

银杏内生真菌的分离及其抑菌活性初探

田 小 卫 刘 鑫

(天津农学院 园艺系 天津 300384)

摘 要: 从银杏的茎和根中分离得到 32 株内生真菌, 并对其发酵液和菌丝丙酮提取物的抑菌活性进行了测定。结果表明: 筛选出 1 株对 4 种供试菌均有强烈抑菌作用的菌株, 命名为 L25 菌株, 其抑菌活性成分在 90℃以下和对紫外线稳定。

关键词: 银杏; 内生真菌; 抑菌作用

中图分类号: S 664.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)01-0182-03

植物内生真菌(Endophyte)是指寄生在健康植物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。内生真菌的存在具有普遍性和多样性。研究表明, 感染了内生真菌的宿主往往具有生长快速、抗逆境、抗病害、抗动物危害等优势, 比未感染植株更具有生存竞争力, 其原因主要在于内生真菌可在寄主体内产生丰富多样的具有生物活性的次生代谢物, 包括激素、酶、抗生素及其它杀虫抑菌物质, 这些发现使得内生真菌在生物活性物质筛选的研究领域中显示出巨大的应用潜力^[1]。

银杏(*Ginkgo biloba* L.)又名白果, 古又称鸭脚树或公孙树, 是我国特有的世界珍稀名贵树种, 是冰川运动后的子遗植物, 因此植物学家们把它看做是植物界的“活化石”。从银杏组织中提取活性成分的研究已有很多报道, 特别是对银杏叶的开发和利用。到目前为止已知其化学成分的银杏叶提取物多达 160 余种。主要有黄酮类、萜类、酚类、生物碱、聚异戊烯、奎宁酸、亚油酸、萜草酸、抗坏血酸、 α -己烯醛、白果醇、白果酮等。目前关于银杏内生真菌的研究还较少。该试验采用组织分离法, 从银杏的不同部位分离银杏的内生真菌, 并测定了其抑菌活性, 期望能寻找到产生新的农抗物质的内生真菌。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 银杏根、茎、叶分别于 2008 年 12 月与 2009 年 3 月中旬采自天津农学院东西校区和天津杨柳青广场。

1.1.2 供试病原菌 小麦赤霉病菌(*Fusarium gra-*

minearum), 马铃薯干腐病菌(*Fusarium solani*), 苹果腐烂病菌(*Glomerella cingulata*), 番茄早疫病菌(*Alternaria solani*), 以上病原菌均由天津农学院植病实验室提供。

1.1.3 培养基 改良 PDA 培养基: 取 100 g 银杏新鲜根皮和 200 g 马铃薯小块, 加蒸馏水 1 000 mL, 煮沸 25 min 后, 用 4 层纱布过滤。滤液中加入 20 g 琼脂粉、20 g 葡萄糖、加热充分溶解后加水补足 1 000 mL, 分装灭菌。液体培养基: 200 g 土豆去皮切块, 加水煮沸 30 min, 滤液加入葡萄糖 20 g 充分溶解后, 分装到三角瓶中(每瓶 150 mL 以内), 灭菌, 待用。

1.2 试验方法

1.2.1 银杏材料的表面消毒 将采集的银杏茎和根用流水冲洗, 除去表面附着泥沙, 室内晾干, 然后把茎和根切成小段, 将其韧皮部和木质部分离, 将样品置于超净工作台上, 在 75%酒精中浸泡 5 min, 用无菌水冲洗 4 次, 再用 0.1%的升汞漂洗 20 s, 最后以无菌水冲洗 5 次, 接于改良的 PDA 平板上。消毒检验——印痕处理: 为检查表面消毒是否彻底, 设对照试验。将上述同样条件下处理过的材料在 PDA 平皿滚动, 充分接触, 置于培养箱中培养, 看皿内是否有菌生长, 检验消毒是否彻底^[2]。

1.2.2 内生真菌的分离与纯化 将消毒后的银杏叶片、茎和根在无菌条件下切成 0.5 mm 小片, 定植于改良的 PDA 培养基上, 每皿 4~6 块, 在 25℃恒温培养。待样品边缘有菌落长出时, 按照菌落的外部特征(包括菌落颜色、表面特征、质地、是否产色素等)将其分为不同的菌株, 同时给其编号, 接种到斜面, 冰箱保存待用^[3]。

1.2.3 内生真菌的液体摇瓶发酵 在无菌条件下, 用接种针挑取少量菌落接于液体培养基中, 封口, 置于振荡器内, 在 180 rpm、25℃培养 7 d, 发酵终止后用滤纸过滤发酵产物, 分为菌丝体和发酵液, 作以下处理^[4]。发酵液: 6 000 rpm, 离心 5 min, 弃去沉淀, 取上清液备用。菌丝体: 湿菌丝自然挥发干, 捣碎, 放入小三角瓶中, 加入丙酮 30 mL, 静置提取 1 d, 然后采用超声波提取 20 min,

第一作者简介: 田小卫(1976-), 男, 陕西西安人, 讲师, 现主要从事植物化学保护的教学和研究工作。E-mail: tianxiaowei@tjau.edu.cn.

基金项目: 天津农学院科学研究发展基金资助项目(2006008)。

收稿日期: 2009-08-20

得到菌丝体丙酮粗提物。

1.2.4 发酵产物抑菌活性测定 生长速率法: 在无菌条件下, 取内生真菌发酵上清液或丙酮提取物和培养基的比例为 1 :9 的进行混合, 倒入无菌培养皿中, 分别接入供试病原菌菌饼, 以无菌水作为对照, 每处理重复 3 次, 置于 25℃培养箱内培养 72 h, 计算抑制率^[5]。

1.2.5 发酵产物稳定性 分别测定发酵液热稳定性(70、80、90、110、121℃处理 30 min)和紫外照射稳定性^[9]。

1.2.6 盆栽试验 保护作用的测定: 先在盆栽作物上喷洒发酵液, 在保湿条件下 24 h 后接种番茄灰霉病原菌。每个处理 4 次重复, 每重复为 1 盆, 以清水为对照。7 d 后按照番茄灰霉病的分级标准进行病情调查。治疗作用的测定: 先在保湿条件下接种番茄灰霉病菌, 24 h 后在植株上喷施放线菌株发酵液。每个处理 4 次重复, 每重复为 1 盆, 以清水为对照。7 d 后按番茄灰霉病的分级标准进行病情调查。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的分离数量

不同银杏组织中内生真菌的数量有所不同。该次试验中, 总共分离得到 32 株银杏内生真菌, 其中从茎的韧皮部中分离出 20 株内生真菌, 从根的韧皮部中分离出 12 株内生真菌, 而木质部和叶子未分离到内生菌。同时在不同季节, 内生真菌的数量也有所不同, 冬季共分离得到 11 株真菌, 而春季得到 21 株真菌。由此可以得出, 内生真菌的数量与银杏树生长历期和部位有关, 组织营养丰富, 树体代谢旺盛, 内生真菌种类就多。

表 2		不同温度处理后发酵液对病原菌的抑制率					%
指示菌	70℃	80℃	90℃	110℃	121℃	未处理	
小麦赤霉病菌	51.3	56.1	43.5	12.1	0	47.0	
苹果腐烂病菌	78.6	80.0	82.9	37.1	0	77.2	
马铃薯干腐病菌	97.0	91.4	90.0	80.5	3.3	96.6	
番茄早疫病菌	85.5	82.9	84.7	56.2	0	85.8	

2.4.2 紫外线照射稳定性 发酵液经过紫外线照射后, 对 4 种供试病原菌的抑制效果影响不显著。

表 3 L25 菌株发酵液对番茄叶霉病的盆栽试验		番茄叶霉病			
发酵液稀 释倍数	保护作用/ %		治疗作用/ %		
原液	24.4	61.8	27.7	56.7	
2×	31.5	50.7	37.4	41.6	
4×	49.6	22.5	48.7	23.9	
CK	64.0		64.0		

2.5 盆栽试验结果

从表 3 中看出, L25 菌株发酵原液对番茄叶霉病均具有一定的保护和治疗作用, 分别为 61.8%和 56.7%。但随着稀释倍数的增大, 防治作用迅速下降, 在发酵液

2.2 抑菌活性测定

对 32 株银杏内生真菌进行液体摇瓶发酵, 用发酵液和菌丝丙酮提取物分别对小麦赤霉病菌、马铃薯干腐病菌、苹果腐烂病菌、番茄早疫病菌 4 种植物病原真菌进行抑菌试验, 其中有 8 株菌株的发酵液或菌丝丙酮提取物对 4 种供试菌中至少 1 种的抑制率在 70%以上。说明, 银杏存在丰富的具有抑菌活性的内生真菌菌株。其中, L25 菌株发酵液对 4 种供试菌的抑制率都达到 70%以上, 可以得出 L25 菌株能够产生较为广谱的抗菌物质。

2.3 L25 菌株的毒力测定

为了进一步验证 L25 这株菌的抑菌活性, 其发酵液对 4 种病原真菌进行毒力测定(表 1)。由表 1 可以看出, L25 对所测的 4 种病原菌均具有一定的毒力。对马铃薯干腐病菌的毒力最强, 其 EC₅₀ 仅为 37.4 μL/mL, 而对小麦赤霉病菌的毒力最差, 其 EC₅₀ 为 125.2 μL/mL。

2.4 L25 菌株发酵液的稳定性

2.4.1 热稳定性 从表 2 看出, 发酵液经过 90℃以下不同温度处理后, 对 L25 菌株发酵液的抑菌效果的影响不明显, 但经过 110、121℃处理后, 抗菌物质活性下降较快。说明发酵液中的抗菌物质在 90℃以下具有较好的热稳定性。

表 1 L25 发酵液对 4 种病原菌的毒力测定			
菌株	回归方程	相关系数	EC ₅₀ /μL · mL ⁻¹
苹果腐烂病菌	Y=5.7054+0.5343X	0.9618	47.8
马铃薯干腐病菌	Y=6.0718+0.7508X	0.9870	37.4
小麦赤霉病菌	Y=6.1919+1.3209X	0.9939	125.2
番茄早疫病菌	Y=5.4046+0.3576X	0.9921	73.9
番茄早疫病菌	Y=5.4046+0.3576X	0.9921	73.9

稀释 4 倍的条件下, 对番茄叶霉病的保护和治疗作用仅有 22.5%和 23.9%。

3 讨论

试验对银杏体内的内生真菌进行了分离。分离结果为, 银杏树体内含有丰富的内生真菌, 内生真菌主要分布在银杏的根和茎的韧皮部, 木质部和叶片中内生菌很少, 这可能和韧皮部质地疏松、营养丰富有关。另外, 内生真菌的数量和季节也有一定关系, 春季较多而冬季较少。

试验从银杏中分离得到 32 株内生真菌, 通过生物测定, 筛选到 1 株能够产生广谱抗菌活性物质的内生真菌。离体条件下, 其对 4 种供试病原菌均有较好的抑菌活性, 活体条件下对番茄叶霉病也有较好的保护和治疗

吉林李子主要病虫害及防治措施

尚海庆

(吉林农业科技学院 植物科学系, 吉林 吉林 132101)

中图分类号:S 436.629(234) 文献标识码:B 文章编号:1001-0009(2010)01-0184-02

李子属于蔷薇科李属, 自古被列为“五果”之首, 据说李子含有蛋白质、脂肪、碳水化合物、钙、磷、铁、胡萝卜素以及多种氨基酸等营养成分。李子除鲜食外还可制干果、蜜饯、罐头等, 解渴和提神的功能尤其明显。在吉林核果类栽培中, 占有十分重要的地位, 栽培面积较大, 品种主要有吉盛、吉丰、一号、九台晚、黄干核、杏梅(大李梅)等, 但在生产中管理不当, 病虫害发生十分普遍、危害严重, 轻者影响树体发育, 重者造成树体衰弱、寿命缩短、甚至死亡, 影响了果实的品质、产量和经济效益。主要的害虫有李小食心虫、红颈天牛、蚜虫和红蜘蛛、金龟子及其它食叶害虫等, 主要的病害有流胶病、红点病、细菌性穿孔病、和根腐病等。因此, 适时有效地加

强病虫害的防治和提高田间管理水平, 成为李树生产上非常重要的技术问题。

1 虫害的防治

1.1 李小食心虫

该虫是危害李树果实最严重的害虫, 被害果实内呈“豆沙馅”状, 并在虫孔处流出果胶, 果实提早变红脱落, 严重影响果实品质和产量。虫果率在不防治情况下可达100%, 虫果率与损失率几乎等同。防治上在吉林农户主要采取地上部和地面防治相结合的方法进行。以地上部为主, 每年在6月15日至7月15日, 每15 d打1次药, 一般3次。药剂主要是菊酯类与氧化乐果混合, 如2.5%敌杀死 EC与40%氧化乐果 EC、2.5%功夫 EC和40%氧化乐果、20%灭扫利和40%氧化乐果 EC, 按2000倍液喷洒。树上于落花末期(95%落花)果实绿豆粒大小时喷施40%氧化乐果乳剂1000倍液。也可兼防其它食叶害虫和吸汁害虫。也有农民在上年秋天剥玉米时

作者简介: 尚海庆(1963-), 男, 吉林省永吉县人, 硕士, 副教授, 研究方向为植物保护。E-mail: jlsqh63@163.com.

收稿日期: 2009-09-20

作用。这种活性物质对温度和紫外线不敏感, 因此有必要对该菌株进行菌种鉴定和活性物质的提取分离, 以期找到新的抗菌活性物质。

参考文献

- [1] 杨润亚, 冯培勇, 李清. 植物内生真菌农药活性的研究进展[J]. 农药, 2006, 45(7): 440-443.
- [2] 邹小明, 肖春玲, 陈丹萍, 等. 青霉属银杏内生菌的筛选及鉴定[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(20): 5255-5264.
- [3] 黄小丹, 李素春, 于新. 银杏采后真菌病害的初步研究[J]. 仲恺农业

技术学院学报, 1998, 11(2): 50-55.

[4] 严铸云, 罗静, 汪杨丽, 等. 银杏内生真菌菌种的分离及鉴定[J]. 华西药杂志, 2006, 21(5): 425-427.

[5] 侯慧. 防治植物病害的农用抗生素的研究与应用[J]. 河南农业科学, 2003, 11: 28-31.

[6] 柯野, 陈喆, 马建波, 等. 辣木内生真菌的分离及其抗菌活性物质的初步研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2006, 32(5): 521-523.

[7] 郭新建, 孙广宇. 银杏内生真菌抗真菌活性菌株的分离及鉴定[J]. 西北农业学报, 2005, 14(4): 14-17.

The Study of Isolation on *Gingko bioba* L. Endophyte and Its Antifungal Action

TIAN Xiao wei, LIU Xin

(Horticulture College, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384)

Abstract: 32 strains endophytes had been isolated from stems and roots of *Gingko bioba* L. The antifungal action of their fermentation liquor and acetone extracts of mycelium had been tested. The results showed that the fermentation liguor of one strain endophyte, named as L25, had intense inhibition against four pathogens. The active component was thermo-stable below 80 °C and not sensitivity to ultraviolet radiation.

Key words: *Gingko bioba* L.; endophyte; antifungal action