

放线菌 Lj20 抗真菌物质的分离及其在病害防治中的作用

陈红兵¹ 马 林² 韩巨才^{3*} 曹 挥³

(1. 山西农业大学文理学院, 太谷 030801; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 南京 210014; 3. 山西农业大学农学院, 太谷 030801)

摘要: 菌株 Lj20 是从健康辣椒植株分离得到的一株有抗真菌活性的植物内生放线菌, 为了进一步明确其生物防治潜力, 利用大孔吸附树脂、离心薄层层析以及柱层析等技术对 Lj20 代谢产物中的抗真菌活性物质进行了分离和提纯, 并采用生长速率法测定了其代谢产物对黄瓜灰霉病菌的抑制作用, 同时在温室中对 Lj20 发酵液粗提物的防病效果进行了试验。从 Lj20 代谢产物中分离得到一个抗真菌活性物质, 该化合物对黄瓜灰霉病菌具有较强抑制作用, EC_{50} 值为 174.94 mg/L; 500 mg/L Lj20 发酵液粗提物对黄瓜灰霉病的防治效果达 62.5%; 经鉴定其化合物结构为 3,5-二叔基-4-羟基-苄基甲醚。结果表明, 放线菌 Lj20 有进一步开发和利用的价值。

关键词: 植物内生放线菌 Lj20 抗真菌物质; 灰霉病; 病害防治

Isolating of an antifungal activity substance from endophytic actinomycete Lj20 and the role in disease control

Chen Hongbing¹ Ma Lin² Han Jucai^{3*} Cao Hui³

(1. College of Arts & Sciences, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, Jiangsu Province, China; 3. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

Abstract Endophytic actinomycete Lj20 with antifungal activity was isolated from healthy capsicum plants. In order to determine its potential application in biological control, the antifungal activity substance was separated and purified from metabolites of Lj20 by the means of macroporous absorbing resin, centrifugal thin layer chromatography and column chromatography. The inhibitory efficacy of Lj20 metabolites on *Botrytis cinerea* Pers was also studied by means of the inhibition rate of mycelium growth *in vitro* and the control efficacy in the greenhouse. The results showed that the structure of a compound isolated from the Lj20 metabolites was identified as 3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl methyl ether by analysis of IR (infrared spectroscopy) and ¹H-NMR (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy) spectroscopic data. This compound indicated the inhibition efficacy on *B. cinerea* *in vitro* with the EC_{50} was 174.94 mg/L. In addition, the control efficacy of crude extracts from Lj20 fermentation on *B. cinerea* reached 62.5% at the concentration of 500 mg/L in the greenhouse experiments, indicating that this endophytic actinomycete Lj20 had a potential value for further exploitation and utilization.

Key words endophytic actinomycete Lj20 antifungal substance; *Botrytis cinerea*; disease control

基金项目: 山西省科技攻关项目 (20100311038, 2007031039); 山西省留学基金项目 (2009043)

作者简介: 陈红兵, 男, 1972 年生, 副教授, 研究方向为有机化学与生物源农药, email: ndchb@126.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: sxndhj@yahoo.com.cn; Tel: 0354-6288351

收稿日期: 2010-04-03

化学防治是控制植物病害的有效途径,但存在病原菌抗药性、环境与食品安全、药害等许多实际问题,一些化学杀菌剂在许多发达国家和地区已严格限制使用^[1-2]。而与环境友好的生物农药越来越受到重视,并已广泛使用,成为农业可持续发展的重要组成部分^[3]。源于微生物次生代谢产物的农用抗生素因具有环境兼容性好、高效、无残留、易分解等优点已倍受青睐^[4]。然而,目前我国已获得农药登记的农用抗生素仅 10 余种,远远不能满足农业生产的需要^[5-6]。

植物内生菌分布广泛、生防性能好,已成为植物病害生物防治的重要来源^[7-9]。放线菌是微生物中的重要类群,种类多、代谢功能各异,可产生多种有益的代谢产物^[10-12],从微生物中发现的大约 8000 种生物活性物质中近 70% 是由放线菌产生的,其生防潜力已成为人们关注的焦点^[13-15]。目前,对黄瓜灰霉病菌 *Botrytis cinerea* Pers 具有拮抗作用的放线菌的分离筛选研究已有一些报道,如汪倬等^[16]采用平板对峙培养,筛选出对黄瓜灰霉病菌具有一定拮抗作用的放线菌菌株;张武岗等^[17]研究表明,放线菌 19G-317 菌株发酵产物对供试 22 种植物病原菌菌丝生长均有不同程度的抑制作用。

邢鲲等^[18]从辣椒根茎结合部位分离得到内生放线菌 Lj20,马林等^[19-20]鉴定该菌株为娄彻氏链霉菌 *Streptomyces rochei* 并用气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 检测其代谢产物中的抗真菌活性成分,结果表明,放线菌 Lj20 的代谢产物中含有多种抗真菌活性物质,但其活性组分尚未见报道。为此,本试验从 Lj20 发酵液中进一步分离纯化得到单一活性组分,并对其进行了抑菌活性测定和化学结构分析,同时在温室中进行了 Lj20 发酵液粗提物对黄瓜灰霉病的防病效果试验。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:植物内生放线菌 Lj20 和黄瓜灰霉病菌 *B. cinerea*,均由山西农业大学植物病理实验室提供。

供试植物:黄瓜津杂 2 号,天津市蔬菜黄瓜研究所提供。

供试药剂:70% 嘧霉胺 (pyrimethanil) 水分散粒剂,山东东泰农化有限公司;2% 多抗霉素 (polyoxin)

可湿性粉剂,农德利生物科技有限公司。

化学试剂:甲醇、石油醚、乙酸乙酯、丙酮等均为分析纯。

主要仪器:硅胶 GF254 柱层析硅胶、薄层层析硅胶,青岛海洋化工厂;制备型 LBC-1 离心薄层层析仪,北京青云卓立精密设备有限公司;Thermo R200 傅立叶变换红外光谱仪,Thermo Nicolet 公司;Bruker AC-P200 型核磁共振仪,德国 Bruker 公司;工农-16 型手动喷雾器,上海工农喷雾器厂。

1.2 抑菌活性物质的提取和结构鉴定

参照邢鲲等^[18]的方法,发酵液用多层纱布过滤,20℃、6000 r/min 离心 15 min,取上清液。用 D-101 大孔树脂振荡吸附提取,然后用无水乙醇洗脱,洗脱液经旋转蒸发得黄褐色粗提物,粗提物再用制备型 LBC-1 离心薄层层析仪,依次用石油醚、乙酸乙酯、甲醇 3 种洗脱液进行多次梯度洗脱分离富集,最后上硅胶柱用石油醚:乙酸乙酯 = 4:1 (v:v) 梯度洗脱得到其中 1 种淡黄色结晶物 (J1)。结晶物红外光谱图用傅立叶变换红外光谱仪分析,¹H-NMR 谱图用核磁共振仪分析,同时结合薄层层析和测定熔点的方法,与马林等^[20]合成的化合物 3-5-二叔丁基-4-羟基-苄基甲醚对比。

1.3 Lj20 代谢产物的抑菌活性测定

1.3.1 发酵液粗提物对灰霉病菌孢子萌发的影响

采用悬滴法^[2],将粗提物分别稀释成最终浓度为 10、25、50 mg/mL,配成的孢子悬浮液浓度为每视野孢子数 100 个左右,取 50 μL 滴于凹玻片上,以不加粗提物的孢子悬浮液作对照,28℃ 恒温保湿培养,每隔 4 h 用光学显微镜观察孢子的萌发情况,观察 24 h 每处理重复 5 次。孢子萌发标准为芽管长至超过孢子直径的一半,统计病菌孢子的萌发率和抑制率。

1.3.2 代谢产物对灰霉病菌菌丝生长的影响

发酵液粗提物、淡黄色结晶物、多抗霉素、嘧霉胺分别用少量甲醇溶解,用无菌水以等比数列稀释为 40、80、160、400 和 800 mg/L 5 个浓度,将稀释液与 PDA 培养基^[20]按 1:9 混匀,接种黄瓜灰霉病菌块作为指示菌,加入等体积的无菌水 (含少量甲醇) 为对照。以多抗霉素和嘧霉胺为农用抗生素与化学杀菌剂进行对比。在 25℃ 条件下恒温培养,当对照菌落直径长至大于平皿直径 2/3 而小于全皿时,用直尺采用十字交叉法测量供试病菌在不同浓度含药

培养基上的菌落直径,重复 3 次,求其平均值,计算各药剂处理对菌落扩展的生长抑制率,并采用回归分析法对试验数据进行分析,计算毒力回归方程式、EC₅₀值和 95% 置信限。

1.3.3 温室防治试验

试验于 2008 年在山西农业大学附近的塑料大棚内进行,共设 4 个处理,每处理 4 次重复,共 16 个小区。小区区组随机排列,小区面积 15 m²,各小区采取 5 点取样法,每点随机取样 10 株。黄瓜于 2008 年 11 月 9 日育苗,2008 年 12 月 18 日定植,行距×株距为 100 cm×30 cm,施药期为盛果期。用丙酮配置浓度为 100 g/L 的粗提物溶液,再用清水和吐温-80 稀释至浓度为 500 mg/L,均匀喷雾到黄瓜植株上,设对照杀菌剂 70% 嘧霉胺水分散粒剂 1000 倍液、2% 多抗霉素可湿性粉剂 200 倍液,以清水为空白对照。于施药前(2 月 14 日上午)调查发病基数,并用工农-16 型手动喷雾器进行第 1 次施药,分别于 2 月 21 日和 2 月 28 日进行第 2 次和第 3 次施药,之后 7 天(3 月 7 日)调查病情,计算病情指数和防治效果。

分级标准、病情指数和防治效果计算按照农业部农药检定所《农药田间药效试验准则一》^[21]。黄瓜灰霉病的分级标准:0 级:无病斑;1 级:残留花发病;3 级:果脐部发病;5 级:病斑长度占果实的 10% 以下;7 级:病斑长度占果实的 11%~25%;9 级:病斑长度占果实的 26% 以上。

数据用 DPS 3.01 统计软件进行方差分析和多重比较,并采用 Duncan 氏新复极差法对防治效果进行差异显著性分析。

2.2 黄瓜灰霉病的温室防治效果

结果显示, Lj20 发酵液粗提物对黄瓜灰霉病的防治效果为 62.5%,而对照药剂 2% 多抗霉素可湿性粉剂 200 倍液的防治效果仅为 51.8% (表 3)。表

2 结果与分析

2.1 Lj20 发酵液代谢产物的抑菌活性

孢子萌发测定结果表明, Lj20 发酵液粗提物在浓度为 10~50 mg/mL 时对黄瓜灰霉病原菌孢子萌发抑制率分别为 59.8% 和 72.7% (表 1)。生长速率法测定表明,发酵液粗提物和纯化得到的结晶物 JT1 都能有效抑制黄瓜灰霉病原菌菌丝的生长,抑制作用随粗提物浓度增加而明显增强,粗提物和结晶物 JT1 的 EC₅₀ 分别为 382.54 mg/L 和 174.94 mg/L (表 2)。可见发酵液粗提物能有效抑制黄瓜灰霉病原菌孢子萌发,从而使病菌失去侵染能力,而且 Lj20 发酵液粗提物对病原菌菌丝生长的抑制作用明显优于对孢子萌发的抑制作用,结晶物 JT1 是 Lj20 发酵液中的抗真菌活性物质。

表 1 Lj20 发酵液粗提物对黄瓜灰霉病原菌孢子萌发的影响
Table 1 Effect of rude extracts from Lj20 fermentation on spore germination of *Botrytis cinerea*

处理 (mg/mL) Treatment	黄瓜灰霉病原菌孢子萌发 Conidial germination of <i>B. cinerea</i>	
	萌发率 (%) Germination rate	抑制率 (%) Inhibition rate
10	34.9±0.9 B	59.8±1.8
25	22.8±1.6 C	66.7±1.2
50	16.1±1.9 D	72.7±1.3
对照 Control	86.7±1.8 A	

注:数据后不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。
Note: The letters indicate the significant differences at $P < 0.01$ level

表 2 Lj20 代谢产物对灰霉病原菌菌丝生长的抑制作用
Table 2 Inhibition effects of Lj20 metabolites on mycelium growth of *Botrytis cinerea*

处理 Treatment	毒力回归方程 Regression equation	抑制中浓度 (mg/L) EC ₅₀	95% 置信限 (mg/L) 95% FL
粗提取物 Rude extracts	$Y = 2.0336 + 1.1486x$	382.54	303.23~482.59
结晶物 JT1 Crystall JT1	$Y = 2.3885 + 1.1644x$	174.94	139.11~219.98
多抗霉素 Polyoxin	$Y = 1.8631 + 1.1503x$	533.45	423.00~672.75
嘧霉胺 Pyrimethanil	$Y = 2.7667 + 1.0370x$	142.42	110.11~184.22

明 Lj20 发酵液粗提物对黄瓜灰霉病有较好的防治效果。方差分析和多重比较结果显示, Lj20 发酵液粗提物和 70% 嘧霉胺水分散粒剂 1000 倍液处理的防治效果差异不显著 ($P > 0.01$)。说明 Lj20 发酵

表 3 Lj20 发酵液粗提物对黄瓜灰霉病的防治效果

Table 3 The control efficacy of nude extracts from fermentation on cucumber gray mold in the greenhouse

处理 Treatment	施药前病情指数 Disease index before treatment	施药后病情指数 Disease index after treatment	防治效果 (%) Control efficacy
多抗霉素 Polyoxin	1.1±0.3	7.5±0.2 B	51.8±0.6
嘧霉胺 Pyrimethanil	1.3±0.1	6.5±0.3 C	69.6±0.9
粗提物 Rude extracts	1.2±0.2	7.4±0.3 B	62.5±0.5
CK	1.2±0.1	18.9±0.6 A	

注: 数据后不同大写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。Note The letters indicate the significant differences at $P < 0.01$ level

液的粗提物能有效地防治黄瓜灰霉病, 有进一步开发利用的价值。

2.3 淡黄色结晶物 (JT1) 的波谱分析

化合物为淡黄色晶体, 熔点 99.5℃。¹H-NMR: 含有 5 种不同位移的 H, 1.43924 (18H, 叔丁基上 H), 3.40046 (3H, 醚键甲基上 H), 4.34321 (2H, 亚甲基上的 H), 5.19474 (1H, 羟基上的 H), 7.13985 (2H, 苯环上的 H)。5 种 H 面积比值为 18:2.96:1.98:0.95:2.01, 其比值接近 18:3:2:1:2。¹H-NMR 谱图与 3,5-二叔丁基-4-羟基苄基甲醚结构相符。IR 3539.63, 2954.8, 1233.64 cm⁻¹ 分别来源于 O-H、C-H 和酚中 C-O 伸缩振动的吸收峰; 1192.17 cm⁻¹ 来源于芳环中 C-H 的面内弯曲振动; 868.66, 773.27 cm⁻¹ 来源于芳环中 C-H 的面外弯曲振动; 1092.63 cm⁻¹ 来源于醚键 C-O-C 的不对称伸缩振动的吸收峰, 强度大。¹H-NMR 和 IR 谱图数据与马林等^[20]报道的用化学合成方法合成的 3,5-二叔丁基-4-羟基苄基甲醚结构谱图数据相符, 而且分离提纯的淡黄色结晶物与 3,5-二叔丁基-4-羟基苄基甲醚合成物混合后再测定熔点不变, 薄层层析显示有相同的迁移率 R_f 值。上述结果说明分离提纯的淡黄色结晶物为 3,5-二叔丁基-4-羟基苄基甲醚。

3 讨论

色谱分离法是发酵液中活性物质分离提取的普遍方法, Harindran 等^[22]采用薄层层析成功地从 *Streptomyces* CDR IL-312 发酵液中提纯了大环内酯类抗真菌物质 HA-1-92 王昌禄等^[23]采用大孔吸附树脂对发酵液中香兰素进行分离提取, 得到白色针状香兰素结晶; Koitabashi 等^[24]采用硅胶柱以正己烷-乙烷为流动相成功地从真菌菌株 KyuW 63 发酵液浓缩液中分离出 2 种脂溶性抗真菌组分 PTF

和 PDF。利用大孔吸附树脂可以较快地从大量发酵液中提取和富集活性物质, 所以本试验先使用了大孔树脂进行吸附提取。柱层析分离过程中样品的杂质越小, 分离效果越好, 在柱层析分离之前先用离心薄层层析仪纯化样品, 再用柱层析分离, 最终取得较好的分离效果。本试验分离所得化合物, 经红外光谱和核磁共振分析确定为 3,5-二叔丁基-4-羟基苄基甲醚, 与马林等^[20]研究结果相符。

Lj20 菌株的菌体和代谢产物对番茄灰霉病菌、番茄早疫病菌等多种病原真菌都有很好的抑制作用^[18-20]。本试验结果表明, Lj20 发酵液粗提物对田间黄瓜灰霉病具有较好的防治作用, Lj20 发酵液中活性物质对黄瓜灰霉病菌菌丝生长和孢子萌发均有较好的抑制作用, 而其作用机制还有待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

[1] 宋卫国, 李宝聚, 叶志华, 等. 黄瓜病害控制中多菌灵和甲基硫菌灵的替代药剂评价. 农业环境科学学报, 2007, 26(增刊): 236-241

[2] 石延霞, 袁莉萍, 张一宾, 等. 新型杀菌剂氯苯胍唑对蔬菜主要病原菌的抑制作用及田间防病效果. 农药学报, 2007, 9(2): 126-130

[3] 朱昌雄, 蒋细良, 姬军红, 等. 我国生物农药的研究进展及对未来发展建议. 现代化工, 2003, 23(7): 1-4

[4] Compant S, Duffy B, Novak J, et al. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(9): 4951-4959

[5] Arasi M V, Duraipandian V, Agastian P, et al. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ER-13 isolated from Western Ghats rock soil (India). Journal de Mycologie Medicale, 2009, 19(1): 22-28

[6] Ilic S B, Konstantinovic S S, Todorovic Z B, et al. Characterization and antimicrobial activity of the bioactive metabolites in *Streptomyces* isolates. Microbiology, 2007, 76(4): 421-428

- [7] 石晶盈, 陈维信, 刘爱媛. 植物内生菌及其防治植物病害的研究进展. 生态学报, 2006, 26(7): 2395– 2401
- [8] 任安芝, 高玉葆. 植物内生真菌——一类应用前景广阔的资源微生物. 微生物学通报, 2001, 28(6): 90– 93
- [9] Cao L, Qiu Z, You J et al. Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. Letters in Applied Microbiology, 2004, 39(5): 425– 430
- [10] Michell AM, Strobel GA, Moore E, et al. Volatile antimicrobials from *Muscodora crispans*, a novel endophytic fungus. Microbiology, 2010, 156(1): 270– 277
- [11] Conn VM, Franco CM M. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1787– 1794
- [12] Igarashi Y, Mura SS, Fujita T, et al. Pterocidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygrosopicus*. Journal of Antibiotics, 2006, 59(3): 193– 195
- [13] 杨秀芳, 刘伟成, 卢彩鸽, 等. 拮抗放线菌 A03 的生防作用及其分类鉴定. 植物保护学报, 2007, 34(1): 73– 77
- [14] Strobel GA, Klick K, Hess WM, et al. *Muscodora albus* E-6, an endophyte of *Guazuma ulmifolia* making volatile antibiotics: isolation, characterization and experimental establishment in the host plant. Microbiology, 2007, 153(8): 2613– 2620
- [15] 黄晓辉, 李珊, 谭周进, 等. 植物内生放线菌研究进展. 生物技术通报, 2008 (1): 42– 46
- [16] 汪倬, 王茅, 周骏江. 抗黄瓜灰霉病菌生防放线菌的筛选及其抑菌机理的初步研究. 农药科学与管理, 2009, 30(1): 18– 22
- [17] 张武岗, 冯俊涛, 张锦恬, 等. 放线菌 19G-317 菌株发酵产物抑菌活性初步研究. 西北农林科技大学学报, 2009, 37(4): 158– 162, 168
- [18] 邢鲲, 韩巨才, 刘慧平, 等. 辣椒内生放线菌的分离、鉴定和拮抗作用. 安徽农业科学, 2005, 33(5): 777– 778
- [19] 马林, 韩巨才, 刘慧平. 植物内生放线菌 Fq24 和 Lj20 对番茄早疫病菌的抑制作用. 农药科学与管理, 2006, 27(5): 29– 31, 35
- [20] 马林, 陈红兵, 韩巨才, 等. 植物内生放线菌 Lj20 的鉴定及其抗真菌物质的合成. 微生物学报, 2008, 48(7): 900– 904
- [21] 农业部农药检定所生测室. 农药田间药效试验准则 (一). 北京: 中国标准出版社, 1994, 45– 50
- [22] Harindran J, Gupte TE, Naik SR. HA-1-92, a new antifungal antibiotic produced by *Streptomyces* CDR IL-312: fermentation, isolation, purification and biological activity. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 1999, 15(4): 425– 430
- [23] 王昌禄, 李士炼, 周庆礼, 等. 大孔吸附树脂对发酵液中香兰素的吸附效果. 精细化工, 2005, 22(6): 458– 460
- [24] Koitabashi M, Kajitani Y, Hiashima K. Antifungal substances produced by fungal strain Kyu-W 63 from wheat leaf and its taxonomic position. Journal of General Plant Pathology, 2004, 70(2): 124– 130