

文章编号 :1003-8701(2014)02-0065-03

# 抗稻瘟病内生真菌 DW22 次级代谢产物醇提取方法的研究

陈 珣,杨 镇,肖 军,丑 静,龚 娜,  
王 娜,王 红,肇 莹,杨 涛\*

(辽宁省农业科学院微生物工程中心,沈阳 110161)

**摘要:**从辽宁省西北地区根系土壤中分离得到 DW22 号内生真菌,液体培养后,分别用 20%、40%、60%、80%、100%乙醇提取其次级代谢产物,依次编号为 22-1、22-2、22-3、22-4、22-5。进行抗稻瘟病菌的抑制活性检测和方差及差异显著性分析。结果表明:20%乙醇提取 DW22 号内生真菌次级代谢产物对抑制稻瘟病菌有较好的效果。

**关键词:**内生真菌;次级代谢产物;醇提取方法;稻瘟病;抑制活性检测

中图分类号:S435.111.4+2

文献标识码:A

## Studies on Alcohol Extraction Method of Secondary Metabolites from Rice Blast Resistant Endophytic Fungi DW22

CHEN Xun, YANG Zhen, XIAO Jun, CHOU Jing, GONG Na,  
WANG Na, WANG Hong, ZHAO Ying, YANG Tao\*

(Research Center of Microbial Engineering, Liaoning Academy of Agricultural Sciences,  
Shenyang 110161, China)

**Abstract:** Secondary metabolites from DW22, an endophytic fungus isolated from root-zone soil collected in Northwest of Liaoning, were extracted with 20%, 40%, 60%, 80% and 100% ethanol, respectively. The ethanol extracts were numbered with 22-1, 22-2, 22-3, 22-4 and 22-5 in order. Inhibitory activities to *Magnaporthe grisea* were detected, and the variances and significant differences were analyzed. The results showed that 20% ethanol extract of secondary metabolites from DW22 endophytic fungus had better inhibiting effect to *Magnaporthe grisea*.

**Keywords:** Endophytic fungus; Secondary metabolites; Alcohol extraction method; Rice blast; Inhibitory activity detection

植物内生真菌(plant endophytic fungi)是一种新型的微生物资源,研究表明内生真菌通常会产生与其宿主植物相同或相似的生理活性物质<sup>[1]</sup>。在 Stierle 等研究成果的引领下,人们发现内生真菌的次级代谢产物可能是抑菌活性物质的重要来源<sup>[2]</sup>。

因此,内生真菌次级代谢产物生物活性的研究已成为微生物资源开发的一个热点<sup>[3]</sup>。但由于内生真菌次级代谢产物量低,就有必要对其提取方法进行深入细致的研究。

稻瘟病作为水稻的主要病害之一,可引起大幅度减产。流行年份,一般减产 10%~20%,重的可达 40%~50%,局部田块甚至颗粒无收<sup>[4]</sup>。本试验主要以水稻稻瘟病菌为靶标,对从辽宁西北地区采集的根系土壤中分离得到一株内生真菌 DW22 的次级代谢产物的醇提方法进行研究,旨在找到效果最好的提取方法,从而为寻找抗稻瘟

收稿日期:2013-08-28

基金项目:辽宁省科技攻关项目(2011215005);“百千万人才工程”入选项目择优资助项目(2012921065)

作者简介:陈珣(1979-),女,硕士,助理研究员,从事植物内生菌方面的研究。

通讯作者:杨涛,男,研究员,E-mail:smkxzx@sina.com

病的新型抑菌物质打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品来源

内生真菌 DW22 由本实验室从辽宁西北地区采集的根系土壤中分离并保存。

#### 1.1.2 供试培养基

内生真菌固体培养采用 PDA 培养基 ;内生真菌液体培养采用 PA 培养基。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 内生真菌的分离纯化

参照马晓颖等方法进行内生真菌的分离纯化<sup>[5]</sup>。

#### 1.2.2 内生真菌代谢产物的制备

将活化的内生真菌菌种接种于装有 10 mL PA 培养基的小三角瓶中 ,置于 28℃、200 r·min<sup>-1</sup> 的摇床培养 6d 取出 ,抽提菌丝体代谢物 ,将菌丝体代谢物中分别加入等体积的 20%乙醇、40%乙醇、60%乙醇、80%乙醇、100%乙醇 ,浸提 24h ,过滤 ,滤液保存 ,依次编号为 22-1、22-2、22-3、22-4、22-5。

#### 1.2.3 抑菌活性检测

将内生菌代谢产物制备液与熔融的 PDA 培养基混合 ,制成终浓度 50 ng/mL 的带菌平板 ,以加等体积无菌水的 PDA 培养基为空白对照。待平板冷凝后在平板中央接种水稻稻瘟病菌 ,菌饼

Φ=6 mm。然后将平板倒置于 25℃培养箱内培养。待对照平板中水稻稻瘟病菌菌落长满平板时 ,记录各处理病原菌菌落直径大小。每处理重复 3 次。抑制率计算公式如下 :

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - 5} \times 100\%^{[6]}$$

### 1.3 分析方法

试验数据采用 DPS 统计软件 ,以 Duncan 法检验差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 稻瘟病抑菌活性检测

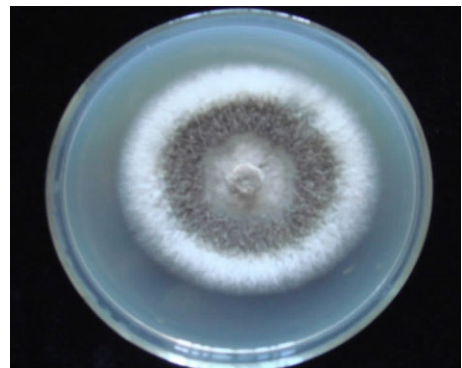
对 DW22 进行稻瘟病菌抑菌活性检测 ,菌落直径大小和抑制率见表 1。从表 1 可以发现 ,22-1 处理的抑菌圈直径明显小于对照 ,而且抑制率达到了 31.52% ,明显高于其他处理。从图 1 也明显看出 22-1 处理的效果好于对照 ,这说明经过 20%乙醇提取的 DW22 的次级代谢产物对稻瘟病菌有明显的抑制效果。

表 1 DW22 抑菌活性检测结果

处理	菌落直径 (cm)	抑制率(%)
CK	8.1	
22-1	7.1	31.52
22-2	8.1	
22-3	7.8	1.08
22-4	7.5	16.48
22-5	7.5	



CK



22-1

图 1 对照与 22-1 的抑菌活性检测结果

### 2.2 方差及差异显著性分析

方差分析中 ,显著水平 P 值是推断试验处理间差异程度的指标。一般来说 ,只有当方差分析表中的显著水平  $P \leq 0.05$  时才能进一步做多重比较分析。多重比较可进一步检验各个处理两两之间的差异。多重比较中 ,各个处理凡后面具有相同字母者 ,表示它们之间的差异不显著 ;只有当某两个

处理后面具有完全不同的字母时 ,它们之间才有显著差异。方差分析表(表 2)中处理间  $P < 0.05$  ,同时  $P < 0.01$  ,说明各个处理间存在差异 ,可以进行差异显著性分析。差异显著性分析表(表 3)可以发现 ,22-1 处理和对照在 5%水平达到了显著差异 ,在 1%水平达到了极显著差异。这说明经过 20%乙醇提取的 DW22 的次级代谢产物对稻瘟病菌抑

表 2 方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	p 值
区组间	0.141 1	2	0.070 6	1.896 0	0.200 5
处理间	2.324 4	5	0.464 9	12.490 0	0.000 5
误差	0.372 2	10	0.037 2	—	—
总变异	2.837 8	17	—	—	—

制效果显著。

表 3 差异显著性分析表

处理	均值	5%显著水平	1%极显著水平
CK	8.066 7	a	A
22-2	8.066 7	a	A
22-3	8.033 3	a	A
22-5	7.933 3	a	A
22-4	7.533 3	b	AB
22-1	7.100 0	c	B

### 3 结论与讨论

内生真菌是微生物生物多样性的一个重要组成部分<sup>[7]</sup>。近年来的一些研究表明有些内生真菌次生代谢产物是生物毒素的主要来源,可以用于杀虫、杀菌,而对环境和人畜无害,为研制环保型杀虫药剂提供了理想的原料。因此,更多的内生真菌次生代谢产物成为人们研究的对象。但由于内生真菌次生代谢产物含量较低,并且有些内生真菌次生代谢产物存在生物活性,这就对次生代谢产物的提取提出了新的要求。快速高效、简便易行的提取工艺对内生真菌次生代谢产物的应用具有重要意义<sup>[8]</sup>。

稻瘟病是世界性的重要稻病,在我国同纹枯病、白叶枯病被列为水稻三大病害。该病对水稻生产威胁极大,常造成惨重损失,甚至颗粒无收。本试验以水稻稻瘟病病菌为靶标,对内生真菌 DW22 的次级代谢产物的醇提取方法进行研究,以寻求效果最好的提取方法,为稻瘟病病害的防治提供新的微生物资源。

抑菌活性试验检测了内生真菌次生代谢产物对稻瘟病菌的抵抗能力。本试验中经过 20%乙醇

提取的 DW22 的次级代谢产物对稻瘟病菌的抑制率达到了 31.52%,在所有处理中抑制率最高,这说明 20%乙醇提取的 DW22 的次级代谢产物对稻瘟病菌有明显的抑制效果。

方差分析是数理统计学中常用的数据处理方法之一,是农业生产和科学研究中分析试验数据的一种有效的工具,因而其应用比较广泛<sup>[9]</sup>。本试验中经过 20%乙醇提取的 DW22 的次级代谢产物和对照在 5%水平达到了显著差异,在 1%水平达到了极显著差异,这说明经过 20%乙醇提取的 DW22 的次级代谢产物对稻瘟病菌抑制效果显著。

参考文献:

- [1] 申屠旭萍,陈列忠,俞晓平,等.银杏内生真菌 No. 1028 代谢产物的抗真菌活性及其培养生物学特性[J].植物保护学报,2007,2(4):147-152.
- [2] 臧威,何旭,孙剑秋,等.桦木内生真菌的分离与代谢产物的抑菌活性[J].生态环境学报,2012,21(4):661-665.
- [3] 邓祖军,曹理想,周世宁.红树林内生真菌的分离及代谢产物生物活性的初步研究[J].中山大学学报(自然科学版),2010,2(3):100-104.
- [4] 李静波,柏连阳,任新国,等.诱抗剂及诱导对水稻稻瘟病抗性的机理研究进展[J].中国植保导刊,2008,28(1):15-18.
- [5] 马晓颖,高颖,贾东贝,等.1株 *Alternaria sp.* 真菌菌丝提取物对玉米种子发芽促进作用的研究[J].微生物学杂志,2010,31(3):39-42.
- [6] 王伟,翟梅枝,徐文涛,等.核桃内生菌研究 - 核桃内生菌的分离及代谢产物活性研究[J].西北农林学报,2008,17(1):77-81.
- [7] 陆伟东,田雪莲,卯霞,等.大叶黄杨内生真菌的分离及抑菌活性研究[J].安徽农业科学,2011,39(35):21704-21705,21799.
- [8] 金鑫,吕长利,孙守慧,等.林木次生代谢产物提取方法的研究进展[J].中国森林病虫,2008,27(1):31-34.
- [9] 徐文君,李红智,冀德刚,等.方差分析及多重比较在增肥试验中的应用[J].畜牧与饲料科学,2010,31(4):1,2-5.