

冯蓓蓓,邓业成,卢丹丹,等. 广西地不容和地枫皮内生真菌对罗汉果土传病原真菌的抑制活性[J]. 江苏农业科学,2023,51(1):123-128.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2023.01.018

广西地不容和地枫皮内生真菌对罗汉果 土传病原真菌的抑制活性

冯蓓蓓, 邓业成, 卢丹丹, 汤夏安, 邓志勇, 骆海玉

(广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541006)

摘要:为了探索更加科学环保的防治罗汉果土传病害的方法,采用平板对峙法测定了3株广西地不容内生真菌和4株地枫皮内生真菌对3种罗汉果病原真菌的抗菌活性,并采用菌丝生长速率法测定7株内生真菌的发酵产物不同萃取组分的抑菌活性。结果表明,7株内生真菌都具有一定的抗菌活性。6种植物内生真菌[除DFP-G-5(*Chaetomium globosum*)外]的发酵液乙酸乙酯萃取物对3种病原真菌的抑制活性较好,有效中浓度(EC_{50})为0.120 8~2.911 7 g/L;这6种植物内生真菌的菌丝体甲醇提取物对3种病原真菌的抑制活性一般, EC_{50} 为0.270 8~9.141 3 g/L;4种植物内生菌DBR-5(*Nigrospora* sp.)、DFP-G-5、DFP-G-7(*Fusarium nematophilum*)、DFP-P-7.1的发酵液萃取物对3种病原真菌的抑制活性一般, EC_{50} 为1.488 1~9.431 3 g/L。另外广西地不容内生真菌DBR-5对病原菌的毒力最高,其发酵液乙酸乙酯萃取物对罗汉果白绢病菌(*Athelia rolfsii*) BJB以及菌丝体甲醇提取物对腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*) GFB-G15都具有很强的抑制作用, EC_{50} 值分别为0.120 8 g/L和0.270 8 g/L。上述结果表明,6种植物内生真菌在防治罗汉果土传病害上具有潜在应用价值。

关键词:广西地不容;地枫皮;罗汉果;内生真菌;发酵产物;抑菌活性;土传病害

中图分类号:S435.67;S182;S482.2⁺92 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2023)01-0123-06

罗汉果(*Siraitia grosvenorii*)是葫芦科罗汉果属植物的果实,很早就被发现是药食两用的植物^[1-2]。罗汉果植株的主要土传病害有根腐病^[3-4]、白绢病^[5]、青枯病^[6]、根结线虫病^[7]、芽枯病^[8]等。研究发现,齐整小核菌(*Sclerotium rolfsii* Sacc.)是罗汉果白绢病的致病菌,通过侵害罗汉果的茎基部和根部,使罗汉果茎叶萎蔫,最后枯萎而死^[9]。罗汉果

根腐病的致病菌是镰刀菌根腐类病菌^[10],通过侵染罗汉果根部,使根腐烂,造成植株枯萎死亡。目前,化学防治是最广泛应用的防治方式,但人们越来越注重随之而来的环境、食品等问题,所以研究出更加科学安全的防治方法迫在眉睫。随着技术的发展和人们对杀菌剂要求的日益提高,农业病害的防治提倡采用更加安全、低污染的生物防治,所以植物内生真菌及其产生的抗菌物质成为植物病害防治相关研究的热门方向^[11]。植物内生菌是不危害植物宿主,存在于健康宿主细胞间或细胞内的一大类未完全开发的微生物^[11-13]。

广西地不容(*Stephania kwangsiensis*)是中国特色千金藤属植物^[14],有着广泛的药用价值,比如清热解毒、消肿去瘀等^[15]。目前对广西地不容的杀虫

收稿日期:2022-03-13

基金项目:广西重点研发计划(编号:桂科AB1850025);桂林市重点研发计划(编号:20190211-19)。

作者简介:冯蓓蓓(1994—),女,湖北宜昌人,硕士研究生,主要从事天然产物研究。E-mail:2606692796@qq.com。

通信作者:邓业成,博士,教授,主要从事天然产物与植物保护研究。E-mail:dycheng@163.com。

24(10):351-359.

[16]向妙莲,付永琦,何永明,等. 茉莉酸甲酯浸种对水稻幼苗白叶枯病抗性 & 抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水稻科学,2014,28(4):419-426.

[17]孙正祥,王瑞霞,周 斌,等. 植物诱导抗病性研究进展[J]. 中国植保导刊,2010,30(10):15-17.

[18]王燕荣,王 永,李 杰,等. 番茄早疫病病组织浸提液对番茄早疫病诱导抗性的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学

版),2021,42(1):16-22.

[19]刘嘉方,王 永,云兴福. PIAS对番茄晚疫病的诱导抗性 & 叶片内酶活性的研究[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2021,42(4):12-19.

[20]高晓敏. 西芹浸提液化感物质分离鉴定 & 其对黄瓜枯萎病诱导抗性的研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2015.

[21]田菲菲. 菜粉蝶提取物诱导黄瓜对炭疽病的抗性 & 其机理研究[D]. 保定:河北农业大学,2007.

活性^[16]和抑菌活性^[17]等已有研究报道。地枫皮 (*Illicium difengpi*) 为木兰科八角属植物,具有丰富的药用价值,常用于风湿疼痛类疾病的治理,也是跌打损伤药品的主要药物原料^[18]。

笔者所在课题组经过多年研究得出,广西地不容和地枫皮的内生真菌对多种植物病原真菌有抗菌活性^[19-22]。基于此,进一步研究 2 种植物内生真菌对罗汉果 3 种土传病原真菌的抗菌活性,旨在为其在杀菌剂领域的开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试植物内生真菌 广西地不容内生真菌:

| 表 1 内生真菌和病原真菌种类 | | | |
|-----------------|---------|-----------|---------------------------------|
| 菌株种类 | 菌株编号 | 中文名 | 拉丁名 |
| 广西地不容内生真菌 | DBR-3 | 白壳菌 | <i>Albonectria rigidiuscula</i> |
| | DBR-5 | 黑孢霉属 | <i>Nigrospora</i> sp. |
| 地枫皮内生真菌 | DFP-G-5 | 球毛壳菌 | <i>Chaetomium globosum</i> |
| | DFP-G-7 | 镰孢属真菌 | <i>Fusarium nematophilum</i> |
| | DFP-G-9 | 子囊菌纲柱孢属真菌 | <i>Cylindrocarpon olidum</i> |
| 罗汉果病原真菌 | GFB-G10 | 尖孢镰刀菌 | <i>Fusarium oxysporum</i> |
| | GFB-G15 | 腐皮镰刀菌 | <i>Fusarium solani</i> |
| | BJB | 罗耳阿太菌 | <i>Athelia rolfsii</i> |

1.2 试验方法

1.2.1 内生真菌发酵产物制备 所有试验在广西师范大学雁山校区珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室开展,时间为 2021 年 1—5 月。在无菌超净台内活化 7 种纯化好的植物内生真菌,在 PDA 平板上培养 3 d 后使用。用 0.4 cm 打孔器在每种内生真菌菌落边缘打取菌饼。分别放入已准备好的灭菌 PDB 培养基中,每瓶放 15 个菌饼。放置于(27±1)℃恒温培养箱中培 30 d,每天振荡 3 次。

采用液-液萃取法分离出内生真菌发酵液中的粗提物,操作如下:首先,将内生真菌发酵液与之等体积的乙酸乙酯连续萃取 3 次,将萃取液合并,得到乙酸乙酯层和萃余层。然后,使用旋转蒸发器,分别得到发酵液乙酸乙酯萃取物以及发酵液萃余物的膏体。最后,将分离出的菌丝体烘干、碾碎后,用甲醇浸提^[23]。反复多次浸提直至浸提液无色为止,每次浸提时间为 2 d。通过抽滤把菌丝体与甲醇浸提液分开,使用旋转蒸发仪处理甲醇浸提液得到膏体,即菌丝体甲醇粗提物。

DBR-3、DBR-5、DBR-15;地枫皮内生真菌:DFP-G-5、DFP-G-7、DFP-G-9、DFP-P-7.1。上述内生真菌均由笔者所在实验室保存并提供的菌种中筛选取得,见表 1。

1.1.2 供试罗汉果病原真菌 3 株罗汉果病原真菌为 GFB-G10、GFB-G15 和 BJB。上述病原真菌均由笔者所在实验室保存并提供的菌种中筛选取得,见表 1。

1.1.3 供试培养基和发酵液 菌株活化、制作大量培养基。拮抗试验培养基:马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA,含马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 25 g、蒸馏水 1 L)。液体发酵培养基:马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB,含马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 L)。

1.2.2 抑菌活性测定

1.2.2.1 内生真菌对罗汉果病原真菌的拮抗试验 在无菌超净台内使用平板对峙法^[24-25]完成拮抗试验。操作如下:分别活化 7 种植物内生真菌和 3 种植物病原菌,培养 3 d。在培养皿底面做记号,以培养皿直径画线,以圆心为对称点,2 点之间间距 3 cm 取点,做标记。用直径为 0.4 cm 的打孔器分别在内生真菌和病原菌的菌落边缘打取菌饼,依次接种于标记的 2 点,并在培养皿底面写好对应的菌种名称。对照组除不接内生真菌外,其他与试验组相同,且处理组、对照组都做 3 个重复。于恒温箱(27±1℃)中培养 1~9 d,同时每天观察菌丝生长速度、边缘菌丝是否变形、抑菌带是否产生等。测量每个菌落的半径,按照下面公式计算得出抑制率:

抑制率=(对照组菌落半径-处理组菌落短半径)/对照组菌落半径×100%。

1.2.2.2 发酵产物对罗汉果病原真菌菌丝生长的抑制活性测定 在无菌工作台操作中,使用菌丝生长速率法^[26]完成活性的测定。首先将 7 株内生真菌的发酵液乙酸乙酯萃取物膏体、发酵液萃余物膏

体及菌丝体粗提物膏体制成质量浓度分别为 20、100、100 g/L 的药液,溶剂为丙酮,然后活化内生真菌和植物病原菌 3 d。在 9 cm 直径的培养皿中同时加入 1 mL 药液(对照组药液用丙酮代替,其他与处理组相同)与 9 mL 热熔的 PDA 培养基,轻微晃动使其混合均匀,制成带药培养基(质量浓度分别为:2、10、10 g/L)。用直径为 0.4 cm 的打孔器分别在 3 种罗汉果病原真菌的菌落边缘打取菌饼。菌饼贴于之前做好的已凝固带药培养基上,且菌饼成“品”字排列[白绢病菌病原菌(BJB)的对照组除外,由于 BJB 生长速度过快,因此 BJB 的对照组每皿只接 1 个菌饼],在恒温培养箱(27 ± 1 ℃)中培养 3 d。BJB 的对照组重复 3 次。使用十字交叉法^[27]测量每个菌落的直径,按照下面公式计算得出抑制率:

抑制率 = (对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / (对照组菌落直径 - 0.4) × 100%。

配制一系列质量浓度的带药培养基,计算得出各个质量浓度的抑菌率。用最小二乘法求出毒力回归方程、相关系数(*r*)、有效中浓度(EC₅₀)及 EC₅₀ 的 95% 置信限。

2 结果与分析

2.1 植物内生真菌对罗汉果病原菌的拮抗活性

由表 2 可知,7 种植物内生真菌对 3 种罗汉果病原真菌有不同程度的抑制效果。其中 DBR - 15 对 GFB - G10 和 GFB - G15 的拮抗作用最大,抑制率达到 60.00% ~ 70.77%。DFP - G - 9 对 GFB - G10 的拮抗作用最小,抑制率只有 2.86%。

| 表 2 7 株内生真菌对 3 种罗汉果病原真菌的拮抗活性 | | | |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------|
| 内生真菌 | 抑制率(%) | | |
| | GFB - G10 | GFB - G15 | BJB |
| DBR - 3 | 9.23 ± 7.05 | 26.15 ± 4.62 | 9.20 ± 3.59 |
| DBR - 5 | 18.46 ± 9.61 | 21.54 ± 9.23 | 13.79 ± 3.45 |
| DBR - 15 | 70.77 ± 7.05 | 60.00 ± 2.66 | 41.38 ± 6.90 |
| DFP - G - 5 | 44.29 ± 4.29 | 55.38 ± 4.62 | 39.66 ± 1.72 |
| DFP - G - 7 | 14.29 ± 8.57 | 11.59 ± 2.51 | 28.74 ± 3.59 |
| DFP - G - 9 | 2.86 ± 2.47 | 10.14 ± 6.64 | 35.63 ± 1.99 |
| DFP - P - 7.1 | 50.00 ± 6.55 | 50.72 ± 5.02 | 48.85 ± 2.63 |

2.2 植物内生真菌发酵产物对罗汉果病原真菌的抑制活性

2.2.1 2 g/L 植物内生真菌发酵液乙酸乙酯萃取物对罗汉果病原真菌的抑制活性 如表 3 所示,6 种植物内生真菌 DBR - 3、DBR - 5、DBR - 15、

DFP - G - 7、DFP - G - 9、DFP - P - 7.1 的发酵液乙酸乙酯萃取物对 3 种病原菌抑菌活性好(除 DBR - 15 对 GFB - G10 的抑菌活性一般),抑制率均大于 50%。DFP - G - 5 发酵液乙酸乙酯萃取物抑菌活性差,抑制率均小 50%。根据此结果,接下来研究 2 种罗汉果内生真菌(DBR - 3、DBR - 5)、3 种地枫皮内生真菌(DFP - G - 7、DFP - G - 9、DFP - P - 7.1)的发酵液乙酸乙酯萃取物对 3 种罗汉果病原真菌的毒力和 DBR - 15 的发酵液乙酸乙酯萃取物对 GFB - G15、BJB 的毒力。

| 表 3 7 株内生真菌发酵液乙酸乙酯萃取物对 3 种罗汉果病原真菌菌丝的抑制活性 | | | |
|--|---------------|--------------|---------------|
| 内生真菌 | 抑制率(%) | | |
| | GFB - G10 | GFB - G15 | BJB |
| DBR - 3 | 68.94 ± 2.15 | 70.62 ± 0.98 | 69.64 ± 1.79 |
| DBR - 5 | 100.00 ± 0.00 | 83.05 ± 3.39 | 100.00 ± 0.00 |
| DBR - 15 | 38.51 ± 3.23 | 71.19 ± 4.48 | 100.00 ± 0.00 |
| DFP - G - 5 | 8.07 ± 2.15 | 16.38 ± 1.96 | 38.99 ± 1.03 |
| DFP - G - 7 | 86.45 ± 1.94 | 56.21 ± 1.13 | 100.00 ± 0.00 |
| DFP - G - 9 | 58.06 ± 1.12 | 72.55 ± 3.92 | 93.63 ± 4.31 |
| DFP - P - 7.1 | 77.42 ± 1.12 | 73.20 ± 1.13 | 100.00 ± 0.00 |

2.2.2 10 g/L 植物内生真菌发酵液萃取物对罗汉果病原真菌的抑制活性 如表 4 所示,4 种植物内生真菌 DBR - 5、DFP - G - 5、DFP - G - 7、DFP - P - 7.1 的发酵液萃取物对 BJB 的抑菌活性好,抑制率均大于 50%。其他植物内生真菌的发酵液萃取物对罗汉果病原真菌抑菌活性差,抑制率均小于 50%。得出结论,这 7 种植物内生真菌的发酵液萃取物对 3 种罗汉果病原真菌几乎没有抑制活性。可以确定,抑菌物质主要存在于这 7 种植物内生真菌的发酵液乙酸乙酯萃取物中。根据此结果,接下来研究 4 种内生真菌 DBR - 5、DFP - G - 5、DFP - G - 7、DFP - P - 7.1 的发酵液萃取物对 BJB 的毒力。

| 表 4 7 株内生真菌发酵液萃取物对 3 种罗汉果病原真菌菌丝的抑制活性 | | | |
|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| 内生真菌 | 抑制率(%) | | |
| | GFB - G10 | GFB - G15 | BJB |
| DBR - 3 | 11.76 ± 8.09 | 18.60 ± 1.01 | 45.03 ± 1.15 |
| DBR - 5 | 19.41 ± 7.13 | 45.06 ± 1.07 | 63.91 ± 3.12 |
| DBR - 15 | 2.35 ± 2.04 | 23.26 ± 3.49 | 41.72 ± 3.03 |
| DFP - G - 5 | 18.24 ± 11.75 | 30.81 ± 10.22 | 53.82 ± 3.07 |
| DFP - G - 7 | 3.73 ± 5.99 | 5.47 ± 0.60 | 53.18 ± 2.53 |
| DFP - G - 9 | 6.47 ± 6.36 | 1.16 ± 6.60 | 45.36 ± 6.95 |
| DFP - P - 7.1 | - | - | 100.00 ± 0.00 |

2.2.3 10 g/L 植物内生真菌菌丝体甲醇提取物对罗汉果病原真菌的抑制活性 如表 5 所示,DBR - 5 的菌丝体甲醇粗提物对 3 种病原菌的抑菌活性较好,抑菌率均大于 70%。DBR - 15、DFP - G - 9 的菌丝体甲醇粗提物对 GFB - G10、BJB 的抑菌活性好,抑菌率均大于 50%。DFP - P - 7.1 的菌丝体甲醇粗提物对 GFB - G15、BJB 菌丝的抑菌活性好,抑菌率均大于 50%。DBR - 3 的菌丝体甲醇粗提物对 GFB - G15 的抑菌活性好。DFP - G - 7 的菌丝体甲醇粗提物对 BJB 的抑菌活性好。DFP - G - 5 菌丝体甲醇提取物抑菌活性差,抑菌率均小于 50%。根据此结果,接下来研究 DBR - 5 的菌丝体甲醇提取物对 3 种罗汉果病原真菌的毒力,DBR - 15、DFP - G - 9 的菌丝体甲醇粗提物对 GFB - G10、BJB 的毒力,DFP - P - 7.1 的菌丝体甲醇粗提物对 GFB - G15、BJB 的毒力,DBR - 3 的菌丝体甲醇粗提物对 GFB - G15 的毒力,DFP - G - 7 的菌丝体甲醇粗提物对 BJB 的毒力。

2.3 广西地不容内生真菌发酵产物对罗汉果病原真菌的毒力

为进一步确定广西地不容内生真菌发酵产物的抑菌效果,根据上文抑菌活性测定结果,选取 3 株地不容内生真菌 DBR - 3、DBR - 5、DBR - 15 的发酵液乙酸乙酯萃取物、发酵液萃余物、菌丝体甲醇提取物对罗汉果原真菌抑菌率达到 50% 以上的相应病原菌作为供试菌株,进一步测定其对供试菌株

表 5 7 株内生真菌菌丝体甲醇提取物对 3 种植物病原真菌菌丝的抑制活性

| 内生真菌 | 抑制率(%) | | |
|---------------|--------------|--------------|---------------|
| | GFB - G10 | GFB - G15 | BJB |
| DBR - 3 | 47.54 ± 4.92 | 54.60 ± 8.70 | 32.03 ± 5.05 |
| DBR - 5 | 79.78 ± 3.41 | 71.17 ± 2.81 | 100.00 ± 0.00 |
| DBR - 15 | 54.10 ± 1.64 | 42.94 ± 3.19 | 68.02 ± 8.29 |
| DFP - G - 5 | 37.87 ± 3.07 | 43.21 ± 7.01 | 45.75 ± 3.56 |
| DFP - G - 7 | 13.61 ± 7.17 | 30.25 ± 8.75 | 74.52 ± 4.31 |
| DFP - G - 9 | 57.42 ± 1.94 | 41.36 ± 7.48 | 72.93 ± 3.07 |
| DFP - P - 7.1 | 33.14 ± 6.72 | 50.93 ± 1.08 | 51.27 ± 3.44 |

菌丝的毒力,结果见表 6。3 种病原菌中,DBR - 3 的发酵液乙酸乙酯萃取物对 GFB - G10 的毒力最高,EC₅₀ 为 0.334 0 g/L;对 BJB 的毒力最低,EC₅₀ 为 1.064 5 g/L。DBR - 5 的发酵液乙酸乙酯萃取物对 BJB 的毒力最高,EC₅₀ 为 0.120 8 g/L;对 GFB - G10 的毒力最低,EC₅₀ 为 0.379 9 g/L。DBR - 15 发酵液乙酸乙酯萃取物对 BJB 的毒力比对 GFB - G15 的毒力高。DBR - 5 的菌丝体甲醇提取物对 GFB - G15 的毒力最高,EC₅₀ 为 0.270 8 g/L;对 GFB - G10 的毒力最低,EC₅₀ 为 0.957 8 g/L。DBR - 15 的菌丝体甲醇提取物对 BJB 的毒力比对 GFB - G10 的毒力高。

2.4 地枫皮内生真菌发酵产物对罗汉果病原真菌的毒力

为进一步确定地枫皮内生真菌发酵产物对 3 种罗汉果病原真菌菌丝生长的抑制活性,根据上文抑

表 6 广西地不容内生真菌发酵产物对 3 种罗汉果病原真菌的毒力

| 内生真菌 | 发酵产物 | 病原菌 | 毒力回归方程 | 相关系数 (<i>r</i>) | EC ₅₀ (95% 置信限) (g/L) |
|-----------|----------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| DBR - 3 | 乙酸乙酯萃取物 | GFB - G10 | $y = 5.365\ 4 + 0.779\ 9x$ | 0.971\ 5 | 0.334\ 0 (0.228\ 8 ~ 0.451\ 2) |
| | | GFB - G15 | $y = 5.348\ 4 + 0.751\ 0x$ | 0.987\ 2 | 0.343\ 6 (0.210\ 4 ~ 0.476\ 8) |
| | | BJB | $y = 4.926\ 1 + 2.723\ 5x$ | 0.974\ 0 | 1.064\ 5 (0.696\ 4 ~ 1.432\ 7) |
| DBR - 5 | 菌丝体甲醇提取物 | GFB - G15 | $y = 3.875\ 4 + 1.264\ 2x$ | 0.989\ 3 | 7.755\ 5 (4.605\ 9 ~ 10.905\ 2) |
| | 乙酸乙酯萃取物 | GFB - G10 | $y = 5.552\ 9 + 1.315\ 6x$ | 0.998\ 7 | 0.379\ 9 (0.268\ 1 ~ 0.491\ 8) |
| | | GFB - G15 | $y = 5.608\ 0 + 1.062\ 6x$ | 0.996\ 6 | 0.267\ 8 (0.145\ 0 ~ 0.390\ 6) |
| | | BJB | $y = 5.640\ 9 + 0.698\ 1x$ | 0.977\ 0 | 0.120\ 8 (0.082\ 5 ~ 0.159\ 1) |
| | 发酵液萃余物 | BJB | $y = 4.593\ 7 + 2.353\ 6x$ | 0.987\ 9 | 1.488\ 1 (0.885\ 9 ~ 2.090\ 3) |
| | 菌丝体甲醇提取物 | GFB - G10 | $y = 5.014\ 9 + 0.793\ 6x$ | 0.988\ 9 | 0.957\ 8 (0.616\ 8 ~ 1.298\ 7) |
| | | GFB - G15 | $y = 5.198\ 6 + 0.350\ 1x$ | 0.973\ 8 | 0.270\ 8 (0.152\ 2 ~ 0.389\ 5) |
| BJB | | $y = 5.135\ 5 + 0.325\ 6x$ | 0.999\ 2 | 0.383\ 6 (0.203\ 5 ~ 0.563\ 7) | |
| DBR - G15 | 乙酸乙酯萃取物 | GFB - G15 | $y = 5.349\ 8 + 0.656\ 6x$ | 0.980\ 3 | 0.293\ 3 (0.167\ 4 ~ 0.419\ 2) |
| | | BJB | $y = 5.762\ 5 + 0.979\ 6x$ | 0.999\ 5 | 0.166\ 6 (0.118\ 4 ~ 0.214\ 8) |
| | 菌丝体甲醇提取物 | GFB - G10 | $y = 3.839\ 0 + 1.208\ 2x$ | 0.981\ 9 | 9.141\ 3 (4.999\ 0 ~ 13.283\ 6) |
| | | BJB | $y = 3.427\ 5 + 1.909\ 3x$ | 0.978\ 3 | 6.661\ 6 (3.705\ 9 ~ 9.617\ 2) |

菌活性测定结果,选取 4 株地不容内生真菌 DFP - G - 5、DFP - G - 7、DFP - G - 9、DFP - P - 7.1 的发酵液乙酸乙酯萃取物、发酵液萃余物、菌丝体甲醇提取物对罗汉果原真菌抑菌率达到 50% 以上的相应病原菌作为供试菌株,进一步测定其对供试菌株菌丝的毒力,结果见表 7。3 种病原菌中,DFP - G - 7、DFP - P - 7.1 的发酵液乙酸乙酯萃取物对 BJB 的毒力最高,EC₅₀ 分别为 0.172 4、0.186 1 g/L;对

GFB - G15 的毒力最低,EC₅₀ 分别为 2.911 7、0.878 9 g/L。DFP - G - 9 的发酵液乙酸乙酯萃取物对 BJB 的毒力最高,EC₅₀ 为 0.426 9 g/L;对 GFB - G10 的毒力最低,EC₅₀ 为 1.545 4 g/L。DFP - G - 9 菌丝体甲醇提取物对 BJB 的毒力比对 GFB - G10 的毒力高。DFP - P - 7.1 菌丝体甲醇提取物对 BJB 的毒力比对 GFB - G15 的毒力高。

表 7 地枫皮内生真菌发酵产物对 3 种罗汉果病原真菌的毒力

| 内生真菌 | 发酵产物 | 病原菌 | 毒力回归方程 | 相关系数 (<i>r</i>) | EC ₅₀ (95% 置信限) (g/L) |
|---------------|----------|-----------|----------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| DFP - G - 5 | 发酵液萃余物 | BJB | $y = 3.610\ 2 + 1.576\ 9x$ | 0.984 4 | 7.609 8(4.531 0 ~ 10.688 6) |
| DFP - G - 7 | 乙酸乙酯萃取物 | GFB - G10 | $y = 5.104\ 9 + 1.853\ 8x$ | 0.961 6 | 0.877 8(0.629 1 ~ 1.126 6) |
| | | GFB - G15 | $y = 4.140\ 8 + 1.851\ 2x$ | 0.982 0 | 2.911 7(1.758 6 ~ 4.064 8) |
| | | BJB | $y = 6.403\ 6 + 1.838\ 3x$ | 0.932 5 | 0.172 4(0.104 3 ~ 0.240 5) |
| | 发酵液萃余物 | BJB | $y = 4.071\ 3 + 0.953\ 0x$ | 0.987 4 | 9.431 3(5.085 4 ~ 13.777 3) |
| | 菌丝体甲醇提取物 | BJB | $y = 5.105\ 8 + 0.554\ 6x$ | 0.996 7 | 0.644 4(0.363 8 ~ 0.925 0) |
| DFP - G - 9 | 乙酸乙酯萃取物 | GFB - G10 | $y = 4.916\ 3 + 0.442\ 6x$ | 0.993 0 | 1.545 4(1.115 6 ~ 1.975 2) |
| | | GFB - G15 | $y = 4.978\ 6 + 1.023\ 2x$ | 0.970 0 | 1.049 3(0.774 9 ~ 1.323 8) |
| | | BJB | $y = 5.497\ 0 + 1.344\ 5x$ | 0.924 1 | 0.426 9(0.281 2 ~ 0.572 6) |
| | 菌丝体甲醇提取物 | GFB - G10 | $y = 4.465\ 0 + 0.659\ 8x$ | 0.983 5 | 6.468 8(4.177 6 ~ 8.760 0) |
| | | BJB | $y = 5.072\ 0 + 0.522\ 7x$ | 0.995 2 | 0.728 2(0.430 8 ~ 1.025 7) |
| DFP - P - 7.1 | 乙酸乙酯萃取物 | GFB - G10 | $y = 5.296\ 4 + 1.489\ 1x$ | 0.953 1 | 0.632 4(0.444 0 ~ 0.820 8) |
| | | GFB - G15 | $y = 5.135\ 9 + 2.423\ 4x$ | 0.950 8 | 0.878 9(0.593 3 ~ 1.164 4) |
| | | BJB | $y = 7.055\ 0 + 2.813\ 8x$ | 0.999 5 | 0.186 1(0.114 1 ~ 0.258 1) |
| | 发酵液萃余物 | BJB | $y = 4.069\ 9 + 2.156\ 3x$ | 0.982 1 | 2.700 0(1.782 3 ~ 3.617 7) |
| | 菌丝体甲醇提取物 | GFB - G15 | $y = 4.064\ 4 + 1.001\ 6x$ | 0.988 6 | 8.591 5(5.036 4 ~ 12.146 6) |
| | | BJB | $y = 4.417\ 3 + 0.808\ 1x$ | 0.985 8 | 5.261 0(2.667 1 ~ 7.855 0) |

3 讨论与结论

目前对地枫皮内生真菌的研究较少,已知地枫皮的根、茎、叶中具有大量的内生真菌^[28],其中一些内生真菌对植物病原菌和动物病原菌有较为广泛的抑菌性,所以研究广西特色植物地枫皮的有利于抗菌植株的培养和生物抗菌剂的研发。

目前对广西地不容内生真菌的研究已初具规模,研究发现其块茎中有多种内生真菌具有很强的抗菌性且有较强的普适性^[29]。现已有以广西地不容为原料的生物杀菌剂研发。

随着罗汉果种植的加大,如何防治罗汉果土传病害成为当务之急。目前大多用化学防治,但是随后带来的环境污染不可忽略。所以对罗汉果土传病害的生物杀菌剂的研发迫在眉睫。

在拮抗试验中供试广西地不容和地枫皮内生

真菌对 3 种罗汉果病原真菌有抑制活性普遍偏低。为了节省时间,减少不必要的步骤,先要初步判断 7 种植物内生真菌对 3 种病原真菌是否有抑菌活性,所以采用了平板对峙法。但拮抗试验中抑制效果不好的菌株并不能说明其没有抑菌活性,可能是本试验方法的局限性造成的,比如由于培养时间太短,抑菌物质尚未产生等。所以应该进一步测定内生真菌发酵产物对病原真菌的抑制活性,从而筛选优良的抑菌菌株。

有大量的研究证明,植物内生菌发酵产物的乙酸乙酯萃取物有广泛的抑菌活性^[27-29]。本试验结果也显示,6 种植物内生真菌 DBR - 3、DBR - 5、DBR - 15、DFP - G - 7、DFP - G - 9、DFP - P - 7.1 的发酵液乙酸乙酯萃取物具有很好的抑菌活性,在质量浓度为 2 g/L 时,其对 3 种罗汉果病原真菌 BJB、GFB - G10、GFB - G15 的抑制率均在 50% 以上(除

DBR-15 发酵液乙酸乙酯萃取物对 GFB-G10 的抑菌活性一般),其中 DBR-5 的发酵液乙酸乙酯萃取物对 BJB 的毒力最高, EC_{50} 为 0.120 8 g/L。

这 6 种植物内生真菌的菌丝体甲醇提取物对病原菌的抑制活性一般,质量浓度为 10 g/L 时,对 3 种罗汉果病原真菌其中的一种或多种的抑制率均在 50% 以上,其中 DBR-5 的菌丝体甲醇提取物对 GFB-G15 的毒力最高; EC_{50} 为 0.270 8 g/L。

4 种植物内生 DBR-5、DFP-G-5、DFP-G-7、DFP-P-7.1 的发酵液萃取物对病原菌的抑制活性一般,质量浓度为 10 g/L 时,对 BJB 的抑菌率在 50% 以上,其中 DBR-5 的发酵液萃取物对 BJB 的毒力最高, EC_{50} 为 1.488 1 g/L。

6 种植物内生真菌 DBR-3、DBR-5、DBR-15、DFP-G-7、DFP-G-9、DFP-P-7.1 的发酵产物乙酸乙酯萃取物有较好的抗菌活性,有很大的研究价值与潜在价值,可以推进研究这 6 种植物内生真菌,探究其活性物质的组成。

参考文献:

- [1] 吴裕民. 罗汉果无公害栽培探讨[J]. 现代农业科技,2022(1): 64-65,68.
- [2] Gong X, Chen N, Ren K, et al. The fruits of *Siraitia grosvenorii*: a review of a Chinese food-medicine[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019,10:1400.
- [3] Li H, Ma X, Tang Y Q, et al. Integrated analysis reveals an association between the rhizosphere microbiome and root rot of arecanut palm[J]. *Pedosphere*,2021,31(5):725-735.
- [4] 王瑞昊,邓业成,陈广桂,等. 罗汉果土传病害拮抗细菌的筛选及鉴定[J]. 福建农业学报,2021,36(8):927-935.
- [5] 张 泽,邓业成,陈 敢,等. 罗汉果土传病害拮抗真菌的筛选及其抗菌活性研究[J]. 河南农业科学,2021,50(6):91-98.
- [6] Abo-Elyousr K A M, Hassan S A. Biological control of *Ralstonia solanacearum* (Smith), the causal pathogen of bacterial wilt disease by using *Pantoea* spp. [J]. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*,2021,31(1):113.
- [7] Peiris P U S. Use of botanicals in root-knot nematode control: a meta-analysis[J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*,2021,128(4):913-922.
- [8] Zou J, Dong Y, Wang H, et al. Identification and characterization of *Nothophoma quercina* causing bud blight on *Photinia* \times *fraseri* in China[J]. *Plant Dis*,2021,105(5):1356-1364.
- [9] 王天玉. 苗木白绢病的发生与防治[J]. 现代农村科技,2020(9):28.
- [10] 雷娅红,况卫刚,郑春生,等. 基于 DNA 条形码技术对镰刀菌属的检测鉴定[J]. 植物保护学报,2016,43(4):544-551.
- [11] Gupta S, Chaturvedi P, Kulkarni M G, et al. A critical review on exploiting the pharmaceutical potential of plant endophytic fungi [J]. *Biotechnology Advances*,2020,39:107462.
- [12] 徐 婕. 杜鹃属植物内生真菌的分离鉴定及其抗中药材害虫活性研究[D]. 兰州:西北师范大学,2021:12-14.
- [13] 党苗苗,丁海娥,从丙超,等. 药用植物内生真菌研究进展[J]. 农村经济与科技,2020,31(14):31-32.
- [14] Shang G Y, He J Y, Kang Y, et al. Structural characterisation of alkaloids in leaves and roots of *Stephania kwangsiensis* by LC-QTOF-MS [J]. *Phytochemical Analysis*, 2018, 29 (1): 101-111.
- [15] 罗昱澜,李 江,毛柳璐,等. 广西地不容生物碱化学成分、药理及质量控制研究进展[J]. 右江民族医学院学报,2015,37(2):304-306.
- [16] 邓业成,徐汉虹. 广西地不容的杀虫活性及有效成分研究[J]. 中国农业科学,2005,38(3):523-527.
- [17] 颜桢灵,陈洁萍,农小霞,等. 柑橘内生真菌的分离鉴定及其发酵产物对柑橘溃疡病菌的抑制活性[J]. 广西植物,2021,41(7):1196-1208.
- [18] Li C T, Lu W Q, Wu Z J, et al. Chemical constituents of *Illicium difengpi* [J]. *Chemistry of Natural Compounds*, 2018, 54 (6): 1167-1169.
- [19] 孙文斌. 地枫皮内生真菌及其抑菌活性物质研究[D]. 桂林:广西师范大学,2018:15.
- [20] 卿 朕. 广西地不容内生真菌及其抑菌活性物质研究[D]. 桂林:广西师范大学,2016:15.
- [21] 周秋艳,卿 朕,骆海玉,等. 两株广西地不容内生真菌的抑菌活性研究[J]. 广东农业科学,2016,43(4):111-116.
- [22] 刘晓莹,孙文斌,陈洁萍,等. 广西地不容内生真菌 DBR-12 和 DBR-23 代谢产物的抑菌活性[J]. 河南农业科学,2017,46(3):75-80.
- [23] 林 伟,骆海玉,邓业成,等. 血散薯块根内生真菌 *Periconia igniaria* Sdifi0 发酵产物的生物活性研究[J]. 河南农业科学,2020,49(1):75-81.
- [24] 李枢妍,黎黎恒,肖雪婷,等. 一株香蕉枯萎病拮抗菌的筛选、鉴定及生防效果研究[J]. 南方农业学报,2021,52(7):1826-1834.
- [25] 卫传昊,王美琴. 生防菌 GHt-q6 对黄瓜枯萎病菌的抑制作用[J]. 山西农业科学,2021,49(4):494-498.
- [26] 李 刚,尹志刚,陈 振,等. 拮抗细菌 EBS05 生长曲线及粗提物抑菌活性测定[J]. 浙江农业科学,2015,56(3):369-372.
- [27] 张建宁. 十字交叉法测定药剂对棉花黄萎病菌的抑制作用[J]. 基层农技推广,2015,3(11):26-31.
- [28] 孙文斌,黄小京,冯蓓蓓,等. 地枫皮内生真菌 DFP-G-7 的分离鉴定、生物学特性及抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):97-100.
- [29] 卿 朕,周秋艳,孙文斌,等. 广西地不容内生真菌疣孢漆斑菌 DBR-11 的抑菌活性[J]. 河南农业科学,2016,45(5):77-81,86.