*Alteraria alternata*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、白菜黑斑病菌(*Alternaria solani*)、玉米小斑病菌(*Helminthosporium maydis*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)、葡萄白腐病菌(*Coniothyrium diplodiella*)均由石河子大学农学院植保系病理实验室提供。

1.3 供试培养基 高氏 1 号培养基: KNO_3 1 g, K_2HPO_4 0.5 g, NaCl 0.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, 可溶性淀粉 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2 ~ 7.4。PDA 培养基: 去皮马铃薯 200

收稿日期: 2019-06-25

基金项目: 石河子大学高层次人才科研启动项目(RCSX201722); 大学生创新创业训练计划项目(201710759002)

作者简介: 邵胜楠(1997-), 女, 石河子大学农学院 2015 级本科生. E-mail: shaosn@qq.com

通信作者: 张国强(1986-), 男, 博士, 硕导. 研究方向: 微生物农药的研究与开发.

E-mail: gqzhang@shzu.edu.cn

g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 000 mL。

1.4 发酵液的制备 用打孔器取直径 4 mm 的菌饼 6 个, 置于配好的高氏一号液体培养基中振荡培养。摇床培养温度为 28 ℃, 转速为 120 r · min⁻¹, 培养 7 ~ 10 d。发酵液经 6 000 r · min⁻¹ 离心 30 min 后, 取上清待用。

1.5 发酵液提取物的制备 喷雾干燥器对菌株发酵液进行浓缩, 对干粉进行复溶和过滤后用大孔吸附树脂 AB-8 进行分离, 用 25% 乙醇/水进行洗脱, 将洗脱液浓缩后用乙酸乙酯进行液液萃取, 然后将乙酸乙酯相浓缩后得到菌株发酵液的提取物。

1.6 抑菌活性测定方法 (1) 菌丝生长速率法: 将 PDA 培养基与发酵液或提取物按 9:1 混合均匀, 制成培养基平板, 分别从供试病原菌的菌落边缘, 用打孔器切成直径为 4 mm 的菌饼, 分别放置于培养基中央, 使菌饼带菌丝的一面贴在培养基表面, 空白对照不加放线菌 KN37 发酵液, 每个处理重复 3 次。置于 28 ℃ 恒温箱中培养 72 ~ 96 h 后, 用“十”字交叉法测量供试病原真菌菌落生长直径, 计算菌丝生长抑制率^[6]。菌丝生长抑制率 = (对照菌落生长直径 - 处理菌落生长直径) / (对照菌落生长直径 - 菌柄直径) × 100%。(2) 孢子萌发法: 取供试病原菌孢子配成 10⁶ CFU · mL⁻¹ 悬浮液, 在低倍镜下的每个视野里有 30 ~ 40 个孢子, 将发酵液或提取物与供试菌株的孢子悬浮液 1:1 混合, 每处理重复 3 次, 在 28 ℃ 下培养 12 h 后观察计算孢子萌发率以及抑制率^[7]。孢子萌发率/% = 萌发孢子数/孢子总数 × 100%; 孢子萌发抑制率/% = (对照孢子萌发率 - 处理孢子萌发率) / 对照孢子萌发率 × 100%。(3) 活体组织法: 采摘大小均一、健康新鲜的番茄果实。表面用 0.1% NaClO 溶液消毒晾干后, 接种番茄灰霉病菌菌饼; 保护作用测定方法为将发酵液提取物 (400 mg · L⁻¹) 喷施于番茄果实表面, 22 ℃ 保湿培养 24 h 后接种番茄灰霉病菌菌饼; 治疗作用测定方法: 在保湿条件下接种番茄灰霉病菌菌饼, 24 h 后再喷施供试药液。药剂对照为腐霉利 400 mg · L⁻¹, 2 个菌丝块/果实试验重复 3 次, 5 d 后调查病斑大小, 计算药效^[8]。药效/% = (对照病斑直径 - 处理病斑直径) / 对照病斑直径 × 100%。(4) 田间试验: 于石河子大学试验站温室大棚种植番茄, 试验共设 3 个处理, 处理 1: 空白对照; 处理 2: 施用腐霉利 (400 mg · L⁻¹); 处理 3: 施用发酵液提取物 (400 mg · L⁻¹)。每个处理 3 次重复, 随机区组排列, 小区面积 20 m², 株数 36 株每小区第一次施药前调查病情基数, 每隔 7 d 施药 1 次, 共施药 3 次, 施药后 7 d 调查发病情况, 5 点取样, 每点调查 3 株番茄全株叶片, 统计发病情况并计算病情指数和防治效果^[9]。病情分级标准如下:

0 级——无病斑;

1 级——病斑占整个叶面积 5% 以下;

3 级——病斑占整个叶面积 5% ~ 15%;

5 级——病斑占整个叶面积 16% ~ 25%;

7 级——病斑占整个叶面积 26% ~ 50%;

9 级——病斑占整个叶面积 51% 以上。

根据调查结果计算病情指数和防效。病情指数 = $\sum$ (各级病叶数 × 相对应极值) / 调查总叶数 × 9; 防治效果 = (1 - 空白对照区施药前病情指数 × 药剂处理区施药后病情指数 / 空白对照区施药后病情指数 × 药剂处理区施药前病情指数) × 100%。

1.7 放线菌 KN37 菌株的初步鉴定 (1) 菌丝形态观察: 采用插片法接种菌株, 用移液枪吸取 50 μL 孢子悬浮液于高氏一号培养基上, 用涂布器将其涂布均匀, 将盖玻片斜插入培养基中, 28 ℃ 条件下 5 d 后, 待菌丝覆盖于盖玻片与培养基交叉处时, 取下插片, 置于光学显微镜下观察其观察菌株的基内菌丝、气生菌丝颜色和孢子及孢子丝形态。参考阮继生等人的方法对待测菌株进行形态观察和显微结构鉴定^[10]。(2) 菌落形态观察: 将少量的孢子丝接种于高氏一号培养基上, 使其形成单菌落, 28 ℃ 条件下 5 d 后, 观察菌落的形状、颜色、质地, 以及平板正、反面的特征等一系列的形态特点。(3) 分子鉴定: 利用 EasyPure Bacteria Genomic DNA Kit (全式金, 中国) 进行放线菌基因组 DNA 提取, 参考王秀爽等人的方法使用通用引物 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACG GCTACCTTGTACGACTT-3') 对 16S rDNA 进行扩增^[11], PCR 产物测序后进行 Blast, 选择同源性较高的菌株用 MEGA7.0 软件进行多序列比对, 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 放线菌 KN37 代谢物的抑菌谱 放线菌 KN37 发酵液对多种植物病原菌具有较强的抑制作用(表 1),尤其是对番茄灰霉病菌、细菌性斑点病菌、番茄早疫病菌和油菜菌核病菌的抑制效果最好,抑制率分别为 94.26%,93.66%,92.07% 和 95.67%。

表 1 放线菌 KN37 发酵液对 12 种病原菌的菌落生长抑制作用

Tab. 1 Inhibition effect of actinomycete strain KN37 broth on 12 species of pathogens

病原菌 Pathogens	抑制率/% Growth inhibiting rate	病原菌 Pathogens	抑制率/% Growth inhibiting rate
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	94.26 ± 0.36	立枯病菌 <i>Alternaria alternata</i>	89.76 ± 9.39
番茄细菌性斑点病菌 <i>Pseudomonas syringae</i>	93.66 ± 0.55	番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	92.07 ± 6.09
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	95.67 ± 3.01	白菜黑斑病菌 <i>Alternaria solani</i>	80.89 ± 0.52
黄瓜黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	45.98 ± 2.96	玉米小斑病菌 <i>Helminthosporium maydis</i>	65.06 ± 2.20
稻瘟病菌 <i>Phyricularia grisea</i>	74.02 ± 0.73	棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	47.85 ± 4.80
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	50.62 ± 2.23	葡萄白腐病菌 <i>Coniothyrium diplodiella</i>	58.91 ± 2.15

注:抑制率为平均值 ± 标准差($n=4$)

Note: Inhibition rate is mean values ± SE($n=4$)

2.2 放线菌 KN37 代谢物对番茄灰霉病菌的抑制作用 为了进一步明确 KN37 菌株代谢物的抑菌效果,采用菌丝生长速率法对 KN37 发酵液及其乙酸乙酯提取物的毒力进行测定,结果显示 KN37 发酵液的 EC_{50} 为 $134.0359 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,乙酸乙酯提取物对番茄灰霉病菌的 EC_{50} 为 $37.8643 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,均高于对照药剂腐霉利的 EC_{50} 值。

表 2 放线菌 KN37 发酵液及提取物对番茄灰霉病菌菌丝生长的毒力

Tab. 2 The virulences of actinomycete strain KN37 broth and its extracts on mycelial growth of *Botrytis cinerea*

药剂 Agents	毒力回归方程 Regression equation	$EC_{50} / (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	r	x^2	95% 置信区间 / ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 95% confidence interval
发酵液 Broth	$y = 3.3736 + 0.7646x$	134.0359	0.9935	0.22	22.9419 ~ 783.0938
乙酸乙酯提取物 Extracts	$y = 4.0997 + 0.5707x$	37.8596	0.9985	0.03	3.2980 ~ 434.6129
腐霉利 Procymidone	$y = 3.9242 + 0.9536x$	13.4293	0.9893	1.27	3.4089 ~ 52.9044

此外,放线菌 KN37 发酵液及其提取物也能显著抑制番茄灰霉病菌孢子的萌发,其中发酵液处理孢子 12 h 后的 EC_{50} 为 $40.3005 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($y = 3.2333 + 1.1005x, r = 0.9820$),发酵液提取物的 EC_{50} 为 $6.7134 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($y = 3.8601 + 1.3784x, r = 0.9917$)。KN37 代谢物对孢子萌发的毒力显著高于对菌丝生长的毒力,说明番茄灰霉病菌的孢子对 KN37 代谢物更为敏感。

2.3 放线菌 KN37 代谢物对番茄灰霉病的防治效果 组织法测定结果表明,KN37 发酵液提取物 ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对番茄灰霉病具有较强的防治效果(图 1A),其中保护作用(96.72%)与对照药剂腐霉利 ($400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 效果相当,而治疗作用(77.58%)显著优于对照药剂。从图 1B 可以看出,KN37 发酵液提取物施于番茄果实表面后,病原菌无法深入侵染;即使病原菌已经侵染,KN37 发酵液提取物也能在一定程度上限制其进一步扩展,从而防止果实大面积腐烂的情况发生。

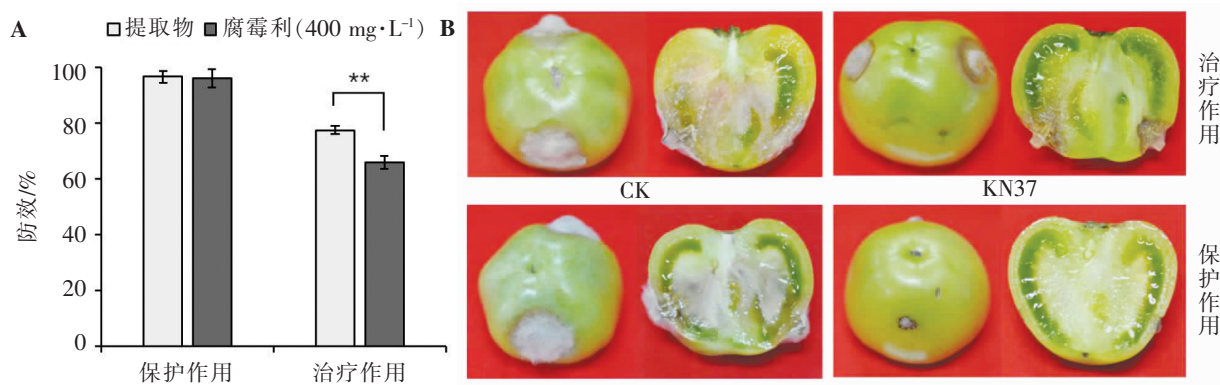


图1 放线菌 KN37 代谢物对番茄灰霉病的保护与治疗作用

Fig. 1 The protective and therapeutic effect of actinomycete strain KN37 extracts on grey mould of tomato fruits caused by *Botrytis cinerea*

利用 KN37 发酵液提取物(400 mg·L⁻¹) 防治温室大棚内的番茄灰霉病,结果表明,在施用3次发酵液后番茄灰霉病的发生率明显降低,对番茄灰霉病的防治效果可达63.12%,与对照药剂腐霉利效果(400 mg·L⁻¹) 相当(图2A),且番茄植株更加粗壮,叶片更绿(图2B)。推测 KN37 代谢物中不仅含有抑菌物质,还可能含有一些可以促进植物生长或诱导植物抗性的物质。

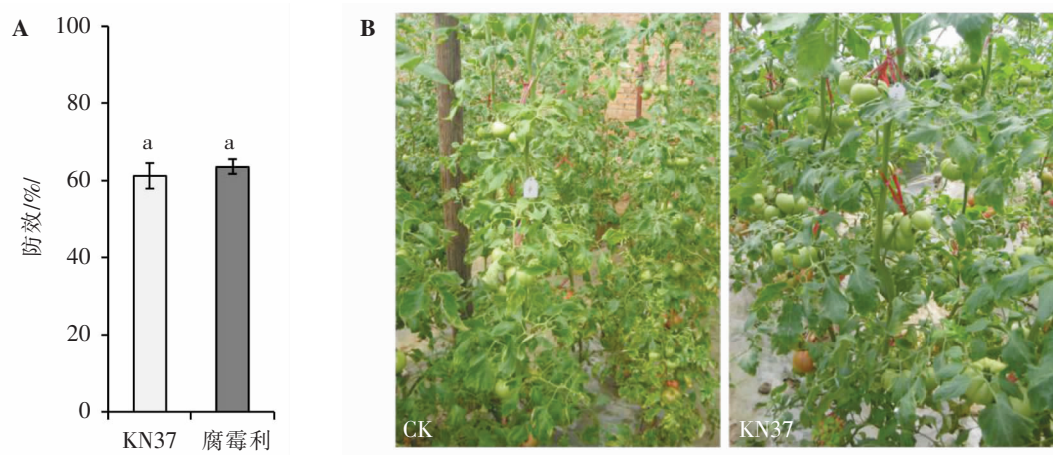


图2 放线菌 KN37 代谢物对温室大棚番茄灰霉病的防治效果

Fig. 2 The control effect of actinomycete strain KN37 extracts on tomato grey mould in greenhouse

2.4 放线菌 KN37 初步鉴定 放线菌 KN37 在高氏1号固体培养基上生长状况良好,菌落呈乳白色,圆形,质地致密,表面干燥,内源有凹陷中间有突起皱褶,菌落周围呈辐射状(图3A)。气生菌丝颜色为乳白色,发育良好,可生成多个长椭圆形孢子,孢子丝呈螺旋状生长(图3B)。基内菌丝为白色,无色素分泌。通过利用16S rDNA 进行 BLAST 序列比对,发现 KN37 菌株与 *Streptomyces kanamyceticus*(NR 043822) 的16S rDNA 序列相似度达到96%,最为近缘(图4)。结合形态观察结果和分子鉴定结果,可将放线菌 KN37 归属为白色链霉菌类群。

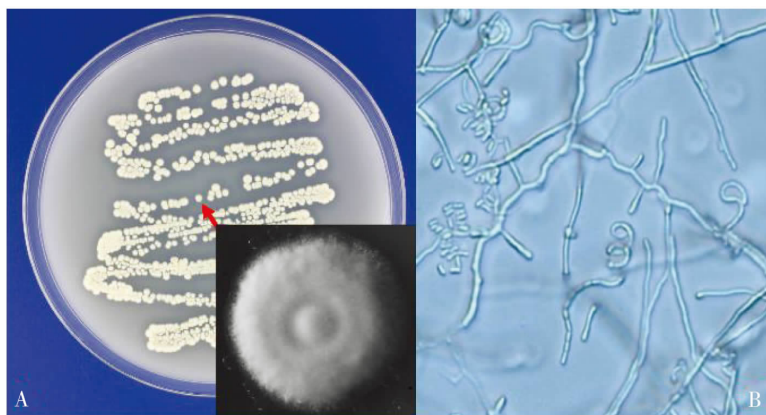


图3 放线菌 KN37 菌落(A)及孢子丝形态(B)

Fig. 3 Colony (A) and sporotrichial (B) of actinomycete strain KN37

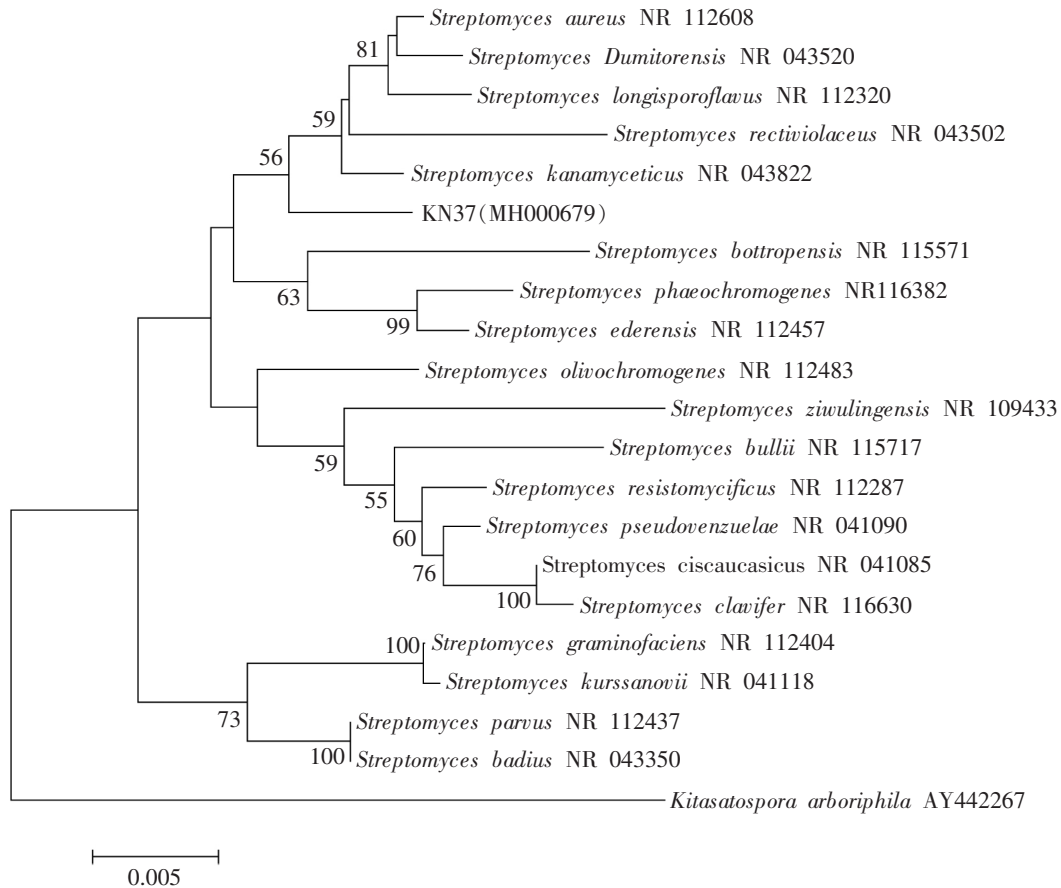


图4 基于 16S rDNA 序列分析的放线菌 KN37 系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of strain KN37 based on the sequence analysis of 16S rDNA

3 讨论

新疆喀纳斯地区生态环境特殊,具有丰富的微生物资源。从当地分离得到的放线菌数量较多,其中不乏一些具有较好生物活性的菌株。韩立荣等人曾从喀纳斯地区土壤中分离得到 1 株新放线菌 *Streptomyces kanasensis* ZX01,该菌可产生一种抗植物病毒的糖蛋白 GP-1,同时,还可诱导植物产生抗病性,极具开发价值^[12-13]。本课题组针对新疆高寒地区放线菌资源进行深度挖掘,目前已对天池和喀纳斯地区放线菌进行了研究,从中发现具有农用活性的放线菌数量占分离得到放线菌总数的 7.32%,相比青藏高原地区(5.73%)较高^[14]。由此可见,新疆高寒地区放线菌资源极为丰富,有待进一步开发利用。

放线菌 KN37 发酵液的抑菌谱测定结果表明,其对多种植物病害均具有较好的抑制效果,如番茄灰霉病、番茄早疫病、番茄细菌性斑点病等。此外,毒力测定表明,发酵液提取物对番茄灰霉病菌的毒力较强,对菌丝生长的 EC_{50} 为 $37.8596 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对孢子萌发的 EC_{50} 为 $6.7134 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上结果表明,KN37 菌株代谢物具有高效、广谱的杀菌特点,可进一步分离纯化得到抑菌化合物后开展农药制剂开发研究。分子鉴定结果表明,*S. kanamyceticus* 和 KN37 菌株的近缘菌(16S rDNA 序列相似度为 96%),该菌为卡那霉素的产生菌。卡那霉素广泛应用于医疗、畜牧及分子生物学方面,主要抑制细菌的蛋白质生物合成^[15]。卡那霉素本身不可抑制真菌生长,但有研究发现卡那霉素经过结构改造后可抑制真菌生长^[16]。通过文献调研,未发现 *S. kanamyceticus* 代谢物具有抗真菌活性。因此,结合 16S rDNA 分析结果可推断 KN37 菌株与 *S. kanamyceticus* 并非同一种菌,下一步可结合代谢物分析及多项分类法对 KN37 菌株进行鉴定。

参考文献:

- [1] 李芳, 陈建明, 陈忠其, 等. 植物免疫诱抗剂对番茄灰霉病和早疫病的抑菌效果 [J]. 农药, 2016, 55(3): 214-216.
- [2] 赵杨, 苗则彦, 李颖, 等. 番茄灰霉病防治研究进展 [J]. 中国植保导刊, 2014, 34(7): 21-29.

- [3] LECHENET M, DESSAINT F, PY G, et al. Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms [J]. *Nature Plants*, 2017, 3(3): 17008.
- [4] TILMAN D, CLARK M, WILLIAMS D R, et al. Future threats to biodiversity and pathways to their prevention [J]. *Nature*, 2017, 546(7656): 73–81.
- [5] WENCEWICZ T A. New antibiotics from nature's chemical inventory [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2016, 24(24): 6227–6252.
- [6] 黄剑, 李天华, 崔艺久, 等. 放线菌 H50 发酵液抑菌活性及其稳定性测定 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2012, 43(3): 311–315.
- [7] 张波, 吴文君, 宗兆锋. 放线菌 Z₁(139) 菌株的分离、鉴定及其生物活性 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(8): 69–72.
- [8] 张宁. 内蒙荒漠盐碱土壤中放线菌和嗜盐细菌的选择性分离及杀虫抑菌活性筛选 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [9] 邱珂. 甲基营养型芽孢杆菌 Lw-6 防治灰霉病研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [10] 阮继生, 黄英. 放线菌快速鉴定与系统分类 [M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [11] 王秀爽, 田江丽, 邵胜楠, 等. 新疆天池放线菌的分离及其抑菌活性 [J]. *西北农业学报*, 2018, 27(11): 1660–1666.
- [12] HAN L R, ZHANG G Q, MIAO G P, et al. *Streptomyces kanasensis* sp. nov., an antiviral glycoprotein producing actinomycete isolated from forest soil around Kanas [J]. *Current Microbiology*, 2015, 71: 627–631.
- [13] ZHANG G Q, FENG J T, HAN L R, et al. Antiviral activity of glycoprotein GP-1 isolated from *Streptomyces kanasensis* ZX01 [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2016, 88: 572–577.
- [14] 张国强. 青藏高原土壤放线菌分离及其农用活性初步研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [15] 张淑曼. 富产卡那霉素 B 菌株的构建及其调控基因的研究 [D]. 北京: 北京化工大学, 2018.
- [16] SUBEDI Y P, ALFINDEE M N, TAKEMOTO J Y, et al. Antifungal amphiphilic kanamycins: new life for an old drug [J]. *Medchemcomm*, 2018, 9(6): 909–919.

The Control Effect of Actinomycete Strain KN37 against Tomato Gray Mold

SHAO Shengnan, ZHANG Anqi, BAERNA Kumaer, ZHANG Guoqiang

(College of Agriculture / Key Laboratory of Oasis Agricultural Pest Management and Plant Protection Resources Utilization,
Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: In order to clarify the control effect of the fermentation product of actinomycete strain KN37 on plant diseases, we determined the antimicrobial spectrum of its broth *in vitro* and *in vivo*, and identified KN37 strain at a molecular level. The results showed that KN37 strain had a high inhibitory effect on mycelial growth and spore germination of *Botrytis cinerea*. This strain also showed high inhibition activities on *Pseudomonas syringae*, *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*, with their inhibition rate being higher than 90%. The strain KN37 had a high control effect on tomato gray mold *in vivo*, and, therefore, has a potential of research and development in the field of microbial pesticides.

Keywords: tomato gray mold; tomato disease; , antimicrobial activity; microbial pesticides

(责任编辑: 钟云芳)