

杜仲内生真菌对植物病原真菌的抑菌活性研究

李 雅^a, 宋晓斌^a, 马养民^a, 张弘弛^b, 苏印泉^a

(西北农林科技大学 a 林学院, b 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 为了研究杜仲内生真菌对植物病原真菌的抑制作用, 以苹果腐烂病菌(*Cytospora* sp.)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、玉米大斑病菌(*Helminthosporium turcicum*)和白菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae*)为供试菌种, 对49株杜仲(*Eucammia ulmoides* Oliv.)内生真菌及其次生代谢物进行了抑菌活性试验。结果表明, 有22株内生菌至少对3种测试菌有抑制作用, 9株内生菌对6种测试菌都有抑制作用; 11株内生菌的次生代谢产物至少对3种测试菌有抑制作用, 4株内生菌的次生代谢产物对6种测试菌都有抑制作用。说明从杜仲内生真菌中可以选择出对植物病原真菌具有良好抑制作用的菌种。

[关键词] 杜仲; 内生真菌; 植物病原真菌; 次生代谢产物; 抑菌活性

[中图分类号] Q 939.5; S 482.2⁺ 92

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)02-0069-05

Study on antifungal activities of endophytic fungi isolated from *Eucammia ulmoides* against phytopathogenic fungi

LI Ya^a, SONG Xiao-bin^a, MA Yang-min^a, ZHANG Hong-chi^b, SU Yin-quan^a

(a College of Forestry, b College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: In order to study antifungal activities of endophytic fungi isolated from *Eucammia ulmoides* against phytopathogenic fungi, the antifungal activities of 49 strains endophytic fungi, isolated from *Eucammia ulmoides* and their secondary metabolites against *Cytospora* sp., *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Helminthosporium turcicum* Pass and *Alternaria brassicae* Sacc were tested. Results showed that at least 22 strains presented antifungal activities to three of the tested fungi, 9 strains to all tested fungi; and the second metabolites of 11 strains at least presented antifungal activities to three of the tested fungi, 4 strains to all tested fungi. It showed that endophytic fungi with good antifungal activities to tested fungi could be isolated from *Eucammia ulmoides*.

Key words: *Eucammia ulmoides*; endophytic fungi; phytopathogenic fungi; secondary metabolites; antifungal activity

植物病害是引起植物品质下降、产量损失的主要原因之一, 而约80%的植物病害是由植物病原真菌引起的。目前, 对植物病害的主要防治手段是采用化学农药杀菌, 而化学农药对人畜的副作用、残留问题及环境污染问题, 已成为当今世界急需解决的主要问题。越来越多抗药性病原菌的出现, 也加速了某

些与环境相容性好、药效持久、无公害的生物型农药的开发^[1-5]。

植物内生真菌是生长于植物根、茎、叶等组织的细胞间隙或细胞内的一类真菌, 是植物微生态系统中的重要组成成分。植物内生真菌中广泛分布着抗菌活性菌株, 其在进化过程中形成了丰富的代谢系

° [收稿日期] 2006-06-15

[基金项目] 国家“十五”科技攻关项目(2001BA502B0403); 中日(NEDO)合作项目

[作者简介] 李 雅(1980-), 女, 陕西宝鸡人, 在读硕士, 主要从事植物资源开发利用研究。

[通讯作者] 苏印泉(1954-), 男, 陕西白水人, 教授, 主要从事植物资源开发利用研究。

统,能产生众多的抗菌产物,并在一定条件下成为植物病原菌的拮抗菌却不会引起宿主植物明显的病症。自然界约有25万种植物,于是便形成了一个巨大的真菌资源库。因此,植物内生真菌是一类很有潜力的生物防治材料^[6]。

杜仲(*Eucammia ulmoides* Oliv)是我国特有的经济树种,是仅存于我国的第三纪孑遗植物,其起源古老,且为单属、单种,是国家二类保护植物。药理及临床研究证实,其次生代谢产物如绿原酸、桃叶珊瑚甙、京尼平甙等具有抗菌、抗肿瘤等药理活性^[7]。本试验仅对杜仲内生真菌的分离及其活性进行研究,以期为进一步研究杜仲内生真菌代谢产物的化学成分奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分离所用植物材料 杜仲根、茎、叶,于2003年秋季采自西北农林科技大学林学院苗圃。

1.1.2 供试植物病原真菌 苹果腐烂病菌(*Cytospora* sp.)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、玉米大斑病菌(*Helminthosporium turcicum*)和白菜黑斑病菌(*Alternaria brassicae*),均由西北农林科技大学资源环境学院微生物实验室提供。

1.1.3 培养基 内生真菌分离培养基为WA-抗生素培养基(琼脂20 g,氨苄青霉素200 mg,链霉素200 mg,水1 000 mL),纯化及测试菌培养基为PDA培养基(马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂20 g,水1 000 mL);发酵培养基为察氏培养基(蔗糖30 g,NaNO₃2 g,KCl 0.5 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,FeSO₄ 0.01 g,K₂HPO₄ 1 g,水1 000 mL)。

1.2 方法

1.2.1 杜仲内生真菌的分离与纯化 刮去杜仲根、茎表皮后,剥下根皮和茎皮,用无菌水冲洗干净,剪成0.5 cm×0.5 cm的小块,叶片也经无菌水冲洗后剪成0.5 cm×0.5 cm的小块。以上材料按下列程序在超净台内进行表面消毒:无菌水冲洗→体积分数75%酒精漂洗3~5 min→无菌水冲洗3~4次→1 g/L升汞漂洗5 min→无菌水冲洗4~5次。表面消毒后分别置于已倒好的WA-抗生素平板培养基上,放置于28℃培养3~7 d,待皿中材料切口处长出菌丝(菌落)后,取切口处菌丝,经纯化后转接至PDA培

养基上培养,并对菌株编号保存。

1.2.2 杜仲内生真菌次生代谢产物的提取 无菌操作取内生菌株0.5 cm的菌饼,接于察氏液体培养基1 000 mL锥形瓶中,于28℃、130 r/min摇床培养10 d,过滤,用乙酸乙酯萃取。萃取液减压浓缩得浸膏(乙酸乙酯相),称重。

1.2.3 杜仲内生真菌抑菌活性测试 抑菌活性测试分别采用菌饼法(活菌活性测定)和纸片扩散法(代谢产物活性测定)^[8]。

菌饼法:用直径0.5 cm的打孔器在生长10 d左右的内生菌菌落边缘制备菌饼,然后将菌饼置于含测试菌的培养基上,每株真菌对每种测试菌分别作3个重复,用未接种的PDA培养基作空白对照。制备好的培养皿于28℃恒温培养2~4 d后观察,测抑菌圈直径(Φ)。

纸片扩散法:将各内生真菌代谢产物的浸膏配成20 mg/mL的丙酮溶液,然后提前4 h将滤纸片(Φ=0.5 cm)浸泡于其中,使其充分吸收,略微风干后,平放于含有测试菌的培养基上,各内生真菌对每种测试菌分别作3个重复,用纯丙酮作空白对照。将制备好的培养皿于28℃恒温培养2~4 d后观察,测抑菌圈直径(Φ)。

2 结果与分析

2.1 杜仲内生真菌对6种测试菌的抑制作用

由表1可以看出,49株杜仲内生真菌中,至少对3种测试菌有抑制作用的有22株,约占总数的45%;对6种测试菌都有抑制作用的有9株,约占总数的18%。其中对苹果腐烂病菌有抑制作用的有22株,约占总数的45%;对番茄灰霉病菌有抑制作用的有19株,约占总数的39%;对西瓜枯萎病菌有抑制作用的有13株,约占总数的27%;对黄瓜枯萎病菌有抑制作用的有14株,约占总数的29%;对白菜黑斑病菌和玉米大斑病菌有抑制作用的各有29株,约占总数的59%。

由此可见,杜仲内生真菌对白菜黑斑病菌和玉米大斑病菌抑制作用最强,对西瓜枯萎病菌抑制作用最弱。

2.2 杜仲内生真菌次生代谢产物对6种测试菌的抑制作用

表2显示,在所选49株杜仲内生真菌的次生代谢产物中,至少对3种测试菌有抑制作用的有11株,约占总数的22%;对6种测试菌都有抑制作用的有4株,约占总数的8%。其中9株对苹果腐烂病菌有抑

制作用, 约占总数的 18%; 13 株对番茄灰霉病菌有抑制作用, 约占总数的 27%; 12 株对西瓜枯萎病菌和黄瓜枯萎病菌有抑制作用, 约占总数的 24%; 4 株对白菜黑斑病菌有抑制作用, 约占总数的 8%; 5 株对玉米大斑病菌有抑制作用, 约占总数的 10%。

表 1 杜仲内生真菌对 6 种测试菌的抑菌活性

Table 1 Antifungal activities of endophytic fungi isolated from *E. ulmoides* to the tested fungi

菌株编号 FungiNo.	苹果腐烂病菌 <i>C. sp.</i>	番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	白菜黑斑病菌 <i>A. brassicae</i>	玉米大斑病菌 <i>H. perium</i> <i>turcicum</i>
DR103	-	-	-	-	-	-
DR11. 1A 1	++	++	-	++	++	++
DR201	++	++	-	-	-	-
DR061	-	-	-	-	++	++
DR062	-	++	+++	+++	+++	+++
DR063	+	+	+	+	++	+
DR101	++	-	-	-	+++	+++
DR2L 22	+	++	-	-	+	+
DR202	++	++++	-	-	+	+
DR02	-	-	-	-	+++	+++
DR03	-	++	+++	+++	+++	++
DR2	++	++	+++	+++	++	++
DR06	-	-	-	-	-	-
DR102	-	-	-	-	++	++
DRL 22	+++	-	++	++	++	++
DR311	++	++	-	-	+	+
DS01	++	-	-	-	-	-
DS02	-	-	-	-	-	-
DS03	++	++	+	+	+	+
DS04	-	-	-	-	-	-
DS05	-	-	-	-	++	+
DS06	-	-	-	-	+++	++++
DS07	-	-	-	-	-	-
DS08	++	++	++	+++	+++	+++
DS09	-	-	-	-	-	-
DS101	-	++	+++	+++	+++	+++
DS102	-	-	-	-	-	-
DS103	-	-	-	-	-	-
DS201	-	++	-	-	+++	+++
DS21	-	-	-	-	-	-
DL 01	-	-	-	-	-	-
DL 02	-	-	-	-	-	-
DL 03	++	++	++	++	++	++
DL 04	++++	-	-	-	+++	++++
DL 05	-	-	-	-	++	++
DL 101	-	-	-	-	-	-
DL 102	++	-	-	-	-	-
DL 14	++	-	-	-	-	-
DL 2	-	-	-	-	++	++
DL 2L 32	+	+	+	+	++	++
DL 23B	++	-	-	-	++	++
DL 32	-	-	-	-	-	-
DB2	-	-	-	-	-	-
DBL 21	++	++	++	++	++	++
DB2L 33	-	-	-	-	-	-
DB3CA	+++	+	-	-	+++	++++
DZ1. 3A 1	++	+++	++	++	++	++
DZY ₁ A	+++	++	++	++	+++	+++
DZY ₁ B	-	-	-	-	-	-
CK	-	-	-	-	-	-

注(Note): —: $\Phi \leq 6\text{ mm}$; +: $6\text{ mm} < \Phi \leq 10\text{ mm}$; ++: $10\text{ mm} < \Phi \leq 16\text{ mm}$; +++: $16\text{ mm} < \Phi \leq 20\text{ mm}$; ++++: $\Phi > 20\text{ mm}$ 。下表同
(The following table is the same).

 © 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

表2 杜仲内生真菌次生代谢产物对6种测试菌的抑菌活性

Table 2 Antifungal activities of the secondary metabolites endophytic fungi isolated from *E. ulmoides* to the tested fungi

菌株编号 FungiNo.	苹果腐烂病菌 <i>C. sp.</i>	番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	西瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	黄瓜枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	白菜黑斑病菌 <i>A. brassicae</i>	玉米大斑病菌 <i>H. peridermium</i>
DR103	-	-	-	-	-	-
DR11. 1A1	+	++	+	+	++	+
DR201	-	-	-	-	-	-
DR061	-	-	-	-	-	-
DR062	-	-	-	-	-	-
DR063	-	-	-	-	-	-
DR101	-	-	-	-	-	-
DR2L 22	-	-	-	-	-	-
DR202	-	-	-	-	-	-
DR02	-	-	-	-	-	-
DR03	-	-	-	-	-	-
DR2	-	-	+	+	-	+
DR06	-	-	-	-	-	-
DR102	-	-	-	-	-	-
DRL 22	+	-	+	+	-	-
DR311	+	++	+	+	-	-
DS01	-	+	-	-	-	-
DS02	-	+	+	+	-	-
DS03	-	-	-	-	-	-
DS04	-	-	-	-	-	-
DS05	-	+	-	-	-	-
DS06	-	-	-	-	-	-
DS07	+	-	+	+	-	-
DS08	-	+	-	-	-	-
DS09	-	-	-	-	-	-
DS101	+	+	+	+	-	-
DS102	-	-	-	-	-	-
DS103	-	-	-	-	-	-
DS201	+	+	-	-	-	-
DS21	-	-	-	-	-	-
DL 01	-	-	-	-	-	-
DL 02	-	-	-	-	-	-
DL 03	-	-	-	-	-	-
DL 04	-	+	+	+	-	-
DL 05	-	-	-	-	-	-
DL 101	-	-	-	-	-	-
DL 102	-	-	-	-	-	-
DL 14	-	+	-	-	-	-
DL 2	-	-	-	-	-	-
DL 2L 32	++	++	++	++	++	+++
DL 23B	++	+	+	+	+	+
DL 32	-	-	-	-	-	-
DB2	+	++	+	+	+	+
DBL 21	-	-	+	+	-	-
DB2L 33	-	-	-	-	-	-
DB3CA	-	-	-	-	-	-
DZ1. 3A1	-	-	-	-	-	-
DZY1A	-	-	-	-	-	-
DZY1B	-	-	-	-	-	-
CK	-	-	-	-	-	-

3 讨 论

本研究结果显示, 杜仲植物体内存在丰富的内生真菌, 对测试植物病原真菌具有抑制作用的内生真菌比例较高, 对大多数供试病原菌都可以筛选到拮抗效果较好的菌株。杜仲内生真菌可以产生丰富的具有抑菌活性的次生代谢产物, 这说明从内生真菌的次生代谢产物中寻找活性物质是可行的, 这为新型活性化合物的筛选提供了新的途径。植物中的内生真菌种类繁多, 产生的次生代谢产物也很丰富, 因此从中发现高活性的新化合物的可能性很大。

综合菌饼法和纸片法的试验结果可知, 编号DR11.1A1的内生真菌活性最好, 经鉴定属于镰孢属(*Fusarium*)。镰孢属真菌是已报道过的产活性物质的真菌类群, 其抗肿瘤、杀有害昆虫、杀根结线虫等活性已有人作过相应研究^[9-10]。因此本试验下一步将对DR11.1A1的次生代谢产物进行大量发酵, 用色谱法从其代谢产物中分离出化合物, 并对分离出的化合物进行活性测定和结构鉴定, 以期能得到高活性的新化合物。但目前对内生真菌的直接利用尚存在一些问题, 其中一个问题是通过内生真菌发酵产生的次生代谢产物的产量很低。如研究得较深入的红豆杉中的内生真菌, 就由于其产紫杉醇的量太低而难以达到商业化生产水平^[11]。在提高紫杉醇产量方面, 科学家们试图从两个方面去解决问题: 一是从产紫杉醇的内生真菌中分离功能基因组, 将其转移到细菌或酵母菌中以期提高紫杉醇的含量; 另一个途径是寻找可以启动微生物中某些遗传机制促进目标产物合成的真菌调节剂。目前第二个途径已初见成效, 据报道, 加入某些真菌调节剂后, 内生

真菌产生紫杉醇的量可以提高几百倍^[12]。本研究同样也存在着发酵产物中活性成分含量太低的问题。因此, 如何大幅提高内生真菌发酵产物中活性物质的产量, 是今后需要研究解决的重要问题。

【参考文献】

- [1] 李桂玲, 王建锋, 黄耀坚, 等. 几种药用植物内生真菌抗真菌活性的初步研究[J]. 微生物学通报, 2001, 28(6): 64-68
- [2] 吴文君, 刘慧霞. 对农药的几点看法[J]. 农药, 1998, 37(9): 1-5
- [3] Liu C H, Zou W X, Tan R X. Antifungal activity of *Aspergillus annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 88(3): 277-282
- [4] Athukoralage R S, Herath H M T B, Wijesundera R L C, et al. Antifungal constituent from *Gordonia dassanayake* [J]. Fitoterapia, 2001, 72(5): 565-567.
- [5] Southcott K A, Johnson J A. Isolation of endophytes from two species of palm from Bermuda[J]. Can J Microbiol, 1997, 43: 789-792
- [6] 周 成, 邵 华, 张玲琪, 等. 植物内生真菌研究的应用潜力分析[J]. 天然产物研究与开发, 2001, 14(2): 69-73
- [7] 李 竹, 晏 媛, 李 青. 杜仲的药理活性研究进展[J]. 中国药事, 2004, 18(2): 131-142
- [8] 庄惠如, 吴文珊, 卢海声, 等. 福建福州25种蕨类植物抑菌活性筛选研究[J]. 亚热带植物通讯, 2000, 29(1): 5-8
- [9] 李海燕, 王志军, 张玲琪, 等. 一种桃儿七内生真菌的分离[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 1999, 21(3): 243
- [10] 李海燕, 刘 丽. 产生活性物质植物内生菌的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(5): 482-485
- [11] 马天有, 董兆麟. 从植物分离产紫杉醇的内生真菌的研究[J]. 西北大学学报: 自然科学版, 1999, 29(1): 47-49
- [12] 文才艺, 吴元华, 田秀玲. 植物内生菌研究进展及其存在的问题[J]. 生态学杂志, 2004, 23(2): 86-91