

白明生,石新卫,张艳新.一株四合木内生菌发酵产物抑制植物病原菌的活性[J].江苏农业科学,2016,44(8):192-194.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.052

一株四合木内生菌发酵产物抑制植物病原菌的活性

白明生¹,石新卫²,张艳新¹

(1. 宁夏大学生命科学学院,宁夏银川 750021; 2. 西安植物园/陕西省植物研究所,陕西西安 710061)

摘要:对四合木 1 株内生真菌四合木链格孢进行液体发酵,提取发酵液和菌丝体代谢产物,依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,通过抑菌试验检测各萃取相抑制植物病原菌活性。结果表明,发酵液和菌丝体代谢产物均具有抑制植物病原菌活性,其中发酵液中乙酸乙酯相和正丁醇相抑菌效果最明显。菌丝体各萃取相抑菌活性弱于发酵液,其中乙酸乙酯相抑菌效果最明显,说明发酵液中活性代谢产物主要存在于乙酸乙酯相和正丁醇相中,菌丝体中活性代谢产物主要存在于乙酸乙酯相中,研究结果为进一步分离抗植物病原菌活性成分和保护四合木这一濒危珍稀植物提供科学依据。

关键词:四合木;四合木链格孢;发酵产物;抗植物病原菌活性

中图分类号: S482.2⁺92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0192-03

植物内生真菌(endophytic fungi)是指在健康植物寄主的各种组织和器官内部或细胞间隙中度过全部或近乎全部生活周期而不使寄主表现任何症状的一类真菌。几乎所有植物内部都存在内生真菌。植物内生真菌的种、属多样性极为丰富,是一种新兴的微生物资源,它对植物某些活性成分的形成有重要影响^[1]。近年来,植物内生真菌本身及其次生代谢产物应用于医药和农业方面的研究逐渐成为热点。这些内生菌在植物体内能产生多种生物学作用,可以提供植物所需要的营养物,参与植物的防卫功能,能够促进植物快速生长,增强植物抗逆境、抗病害、抗动物危害的能力^[2]。

四合木(*Tetraena mongolica* Maxim.), 蒺藜科,落叶小灌木,是中国特有子遗单种属植物,草原化荒漠的群种之一,为强旱生植物,是最具代表性的古老残遗濒危珍稀植物,被誉为植物的“活化石”和植物中的“大熊猫”。其分布范围非常狭窄,属国家二级保护植物^[3]。四合木是一种具有抗生性的植物,病虫害发生较少,可能含有某种特殊的次生代谢产物。高雯芳等研究了四合木提取物对 14 种植物病原菌的生物活性,结果表明,四合木提取物在 100 g/L 浓度下对部分病菌的生长表现出较强的抑制作用^[4]。植物内生真菌通常会与宿主植物相同或相似的生理活性物质^[2,5]。本研究对 1 株分离自四合木的内生真菌四合木链格孢^[6]进行发酵培养,研究其代谢产物对多种植物真菌病害病原菌的抑制作用,以便

为该菌株的进一步开发利用和保护四合木这一濒危珍稀植物提供理论依据和实践基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株及来源 菌株四合木链格孢分离自宁夏石嘴山采集的四合木茎中,经形态学鉴定法确定为链格孢属一新种^[6](编号 PSN AAFS356608),由宁夏农林科学院植物病害标本室提供。

供试病原菌:由宁夏大学生命科学学院微生物研究室提供,斜面保藏于 4 ℃ 冰箱中,备用。

1.1.2 培养基 固体培养基选用 PDA 培养基:马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,琼脂 20 g,水 1 000 mL,pH 自然,121 ℃、30 min 灭菌。

液体培养基为 PDA 液体培养基:马铃薯 200 g,蔗糖 20 g,常水 1 000 mL,pH 自然,121 ℃、30 min 灭菌。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株的液体发酵培养 母种先接种于 PDA 斜面上,后转接于 PDA 平板培养基上,25 ℃ 培养 7 d,用打孔器打孔接种于装有 50 mL 种子培养液(PDA 培养基)的 250 mL 三角烧瓶,静置 2 d,于 25 ℃、120 r/min 旋转摇床上培养 3 d 作为种子,以 10% 量接种于装有 150 mL 发酵培养基(PDA 培养液)的 500 mL 三角瓶中,同样条件下培养 5 d,终止发酵。

1.2.2 发酵液的萃取 将发酵液经 4 层纱布过滤,得菌丝体和发酵液。发酵液浓缩后依次用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇进行萃取,萃取液进行减压浓缩得各萃取物的浸膏。

收稿日期:2015-07-08

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2011BAC07B03)。

作者简介:白明生(1971—),男,陕西定边人,副教授,主要从事植物资源学教学工作。E-mail:baimingsheng@163.com。

[15] van Sanford D, Anderson J, Campbell K, et al. Discovery and deployment of molecular markers linked to *Fusarium* head blight resistance[J]. Crop Science, 2001, 41(3): 638-644.

[16] Kaur S, Chahal S S, Singh N. Assessment of losses caused by head blight in wheat[J]. Journal of Mycology and Plant Pathology, 2000, 30(2): 204-206.

[17] Moschini R C, Fortugno C. Predicting wheat head blight incidence using models based on meteorological factors in Pergamino, Argentina[J]. European Journal of Plant Pathology, 1996, 102(3): 211-218.

[18] 姚菊香,王盘兴,鲍学俊,等. 相关系数显著性检验的几何意义[J]. 南京气象学院学报, 2007, 30(4): 566-570.

1.2.3 菌丝体的提取及萃取 将菌丝体洗涤后 75 ℃ 下烘干,然后粉碎,用甲醇浸提 5 次,每次 1 d,然后合并 5 次提取液,浓缩至干浸膏,加水悬浮,装入分液漏斗中,用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇对悬浮液依次萃取,然后再浓缩得石油醚相、乙酸乙酯相、正丁醇相和水相浸膏。

1.2.4 抑菌效果测定

1.2.4.1 菌悬液的制备及病原菌活化 将病原菌转接于 PDA 培养基平板上,置于培养室[温度(25 ± 1) ℃,光—暗周期 12 h—12 h]连续培养 3 代后,在试验前 3 ~ 5 d 再转接 1 次培养备用。

1.2.4.2 抑制植物病原菌活性测定 将内生真菌的菌丝体和发酵液的粗提物配成 50 mg/mL 液,测定其对病原菌菌丝生长的抑制作用。抑制菌丝生长速率法:将 1 mL 供试药剂与 9 mL 融化的培养基混匀,倒入无菌培养皿中制成培养基平面。培养基凝固后,在每个培养基平面放入 1 个供试菌菌饼(直径为 5 mm),使菌饼带菌丝的一面贴在培养基表面,每个处理 3 次重复。培养 72 ~ 96 h 后,用十字交叉法测定供试菌菌落生长直径,按公式(2)计算抑制率。

菌落直径(mm) = 测定菌落平均直径 - 5.0 mm; (1)

菌丝生长抑制率 = $\frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径}} \times 100\%$ 。(2)

2 结果与分析

2.1 菌株发酵液各萃取相对植物病原菌的抑制作用

由表 1 可见,内生菌发酵液各萃取相在 50 mg/mL 浓度下对这 8 种植物病原菌都有一定的抑制作用,其中,石油醚相对辣椒疫霉菌的抑制率最高,为 68.27%,其次是小麦赤霉菌,抑制率 58.35%;乙酸乙酯相对番茄灰霉菌的抑制率最高,为 98.26%,其后依次是辣椒疫霉菌、马铃薯晚疫病菌、小

麦赤霉菌、棉花枯萎菌、梨黑斑病菌、苹果黑星病菌、苹果炭疽菌,抑制率分别为 93.13%、86.28%、71.60%、68.85%、58.72%、56.39%、52.54%;正丁醇相除梨黑斑病菌、辣椒疫霉菌和苹果炭疽菌外,对其他 5 种植物病原菌的抑制作用非常明显,其中对番茄灰霉菌抑制率最高,为 95.65%,然后依次是小麦赤霉菌 87.46%、马铃薯晚疫病菌 80.90%、苹果黑星病菌 78.58%、棉花枯萎菌 78.20%;水相对马铃薯晚疫病菌和番茄灰霉菌的抑制作用较为明显,抑制率分别为 69.52%和 67.12%。总体分析,乙酸乙酯相的抑制作用最明显,对这 8 种植物病原菌的抑制率都超过 50%,正丁醇相对 5 种植物病原菌的抑制率都超过 50%,说明发酵液的抑菌活性代谢产物主要集中在乙酸乙酯相和正丁醇相中,后续的研究中,应主要从这两相中分离抗植物病原菌活性成分。

2.2 菌株菌丝体提取物各萃取相对植物病原菌的抑制作用

由表 2 可见,内生菌发酵的菌丝体各萃取相在 50 mg/mL 浓度下对这 8 种植物病原菌都有一定的抑制作用。石油醚相对这 8 种植物病原菌抑制率作用均小于 50%;乙酸乙酯相对辣椒疫霉菌的抑制作用最强,抑制率为 96.52%,其后依次是马铃薯晚疫病菌、棉花枯萎菌、番茄灰霉菌、苹果黑星病菌、小麦赤霉菌,抑制率分别为 91.29%、89.88%、75.24%、73.74%、68.25%;正丁醇相对马铃薯晚疫病菌的抑制作用最强,抑制率为 79.38%,其次是番茄灰霉菌,抑制率为 69.18%,而对梨黑斑病菌和苹果炭疽菌有微弱的促进生长的作用;水相对马铃薯晚疫病菌有一定的抑制作用,抑制率为 63.21%,对梨黑斑病菌和苹果炭疽菌有微弱的促进生长的作用。菌丝体各萃取相中乙酸乙酯相的抑制植物病原菌的作用最明显,对其中的 6 种病原菌的抑制率都大于 50%,而其他萃取相的抑菌作用都弱于发酵液各萃取相,有的有一定的促进作用。

表 1 内生菌发酵液各萃取相对病原菌菌丝生长的抑制率

供试菌种	抑制率(%)			
	石油醚相	乙酸乙酯相	正丁醇相	水相
梨黑斑病菌(<i>Alternaria kikuchiana</i>)	3.21	58.72	10.29	2.50
马铃薯晚疫病菌(<i>Phytophthora infestans</i>)	26.33	86.28	80.90	69.52
苹果黑星病菌(<i>Venturia inaequalis</i>)	26.24	56.39	78.58	6.85
小麦赤霉菌(<i>Fusarium graminearum</i>)	58.35	71.60	87.46	30.21
苹果炭疽菌(<i>Glomerella cingulate</i>)	1.98	52.54	6.35	6.28
棉花枯萎菌(<i>Fusarium oxysporum</i>)	20.63	68.85	78.20	45.38
番茄灰霉菌(<i>Botrytis cinerea</i>)	17.23	98.26	95.65	67.12
辣椒疫霉菌(<i>Phytophthora capsici</i>)	68.27	93.13	23.56	8.95

表 2 内生菌菌丝体各萃取相对病原菌菌丝生长的抑制率

供试菌种	抑制率(%)			
	石油醚相	乙酸乙酯相	正丁醇相	水相
梨黑斑病菌(<i>Alternaria kikuchiana</i>)	17.29	36.32	-10.65	-9.82
马铃薯晚疫病菌(<i>Phytophthora infestans</i>)	10.29	91.29	79.38	63.21
苹果黑星病菌(<i>Venturia inaequalis</i>)	20.42	73.74	38.33	12.49
小麦赤霉菌(<i>Fusarium graminearum</i>)	21.21	68.25	38.26	36.38
苹果炭疽菌(<i>Glomerella cingulate</i>)	36.20	6.53	-10.64	-5.29
棉花枯萎菌(<i>Fusarium oxysporum</i>)	38.60	89.88	40.24	21.55
番茄灰霉菌(<i>Botrytis cinerea</i>)	19.84	75.24	69.18	42.12
辣椒疫霉菌(<i>Phytophthora capsici</i>)	44.28	96.52	23.57	11.65

3 结论与讨论

内生菌发酵液各萃取相在 50 mg/mL 浓度下对供试的 8 种植物病原菌都有一定的抑制作用,其中石油醚相对辣椒疫霉菌的抑制率最高,为 68.27%;乙酸乙酯相对番茄灰霉菌的抑制率最高,为 98.26%;正丁醇相对番茄灰霉菌的抑制率最高,为 95.65%;水相对马铃薯晚疫病菌的抑制率最高,为 69.52%。乙酸乙酯相的抑制作用最明显,对这 8 种植物病原菌的抑制率都超过 50%,正丁醇相对 5 种植物病原菌的抑制率均超过 50%。

菌丝体各萃取相在 50 mg/mL 浓度下对供试的 8 种植物病原菌的抑制作用都相对弱于发酵液各萃取相。石油醚相对这 8 种植物病原菌抑制率作用均小于 50%;乙酸乙酯相对辣椒疫霉菌的抑制作用最强,抑制率为 96.52%;正丁醇相对马铃薯晚疫病菌的抑制作用最强,抑制率为 79.38%,而对梨黑斑病菌和苹果炭疽菌有微弱的促进生长的作用;水相对马铃薯晚疫病菌有一定的抑制作用,对梨黑斑病菌和苹果炭疽菌有微弱的促进生长的作用。菌丝体各萃取相中乙酸乙酯相的抑制植物病原菌的作用最明显,对其中的 6 种病原菌的抑制率大于 50%,而其他各萃取相的抑菌作用都弱于发酵液各萃取相。

植物体内广泛存在着具有抗菌活性的菌株,它们对病原真菌、细菌等引起的植物病害有着不同程度的防治作用^[7],通过不同的生防机制,使植物免受或减轻危害,有的还对植物生长有促进作用。植物内生菌生长在植物组织细胞间隙,其中部分内生菌能够产生与宿主相关的活性成分^[2]。高雯芳等研究发现四合木提取物对部分病菌的生长表现出较强的抑制作用^[4,8]。胡佳续等从四合木茎叶石油醚提取物中分离出了抗虫活性成分^[9]。试验结果表明,四合木内生菌发酵产物对植物病原菌有一定的抑制作用,在发酵液中乙酸乙酯相和

正丁醇相的抑菌效果最佳,菌丝体中乙酸乙酯相抑菌效果最佳,说明抑菌活性代谢产物主要在发酵液中乙酸乙酯相和正丁醇相及菌丝体的乙酸乙酯相中,因此,进一步的研究可以集中在这些部分,从中分离纯化获得单体化合物,研究各个单体化合物的抑菌活性,寻找具有抗植物病原真菌活性的次生代谢产物,可将内生真菌用于生物防治或作为对环境无害农药的一个新来源,同时对四合木这一濒危植物的保护具有重要意义。

参考文献:

- [1] Azevedo J L, Maccheroni J W, Pereira J O, et al. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2000, 3(1): 40-65.
 - [2] 孙力军, 陆兆新. 植物内生菌抗菌活性物质研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(2): 78-82.
 - [3] 甄江红, 刘果厚. 珍稀特有植物四合木研究进展[J]. 应用生态学报, 2008, 19(2): 433-440.
 - [4] 高雯芳, 贾长红, 刘 强, 等. 四合木提取物对 14 种植物病原菌生物活性的研究[J]. 天津师范大学学报: 自然科学版, 2007, 27(1): 35-38.
 - [5] Poulev A, O'Neal J M, Logendra S, et al. Elicitation, a new window into plant chemodiversity and phytochemical drug discovery [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2003, 46(12): 2542-2547.
 - [6] 沈瑞清, 商鸿生, 查仙芳. 链格孢属一新种[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(3): 217-218.
 - [7] 李志英, 田岳娟, 徐惠娟, 等. 小叶锦鸡儿内生抗菌株的筛选与分子鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(6): 105-107.
 - [8] 高雯芳. 中国特有植物四合木杀虫抑菌活性的初步研究[D]. 天津: 天津师范大学, 2007: 29-38.
 - [9] 胡佳续, 刘 强. 四合木茎叶石油醚提取物化学成分分析[J]. 广西植物, 2010, 30(3): 426-428.
- (上接第 187 页)
- [2] 李纪顺, 陈 凯, 李红梅, 等. 通过染色体整合 β -1,4-葡聚糖酶基因 *glu14* 提高绿色木霉对小麦纹枯病的防治效果[J]. 植物病理学报, 2013, 43(4): 393-400.
 - [3] 管怀骥, 陈 莉. 哈茨木霉 TH-1 菌株对小麦纹枯病的控制效果研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(16): 9664-9665.
 - [4] 张承胤, 邢彦峰, 代 丽, 等. 适应玉米秸秆还田的小麦根病拮抗细菌的筛选[J]. 中国农学通报, 2009, 25(3): 206-209.
 - [5] Zhen W C, Wang S T, Zhang C Y, et al. Influence of maize straw amendment on soil-borne diseases of winter wheat[J]. Frontiers of Agriculture in China, 2009, 3(1): 7-12.
 - [6] 梁春启. 兼具分解玉米秸秆和防治小麦土传病害作用的微生物土壤添加剂研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2009.
 - [7] 赵 斌, 齐永志, 李海燕, 等. 枯草芽孢杆菌 B1514 菌株发酵条件的优化与片剂制作研究[J]. 河北农业大学学报, 2014, 37(3): 60-65.
 - [8] 李海燕, 苏 媛, 齐永志, 等. 多功能土壤添加剂对小麦土传病害的防效及对玉米秸秆的腐解作用[J]. 河南农业科学, 2015, 44(6): 84-89.
 - [9] 甄文超, 马峙英, 梁春启, 等. 适应小麦玉米秸秆还田的土传病害生防菌剂及其制备方法: 中国, 200810180290.7 [P]. 2011-03-16.
 - [10] 李冠楠, 夏雪娟, 何石宝, 等. 蚕用益生芽孢杆菌 SWL-19 的筛选鉴定及其对肠道菌群多样性的影响[J]. 中国农业科学, 2015, 48(9): 1845-1853.
 - [11] 尹艳宁, 方志翔, 沈文静, 等. 转 *cry1Ac* + *cry2Ab* 基因棉对土壤细菌群落结构和功能多样性的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2014, 30(2): 206-213.
 - [12] 罗泰来, 申亮亮, 柏银兰, 等. 分枝杆菌计数方法的比较研究[J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(4): 373-375.
 - [13] 吴有炜. 试验设计与数据处理[M]. 苏州: 苏州大学出版社, 2002: 115-154.
 - [14] 黄 静, 张超腾, 郑 燕. 应用正交测验法优选巨菌草诱导培养基[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 74-76.
 - [15] 徐 君, 刘凤军, 张国芹, 等. 香稻不育系 1SSR 正交体系优化及验证[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(4): 21-24.
 - [16] 赵 强, 余四九, 王廷璞, 等. 响应面法优化秃疮花中生物碱提取工艺及抑菌活性研究[J]. 草业学报, 2012, 21(4): 206-214.
 - [17] 李 忠, 乐峰松, 殷红福, 等. 枯草芽孢杆菌生防菌产孢条件的优化[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(5): 1937-1938.
 - [18] 郭夏丽, 狄源宁, 王 岩. 枯草芽孢杆菌产芽孢条件的优化[J]. 中国土壤与肥料, 2012(3): 99-103.