

冬青卫矛内生真菌 2QR1 菌株代谢产物的杀菌活性

李会玲,杨春平,武金占,邵彦坡,姬志勤

(西北农林科技大学 农药研究所,陕西 杨凌 712100)

[摘要] 为寻找天然植物源新的具有农药活性的先导化合物,从冬青卫矛根皮中分离到1株内生真菌,编号为2QR1,初步鉴定其为半知菌亚门,曲霉属(*Aspergillus*)。室内活性测定结果表明,2QR1菌株发酵液的杀菌活性远高于菌丝体的杀菌活性。该菌株发酵液乙酸乙酯萃取物对小麦根腐病菌、小麦赤霉病菌、苹果炭疽病菌、玉米大斑病菌、番茄叶霉病菌、烟草赤星病菌和马铃薯干腐病菌菌丝生长抑制的有效中质量浓度 EC_{50} 值分别为 53.6, 63.1, 63.3, 98.2, 106.5, 115.9 和 166.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$;对玉米大斑病菌、小麦根腐病菌、烟草赤星病菌和马铃薯干腐病菌抑制孢子萌发的有效中质量浓度 EC_{50} 值分别为 94.8, 139.1, 146.6 和 180.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$;在质量浓度为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径在 16 mm 以上。盆栽试验结果表明,2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物在质量浓度为 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对小麦白粉病的保护作用和治疗作用分别为 61.9% 和 81.6%。选用硅胶柱层析,以杀菌活性追踪为指导,对该菌株发酵液乙酸乙酯萃取物进行了杀菌活性成分的分离,得到化合物 B_9 。化合物 B_9 对玉米大斑病菌、烟草赤星病菌、小麦根腐病菌和马铃薯干腐病菌抑制孢子萌发的有效中质量浓度 EC_{50} 值分别为 0.8, 1.4, 3.3 和 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

[关键词] 冬青卫矛;内生真菌;代谢产物;杀菌活性

[中图分类号] S481⁺.9;S482.2⁺92

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)06-0135-06

Antifungal metabolites of endophytic fungus of 2QR1 strain in *Euonymus japonicus*

L I Hui-ling, YANG Chun-ping, WU Jin-zhan, SHAO Yan-po, J I Zhi-qin

(Institute of Pesticide Science, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: A endophytic fungi strain was isolated from *Everyreen euonymus*. The strain numbered 2QR1 was preliminarily identified as deuteromycotina *Aspergillum*. The result of fungicidal activities of metabolities of 2QR1 strain showed that the EC_{50} value of ethyl acetate extract of fermentation broth of 2QR1 strain was separately 53.6, 63.1, 63.3, 98.2, 106.5, 115.9 and 166.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium graminearum*, *Glomerella cingulata*, *Exserohilum turcicum*, *Fulvia fulvum*, *Alternaria longipe* and *Fusarium solani*. The EC_{50} value of acetate extract of fermentation broth of 2QR1 to inhibit the spore germinations of *Exserohilum turcicum*, *Alternaria longipes*, *Bipolaris sorokiniana* and *Fusarium solani* was separately 94.8, 139.1, 146.6 and 180.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The inhabition zone diameter of ethyl acetate extract of fermentation broth of 2QR1 strain was more than 16mm at the concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcu aureus*. The results of pot test indicated that ethyl acetate extract of fermentation broth of 2QR1 strain showed 61.9 % of protected efficacy and 81.6 % of therapeutic efficacy at 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Compound B_9 was separated from the ethyl acetate extract of fer-

[收稿日期] 2006-11-17

[基金项目] 国家“863”高技术计划项目(2002AA245121)

[作者简介] 李会玲(1979-),女,陕西蒲城人,在读硕士,主要从事天然产物农药研究。

[通讯作者] 姬志勤(1971-),男,山西永济人,讲师,主要从事天然产物农药研究。E-mail: jizhijun@163.com

mentation broth by p-TLC. The result of spore germination proved that the EC_{50} value of compound B₉ was separately 0.8, 1.4, 3.3 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$, against *Exserohilum turcicum*, *Alternaria longipes*, *Bipolaris sorokiniana* and *Fusarium solani*.

Key words: *Euonymus japonicus*; endophytic fungi; fermentation products; fungicidal activities

冬青卫矛 (*Euonymus japonicus*) 又名正木、大叶黄杨, 为卫矛科卫矛属常绿直立灌木, 在我国南北方各省区均有栽培, 目前多作为园艺观赏植物^[1]。卫矛科植物中的许多化合物具有药用活性, 如细胞毒性、抗癌活性、逆转多重药物抗性 (MDR)、免疫抑制活性、抗艾滋病等已有许多研究报道; 另外, 许多卫矛科植物在中国传统农业中用以保护农作物免受危害^[2]。根据《新华本草纲要》记载, 卫矛科有 11 种植物具有农药活性, 主要集中在雷公藤属、卫矛属、南蛇藤属^[3]。目前, 在国外, 仅 Han 等^[4]报道从冬青卫矛根皮中分离鉴定出 6 个 β -二氢沉香呋喃多元醇酯类生物碱化合物。在国内, 西北农林科技大学农药研究所自 2000 年以来, 从卫矛科杀虫植物苦皮藤的内生真菌中分离出 2 株产生杀虫活性和 3 株产生杀菌活性的内生真菌, 并从编号为 2B 的活性菌株内分离到 3 个环肽类抗菌化合物^[5-6]。黄军海等^[7]对 13 种卫矛科植物杀虫活性的研究发现, 冬青卫矛 (*Euonymus japonicus*) 根皮的石油醚和乙酸乙酯提取物的毒杀活性分别为 20% 和 60%。张启东^[8]从冬青卫矛中分离出的 4 个大环生物碱具有显著杀虫活性。基于某些植物内生真菌能产生与宿主相同或相似的活性成分^[9], 本研究从采自陕西杨凌的冬青卫矛根皮中分离到 1 株内生真菌 2QR1, 对 2QR1 菌株代谢产物的杀菌作用进行了探讨, 以期从天然植物源寻找新的具有农药活性的先导化合物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 从采自陕西杨凌的冬青卫矛 (*Euonymus japonicus*) 根皮中分离到 1 株内生真菌, 命名为 2QR1。

1.1.2 供试病原菌 番茄叶霉病菌 (*Fulvia fulvum*)、小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*)、玉米大斑病菌 (*Exserohilum turcicum*)、烟草赤星病菌 (*Alternaria longipes*)、小麦根腐病菌 (*Bipolaris sorokiniana*)、苹果炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*)、马铃薯干腐病菌 (*Fusarium solani*)、番茄早疫病病菌 (*Alternaria solani*)、西瓜枯萎病菌 (*Fusarium*

oxysporium f. sp. niveum)、棉花枯萎病菌 (*Verticillium dahliae*)、小麦白粉病菌 (*Blumeria graminis*)、及蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、链球菌 (*Streptococcus*), 均由西北农林科技大学农药研究所提供。

1.1.3 供试植物 将已萌发的小麦种子 (小麦品种辉县红) 播在装有土壤的纸杯中, 每纸杯播 7~8 粒, 在 18~20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 左右。

1.1.4 培养基 固体培养基: PDA 培养基, 牛肉膏蛋白胨培养基。

液体培养基: 土豆 200 g, 蔗糖 10 g, 葡萄糖 10 g, 乙酸钠 1.66 g, 硫酸镁 1.02 g, 蛋白胨 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, 0.1 MPa 灭菌 30 min。

1.2 2QR1 菌株发酵产物的制备

1.2.1 2QR1 菌株的液体培养 在 250 mL 三角瓶中装入 100~125 mL 马铃薯液体培养基, 封口, 灭菌。待冷却后用接种针挑取少量 2QR1 菌落接种于培养瓶中, 置摇床上, 在 180~200 r/min、26~30 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 6~7 d。

1.2.2 2QR1 菌株发酵产物的提取 发酵终止后, 将 3 800 mL 2QR1 菌株发酵产物用 4 层纱布过滤, 菌丝体在通风橱中吹干, 获得干菌丝体 41.501 g。菌丝体分别用甲醇、乙酸乙酯和石油醚水浴回流提取各 3 次, 每次 2 h, 合并滤液, 过滤, 用旋转蒸发器浓缩得菌丝体甲醇、乙酸乙酯和石油醚粗提物分别为 1.007, 0.887 和 0.178 g。发酵液用等体积乙酸乙酯萃取 4 次, 合并乙酸乙酯相, 减压浓缩得乙酸乙酯萃取物 1.262 g。

1.3 2QR1 菌株发酵产物对病原菌的抑制作用

1.3.1 对菌丝生长的抑制作用 将一定浓度待测样品的丙酮溶液 1 mL 与 9 mL 融化的 PDA 培养基混匀, 倒入无菌培养皿中制成带药培养基平面。待培养基凝固后, 在每个培养基平面放入 1 个供试菌饼 (直径为 4 mm), 使菌饼带菌丝的一面贴在培养基表面, 以加入 10 mL DNA 培养基为对照, 每处理 3 次重复。培养 72~96 h 后, 用十字交叉法测量供试菌菌落直径, 用下述公式计算抑制率^[10]:

菌丝生长抑制率/ % = (对照菌落直径 -

处理菌落直径)/对照菌落直径 $\times 100\%$ 。

1.3.2 对病原细菌的抑制作用 采用滤纸片扩散法测定病原细菌对 2QR1 菌株发酵产物的敏感性。将融化的牛肉膏蛋白胨培养基冷却至 $45\sim 50\text{ }^{\circ}\text{C}$, 加入体积分数 1.5% 的供试病原细菌摇匀, 每皿 5 L 制成培养基平板。将 2QR1 菌株代谢产物配成质量浓度为 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的丙酮溶液, 取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 点滴于滤纸片(直径 4 mm)上, 使其充分吸收, 挥去溶剂后, 平放于培养基平板上, 以丙酮为对照, 每处理重复 3 次, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中培养, 24 h 后测量抑菌圈大小^[11]。

1.3.3 对敏感真菌的毒力测定 (1)抑制菌丝生长的毒力。将 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物配成 $5\text{ }000, 2\text{ }500, 1\text{ }250, 625, 312.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 5 个不同质量浓度, 每质量浓度为一个处理, 每处理设 3 个重复。其他方法同 1.3.1, 最后根据不同质量浓度的菌丝生长抑制率计算毒力^[10]。

(2)抑制孢子萌发的毒力。取供试病原菌的孢子配成适当浓度的孢子悬浮液(在 10×10 低倍镜下, 每个视野有 $30\sim 40$ 个孢子)。将 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物配成 $500, 250, 125, 62.5, 31.25\text{ }\mu\text{g/mL}$ 5 个不同质量浓度。把一定浓度待测样品的丙酮溶液分别与孢子悬浮液混合, 取 1 滴滴加在凹玻片上, 将凹玻片迅速翻转使液滴倒悬在凹玻片下表面, 小心将凹玻片放在保湿器架上, 使液滴倒悬在保湿的小环境中, 每质量浓度为一个处理, 以加入孢子悬浮液为对照, 每处理 3 次重复。在适当温度下培养 6 h 后检查对照孢子的萌发情况。当对照孢子萌发率达到 85% 后, 检查所有处理孢子的萌发率。以孢子芽管长度大于孢子短半径者为萌发。按下式计算孢子萌发抑制率。最后根据不同质量浓度的抑制率计算毒力^[12]。

萌发抑制率/ $\%=(\text{对照萌发率}-\text{处理萌发率})/\text{对照萌发率}\times 100\%$ 。

1.4 2QR1 菌株发酵产物对小麦白粉病的盆栽防效试验

(1)保护作用测定:先在盆栽小麦植株上喷洒 $1\text{ }000, 2\text{ }000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物, 24 h 后在保湿条件下接种小麦白粉病菌。每处理 4 次重复, 每重复 1 盆, 设清水对照, 7 d 后按照小麦白粉病的分级标准进行病情调查^[13]。

(2)治疗作用测定:先在保湿条件下接种(喷雾法)小麦白粉病菌, 24 h 后再在小麦植株上喷施

$1\text{ }000, 2\text{ }000\text{ }\mu\text{g/mL}$ 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物。每处理 4 次重复, 每重复 1 盆, 设清水对照, 7 d 后按小麦白粉病的分级标准进行病情调查^[13]。

病情指数 = $\frac{\sum(\text{各级发病数} \times \text{该级代表数})}{\text{总株数} \times \text{最高级代表数}}$,

防治效果/ $\%=(\text{对照病情指数}-\text{处理病情指数})/\text{对照病情指数}\times 100\%$ 。

1.5 2QR1 菌株的初步分类鉴定

根据真菌的分类鉴定方法, 通过观察菌落特征及菌丝、分生孢子、产孢结构等的形态, 对比相关分类系统, 确定 2QR1 菌株的种属地位^[14-15]。

1.6 2QR1 菌株发酵产物有效成分的分离

取浓缩挥发干后的 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物 8.4 g 上硅胶柱, 采用干法装柱。以石油醚:乙酸乙酯体积比 $98:2\sim 25:75$; 乙酸乙酯:甲醇体积比 $99:1\sim 50:50$ 淋柱, 流速为 6 mL/min , 每 200 mL 收集 1 份, 收集 9 份后以 500 mL 甲醇清柱。浓缩得 10 个馏分(记为 $A_1\sim A_{10}$), 以枯草芽孢杆菌为指示菌, 采用滤纸片法对每份样品进行杀菌活性测定。

将 $A_1\sim A_{10}$ 馏分中杀菌活性最好的馏分 A_4 放在通风橱中挥发干, 取 2.5 g 上硅胶柱, 用石油醚:乙酸乙酯体积比 $16:6$ 装柱, 湿法上样。采用石油醚:乙酸乙酯:甲醇体积比 $16:6:0.4$ 进行洗脱, 每 20 mL 收集 1 份, 收集 10 份后, 用 200 mL 甲醇清柱。浓缩得 11 个馏分(记为 $B_1\sim B_{11}$)。其中, B_9 是一个淡黄色结晶。经 TLC 和 HPLC 检测分析, 确定其为纯化合物。

2 结果与分析

2.1 2QR1 菌株发酵产物对病原菌菌丝生长的抑制作用

从表 1 可以看出, 2QR1 菌株菌丝体乙酸乙酯提取物在质量浓度为 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时, 对病原菌菌丝生长的抑制作用较强, 其中对玉米大斑病菌和苹果炭疽病菌的菌丝生长抑制率在 80% 以上, 而菌丝体石油醚提取物和甲醇提取物对病原菌菌丝生长的抑制作用较弱。2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物在质量浓度为 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ 时对苹果炭疽病菌、小麦赤霉病菌、小麦根腐病菌、烟草赤星病菌、棉花枯萎病菌、玉米大斑病菌和番茄叶霉病菌的菌丝生长抑制率均大于 90% 。

表 1 2QR1 菌株发酵产物对病原菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Effects of fermentation products of 2QR1 strain on mycelium growth %

供试病原菌 Tested fungus	菌丝生长抑制率 Inhibition rate of mycelium growth			
	菌丝体甲醇提取物 Methanol extracts of mycelium	菌丝体乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extracts of mycelium	菌丝体石油醚提取物 Petroleum ether extracts of mycelium	发酵液乙酸乙酯萃取物 Ethylacetate extracts of fermentation broth
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	47.7	65.6	6.7	100
西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporium</i> f. sp. niveum	4.7	25.0	3.3	88.3
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	31.3	27.8	13.1	87.1
马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium solani</i>	32.2	50.0	12.2	83.3
玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	58.1	91.3	16.8	97.8
烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i>	56.7	56.3	17.8	90.8
苹果炭疽病菌 <i>Glomerella cingulata</i>	35.6	81.7	5.3	100
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	40.3	55.7	7.1	98.1
棉花枯萎病菌 <i>Vertivillium dahliae</i>	22.2	40.6	0.1	90.6
番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulvum</i>	1.2	61.9	12.2	94.7

2.2 2QR1 菌株发酵产物对病原细菌的抑制作用

从表 2 可以看出,2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物在质量浓度为 500 μg/ mL 时,对枯草芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌和金黄色葡萄球菌的抑菌圈直径分别为 23.0,18.5 和 16.0 mm,且抑菌圈突出,而对

链球菌的抑菌活性相对较差,抑菌圈直径为 14.0 mm。在质量浓度为 500 μg/ mL 时,2QR1 菌株菌丝体甲醇和乙酸乙酯提取物对供试细菌的抑菌活性较弱,而石油醚提取物未表现出抑菌活性。

表 2 2QR1 菌株发酵产物对病原细菌的抑制作用

Table 2 Inhibition effects of fermentation products of 2QR1 strain on bacteria

供试细菌 Tested bacteria	抑菌圈直径/ mm Inhibition zone diameter			
	发酵液乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate of fermentation broth	菌丝体甲醇提取物 Methanol extracts of mycelium	菌丝体乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extracts of mycelium	菌丝体石油醚提取物 Petroleum ether of mycelium
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	23.0(+ + +)	8.0(+ +)	14.0(+ + +)	-
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	18.5(+ + +)	7.5(+)	11.5(+ + +)	-
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	16.0(+ + +)	5.0(+)	7.5(+ +)	-
链球菌 <i>Streptococcus</i>	14.0(+ +)	-	8.5(+)	-

注:数据为 3 次重复的平均值;“+”表示抑菌圈可见;“++”表示抑菌圈清晰;“+++”表示抑菌圈突出;“-”表示无抑制作用。表 6 同。
Note :All values are means of three replicates;“+”means eyeable;“++”means clear;“+++”means protrudent;“-”means no inhibitory effect。

2.3 2QR1 菌株发酵产物对敏感真菌的毒力测定结果

2.3.1 抑制菌丝生长的毒力测定结果 在 2.1 试验结果的基础上,进一步测定了 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物对 7 种供试病原菌菌丝生长的毒力,结果见表 3。从表 3 可以看出,2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物对小麦根腐病菌、苹果炭疽病菌和小麦赤霉病菌菌丝生长的毒力较高,EC₅₀ 值分别为

53.6,63.3 和 63.1 μg/ mL ;对马铃薯干腐病菌菌丝生长的毒力较低,EC₅₀ 值为 166.3 μg/ mL。

2.3.2 抑制孢子萌发的毒力测定结果 孢子萌发的毒力测定结果(表 4)表明,2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物对玉米大斑病菌的毒力较高,EC₅₀ 值为 94.8 μg/ mL,对其他 3 种病原菌孢子萌发的毒力较低,EC₅₀ 值为 139.1~180.1 μg/ mL。

表 3 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物抑制菌丝生长的毒力测定结果

Table 3 Toxicity of ethyl acetate of fermentation broth of 2QR1 strain on mycelium growth of plant pathogenic			
供试病原菌 Tested fungus	毒力方程 Toxicity equation	相关系数 <i>r</i> Correlation coefficient	<i>EC</i> ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i>	$Y = 1.777\ 4 + 1.561\ 3x$	0.982 2	115.9
玉米大班病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	$Y = 2.724\ 0 + 1.142\ 5x$	0.953 8	98.2
番茄叶霉病菌 <i>Fulvia fulvum</i>	$Y = 1.733\ 2 + 1.6113x$	0.993 4	106.5
马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium solani</i>	$Y = 2.037\ 4 + 1.333\ 9x$	0.986 0	166.3
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	$Y = 1.690\ 7 + 1.913\ 8x$	0.968 1	53.6
苹果炭疽病菌 <i>Glomerella cingulata</i>	$Y = 0.220\ 7 + 2.652\ 6x$	0.918 8	63.3
小麦赤霉病菌 <i>Fusarium graminearum</i>	$Y = 0.838\ 7 + 2.312\ 1x$	0.917 1	63.1

表 4 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物对病菌孢子萌发的毒力测定结果

Table 4 Toxicity of ethyl acetate of fermentation broth of 2QR1 strain on spore germination of plant pathogenic			
供试病原菌 Tested fungus	毒力方程 Toxicity equation	相关系数 <i>r</i> Correlation coefficient	<i>EC</i> ₅₀ / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i>	$Y = 0.039\ 6 + 2.290\ 0x$	0.974 7	146.6
马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium solani</i>	$Y = -0.929\ 2 + 2.628\ 6x$	0.960 5	180.1
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	$Y = -0.374\ 0 + 2.507\ 2x$	0.978 3	139.1
玉米大班病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	$Y = 1.650\ 0 + 1.694\ 6x$	0.994 8	94.8

2.4 2QR1 菌株代谢产物对小麦白粉病的盆栽试验结果

从表 5 可见,2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物在 1 000 和 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,对小麦白粉病均有

不同程度的保护和治疗作用,且治疗作用优于保护作用,其中在质量浓度为 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对小麦白粉病的保护效果达到 61.9%,治疗效果也达到 81.6%。

表 5 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物对小麦白粉病的盆栽试验结果

Table 5 Control effect of Ethyl acetate of fermentation broth of 2QR1 strain on <i>Blumeria guaminis</i>				
乙酸乙酯萃取物 质量浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) Ethyl acetate of fermentation broth quality concentration	病情指数 Disease index		防治效果/ % Control effect	
	保护 Protected efficacy	治疗 Therapeutic efficacy	保护 Protected efficacy	治疗 Therapeutic efficacy
1 000	49.6	31.5	22.5	48.4
2 000	24.4	11.2	61.9	81.6
CK	64.0	61.0		

2.5 2QR1 菌株初步分类鉴定结果

2.5.1 形态特征 2QR1 菌株菌丝较细,有隔,分生孢子头球形,直径 10.5 μm ,分生孢子梗直立,生自气生菌丝,孢子梗径光滑,顶囊近球形,全部表面可育,偶有小顶囊存在,仅顶部可育;产孢结构双层;分生孢子球形或近球形,壁光滑。

2.5.2 培养特征 2QR1 菌株在 PDA 培养基上 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 时,菌落直径为 22~26 mm;2 d 后产生大量产孢结构,颜色黄褐色;有大量无色或黄色的渗出液;菌落反面黄褐色,分泌大量黄褐色可溶性色素。

2QR1 菌株在查氏琼脂培养基上 25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 7 d 时,菌落直径为 20~25 mm;菌落质地絮状,厚度中等,中央稍隆起;分生孢子结构中部较密,边缘较稀;颜色为橘黄色,后变为黄褐色,中央颜色较深,分泌浅黄色可溶性色素。

根据文献[13-14]和 2QR1 菌株菌落的以上特征初步鉴定 2QR1 菌株为半知菌亚门,曲霉属(*Aspergillus*)。

2.6 2QR1 菌株发酵产物有效成分的分离结果

2.6.1 杀菌活性成分的分离结果 杀菌活性成分分离得到 10 个馏分,其对枯草芽孢杆菌的抑制作用见表 6。从表 6 可见,*A*₃~*A*₆、*A*₈ 均有杀菌活性,但以馏分 *A*₄ 的杀菌活性最强,对枯草芽孢杆菌的抑菌圈突出,且直径为 17 mm。

2.6.2 化合物 *B*₉ 对病原真菌孢子萌发的毒力测定结果 从表 7 可以看出,化合物 *B*₉ 对玉米大班病菌、烟草赤星病菌、小麦根腐病菌和马铃薯干腐病菌抑制孢子萌发的有效中质量浓度 *EC*₅₀ 值分别为 0.8,1.4,3.3 和 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。因此,初步断定 *B*₉ 为 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物部分的主要活性物质。

表 6 2QR1 菌株发酵产物各馏分对枯草芽孢杆菌的抑制作用

Table 6 Inhibition effects of fermentation products of 2QR1 strain on *Bacillus subtilis*

馏分编号 Fraction No.	抑菌圈直径/ mm Inhibition zone diameter	馏分编号 Fraction No.	抑菌圈直径/ mm Inhibition zone diameter
A ₁	-	A ₆	7(+)
A ₂	-	A ₇	-
A ₃	11.5(++)	A ₈	6.5(+)
A ₄	17(+++)	A ₉	-
A ₅	12(+++)	A ₁₀	-

表 7 化合物 B₉ 对植物病原真菌孢子萌发的毒力测定结果

Table 7 Toxicity of Ethyl acetate of compound B₉ on spore germination of plant pathogenic

供试病原菌 Tested fungus	毒力方程 Toxicity equation	相关系数 <i>r</i> Correlation coefficient	EC ₅₀ / (μg · mL ⁻¹)
烟草赤星病菌 <i>Alternaria longipes</i>	$Y = 4.927\ 1 + 0.456\ 0x$	0.906 3	1.4
马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium solani</i>	$Y = 4.558\ 7 + 0.629\ 5x$	0.978 8	5.0
小麦根腐病菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	$Y = 4.727\ 9 + 0.524\ 5x$	0.943 7	3.3
玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	$Y = 5.348\ 1 + 0.316\ 9x$	0.979 5	0.8

3 小结与讨论

本试验结果表明,2QR1 菌株发酵液的杀菌活性远高于菌丝体的杀菌活性。说明该菌株代谢产物主要集中在发酵液中,初步推测内生真菌在宿主体内生活时可能主要是通过分泌其代谢产物发挥其生物学效应的。植物内生真菌通过分泌代谢产物来抗菌,这些抗菌物质可以扩散到周围,甚至通过植物体内的运输系统运送到其他组织,这样可以扩大宿主抵抗外源侵染的范围。

本试验在离体条件下测定了 2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物对病原真菌的毒力,结果表明,2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物既能抑制菌丝生长,又能抑制孢子萌发,说明该菌株发酵液乙酸乙酯萃取物对病原真菌有抗侵染和抗扩展的作用。在测试的病原菌中,2QR1 菌株发酵液乙酸乙酯萃取物对小麦根腐病菌、苹果炭疽病菌和小麦赤霉病菌菌丝生长的抑制作用较强,而对小麦根腐病菌的孢子萌发抑制作用不明显。

本研究对 2QR1 菌株代谢产物只进行了室内杀菌活性测定,对 2QR1 菌株代谢产物在大田试验中能否防治植物病害,有待进一步研究。而且试验对 2QR1 菌株只进行了形态学方面的鉴定,未进一步观察其有性世代的产孢结构及孢子形态。因此,要确定 2QR1 菌株的准确归属地位,还应从生物学特征和分子生物学特征两方面进行更深入的研究。此外,对菌丝体及发酵液中的杀菌活性成分也需进一步研究。

[参考文献]

[1] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京:北京科

学出版社,1999.

[2] Spivey A C,Weston M,Woodhead S. Chem[J]. Soc Rev,2002, 31(1):43-59.

[3] 江苏植物研究所. 新华本草纲要[M]. 上海:上海科技出版社, 1988:295-315.

[4] Han B H, Park M K, Rvu J H, et al. Sesquiterpene aikaloids from *Euonymus japonica* [J]. Phytochemistry, 1990, 29: 2303-2307.

[5] 兰 琪,姬志勤,顾爱国,等. 苦皮藤内生真菌中杀虫杀菌活性物质的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2004,32(10):79-84.

[6] 杨春平,陈华保,顾爱国,等. 植物内生真菌次生代谢产物的多样性及潜在应用价值[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 126-132.

[7] 黄军海,刘国强,白红进,等. 13 种卫矛科植物杀虫活性研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(4): 688-692.

[8] 张启东. 30 种药用植物杀虫杀菌活性筛选及冬青卫矛杀虫活性成分研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学农药研究所, 2006.

[9] 曾松荣,徐成东,王海坤,等. 药用植物内生真菌及其宿主相同活性成分的机制初探[J]. 中草药, 2000, 31(4): 306-308.

[10] 吴文君. 植物化学保护实验指导丛书[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1990.

[11] Zhuang H R, Wu W S, Lu H S, et al. Screening test of anti microbial activities of 25 specie of pteridophytes from Fuzhou, FuJian[J]. Subtropic Plant Research Communication, 2000, 29(1):5-8.

[12] 李树正. 农药实验法——杀菌剂篇[M]. 北京:北京农业出版社, 1991:254.

[13] 慕立义,吴文君,王开运. 植物化学保护研究方法[M]. 北京:中国农业出版社,1994.

[14] 张继忠. 微生物分类学[M]. 上海:复旦大学出版社,1996.

[15] 齐祖同,孔华忠,孙曾美. 中国真菌志:曲霉属及其相关有性型(5 卷)[M]. 北京:科学出版社,1997.