

拮抗菌 A02 代谢产物对几种果树病害的活性

刘 霆¹, 陶万强², 王 合², 花玉鹏^{1,3}, 刘伟成¹

(1. 北京市农林科学院 植物保护环境保护研究所, 北京 100097; 2. 北京市林业保护站, 北京 100029; 3. 河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002)

摘 要:以北京市农林科学院植物保护环境保护研究所自主分离筛选的利迪链霉菌 A02 为供试菌株, 采用离体生物测定法评价了其对于葡萄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、桃褐腐病菌 (*Monilinia fructicola*) 和枣青霉病菌 (*Penicillium* sp.) 3 种果树病原真菌的室内毒力, 通过小区试验测定了其对于葡萄霜霉病的田间防效。结果表明: A02 活性产物对葡萄灰霉病菌、桃褐腐病菌和枣青霉病菌均具有强毒力, 对其菌丝生长的抑制中浓度分别为 1.3696、8.1115 和 7.4989 mg/L, 最低抑菌浓度均在 30 mg/L 以下; 对葡萄霜霉病的田间小区防效达 95.7%, 显著高于对照生物农药 10% 宝丽安可湿性粉剂和 1% 多抗霉素水剂。

关键词:利迪链霉菌; 纳他霉素; 果树病害; 室内毒力; 田间防效

中图分类号: S 436.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2011)17-0013-04

果树病害是影响果品产量和质量的重障碍之一, 长期以来果树病害的防治主要依赖于化学农药^[1]。近年来果树病害, 尤其是设施果树病害的发生和危害呈上升趋势^[2], 由于果树的高效益特性, 迫使病害防治中的用药次数和施药量不断增加, 这一方面加重了环境的污染, 破坏了果园生态平衡; 另一方面也导致农药

残留超标, 影响果品质量, 不仅威胁了人们的身体健康, 也降低了其在国际市场上的竞争能力; 同时, 化学农药的长期大量应用也诱导了病原菌的抗药性, 有研究表明, 桃褐腐病的主要病原菌美澳型核果褐腐菌 (*Monilinia fructicola*) 对生产上常用的苯丙咪唑类杀菌剂甲基硫菌灵已出现了抗药性菌株^[3-4], 葡萄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 甚至出现了兼抗苯丙咪唑类、二甲酰亚胺类和氨基甲酸酯类杀菌剂的“RRR”型菌株^[2], 增加了此类病害防治难度。因此, 开发新的防治果树病害的替代技术和产品日益受到重视, 而微生物源农药以其源于自然、资源丰富、安全环保等特点成为近年来研究的热点, 许多针对重要果树病害生防微生物的研究已有报道^[5-8]。菌株 A02 是该试验组分离筛选到的高活性拮抗菌, 经鉴定为利迪链霉菌 (*Streptomyces lydicus*), 前期研究表明其代谢产物的主要抗菌组分为

第一作者简介: 刘霆(1975-), 男, 河南信阳人, 博士, 现主要从事植物病害生物防治研究工作。E-mail: lting11@163.com。

责任作者: 刘伟成(1959-), 男, 辽宁凌源人, 博士, 研究员, 现主要从事植物真菌病害及其生物防治研究工作。E-mail: liuwc@126.com。

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目(6101001); 北京市科技计划资助项目(D0705002040291); 北京市农林科学院资助项目(2010A006)。

收稿日期: 2011-05-27

Effects of Polyamines and Urea Applied in Autumn on Storage Nutrition Content and Freezing Tolerance in Grapevine

PING Ji-cheng, SHAN Shou-ming, LIU Jing, WANG Zhen-ping
(College of Agriculture, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

Abstract: In order to increase the storage nutrition and freezing tolerance in dormancy of grapevine. Used *Vitis vinifera* L. Cabernet Sauvigno that was 6 years old and had the same growth vigor as materials, the effects of urea and polyamine treatments that influenced on photosynthesis, carbohydrate content, metabolism of reactive oxygen species, bud and inflorescence quality were studied. The results showed that 4 mM spermine, 1 mM spermidin, 3% urea applied in autumn significantly increased Gs, chlorophyll content and net photosynthetic rate. In the grapevine dormancy, carbohydrate content, bud quality, SOD and CAT activities were significantly increased, and the comparatively conductance, MDA content significantly decreased by foliar sprayed of 4 mM spermine, 1 mM spermidin, 3% urea, in the next year, the inflorescence quality increased too. It was concluded that foliar sprayed of suitable concentration of polyamine and urea in autumn could improve the storage nutrition, freezing tolerance, bud and inflorescence quality by increased the photosynthesis in grapevine in autumn, in the end, the quality and yield of grapevine would improved too.

Key words: polyamines; urea; grapevine; storage nutrition; freezing tolerance

广谱抗真菌天然药物纳他霉素^[9],对多种植物病原真菌均有强烈的抑制作用^[10]。该研究测定其对几种果树病害病原真菌的室内毒力及对葡萄霜霉病的小区防治效果,旨在明确其对重要果树病害的防控潜能,为其进一步的深入研究和开发应用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 利迪链霉菌 A02 由北京市农林科学院植物保护环境保护所分离自北京远郊森林土壤,该实验室保存编号为 JZB130002;靶标病原菌葡萄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、桃褐腐病菌 (*Monilinia fructicola*)和枣青霉病菌 (*Penicillium* sp.) 分别分离自各自的病果。

1.1.2 培养基 固体培养基:改良高氏(Gause)I 号和 PDA 培养基按文献^[11]的方法配制。菌株 A02 液体种子培养基:1.5% 黄豆粒(加适量蒸馏水煮沸 0.5~1 h 取滤液),0.5% 蛋白胨,0.25% (NH₄)₂SO₄,2% 葡萄糖,1% 淀粉,0.025% MgSO₄·7H₂O,0.02% KH₂PO₄,0.4% NaCl。配成水溶液,调 pH 至 7~8 后,加 1% CaCO₃。1.06 kg/cm² 灭菌 20 min。液体发酵培养基:1.0% 葡萄糖,4.0% 可溶性淀粉,0.005% 淀粉酶,0.5% 蛋白胨,0.5% (NH₄)₂SO₄,4% 豆粕粉,1% 棉籽饼粉;0.1% MgSO₄·7H₂O,0.5% NaCl,0.02% KH₂PO₄。配成水溶液,调 pH 至 7~7.4 后,加 0.7% CaCO₃。1.06 kg/cm² 灭菌 20 min。

1.1.3 对照药剂 10% 宝丽安可湿性粉剂(多抗霉素 WP);日本科研制药株式会社;1% 多抗霉素水剂:陕西绿盾生物制品有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 A02 代谢活性产物的制备及其定量分析 摇瓶发酵:按文献^[10]的方法进行,发酵液经 0.45 μm 的无菌微孔滤膜过滤除菌,无菌滤液用于室内毒力测定。30 L 发酵罐补料批发酵:液体种龄 20~30 h,接种量 5%~10% (V/V),培养温度 28~30℃,pH 控制在 6.0~6.3 之间,搅拌转速 340~380 r/min,控制溶氧 20%~30%,OUR 和 CER 分别控制在 25~15 和 20~12 之间;发酵周期 108 h。发酵液经过滤离心去除菌体,无菌滤液用于田间防治试验,用时稀释至含纳他霉素浓度为 50 mg/L。发酵滤液中纳他霉素含量的测定:采用紫外分光光度法^[12],以甲醇为溶剂进行测定。

1.2.2 对病原菌的室内毒力测定 采用带毒平皿法^[13]检测活性产物对靶标病原菌菌丝生长速率的抑制作用。靶标病原菌在 PDA 平板上 25℃ 培养 5~10 d,打制直径 7 mm 菌饼;用 A02 发酵液制备纳他霉素终浓度分别为 0(CK)、2、4、6、8、10、20、30 mg/L 的

PDA 含毒平板,将菌饼菌丝面朝下置于含毒平板中央,3 次重复,25℃ 恒温培养 5~10 d,待对照菌落充分扩展后用十字交叉法测量菌落直径,取平均值计算对菌丝生长的相对抑制率;以相对抑制率为 100% 时的纳他霉素浓度视为其活性产物对该菌的最低抑制浓度(MIC);利用统计分析软件 Spss 13.0 对发酵液纳他霉素浓度的对数值与其相对抑制率对应的机率值进行线性回归分析,建立毒力回归方程,求算其对靶标病原菌的抑制中浓度(IC₅₀)。

1.2.3 葡萄霜霉病田间小区防治试验 试验园概况:试验园位于北京市延庆县张山营镇松湖果园,地处华北平原与内蒙古高原的过渡地带,属大陆季风性气候,海拔 500 m,气候冬冷夏凉,昼夜温差大,光照充足,年平均气温 8.5℃,无霜期 182 d,日照时数 2 826 h,平均降水量 494 mm。试验年份 6~9 月份平均气温 22.4℃,月均温 7 月份最高,为 23.4℃,6 月份最低,为 21.3℃;园内平均相对湿度 85.1%,月均湿度 6 月份最高,为 90.9%,9 月份最低,为 72.5%。园地面积 11.3 hm²,其中葡萄栽培面积 1.7 hm²。试验样地面积 0.4 hm²,供试葡萄品种为红提,多为 10 a 生,栽植行株距 4.7 m×0.7 m,每 667 m² 栽植 203 株。采用水平棚架,架高 2 m,架面长 50 m;春季出土后施 1 次有机肥,每 667 m² 施 5 000 kg;生长季于 6 月末每 667 m² 加施尿素 40 kg。葡萄园于 2008 年 7 月 15 日发现葡萄霜霉病,于 7 月 16 日设计试验进行防治。病害为初发阶段,防治前发病基数忽略不计。试验设计:试验共设 4 个处理:A02 发酵滤液(含纳他霉素 50 mg/L)、10% 宝丽安可湿性粉剂 600 倍液、1% 多抗霉素水剂 500 倍液喷雾处理和清水喷雾对照。每处理小区面积 222 m²,随机排列,设 3 次重复;于发病初期全株均匀喷施,7 d 后再喷 1 次。病情调查及数据处理:第 2 次施药后 10 d 进行病情调查,每小区取 10 个样株,调查病叶率和发病程度,按以下标准进行病害分级:0 级:无病斑;1 级:病斑面积占整个叶面积的 5% 以下;3 级:病斑面积占整个叶面积的 6%~10%;5 级:病斑面积占整个叶面积的 11%~25%;7 级:病斑面积占整个叶面积的 26%~50%;9 级:病斑面积占整个叶面积的 50% 以上。利用统计分析软件 Spss 13.0 对试验结果进行方差分析和多重比较。

2 结果与分析

2.1 室内抑菌活性

不同浓度的 A02 活性产物对葡萄灰霉病菌、桃褐腐病菌和枣青霉病菌菌丝生长的平板抑制作用见图 1~3,其抑制率及所得毒力回归方程列于表 1。由表 1 可知,A02 活性产物对供试的 3 种病原真菌均有强烈

的抑制作用,其抑制中浓度均小于 8.1115 mg/L,且三者差异显著,其中对葡萄灰霉病菌的最低;从不同浓度的活性产物对此菌的抑制率亦可见,浓度由 2 mg/L 上升到 4 mg/L,其相对抑菌率从 7.69% 跃升至 76.92%,提高了近 10 倍,说明其在较低的浓度下对此菌即可产生较强的毒力,随着浓度的增加,其毒力增强的趋势减缓。从最低抑菌浓度看,三者均在 30 mg/L 以下,对枣青霉的最低,为 20 mg/L,但在试验检测过程中,此浓度下枣青霉接种菌饼表面亦有少量菌丝生长,只是不能扩展到平板培养基中,故其实际 MIC 值应在 20~30 mg/L 之间,所以三者基本相近。

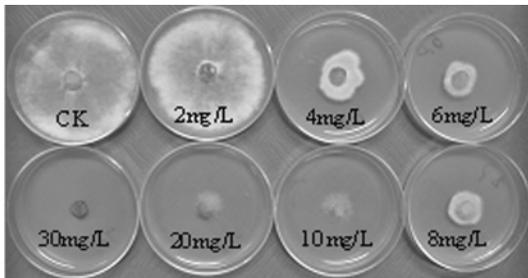


图 1 A02 活性产物对葡萄灰霉病菌的抑制作用
Fig.1 The antifungal effect of bioactive metabolite of strain A02 against *Botrytis cinerea*

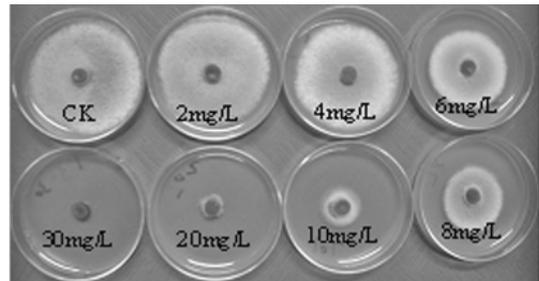


图 2 A02 活性产物对桃褐腐病菌的抑制作用
Fig.2 The antifungal effect of bioactive metabolite of strain A02 against *Monilinia fructicola*

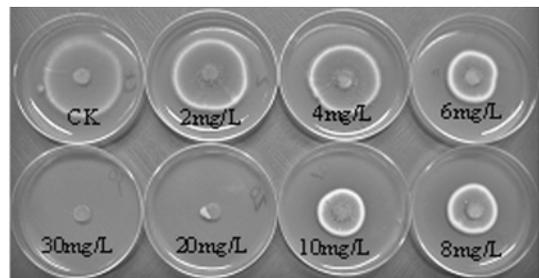


图 3 A02 活性产物对枣青霉病菌的抑制作用
Fig.3 The antifungal effect of bioactive metabolite of strain A02 against *Penicillium* sp.

表 1 A02 活性产物对 3 种植物病原真菌的室内毒力测定结果

Table 1 The toxicity of bioactive metabolite of strain A02 against 3 species of fruit pathogenic fungi *in vitro*

病原菌 Pathogen	A02 活性产物浓度(mg/L)及其抑菌率/% Concentration of antifungal substance of A02(mg · L ⁻¹) and its inhibitory rate(%)							毒力回归方程 Toxicity regression equation(y =)	R ²	IC ₅₀ /mg · L ⁻¹	MIC /mg · L ⁻¹
	2	4	6	8	10	20	30				
葡萄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	7.7	76.9	81.3	83.5	86.8	95.6	100	1.3913x+4.8099	0.945	1.3696c	30
桃褐腐病菌 <i>M. fructicola</i>	5.8	8.1	28.7	43.7	72.4	95.4	100	4.4668x+0.9392	0.990	8.1115a	30
枣青霉病菌 <i>Penicillium</i> sp.	8.2	19.7	44.3	50.8	63.9	100	100	2.5347x+2.7828	0.979	7.4989b	20

注:均值后的字母示差异显著性分析结果,同一列内标有不同字母的均值在α=0.05 水平上具有显著性差异,下同。

Note: The letters following means indicate the result of variance analysis and multiple comparison. Within the same column, the means with different letters are significantly different at α=0.05 level, the same below.

2.2 田间小区防治效果

由表 2 可知,3 种微生物制剂对葡萄霜霉病的防治效果均达 88% 以上,其中含纳他霉素浓度为

50 mg/L 的 A02 发酵滤液防效为 95.70%,显著高于 2 种对生物农药 10% 宝丽安可湿性粉剂和 1% 多抗霉素水剂;而 2 种对照药剂防效差异不显著。

表 2 3 种微生物制剂对葡萄霜霉病的田间防治效果

Table 2 The control effects of 3 microbial agents against grape downy mildew in field plot trial

处理 Treatments	病叶率 Rate of disease leaf/%	病情指数 Disease index	防治效果 Control efficacy/%
A02 发酵滤液 Fermented broth filtrate of A02	6.96	1.49	95.70a
10% 宝丽安可湿性粉剂 Polyoxin 10% WP	22.13	4.10	88.17b
1% 多抗霉素水剂 Polyoxin 1% AS	16.10	3.30	90.48b
CK	74.26	34.65	

3 讨论与结论

近年来,随着生活水平的不断提高,人们的饮食安全和健康意识日益增强,农产品的质量普遍受到重

视,果树产品以供人们直接入口鲜食为主,对品质要求更为严格;而农药残留是影响果品质量的重要因素之一,因此从人类健康和果园生态的角度考虑,果树生产

应避免使用化学农药^[1]。利迪链霉菌 A02 主要代谢活性成分纳他霉素是多烯大环内酯类广谱抗真菌天然产物,前人报道其几乎对所有的供试真菌均有强烈的抑制作用,具有用量低、效率高、抗菌作用时间长等特点,对哺乳动物无毒,无诱变、致畸、致癌作用和过敏反应,且不易诱导靶标病原菌的抗药性^[14],是一种安全、高效的抗真菌剂。在前期的研究中,A02 活性产物显示出诱导植物体内防御酶系和 PR 蛋白活性及酚类物质积累,从而增强植株抗病性的作用^[15-16],并能明显提高葡萄产量,对果实可溶性糖、维生素 C、可溶性固形物等营养成分也有改善作用^[17]。该研究结果表明,A02 活性产物对葡萄灰霉病菌、桃褐腐病菌和枣青霉病菌菌丝生长的抑制中浓度在 1.3696~8.1115 mg/L 之间,最低抑制浓度均在 30 mg/L 以下;对葡萄霜霉病的田间小区防效达 95.7%,显著高于对照生物农药 10% 宝丽安可湿性粉剂和 1% 多抗霉素水剂。所选的 4 种靶标病害可分别在果树生长期和果品贮藏期造成严重的损失,具有一定的代表性。据此认为,利迪链霉菌 A02 活性产物可用作果树病害防治的安全、高效替代药物,尤其对于绿色、健康果品的生产及其采后保鲜具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 李保华,董向丽. 落叶果树病害管理状况及发展趋势[J]. 莱阳农学院学报,2001,18(1):54-60.
 [2] 陈宇飞,文景芝,李立军. 葡萄灰霉病研究进展[J]. 东北农业大学学报,2006,37(5):693-699.
 [3] Ma Z H, Yoshimura M A, Michailides T J. Identification and characterization of benzimidazole resistance in *Monilinia fructicola* from stone

- fruit orchards in California[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003,69(12):7145-7152.
 [4] 樊锦艳,房雅丽,国立耘. 美澳型核果褐腐病菌对甲基硫菌灵和啶酰菌胺的敏感性[J]. 植物保护学报,2009,36(3):251-256.
 [5] 胡海文,杨海清,王朋,等. 桃褐腐病菌拮抗细菌的分离筛选与鉴定[J]. 中国农学通报,2009,25(12):195-200.
 [6] 史凤玉,朱英波,吉志新,等. 枯草芽孢杆菌 QDH-1-1 对采后苹果青霉病的抑制效果[J]. 中国食品学报,2007,7(4):80-84.
 [7] 朱昌雄,田云龙,蒋细良,等. 4% 增效农抗 120 对几种主要果树病害的试验效果[J]. 中国生物防治,2004,20(3):190-192.
 [8] 江琴琴,周俞超,陈小龍,等. 产抗灰霉病菌物质的微生物筛选和鉴定[J]. 农药,2010,49(4):257-259.
 [9] 隋勤,刘伟成,卢彩鸽,等. 利迪链霉菌 A02 抗真菌活性产物的分离和结构鉴定[J]. 生物工程学报,2009,25(6):840-846.
 [10] 刘伟成,裘季燕,刘建华,等. 一株利迪链霉菌及其在植物病害生物防治中的应用[S]. 中国专利,专利号:200610065620.9,2009-03-11.
 [11] 李振高,骆永明,滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京:科学出版社,2008.
 [12] 魏宝东,郑凤娥,孟宪军,等. 发酵液中纳他霉素含量快速检测方法研究[J]. 食品研究与开发,2007,28(2):132-136.
 [13] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京:北京农业大学出版社,1991.
 [14] Oostendorp J G. Natamycin [J]. Antonie van Leeuwenhoek,1981,47(2):170-171.
 [15] 刘宇,刘建华,刘伟成,等. 利迪链霉菌 A02 诱导番茄抗灰霉病作用机理研究—对植株防御酶系的影响[J]. 华北农学报,2007,22(2):152-155.
 [16] 刘宇,刘建华,刘伟成,等. 利迪链霉菌 A02 诱导番茄抗灰霉病作用机理研究—对植株两种 PR 蛋白和总酚的影响[J]. 河北农业大学学报,2007,30(2):27-30.
 [17] 刘伟成,李健,王合,等. 两种微生物制剂对红提葡萄产量和果实品质的影响[J]. 中国果树,2009(4):13-16.

The Antifungal Activity of the Metabolite of Biocontrol Strain A02 Against Some Fruit Tree Diseases

LIU Ting¹, TAO Wan-qiang², WANG He², HUA Yu-peng^{1,3}, LIU Wei-cheng¹

(1. Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097; 2. Beijing Municipal Forestry Protection Station, Beijing 100029; 3. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract: *Streptomyces lydicus* A02, which isolated from Institute of Plant and Environment Protection, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences. Evaluated pathogen fungi indoor toxic against *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* and *Penicillium* sp. By the strains bioassays evaluation method and the field plot experiment respectively. The results showed that the metabolite of strain A02 presented a strong toxicity against *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola* and *Penicillium* sp. with the 50% inhibiting concentration(IC₅₀) of 1.3696, 8.1115 and 7.4989 mg/L respectively and the minimal inhibitory concentration(MIC) lower than 30 mg/L. Its control efficacy against grape downy mildew in field plot was up to 95.7%, which was significantly(0.05) higher than that of the two control agents, 10% WP and 1% AS of Polyoxin. In conclusion, the antifungal metabolite of *S. lydicus* A02 may be used as a safe and effective agent to control fruit tree diseases.

Key words: *Streptomyces lydicus*; natamycin; fruit tree disease; toxicity; field control efficacy