

徐艳,王东华,纪明山. 5种常见食用菌液体发酵产物对黄瓜褐斑菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2014,42(8):114-115.

5种常见食用菌液体发酵产物对黄瓜褐斑菌的抑制作用

徐艳^{1,2}, 王东华², 纪明山¹

(1. 沈阳农业大学植物保护博士后流动站, 辽宁沈阳 110161; 2. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110161)

摘要:研究5种食用菌香菇、杏鲍菇、金针菇、猴头菇、鸡腿菇液体发酵产物对黄瓜褐斑菌的抑制作用。通过母种试管活化培养、摇瓶种子培养、摇瓶发酵培养等一系列操作收集发酵产物,最后采用平板法研究各产物对黄瓜褐斑菌的抑制作用。结果表明,各菌种发酵液的抑菌活性明显高于菌丝提取物。其中,以香菇、猴头菇发酵液抑菌活性最好,抑制率达50%以上。猴头菇发酵液的分离纯化结果表明,乙酸乙酯萃取物和正丁醇萃取物的抑菌活性均好于原发酵液,其中乙酸乙酯萃取物的抑菌活性最好。

关键词:食用菌;液体发酵产物;平板法;黄瓜褐斑菌;抑菌作用

中图分类号: S436.421.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)08-0114-02

黄瓜是日常生活的主要蔬菜,随着保护地黄瓜种植的发展,黄瓜褐斑病逐年加重,已成为保护地黄瓜生产中亟待解决的叶部病害。黄瓜褐斑病是由多主棒孢菌引起的世界性分布的病害。1994年房德纯等报道了该病在辽宁省的发生情况,此后,黄瓜褐斑病在华北、西北的露地和保护地相继发生^[1]。近年来,随着黄瓜保护地种植规模的不断扩大,该病害蔓延趋势明显,尤其在2008年,全国各地黄瓜产区普遍有黄瓜褐斑病发生,发病严重地块经济损失在20%以上。在黄瓜褐斑病的防治上,多以百菌清、甲基硫菌灵、福美双等药剂为主,这些常见药剂作为预防药剂,有病无病都在使用,致使褐斑病菌对其不再敏感,病害一旦在田间流行就很难控制,而且化学农药也会造成一定的环境污染,给人类生活和生存带来不利的影 响^[2]。目前,许多学者从天然植物中筛选农药取得了一定的进展^[3-8],但天然植物受资源限制严重,对生态环境有一定的破坏,而且开发成本较高。我国药食用真菌资源丰富,无毒副作用,从中寻找抑制植物病原菌的活性物质,研制新型杀菌剂以防治植物病害,对栽种符合健康标准的蔬菜具有重要意义。一方面,从药食用真菌中不断发现结构新颖和具有显著生物活性的化合物,这种结构多样性对于新农药的发现有重要意义;另一方面,大型药食用真菌可以较方便地通过菌丝体或孢子发酵培养,实现生产的工业化、规模化,产量高、发酵周期短、生产效益高。这为今后可能产业化生产提供了资源保证,相对于受资源限制的植物源农药而言,这是一个潜在的优势^[9]。本研究通过平板法,以香菇(*Lentinula edodes*)、杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)、猴头菇(*Hericium erinaceus*)、鸡腿菇(*Coprinus comatus*)等几种常见食用真菌发酵产物为研究对象,分别对黄瓜褐斑菌进行抑菌试验,进而通过生长速率法分别计算各个菌种发酵产物对黄瓜

褐斑病菌的抑菌率。结果表明,发酵液的抑菌活性明显高于菌丝提取物。其中,以香菇、猴头菇发酵液抑菌活性最好,抑制率达50%以上。猴头菇发酵液的分离纯化结果表明,乙酸乙酯萃取物抑菌活性最好。

1 材料与方法

1.1 试验菌株

香菇、杏鲍、金针菇、猴头菇和鸡腿菇等供试菌株均由辽宁省农业科学院提供;黄瓜褐斑菌由沈阳农业大学植物保护学院生物农药实验室提供。

1.2 主要试验仪器

恒温电热水浴锅、高压蒸汽灭菌锅、电热恒温鼓风干燥箱、电子分析天平、恒温振荡箱、超净工作台、电动粉碎机、电冰箱。

1.3 方法

1.3.1 培养基的配制 PDA固体培养基含马铃薯200 g/L,葡萄糖20 g/L,琼脂20 g/L,水1 000 mL。不同菌种的种子培养基与发酵培养基如下。

1.3.1.1 香菇 种子培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,酵母膏20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 1.5 g。发酵培养基:玉米粉40 g,酵母膏3 g,蔗糖25 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 1 g,维生素 B_1 0.05 g, pH值5.25。

1.3.1.2 杏鲍菇 种子培养基:马铃薯200 g,麦麸40 g,葡萄糖20 g, KH_2PO_4 3 g, MgSO_4 1.5 g。发酵培养基:玉米粉30 g,麦麸20 g,酵母膏3 g,葡萄糖20 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g。

1.3.1.3 金针菇 种子培养基:玉米粉50 g,麦麸30 g,酵母膏10 g,蔗糖4 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g,维生素 B_1 0.1 g。发酵培养基:玉米粉30 g,可溶性淀粉20 g,麦麸30 g,蛋白胨10 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g,维生素 B_1 0.1 g。

1.3.1.4 猴头菇 种子培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,酵母膏1 g, KH_2PO_4 2 g, MgSO_4 1 g,维生素 B_1 0.1 g, pH值6.5。发酵培养基:可溶性淀粉25 g,酵母膏25 g, KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 1 g,维生素 B_1 0.1 g, pH值5.0。

1.3.1.5 鸡腿菇 种子培养基:蔗糖20 g,酵母粉5 g,

收稿日期:2013-10-27

作者简介:徐艳(1973—),女,吉林吉林人,博士,讲师,主要从事天然产物活性成分的开发与利用。E-mail: xuyan1001@hotmail.com。
通信作者:纪明山(1966—),男,博士,教授,主要从事生物农药及农药毒理学研究。Tel: (024) 88492673; E-mail: jimingshan@163.com。

KH_2PO_4 1 g, MgSO_4 0.05 g, 维生素 B_1 0.01 g。发酵培养基: 蔗糖 20 g, 酵母粉 5 g, 麦麸 40 g, 玉米粉 30 g, KH_2PO_4 3 g, MgSO_4 1 g。培养基每瓶 100 mL 分装于三角瓶中进行高压灭菌, 121 °C 灭菌 20 min 后置于超净台冷却备用。

1.3.2 菌种的发酵培养 将培养好的种子液按 10% 的接种量接入发酵培养基中, 在 27 °C 摇床中培养, 待菌丝生长成熟后结束发酵。

1.3.3 各菌种代谢产物对黄瓜褐斑菌的抑制作用

1.3.3.1 菌丝活性成分的提取 收集菌丝, 水洗后低温干燥。菌丝加水后超声提取, 收集提取液。

1.3.3.2 培养基平板的制备 采用平板法测定各发酵产物的抑菌活性。将灭菌的 9 cm 直径平皿分为 2 组, 一组为空白对照, 一组为加样组。各组均加入 10 mL PDA 培养基, 随后加样组中加入 5 mL 发酵液混匀, 空白对照组中则加入 5 mL 无菌水混匀, 静置数分钟待培养基冷凝备用。

1.3.3.3 黄瓜褐斑菌的接种与培养 用已灭菌的打孔器 (直径为 10 mm) 取已活化好的黄瓜褐斑菌饼, 小心放入所有制备好的培养基平板中心 (确保褐斑菌能均匀的向四周生长)。接种完成后用封口膜将平皿密封好, 放入电热恒温鼓风干燥箱中, 28 °C 培养 7 d 后观察结果。以上操作均在无菌条件下完成。

1.3.4 生长速率法测定抑菌率 待菌落生长一定时间后用十字交叉法测量黄瓜褐斑菌菌落的直径, 菌落生长直径 (mm) 采用 3 次测量菌落直径平均值, 并用下述公式计算抑菌率:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{对照组菌落直径} - \text{试验组菌落直径}}{\text{对照组菌落直径}} \times 100\%$$

1.3.5 猴头菇发酵液的分离纯化 将猴头菇发酵液放入分液漏斗中, 依次用乙酸乙酯、正丁醇分别对发酵液样品进行萃取, 每种萃取液重复萃取 2 次, 分别合并萃取液, 将其浓缩, 放置在 4 °C 冰箱中保存备用。

2 结果与分析

2.1 各菌种发酵产物抑菌试验结果

试验结果表明, 菌丝提取物几乎没有抑制作用, 几种真菌发酵液对黄瓜褐斑菌都有不同程度的抑制作用, 培养数天后菌落的菌斑大小各有不同, 表 1 结果表明, 香菇、杏鲍菇、金针菇、猴头菇、鸡腿菇这 5 种常见的食用真菌发酵液均具有不同程度的抑菌效果。其中, 香菇和猴头菇的抑菌率最高, 分别为 58.8% 和 60.0%; 杏鲍菇和金针菇次之, 分别为 45.9% 和 38.8%; 鸡腿菇的抑菌率最低, 仅为 29.4%。

表 1 各菌种发酵液对黄瓜褐斑菌的抑制作用

菌种	菌落直径 (cm)		抑菌率 (%)
	空白对照组	试验组	
香菇	8.5	3.5	58.8
杏鲍菇	8.5	4.6	45.9
金针菇	8.5	5.2	38.8
猴头菇	8.5	3.4	60.0
鸡腿菇	8.5	6.0	29.4

2.2 发酵液的分离纯化与抑菌作用

通过正丁醇、乙酸乙酯依次萃取猴头菇发酵液, 将其浓缩, 用丙酮分别溶解正丁醇和乙酸乙酯的提取物, 然后用平板法研究它们对植物病原菌的抑制作用。由表 2 可知, 乙酸乙酯组抑菌率为 68.23%, 正丁醇组抑菌率为 62.35%。由此可以看出, 正丁醇及乙酸乙酯萃取物均能抑制猴头菇的生长, 但是乙酸乙酯的抑制效果更明显。

表 2 猴头菇发酵液分离纯化产物对黄瓜褐斑菌的抑制作用

组别	菌落直径 (cm)	抑菌率 (%)
空白对照组	8.5	0
发酵液组	3.4	60.00
乙酸乙酯萃取物组	2.7	68.23
正丁醇萃取物组	3.2	62.35

3 结论

本研究所选用的 5 种真菌均为常见的食用真菌, 其发酵方法已较成熟, 但其对植物病原菌的抑制活性鲜有报道。本研究结果证明了这 5 种食用真菌发酵液有一定的抑制黄瓜褐斑菌的活性, 由于发酵液只进行了初步纯化, 有必要继续对发酵液的活性物质进行研究。研究中所提取的各种活性物质对人、动物和环境没有任何影响, 是理想的生物农药前导物, 有较大的开发前景。

参考文献:

- [1] 房德纯, 傅俊范. 黄瓜褐斑病病原与发病情况调查研究初报 [J]. 植物保护, 1994, 20(3): 23-24.
- [2] 许远, 张子君, 邹庆道, 等. 黄瓜褐斑病的药剂防治研究 [J]. 辽宁农业科学, 2000, 31(6): 47-48.
- [3] Eduardo O, Mariano F, Daniel H, et al. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi [J]. Industrial Crops and Products, 2010, 31(1): 153-157.
- [4] 朱巧萍, 高雪平, 程璐, 等. 微波辅助提取香榧假种皮挥发油及其对植物病原真菌的抑制活性 [J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 309-311.
- [5] Mahlo S M, McGaw L J, Eloff J N. Antifungal activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens [J]. Crop Protection, 2010, 29(12): 1529-1533.
- [6] 刘绍雄, 王金华, 熊智, 等. 青蒿乙醇提取物对 5 龄思茅松毛虫肠道细菌的抑制作用 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(4): 141-142.
- [7] de Rodríguez D J, Hernández-Castillo D, Rodríguez-García R, et al. Antifungal activity *in vitro* of aloe vera pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi [J]. Industrial Crops and Products, 2005, 21(1): 81-87.
- [8] 吴雪平, 田雪亮, 项志锋. 蓖麻籽水提取物对黄瓜褐斑病菌的生物活性研究 [J]. 西北农业学报, 2006, 15(6): 215-216.
- [9] 杨民宝. 锈草孔菌科三种真菌对植物病原菌抑制作用的研究 [D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009: 1.