

• 研究简报 •

除虫菊内生真菌 Y2 菌株的分离鉴定及其 发酵产物抑菌活性初步研究

易晓华, 冯俊涛, 王永宏*, 郭小炜, 张 兴

(西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心 / 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

摘 要: 在对从除虫菊中分离到的内生真菌进行抑菌活性系统筛选的基础上, 对其中活性较高的 Y2 菌株进行了初步的鉴定和活性物质的分离。经形态学初步鉴定该菌株为镰孢属真菌 *Fusarium* sp., 其发酵液粗提物高抑菌活性馏分集中在丙酮、乙酸乙酯等中等极性馏分段。Y2 菌株发酵液 10 倍稀释液对玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum* 等 6 种供试植物病原真菌菌丝生长的抑制率在 80.41%~93.26% 之间, 其 5 倍稀释液对番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和苹果炭疽病菌 *Gibberella cingulata* 孢子萌发的抑制率均大于 80%。活体生测结果表明, 该发酵液对番茄灰霉病和黄瓜霜霉病的保护效果大于 50%, 治疗效果不明显。

关键词: 除虫菊; 内生真菌; 发酵产物; 活性筛选; 抑菌活性

中图分类号: S482.292

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2007)02-0193-04

The Preliminary Study on Screening and Identification of Endophytic Fungi Y2 from *Pyrethrum cinerariifolium* and Antifungal Activity of Y2 Fermentation Products

YIXiao-hua FENG Jun-tao WANG Yong-hong*, GUO Xiao-wei ZHANG Xing

(Research and Development Center of Bio-rational Pesticide Technology and Engineering

Research Center of Biopesticide, Northwest A & F University, Yangling, 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract Based on the antifungal activity screening of endophytic fungi obtained from *Pyrethrum cinerariifolium*, the strain of Y2 with higher activity was primarily identified and its active substances were separated. The primary morphological characteristics identification indicated that Y2 belongs to *Fusarium* sp. The extracts of Y2 fermentation liquid with high antifungal activity were eluted by acetone and ethyl acetate. The bioassay results showed that the inhibition rates of 10 time diluted fermentation liquid of Y2 against 6 pathogenic fungi including *Exserohilum turcicum* et al were ranged from 80.41% to 93.26%, and that of the 5 time diluted fermentation liquid of Y2 against *Botrytis cinerea* and *Gibberella cingulata* were more than 80%. The antifungal activity of fermentation product of Y2 were analyzed by in vivo assay, the protective effect against *B. cinerea* and *Lycopersicon esculentum* were more than 50%, the therapeutic effect were not prominent.

Key words *Pyrethrum cinerariifolium* Trev.; endophytic fungi; fermentation products; activity screening; antifungal activity

收稿日期: 2007-01-05 修回日期: 2007-04-02

作者简介: 易晓华 (1972-), 女, 讲师, 在读博士研究生, 主要从事天然产物研究与开发; 通讯作者 (A author for correspondence): 王永宏 (1968-), 男, 博士, 副教授, 主要从事生物源农药的研究与开发. 联系电话: 029-87092122 E-mail: wyh34@yahoo.com.cn

基金项目: 国家“十五”科技攻关重大专项 (2002BA516A04).

从传统药用植物及一些特殊环境植物的内生真菌次生代谢产物中寻找新型活性物质,是内生真菌研究的主流之一^[1]。除虫菊是一种优良的杀虫植物,其除虫菊素同时还具有一定的杀菌作用,特别是对真菌效果明显^[2]。植物内生真菌对植物某些药效成分的形成有重要影响。研究表明,内生真菌能产生与宿主相同或相似的具有生理活性的次生代谢产物^[3~5],且真菌易于培养,可通过育种手段和控制发酵条件等措施来大幅提高其药用成分的含量。因此,利用植物内生真菌发酵生产生物源农药是突破某些植物资源生长周期长、不可再生等限制因素的一条新途径^[1]。

作者在对从除虫菊的根、茎、叶、花中所分离到的 128 株内生真菌进行抑菌活性系统筛选的基础上,对其中活性较好的、从叶中分离到的 Y2 菌株进行了初步的鉴定和活性物质的分离,并对其发酵产物的抑菌活性进行了测定,结果简报如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

植物:除虫菊 *Pyrethrum cinerariifolium* Trev., 中国科学院云南昆明植物研究所提供。

药剂:50% 速克灵 (procymidone) 可湿性粉剂, 日本住友化学株式会社; 72% 傲霜清 [8% 霜脲·64% 锰锌 (质量分数)], cymoxanil·mancozeb 可湿性粉剂, 山东临淄绿神农药有限公司生产。

发酵培养基: PDA 培养基用于除虫菊内生真菌的分离, PD 液体培养基用于内生真菌的摇瓶发酵。

产孢培养基: 康乃馨琼脂培养基 (CLA)^[6]。

供试植物病原真菌: 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia cerealis*、苹果炭疽病菌 *Glomerella cingulata*、玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、辣椒疫霉病菌 *Phytophthora capsici*、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、番茄叶霉病菌 *Fulvia fulva*、白菜黑斑病菌 *Alternaria brassicae*、黄瓜霜霉病菌 *Pseudoperonospora cubensis*, 由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

1.2 Y2 菌株的分离、纯化及鉴定

取洗净的新鲜除虫菊叶片,依次用 75% 酒精漂洗 10 s, 0.1% 的升汞漂洗 30 s, 无菌水冲洗 3~

5 次,彻底消毒后剪成约 0.5 cm × 1.0 cm 的小段,置于 PDA 平板上,28℃ 下避光培养 7 d,待样品边缘长出菌丝后,转接至新 PDA 培养基上继续培养,纯化,并对菌株进行编号、保存。

从叶中共分离得到 49 株内生真菌,生长速率法测试发现其中 Y2 菌株发酵液的抑菌活性最好。将 Y2 菌株接种于 CLA 培养基上促其产孢,参照文献 [7] 方法,根据观察到的 Y2 菌株的形态学特征和培养特性,初步鉴定其为镰孢属真菌 *Fusarium* sp.。

1.3 发酵产物的制备

内生真菌发酵条件:将 Y2 菌株先转接到 PDA 培养基上培养 5~7 d 待长出菌落后,打取直径 4 mm 的菌饼接种于 PD 液体培养基中 (15 个菌饼/瓶),置于摇床上 (95 r/min) 发酵 7~10 d。

发酵液和发酵浸膏的制备:取上述发酵条件下的菌液,在 4℃、10 000 r/min 下离心 20 min,取上清液即为 Y2 菌株发酵液。将 30 L 发酵液用 4 层纱布过滤,4℃、10 000 r/min 离心 20 min,所得上清液于旋转薄膜蒸发仪上浓缩 (45℃),得发酵液浸膏。

1.4 Y2 菌株发酵液硅胶柱层析馏分的分离制备

采用湿法装柱。先在玻璃层析柱 (47 mm × 800 mm) 中装入 200~300 目的硅胶,将发酵液浸膏用 80~100 目的硅胶拌样、吹干、研磨、装柱,依次用石油醚、石油醚-氯仿 (1:1, 体积比,下同)、氯仿、乙酸乙酯、氯仿-乙酸乙酯、丙酮-乙酸乙酯、丙酮、丙酮-甲醇、甲醇洗脱,根据薄层层析情况,合并洗脱液,得馏分若干。各馏分于旋转薄膜蒸发仪上 45℃ 下浓缩,浓缩液于通风橱中自然挥干,待用。

1.5 抑菌活性测定方法

1.5.1 离体活性测定^[8] 分别采用菌丝生长速率法和孢子萌发法进行,每处理重复 3 次,计算菌丝生长抑制率和孢子萌发抑制率。

1.5.2 活体组织法测定 按文献 [9] 方法进行。

1.5.3 盆栽试验法 按文献 [9] 方法进行并计算病情指数和相对防效。

2 结果与分析

2.1 Y2 菌株的分离及其抑菌活性筛选

生长速率法测试结果表明,从叶中分离到的

Y2菌株发酵液的抑菌活性最强,其 10 倍稀释液对 6 种供试病原真菌菌丝生长的抑制率分别为:番茄灰霉病菌 93.26%,小麦赤霉病菌 91.54%,苹果炭疽病菌 91.09%,辣椒疫霉病菌 90.08%,立枯丝核菌 89.74%,玉米大斑病菌 80.41% (表略)。

孢子萌发法测定结果表明,Y2 菌株发酵液 5 倍稀释液对番茄灰霉病菌和苹果炭疽病菌孢子萌发均有较强的抑制作用,抑制率在 80% 以上;对

白菜黑斑病菌的抑制率为 56.24%;对番茄叶霉病菌的抑制率最低,仅为 37.48% (表略)。且随稀释倍数加大抑制率下降。

2.2 Y2菌株发酵液对番茄灰霉病的保护和治疗效果

活体组织法测定结果(表 1)表明,Y2 菌株发酵液原液对番茄灰霉病的保护效果为 50.84%,与对照药剂 50% 速克灵 1 000 倍稀释液的防效相当;但治疗效果明显低于对照药剂。

表 1 Y2菌株发酵液对番茄灰霉病的保护和治疗作用

Table 1 The efficacy of Y2 broth against the B. circerea on tomato after 4 d treatment (tissue method)			
样品 Sample	稀释倍数 Multiple of dilute	相对防效 Relative efficacy (%)	
		保护作用 Protective effect	治疗作用 Therapeutic effect
Y2 发酵液	0	50.84 b	38.62 b
Y2 broth	10	38.11 c	26.41 c
	20	11.78 d	8.25 d
50% 速克灵	1 000	62.99 a	54.49 a
50% Procymidone			
CK		-	-

注:采用 Duncan's 方法对试验结果进行统计分析,同列不同小写字母表示差异达显著水平 ($P < 0.05$);下同。
Note: The column followed by different letters were significantly different at the 5% level by Duncan's multiple range test. The same as followed.

2.3 Y2菌株发酵液对黄瓜霜霉病的盆栽防效

结果表明(表 2),Y2 菌株发酵液对黄瓜霜霉病有一定的预防作用,其中原液的保护效果最佳,

防效为 59%,但不及对照药剂 72% 傲霜清 2 000 倍稀释液;治疗效果则明显低于对照药剂。

表 2 Y2菌株发酵液对黄瓜霜霉病的保护和治疗作用

Table 2 The efficacy of Y2 broth against the P. cubensis after 7 d treatment (pot method)					
样品 Sample	稀释倍数 Multiple of dilute	保护作用 Protective effect		治疗作用 Therapeutic effect	
		病情指数 Disease index	防治效果 (%) Control efficacy	病情指数 Disease index	防治效果 (%) Control efficacy
Y2 发酵液	0	27.78±1.76	59.00 b	47.33±1.23	32.69 b
Y2 broth	10	38.88±2.01	43.65 c	59.11±2.97	17.75 c
	20	53.47±1.21	20.32 d	63.95±1.25	8.77 d
72% 傲霜清	2 000	20.70±1.39	71.86 a	33.69±1.10	53.97 a
Cymoxanil+ mancozeb					
CK		67.32±2.48	-	70.06±2.13	-

2.4 硅胶柱层析各馏分的抑菌活性

Y2 菌株发酵液经浓缩得 15 g 浸膏,采用硅胶柱层析初步分离共得到 A~I 9 个馏分,各馏分对番茄灰霉病菌孢子萌发的抑制作用结果见表 3。不同馏分间抑制作用差异较大,在 0.5 mg/mL 浓度下,抑菌活性成分主要集中在 D、G、H 3 个馏分段,而这一区段的洗脱液分别为乙酸乙酯、丙酮和丙酮-甲醇(1:1 体积比),均为中等极性馏分段,

说明 Y2 菌株发酵液抑菌活性成分可能是中等极性的物质。这为后续大量样品分离过程中洗脱液的选择奠定了基础。

3 小结与讨论

有研究表明,宿主与内生真菌在相互作用过程中,一些内生真菌能产生与宿主相同或相似的

表 3 硅胶柱层析各馏分对番茄灰霉病菌孢子萌发的抑制作用 (0.5 mg/mL)

Table 3 Antifungal activity of different fractions separated by silica-gel column chromatography against *B. cinerea* at 0.5 mg/mL

馏分 Fraction ^a	抑制率 Inhibition rate(%)	馏分 Fraction	抑制率 Inhibition rate(%)
丙酮 Acetone (CK)	—	E	44.39
A	—	F	51.54
B	—	G	90.30
C	56.13	H	71.43
D	71.94	I	2.04

^a 洗脱剂: A.石油醚, B.石油醚-氯仿 (1:1, 体积比, 下同), C.氯仿, D.乙酸乙酯, E.氯仿-乙酸乙酯, F.丙酮-乙酸乙酯, G.丙酮, H.丙酮-甲醇, I.甲醇。

^a Extraction solvent: A. petroleum-ether; B. petroleum-ether+ chloroform = 1:1 (V/V); C. chloroform; D. ethyl acetate; E. chloroform + ethyl acetate = 1:1; F. ethyl acetate+ acetone = 1:1; G. acetone; H. acetone+ methanol = 1:1; I. methanol.

活性物质^[10]。从理论上说,从除虫菊中应该分离得到具有杀虫活性的内生真菌,而试验中筛选到的却是具有杀菌活性的菌株,原因可能是:①一些内生真菌在 PDA 培养基上不能生长,从而造成某些特殊的或具有杀虫活性的真菌被漏分。②杀虫活性物质为除虫菊植株本身所具有,其内生真菌不产生杀虫活性物质。内生真菌可增强宿主对病原细菌和真菌的抗性,保护宿主免受危害^[11,12],除虫菊不易遭受病害侵袭,可能与其内生真菌普遍具有抑菌活性有关。

室内和盆栽试验表明,Y2菌株发酵液对供试病原真菌的菌丝生长和孢子萌发均具有较好的抑制作用,对番茄灰霉病和黄瓜霜霉病有较好的保护作用,但有关其田间的实际杀菌作用还有待进一步研究。

后期还将进一步分离纯化 Y2菌株代谢物的抑菌活性成分并对其结构进行鉴定,进而对所分离出的各组分的抑菌活性和相互作用做更深入的研究。

致谢:感谢中国科学院云南昆明植物研究所邱明华研究员提供除虫菊材料!

参考文献:

[1] ZOU Wen-xin (邹文欣), TAN Ren-xiang (谭仁祥). 植物内生真菌研究进展 [J]. Acta Botanica Sinica (植物学报), 2001, 43(9): 881-892.

[2] FAN Jie-ni (范洁茹). 天然除虫菊素特性及技术开发研究 [M] // Plant Protection and Food Security (植物保护与粮食安全). Beijing(北京): Chinese Agriculture Press(中国农业出版社), 2005: 315.

[3] STROBE G, STIERLE D. Taxol and Taxane Production by

Taxomyces and reanae, an Endophytic Fungus of Pacific Yew [J]. Science, 1993, 260: 214-216.

[4] GUO Bo (郭波), LI Hai-yan (李海燕), ZHAN Ling-qi (张玲琪), et al. 一种产长春碱真菌的分离 [J]. J. Yunnan Univ (云南大学学报), 1998, 20(3): 214-215.

[5] LI Hai-yan (李海燕), WANG Zh-jun (王志军), ZHANG Ling-qi (张玲琪), et al. 一种桃儿七内生真菌的分离初报 [J]. J. Yunnan Univ (云南大学学报), 1999, 21(3): 243-244.

[6] BURGESS L W, SUMMERELL B A, BULLOCK S, et al. Laboratory Manual for Fusarium Research [M]. Sydney: The University of Sydney Press, 1994: 121-122.

[7] WEI Jing-chao (魏景超). Manual of Fungi Taxonomy (真菌鉴定手册) [M]. Shanghai(上海): Shanghai Science and Technology Press(上海科学技术出版社), 1979: 609-638.

[8] WU Wen-jun (吴文君). Introduction to Experiment of Chemical Plant Protection (植物化学保护实验技术导论) [M]. Xi'an (西安): Shaanxi Sci-Tech Press(陕西科技出版社), 1987: 141-145.

[9] FANG Zhong-da (方仲达). Research Method of Plant Pathology (植病研究方法) [M]. Beijing(北京): Chinese Agriculture Press(中国农业出版社), 1998: 152-157.

[10] LIN eng-zhang (李能章), PENG Yuan-yi (彭远义). 一株芦荟抗菌内生细菌的分离鉴定及生物学性质研究 [J]. Letters in Biotechnology (生物技术通讯), 2004, 15(2): 1412-1451.

[11] CHRISTENSEN M J. Antifungal Activity in Grasses Infected with Acremonium and Epichloe Endophytes [J]. Austr Plant Pathol, 1996, 25: 186-191.

[12] STURZ A V, CHRISTIE B R, MATHESON B G, et al. Endophytic Bacterial Communities in the Periderm of Potato Tubers and Their Potential to Improve Resistance to Soil-borne Plant Pathogens [J]. Plant Pathol, 1999, 48: 360-369.

(Ed. TANG J)