

引用格式:

郭垂宝, 刘双清, 马文月, 韩军花, 曹海佳, 张小艳, 廖晓兰. 龙牙百合内生拮抗灰葡萄孢菌细菌的筛选与鉴定及发酵条件优化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2022, 48(2): 190–195.

GUO C B, LIU S Q, MA W Y, HAN J H, CAO H J, ZHANG X Y, LIAO X L. Screening and identification of endophytic bacteria against *Botrytis cinerea* on *Lilium brownii* var. *viridulum* Baker and optimization of fermentation conditions[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2022, 48(2): 190–195.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



龙牙百合内生拮抗灰葡萄孢菌细菌的 筛选与鉴定及发酵条件优化

郭垂宝¹, 刘双清¹, 马文月¹, 韩军花¹, 曹海佳¹, 张小艳¹, 廖晓兰^{1,2*}

(1.湖南农业大学植物保护学院,湖南长沙410128;2.湖南省生物农药与农药制剂加工工程技术研究中心,湖南长沙410128)

摘要:采用平板分离法、平板对峙法从龙牙百合内生菌中筛选获得了具有抑制灰葡萄孢菌活性的98号菌,其抑菌率为74%;对98号菌进行生理生化测定及16S rDNA序列分析,鉴定为唐菖蒲伯克霍尔德菌(*Burkholderia gladioli*)。通过单因素和正交试验优化该菌株的发酵条件和最适发酵培养基配方,结果表明,pH值为7、培养温度为32℃、接种量为发酵液体积的6%、250 mL三角瓶装100 mL牛肉膏蛋白胨液体发酵培养基、180 r/min的摇床培养5 d,其抑菌活性最大;优化后的最适培养基配方为硫酸亚铁0.15 g、玉米粉20 g、牛肉膏15 g,水1 L。

关键词:龙牙百合;龙牙百合灰霉病菌;内生细菌;发酵条件

中图分类号: S644.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2022)02-0190-06

Screening and identification of endophytic bacteria against *Botrytis cinerea* on *Lilium brownii* var. *viridulum* Baker and optimization of fermentation conditions

GUO Chuibao¹, LIU Shuangqing¹, MA Wenyue¹, HAN Junhua¹, CAO Haijia¹, ZHANG Xiaoyan¹, LIAO Xiaolan^{1,2*}

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China; 2.Hunan Biological Pesticides and Pesticide Preparation Processing Engineering Technology Research Center, Changsha, Hunan 410128, China)

Abstract: Strain 98 with the activity of inhibiting *Botrytis cinerea* was screened from the endophytic bacteria of *Lilium brownii* var. *viridulum* Baker by plate separation method and plate confrontation method, and the antibacterial rate was 74%. The endophyte strain 98 was identified as *Burkholderia gladioli* by physiological and biochemical assays and 16S rDNA sequence analysis. The fermentation conditions and the formula of fermentation medium for strain 98 were optimized by single factor and orthogonal tests. The results showed that 100 mL of fermentation medium in 250 mL triangular flasks with pH 7, incubation temperature of 32 °C, and inoculum size of 6% under shaker incubation at 180 r/min for 5 days resulted in the greatest inhibition activity. The optimized medium was formulated as FeSO₄ 0.15 g, corn flour 20 g, beef paste 15 g in 1 L water.

Keywords: *Lilium brownii* var. *viridulum* Baker; *Botrytis cinerea*; endophytic bacteria; fermentation conditions

收稿日期: 2020-11-24

修回日期: 2021-10-29

基金项目: 湖南省科学技术厅“三区”科技人才项目(湘科计[2021]35号)

作者简介: 郭垂宝(1993—),男,湖南邵阳人,硕士研究生,主要从事龙牙百合连作障碍研究,592508668@qq.com; *通信作者,廖晓兰,博士,教授,主要从事生防资源的挖掘与利用研究, liaoxi88@126.com

灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)通常引起植物的灰霉病^[1],其寄主广泛,可侵染 1400 余种植物^[2]。在百合生长过程中灰霉病是主要病害之一^[3]。灰葡萄孢菌繁殖速度快、产孢量大、发病周期短^[4],化学防治仍然是主要的防治方法。利用内生拮抗菌防治灰霉病已有一些报道:内生菌 ZSY-1 对番茄叶片和果实上灰霉病的防效分别为 80%和 75%^[5];短短芽孢杆菌 W4 对番茄灰霉病菌菌丝生长抑制率达到 93%^[6];内生枯草芽孢杆菌 Em7 对葡萄的相对防治效果为 79%^[7];NR4-1 对葡萄灰霉病菌抑菌率达 69%^[8];人参内生细菌 GS-1 对人参灰霉病菌孢子萌发的抑制率达 62%^[9]。

龙牙百合是一种“药食同源”的天然保健品,经济价值高,在湖南省隆回县龙牙百合年产值已达 7 亿元^[10]。随着栽培年限延长,百合病害发生较频繁,灰霉病成为其地上部发生最严重的病害,造成严重的经济损失^[11]。鉴于此,笔者拟采集健康龙牙百合鳞茎部分,采用平板对峙法,分离筛选对龙牙百合灰霉病菌具拮抗作用的内生细菌,对其进行生理生化特性及分子生物学鉴定,优化发酵条件,以期丰富龙牙百合灰霉病生防菌种资源,为防治龙牙百合灰霉病提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

于湖南省隆回县采集龙牙百合及叶片。龙牙百合灰葡萄孢菌由湖南农业大学植物保护学院生防资源筛选及利用实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 龙牙百合内生拮抗灰葡萄孢菌细菌的分离筛选及鉴定

取龙牙百合健康鳞茎 5 g,参照赵新贝等^[12]的方法处理鳞茎;参照张猛等^[13]的方法,分离龙牙百合鳞茎的内生细菌;采用平板对峙法,筛选对龙牙百合灰葡萄孢菌具拮抗作用的内生细菌菌株。选取对龙牙百合灰葡萄孢菌拮抗效果好的菌株,按《微生物学实验技术》^[14],测定其生理生化特性;将纯化后的菌株送生工生物工程(上海)有限公司进行 16S rDNA 测序,得到该内生菌的基因序列后在

NCBI 上进行序列比对,并在其上获得该菌的登录号。运用 MEGA 6.0 软件构建系统发育树。

1.2.2 内生拮抗菌发酵条件的优化

1) 发酵条件的优化。以牛肉膏蛋白胨液体培养基^[15]为发酵培养基,在不同发酵时间(1、2、3、4、5、6、7 d),不同接种量(占总体积的 2%、4%、6%、8%、10%),不同装液量(50、100、150、200、250 mL),不同 pH(5、6、7、8、9),不同摇床转速(120、140、160、180、200、220 r/min),不同发酵温度(24、28、32、36、40 °C)下测定内生拮抗菌对灰葡萄孢菌的抑菌活性。

2) 培养基成分的优化。以牛肉膏蛋白胨液体培养基为基础,以 5 种无机盐(1.0 g/L ZnSO₄、1.0 g/L KH₂PO₄、1.0 g/L MgSO₄、0.1 g/L FeSO₄、1.0 g/L CaCO₃),5 种碳源(甘露醇、麦芽糖、玉米粉、可溶性淀粉、蔗糖)20 g/L,5 种氮源(牛肉膏、蛋白胨、KNO₃、黄豆粉、(NH₄)₂SO₄) 10 g/L 分别代替基础培养基中的无机盐、碳源和氮源进行发酵,测量抑菌圈直径,确定最适碳源、氮源和无机盐。

3) 发酵组分正交试验的优化。对筛选的发酵培养基最佳组分进行 L₉(3³)正交试验优化,确定最优培养基组分配比。

1.2.3 内生拮抗菌离体生测及对部分作物的安全性评价

摘取果熟期大小及形状相近、健康的龙牙百合叶片,5%次氯酸钠消毒 5 min,无菌水冲洗 3 次,晾干,无菌接种针刺伤,备用。

设 4 个处理:处理 1,取龙牙百合叶片 3 片,在拮抗菌发酵液中浸泡 30 s 后,在叶片针刺处接种灰葡萄孢菌饼(20 °C、培养箱培养 7 d);处理 2,取龙牙百合叶片 3 片,在叶片针刺处接种灰葡萄孢菌饼,待发病后(3 d),将拮抗菌发酵液喷于叶片上;处理 3(阳性对照),取龙牙百合叶片 3 片,在叶片针刺处接种灰葡萄孢菌菌饼,再喷无菌水;处理 4(阴性对照),取龙牙百合叶片 3 片,不作其他处理。每个处理重复 3 次。人工气候箱中,25 °C、12 h 光照与黑暗交替培养,5 d 后观察拍照,用 Photoshop 计算病斑大小^[16-17]。

选取玉米、黄豆、辣椒、茄子、水稻叶片为材料, 5%次氯酸钠消毒 5 min, 无菌水冲洗 3 次, 晾干, 用无菌接种针蘸取拮抗菌发酵液刺伤植物叶片进行接种, 分别重复 3 次, 25 °C、12 h 光照和黑暗交替培养, 3 d 后观察植物叶片情况。

1.3 数据处理

采用 Minitab 17 进行正交优化试验设计, 运用 Microsoft Excel 2016 和 SPSS 21.0 进行数据处理。



1 拮抗效果; 2 平板带毒效果; 3 对照。

图 1 龙牙百合内生拮抗菌 98 号菌对百合灰霉菌的拮抗效果

Fig. 1 Antagonism effect of endophytic strain 98 against grey mold pathogen on lily

98 号菌 28 °C 恒温培养箱培养 48 h, 在牛肉膏蛋白胨琼脂培养基上呈淡黄色菌落, 圆形, 表面光滑有光泽, 不透明(图 2-1); 革兰染色阴性(图 2-2); 生理生化测定结果表明, 98 号菌能水解淀粉、液化

2 结果与分析

2.1 龙牙百合内生拮抗菌的筛选及鉴定结果

采用平板对峙法, 对分离得到的内生细菌进行拮抗作用测定, 筛选出 1 株对龙牙百合灰葡萄孢菌具拮抗效果的内生菌, 命名为 98 号菌, 含菌平板抑菌带宽 16.93 mm, 抑制率可达 74%(图 1)。

明胶、产生硫化氢气体, 甲基红与 V.P. 试验呈阳性, 可利用葡萄糖、不能利用乳糖、蔗糖、麦芽糖、木糖, 不能在麦康凯培养基上生长, 能产生脲酶, 不能产生氧化酶。

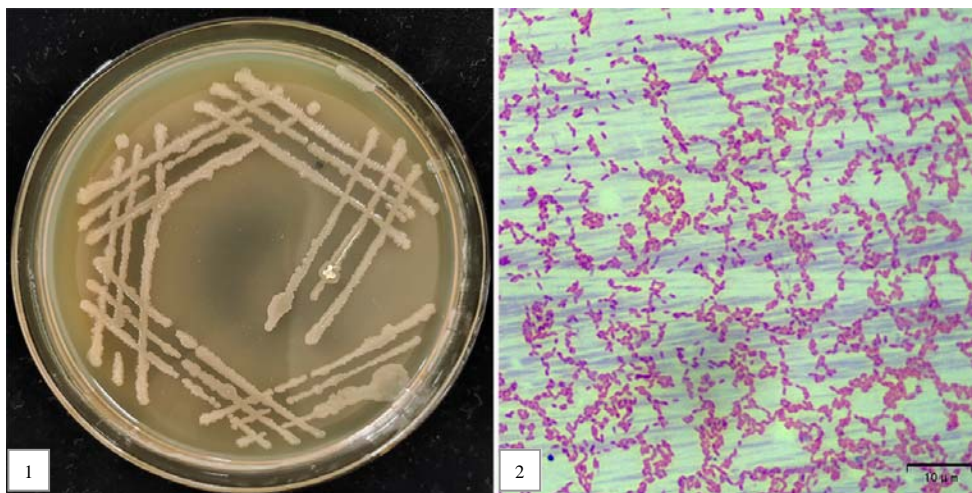


图 2 98 号菌的形态特征及革兰染色结果

Fig. 2 Staining and morphological characteristics of strain 98

将 98 号菌送至生工生物工程(上海)有限公司测序, 得到长度为 1497 bp 的片段, 提交至 GenBank, 获得登录号 MW320460。测序结果经 BLAST 同源性比对发现, 98 号菌与唐菖蒲伯克霍尔德菌的同源

性达到 99%。将菌株序列与高度同源性序列进行多重比较并构建系统发育树, 结果显示 98 号菌与 *Burkholderia gladioli* 聚在同一系统分支上(图 3)。

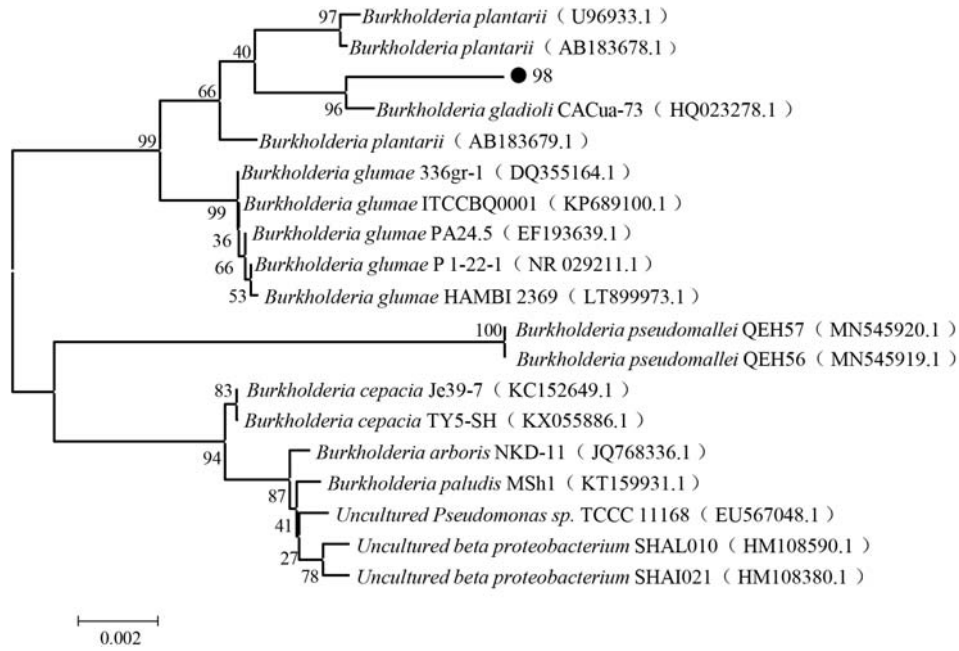


图 3 基于 16S rDNA 序列构建的 98 号菌系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree for strain 98 based on 16S rDNA sequence analysis

2.2 98 号菌发酵的较优条件

由表 1 可知，在发酵时间为 5 d、pH 为 7、装液量为 100 mL 和转速 180 r/min 时，抑菌带宽度显著高于其他处理；接种量在 2%、4%、6% 和 8% 时，抑菌带没有显著差异，但 6% 抑菌带宽度最大；因此，接种量控制在 2%~8%，最优选取 6%。发酵温

度在 32 °C 时抑菌带宽度最大，与 28 °C 无显著差异，28 °C 与 24 °C 又无显著差异，但 32 °C 时显著高于 24 °C 的，因此最优温度选择 32 °C。综上，优化后的发酵条件为温度 32 °C、pH 为 7、装液量为 100 mL，接种量 6%、转速 180 r/min，发酵 5 d。

表 1 不同培养条件下 98 号菌的抑菌带宽度

Table 1 Effect of different culture conditions on antimicrobial activity of strain 98

| 发酵时间/d | 抑菌带宽度/mm | 起始 pH | 抑菌带宽度/mm | 接种量/% | 抑菌带宽度/mm |
|--------|---------------|-------|----------------|-------|---------------|
| 1 | (23.67±1.15)b | 5 | (19.00±1.00)b | 2 | (21.67±1.53)a |
| 2 | (24.00±1.73)b | 6 | (19.33±1.15)b | 4 | (22.00±1.73)a |
| 3 | (24.33±0.58)b | 7 | (21.33±0.58)a | 6 | (23.67±0.58)a |
| 4 | (25.00±1.00)b | 8 | (18.00±1.00)bc | 8 | (21.67±1.53)a |
| 5 | (27.33±0.58)a | 9 | (17.33±0.58)c | 10 | (19.00±1.00)b |
| 6 | (21.33±0.58)c | | | | |
| 7 | (16.67±1.15)c | | | | |

| 装液量/mL | 抑菌带宽度/mm | 温度/°C | 抑菌带宽度/mm | 转速/(r·min ⁻¹) | 抑菌带宽度/mm |
|--------|---------------|-------|----------------|---------------------------|----------------|
| 50 | (24.33±0.58)b | 24 | (19.00±1.00)b | 140 | (24.00±1.00)c |
| 100 | (30.33±1.53)a | 28 | (20.00±1.00)ab | 160 | (25.00±0.00)b |
| 150 | (23.33±0.58)b | 32 | (22.00±1.00)a | 180 | (26.00±0.00)a |
| 200 | (20.67±0.58)c | 36 | (16.00±1.73)c | 200 | (24.67±0.58)bc |
| 250 | (18.67±0.58)d | 40 | (9.00±1.00)d | 220 | (24.00±0.00)c |

不同小写字母表示处理间差异显著(P < 0.05)。

由表 2 可知，分别以玉米粉作碳源和牛肉膏作氮源发酵时，98 号菌的抑菌活性最大，且显著高于其他组的，二者为最佳碳源和氮源；以硫酸亚铁作

无机盐发酵 98 号菌，其抑菌活性优于其他组，与硫酸镁、磷酸二氢钾和碳酸钙之间无显著差异，但显著高于硫酸锌，最佳无机盐为硫酸亚铁。

表2 98号菌在不同培养基组分下对灰葡萄孢菌的抑菌活性

| 碳源 | 抑菌带宽度 | 氮源 | 抑菌带宽度 | 无机盐 | 抑菌带宽度 |
|-------|---------------|-----|----------------|---------------------------------|----------------|
| 蔗糖 | (21.67±0.67)b | 牛肉膏 | (23.67±0.33)a | ZnSO ₄ | (19.67±0.33)b |
| 可溶性淀粉 | (21.00±0.58)b | 蛋白胨 | (20.33±0.33)c | KH ₂ PO ₄ | (20.33±0.33)ab |
| 麦芽糖 | (19.67±0.33)b | 黄豆粉 | (21.67±0.33)b | MgSO ₄ | (20.00±0.58)ab |
| 玉米粉 | (24.33±0.33)a | 硝酸钾 | (21.33±0.33)b | FeSO ₄ | (21.67±0.33)a |
| 甘露醇 | (19.67±1.20)b | 硫酸铵 | (21.00±0.00)bc | CaCO ₃ | (20.00±1.00)ab |

同列不同小写字母表示处理间差异显著($P < 0.05$)。

选取玉米粉(10、20、30 g/L)、牛肉膏(5、10、15 g/L)和硫酸亚铁(0.05、0.10、0.15 g/L)进行正交试验,结果(表3)表明,对98号菌生长影响效果的主次为牛肉膏用量、玉米粉用量、硫酸亚铁用量。适合98号菌生长的最优培养基组分是0.15 g/L硫酸亚铁、20.0 g/L玉米粉、15.0 g/L牛肉膏。

表3 98号菌培养基优化的正交试验结果

Table 3 Orthogonal test results of optimization of culture medium for strain 98

| 编号 | FeSO ₄ / (g·L ⁻¹) | 玉米粉/ (g·L ⁻¹) | 牛肉膏/ (g·L ⁻¹) | 抑菌带 宽度/mm |
|----------------|---|------------------------------|------------------------------|--------------|
| 1 | 0.05 | 10.0 | 5.0 | 20.22 |
| 2 | 0.10 | 10.0 | 10.0 | 19.36 |
| 3 | 0.15 | 10.0 | 15.0 | 24.16 |
| 4 | 0.10 | 20.0 | 5.0 | 22.59 |
| 5 | 0.15 | 20.0 | 10.0 | 23.41 |
| 6 | 0.05 | 20.0 | 15.0 | 25.82 |
| 7 | 0.15 | 30.0 | 5.0 | 21.47 |
| 8 | 0.05 | 30.0 | 10.0 | 21.28 |
| 9 | 0.10 | 30.0 | 15.0 | 22.62 |
| K ₁ | 22.44 | 21.25 | 21.43 | |
| K ₂ | 21.52 | 23.94 | 21.35 | |
| K ₃ | 23.01 | 21.79 | 24.20 | |
| R | 1.49 | 2.69 | 2.85 | |

2.3 拮抗菌离体生测及其对部分作物的安全性评价结果

2.3.1 拮抗菌生测结果

生测试验结果(图4)表明,处理4(阴性对照)针刺处未见病斑;处理1、2、3在接种龙牙百合灰霉病菌菌饼处发病,病斑以菌饼为中心扩散,但病斑大小有差异;处理3(阳性对照)病斑面积最大,处理1、处理2用98号菌发酵液处理后其病斑均小于处理3,且处理2病斑面积最小,防治效果最好。



1 处理1; 2 处理2; 3 阳性对照; 4 阴性对照。

图4 98号菌发酵液对龙牙百合叶片灰霉病的防治效果

Fig. 4 Control effect of fermentation broth of strain 98 against *Botrytis cinerea* in vitro

2.3.2 内生细菌对部分作物的安全性

如图5所示,用98号菌发酵液处理玉米、黄豆、辣椒、茄子、水稻叶片后未表现出任何病状,表明98号菌发酵液对玉米、黄豆、辣椒、茄子、水稻安全。



1 玉米叶; 2 黄豆叶; 3 辣椒叶; 4 茄子叶; 5 水稻叶。

图5 98号菌对5种作物叶片的致病性

Fig. 5 Pathogenic test of strain 98 on five kinds of plant leaves

3 讨论与结论

结合 16S rDNA 基因序列、生理生化和形态学特征分析, 确定 98 号菌为唐菖蒲伯克霍尔德菌 (*Burkholderia gladioli*)。98 号菌的抑菌活性受其发酵时间、接种量、摇瓶装液量、pH、转速以及发酵温度的影响。此外, 还受硫酸亚铁、玉米粉、牛肉膏 3 种培养基组分的影响。

百合灰霉病菌主要为害百合的叶和茎秆, 形成半椭圆形病斑, 气候适宜时病斑迅速扩大, 发病严重时植株枯死^[18]。筛选得到的唐菖蒲伯克霍尔德菌 98 号对其具有良好的抑菌效果, 抑菌带明显, 最大抑制率可达 74%, 这一结果与江西师范大学申请的“一株东乡野生稻内生细菌唐菖蒲伯克霍尔德菌 Fse32 及其应用”专利结果相一致, 该专利指出唐菖蒲伯克霍尔德菌能显著促进植物生长并对多种病原真菌有拮抗活性^[19], 这表明笔者分离获得的 98 号菌对百合灰霉病具有一定的生防潜力, 其抑菌机理、防病方式及田间应用等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 黄蓉, 胡建坤, 黄瑞荣, 等. 环境条件对灰葡萄孢菌菌核萌发的影响[J]. 植物病理学报, 2019, 49(1): 134-140.
- [2] FILLINGER S, ELAD Y. Botrytis: the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems [M]. Cham: Springer International Publishing, 2016.
- [3] GAO X, ZHANG Q, ZHAO Y Q, et al. The lre-miR159a-LrGAMYB pathway mediates resistance to grey mould infection in *Lilium regale*[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(6): 749-760.
- [4] 张晓柯. 灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)对两种呼吸抑制剂烯肟菌胺和氟吡菌酰胺的抗性风险评估[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- [5] 高振峰, 李娜, 张晓宇, 等. 番茄灰霉病高效内生拮抗细菌的筛选与定殖特性[J]. 河南农业科学, 2020, 49(3): 88-100.
- [6] 杨从军. 抗番茄灰霉病菌的内生短短芽孢杆菌 W4 菌株发酵条件优化[J]. 中国蔬菜, 2019(6): 64-69.
- [7] 伏波, 姚娟妮, 高小宁, 等. 植物内生枯草芽孢杆菌 Em7 菌株对葡萄灰霉病菌的抑菌活性[J]. 农药学报, 2016, 18(4): 465-471.
- [8] 周玲璇, 刘娅. 红提葡萄内生细菌的分离鉴定及灰霉病拮抗菌的筛选[J]. 生物技术通报, 2016, 32(4): 184-189.
- [9] 潘晓曦, 关一鸣, 李美佳, 等. 人参内生细菌 GS-1 的分离鉴定及对灰霉病菌的拮抗作用[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(15): 148-150.
- [10] 夏青, 罗晨, 曾粮斌, 等. 强还原土壤处理对再植龙牙百合生长不利因子的消减作用[J]. 土壤学报, 2022, 59(1): 183-193.
- [11] 吴力红, 李润根, 廖振军, 等. 龙牙百合灰霉病病原菌灰葡萄孢菌的分离与鉴定[J]. 湖南农业科学, 2021(7): 7-10.
- [12] 赵新贝, 上官妮妮, 李月飞, 等. 番茄灰霉病拮抗细菌 18BS-12 发酵条件的优化及防治效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2016, 44(6): 116-124.
- [13] 张猛, 王琼, 冯发运, 等. 植物内生特基拉芽孢杆菌的分离、鉴定及防治西瓜枯萎病效果[J]. 中国生物防治学报, 2017, 33(3): 371-377.
- [14] 石若夫. 微生物学实验技术[M]. 北京: 北京航空航天大学出版社, 2017.
- [15] 全桂静. 苹果采后病害拮抗细菌的筛选与防腐效果研究[J]. 北方园艺, 2013(11): 130-132.
- [16] 崔华威, 杨艳丽, 黎敬涛, 等. 一种基于 Photoshop 的叶片相对病斑面积快速测定方法[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(22): 4.
- [17] 孙家隆, 慕卫. 农药学实验技术与指导[M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [18] 瞿友均, 徐源辉. 百合灰霉病的发生特点和综合防治方法[J]. 中国植保导刊, 2010, 30(4): 26-27.
- [19] 张志斌, 刘斌, 朱笃, 等. 一株东乡野生稻内生细菌唐菖蒲伯克霍尔德菌 Fse32 及其应用: CN105018371B[P], 2019-05-10.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 罗维