

绿色木霉菌 LTR-2 孢子提取物的抑菌活性及化学成分分析*

陈凯 杨合同** 李纪顺 扈进冬 张广志

(山东省科学院中日友好生物技术研究中心 山东省应用微生物重点实验室 济南 250014)

摘要 通过研究绿色木霉菌 LTR-2 分生孢子提取物的抑菌活性及化学成分,为进一步提取纯化新型抗生素提供依据。采用固体麸皮培养基培养绿色木霉菌 LTR-2,以二氯甲烷浸提法提取分生孢子中的抗菌物质,采用菌丝生长法测定提取物的抑菌活性,并用气相色谱-质谱联用仪进行分析,峰面积归一法计算有关成分的相对含量。绿色木霉菌 LTR-2 分生孢子的提取物抑菌谱广,对供试 11 种植物病原真菌均有不同程度的抑制作用,抑制效果好,对禾谷丝核菌的抑制率为 89.3%。从提取物中分离鉴定出 60 多种化学成分,其中烷烃类成分数量最多,为 43 种,其他成分有酮类、有机酸类、醇类、烯类等,主要成分是麦角固醇,含量为 41.90%。结论:绿色木霉菌 LTR-2 分生孢子提取物具有抑菌作用。通过化学成分分析,提取物中含有化合物 5 β -二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮,含量为 2.35%,结合文献报道,推测 5 β -二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮是提取物中起抑菌作用的物质。

关键词 绿色木霉 病原真菌 抑菌活性 气相色谱-质谱

中图分类号 S432.2+3 Q936 文献标识码 A 文章编号 0253-2654(2007)03-0455-04

Analysis of Chemical Components and Antifungal Activity of Extraction from Conidia of *Trichoderma viride* LTR-2*

CHEN Kai YANG He-Tong** LI Ji-Shun HU Jin-Dong ZHANG Guang-Zhi

(SINO-Japanese Friendship Biotechnology Research Center of Shandong Academy of Science, Shandong Province Key Lab for Applied Microbiology, Jinan 250014)

Abstract To study the chemical components and the antifungal activity of extraction from conidia of *Trichoderma viride* LTR-2. The extraction were obtained by distilling with Methylene dichloride from conidia of *Trichoderma viride* LTR-2 cultured on wheat bran solid matrix. Antifungal activity were determined by mycelium growth method. The chemical components of the extraction were analysed by GC-MS, the relative components in the extraction were determined by area normalization. The extraction not only have broad-spectrum control, showed antibiosis against eleven different plant fungal pathogens in PDA dish, such as *Rhizoctonia solani*, *Alternaria brassica*, *Verticillium dahliae*, *Macrophoma kawatsukai*, *Fusarium moniliforme*, *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia cerealis*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Bipolaris sorokinana*, *Fusarium graminearum*, *Alternaria mali*, but also have high inhibitory effect, and had 89.3% suppressive rate to *Rhizoctonia cerealis*. About sixty components were separated and identified by GC-MS, majority components were Hydrocarbon, the number of the Hydrocarbon were forty-three kinds. Ergosterol was the major chemical components of the extract, and has 41.90% content. Other components comprised: Ketone, Organic acid, Alcohol, Ene, et al. Conclusion: The extraction from conidia of *Trichoderma viride* LTR-2 have antifungal activity. The extraction comprised 2H-Pyran-2-one, 5 β , 6-dihydro-6-pentyl, it has 2.35% content. reference others literature, 2H-Pyran-2-one, 5 β , 6-dihydro-6-pentyl may be the suppressive component of the extraction.

Key words *Trichoderma viride*, Plant fungal pathogen, Antifungal activity, GC-MS

木霉菌(*Trichoderma* spp.)属于半知菌亚门、丝孢纲、丝孢目、粘孢菌类^[1],是重要的植物病害生物防治菌,能够产生多种抗菌物质,如异腈类

(Isonitrioles), 肽醇类(Petaibols), 二酮哌嗪类(Diketopiperazines), 倍半萜烯类(Sesquiterpens), 类固醇类(Steroids), 聚酮类(Polyketides), 烷基吡喃酮类

* 国家 863 计划现代农业技术领域重大项目资助(No.2006AA10A211)

** 通讯作者 Tel: 0531-82605386, E-mail: yanght@keylab.net

收稿日期: 2006-07-14, 修回日期: 2006-10-24

(Alkyl pyrones)等,很多抗菌物质的生物活性已被确认^[2]。由于此类微生物农药既能控制病害又对环境友好,故其在生物防治中的作用越来越受到注重,产生抗性代谢产物与否及其产量大小已成为植病生防菌筛选的重要指标^[3,4]。

山东省应用微生物重点实验室筛选的绿色木霉菌(*Trichoderma viride*)LTR-2,对多种植物病原真菌具有强烈的拮抗作用,并以活体菌剂的方式进行了商品化,取得了良好的社会效益^[5,6]。为进一步研究LTR-2的作用机理,笔者从其分生孢子中提取到有活性的抑菌物质,并采用气相色谱-质谱联用仪分析了提取物中的化学成分,为进一步提取纯化新型抗生素提供了依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及培养

实验于2004年7月~11月在山东省科学院生物技术研究中心与山东省科学院测试中心进行。将供试生防菌株绿色木霉LTR-2纯化复壮后,接种固体麸皮培养基(麸皮:稻壳:玉米粉=7:1:2,质量比,含水量70%),于28℃培养4d~5d至分生孢子布满培养基表面,自然风干后过100目筛收集孢子粉。指示菌为山东省应用微生物重点实验室保存的11种植物病原真菌(表1)均用PDA培养基培养备用。

1.2 抑菌物质的提取^[7]

取10g绿色木霉LTR-2分生孢子,加入200mL二氯甲烷,于5℃下浸提2d。浸提液用5%活性炭振荡吸附2h,过滤除杂,上清液加入等体积的3%碳酸钠溶液洗涤,重复一次,将碳酸钠溶液合并后,用少许二氯甲烷洗涤回收后并入洗涤液,洗涤液加无水硫酸钠脱水,将脱水洗涤液真空减压浓缩至1mL的粘稠状液体。

1.3 抑菌谱测定

将1.2得到的提取物与冷却至45℃的PDA培养基按1:200(体积比)的比例混合后倾倒入平板,空白对照以二氯甲烷代替,将直径为5mm的病原真菌菌片分别接入上述配制好的含药平板中央,相同的处理设3个重复,25℃培养2d~5d至对照平板上的病原真菌长满平板,记录含药平板上的相应病原真菌的菌落扩展直径,计算抑制率。

抑制率%=(对照菌落扩展面积-药剂处理菌

落扩展面积)×100%/对照菌落扩展面积。

1.4 提取物化学成分分析

采用气相色谱-质谱联用仪对提取物的成分进行分析,仪器型号为Agilent 6890-5973N GC-MS,离子源为EI,电子能量为70eV,离子源温度为230℃,接口温度为280℃,质量扫描范围为29amu~500amu,色谱柱为HP-5MS(30m×0.25mm×0.25μm),起始柱温50℃,恒温5min后以5℃/min升温到300℃,汽化室温度为300℃,载气为氦气,分流比为10:1,进样量为1μL。

2 结果与分析

2.1 抑菌谱测定

绿色木霉LTR-2孢子提取物对实验病原真菌均有抑制作用,但对不同病原真菌的抑制作用不同,其显著性差异程度也不同(SPSS统计软件中的Duncan方法,显著性差异水平 $P=0.05$),对禾谷丝核菌的抑制效果最好,抑制率为89.2%;对禾谷镰孢菌的抑制效果最差,抑制率仅为24.9%(表1)。

表1 绿色木霉LTR-2孢子提取物的抑菌谱测定

病原真菌	病原真菌 扩展直径(mm)		抑制率 %
	CK	处理	
禾谷镰孢(<i>Fusarium graminearum</i>)	90.0	78.0	24.9 a
灰葡萄孢(<i>Botrytis cinerea</i>)	90.0	68.0	42.9 b
串珠镰孢(<i>Fusarium moniliforme</i>)	90.0	67.5	43.7 b
大丽花轮枝孢(<i>Verticillium dahliae</i>)	90.0	63.5	50.2 c
尖孢镰刀菌萎蔫专化型(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i>)	90.0	60.5	54.8 d
麦根腐平脐蠕孢(<i>Bipolaris sorokinana</i>)	90.0	56.0	61.2 e
芸薹链格孢(<i>Alternaria brassica</i>)	90.0	45.5	74.4 f
轮纹大茎点菌(<i>Macrophoma kawatsukai</i>)	90.0	42.0	78.2 g
苹果链格孢(<i>Alternaria mali</i>)	90.0	35.0	84.9 h
立枯丝核菌(<i>Rhizoctonia solani</i>)	90.0	32.0	87.4 hi
禾谷丝核菌(<i>Rhizoctonia cerealis</i>)	90.0	29.5	89.2 i

注:采用SPSS统计软件中的Duncan方法,显著性差异水平 $P=0.05$,不同小写字母标识间存在显著性差异。

2.2 提取物化学成分分析

采用气相色谱-质谱联用仪进行定性分析,结合计算机检索技术,对化学成分进行分离鉴定,应用气相色谱峰面积归一化法测定各成分的相对含量。绿色木霉LTR-2孢子提取物内共检测到60多种化学成分,其中烷烃类数量最多为43种,其他成分为酮类、有机酸类、醇类、烯类等。主要成分是麦角固醇,含量为41.90%(表2)。

表2 绿色木霉 LTR-2 孢子提取物中的化学成分分析

峰号	时间(min)	名称	分子式	分子量	含量(%)
1	20.230	(正)十四(碳)烷	C ₁₄ H ₃₀	198	0.23
2	22.376	5,6-二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	2.35
3	22.738	十五烷	C ₁₅ H ₃₂	212	4.38
4	23.101	丁基化羟基甲苯	C ₁₅ H ₂₄ O	220	0.98
5	23.863	十二烷	C ₁₂ H ₂₆	170	0.25
6	25.112	十六烷	C ₁₆ H ₃₄	226	0.77
7	25.934	异十七烷	C ₁₇ H ₃₂	238	0.20
8	26.229	2,6,10,14-四甲基-十六烷	C ₂₀ H ₄₂	282	1.62
9	26.771	α -3,4-三甲基硅基-苯乙酸酯	C ₂₀ H ₂₄ O ₅ Si ₄	472	0.71
10	27.121	3-溴-4-甲基-3-五亚乙基六胺-2-酮	C ₆ H ₉ OBr	176	0.59
11	27.361	十七烷	C ₁₇ H ₃₆	240	1.47
12	27.485	2-甲基-癸烷	C ₁₁ H ₂₄	156	0.38
13	28.335	3-乙基-6-三氟乙酰基辛烷	C ₁₂ H ₃₁ O ₂ F ₃	254	0.46
14	29.096	菲	C ₁₄ H ₁₀	178	0.58
15	29.482	十八烷	C ₁₈ H ₃₈	254	1.05
16	30.125	4[2,2-二甲基-1-氧丙烷基 氨基-安息香酸	C ₁₂ H ₁₅ O ₃ N	221	0.40
17	30.304	顺式-1-甲基-3-n-壬基环己烷	C ₁₆ H ₃₂	224	0.34
18	30.615	6,6,9a-三甲基-十二氢萘基[1,2c]咪喃-1,4-二酮	C ₁₅ H ₂₂ O ₃	250	0.48
19	30.933	1,5-戊基-2-烯-3-甲基-5-(2,6-二甲基庚基)交酯	C ₁₅ H ₁₆ O ₂	238	0.36
20	31.091	2-甲基-十三烷	C ₁₄ H ₃₀	198	0.30
21	31.202	十九烷	C ₁₉ H ₄₀	268	0.59
22	31.335	1-甲基环乙基-1-甲酮	C ₉ H ₁₆ O	140	0.12
23	31.538	1-乙基-2-甲基-环己胺	C ₉ H ₁₈	126	0.58
24	31.862	2,4,6-三甲基-庚烷	C ₁₀ H ₂₂	142	0.38
25	32.035	2-甲基-十八烷	C ₁₉ H ₄₀	268	0.14
26	32.158	3-氧代-2-环戊烯基-1-乙烯基-8-辛酸	C ₁₈ H ₂₈ O ₃	292	0.42
27	32.422	1,1,1,5,7,7,7-七甲基-3,3-双(三甲基,甲硅氧烷基)四硅氧烷	C ₁₃ H ₄₀ O ₅ Si ₆	444	0.23
28	32.596	二十烷	C ₂₀ H ₄₂	282	0.79
29	32.859	2-甲基-2-丁氧基-1-丁烯	C ₉ H ₁₈ O	142	0.35
30	33.163	5-甲基-癸烷	C ₁₁ H ₂₄	156	0.24
31	33.529	十六烷	C ₁₆ H ₃₄	226	0.57
32	33.795	二十二烷	C ₂₂ H ₄₆	296	0.54
33	33.973	二乙烯基二甲基硅烷	C ₆ H ₁₂ Si	112	0.38
34	34.153	2,6,10,14-四甲基-十四烷	C ₁₈ H ₃₂	268	0.86
35	34.491	异丙基亚油酸	C ₂₁ H ₃₈ O ₂	322	1.10
36	34.860	甘二烷	C ₂₂ H ₄₆	310	2.57
37	35.228	甘一烷	C ₂₁ H ₄₄	296	0.66
38	35.452	2,2,4-三甲基-3-醇-5-己烯	C ₉ H ₁₈ O	142	0.61
39	35.831	十八烷	C ₁₈ H ₃₈	254	2.67
40	35.988	三十五烷	C ₃₅ H ₇₂	493	0.89
41	36.213	3-甲基-1-醇-3-环己烯	C ₇ H ₁₂ O	112	0.77
42	36.444	异十九烷	C ₁₉ H ₃₈	266	0.34
43	36.614	十一烷基-环己胺	C ₁₇ H ₃₄	238	0.37
44	36.729	二十四烷	C ₂₄ H ₅₀	338	1.60
45	36.899	异二十四烷	C ₂₄ H ₄₈	336	0.73
46	37.032	二十三烷	C ₂₃ H ₄₈	324	0.81
47	37.571	2,6,10,14-四甲基-十六烷	C ₂₀ H ₄₂	282	2.44
48	38.015	2,6,10,14-四甲基-十五烷	C ₁₉ H ₄₀	268	1.07
49	38.821	二十八烷	C ₂₈ H ₅₈	394	2.28
50	39.407	甘一烷	C ₂₁ H ₄₄	296	1.60

续表

峰号	时间(min)	名称	分子式	分子量	含量(%)
51	40.560	二十九烷	C ₂₉ H ₆₀	408	1.19
52	41.461	11-甲基-二十九烷	C ₃₀ H ₆₂	422	1.03
53	41.969	三十一烷	C ₃₁ H ₆₄	436	1.39
54	42.603	2,2-双乙氧基甲氧基-9-丙基-萹	C ₂₇ H ₃₆ O ₄	424	0.53
55	42.789	三十烷	C ₃₀ H ₆₂	422	1.55
56	43.200	麦角固醇	C ₂₈ H ₄₄ O	396	41.90
57	43.727	2,4-二硝基苯-叠氮甲基-5-二氢咪唑-2-酮	C ₁₁ H ₁₀ O ₆ N ₄	294	1.17
58	44.293	谷甾醇	C ₂₉ H ₅₀ O	414	2.73
59	46.146	三十五烷	C ₃₅ H ₇₂	492	0.95
60	46.398	1'-甲基-16,17-b-咪唑-3-醇-16-烯-1-甾醇	C ₂₆ H ₃₅ ON	377	2.11
61	47.708	二十六烷	C ₂₆ H ₄₈	366	0.53

3 讨论

长期以来,在对生防木霉菌的利用上以活体菌剂为主。生物活体制剂对环境条件要求较高,还可能对非靶生物带来潜在的影响,利用代谢产物抑菌,可减轻对环境的依赖与对非靶生物的危害,具有广阔的应用前景与价值,对土壤环境的质量改善具有重要意义^[8,9]。从木霉菌中分离提纯抗生素,可以扩大现有抗生素的品种和资源,有效抑制病原菌的抗药性,而且也作为化学合成抗生素提供理论依据。

到目前为止,木霉菌中已鉴定出7大类,几百种抑菌物质^[10~13],由于抑菌物质的种类与化学性质的差异,病原菌往往难以产生抗药性^[14],特别是烷基吡喃酮类物质,对许多植物病原菌具有强烈抗菌活性,在温室条件下产生烷基吡喃酮的木霉菌对多种植物病害防治效果显著^[15~18]。通过气相色谱-质谱联用分析,绿色木霉 LTR-2 孢子提取物中分离鉴定到60多种化学成分,其中烷烃类数量最多为43种,其他成分为酮类、有机酸类、醇类、烯类等。结合文献报道及理论分析,提取物中大多成分无抑菌作用,而起抑菌作用的物质应是吡喃酮类物质。5,6-二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮,该物质在提取物中的含量为2.345%。5,6-二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮属于次级代谢产物,且易挥发,故提取物中5,6-二氢-6-戊基-2H-吡喃-2-酮的含量较低。通过分析研究提取物中化合物的成分,可以合理设计下一步的实验方案,有针对性的分离纯化目标物质。

致谢:感谢山东省科学院生物研究所王加宁博士和山东省科学院测试中心苑金鹏硕士的帮助!

参考文献

[1] Cook R J, Baker K F. The nature and practice of biological control of

plant pathogen. APS, 1983, 318.

- [2] Ghisalberti E. L. Current Medicinal Chemistry - Anti-Infective Agents, 1nd ed, Bentham Science Publishers, 2002, 343 ~ 374.
- [3] 姬生宝, 范晋勇, 元英进. 微生物学通报, 2005, 32(3): 77 ~ 81.
- [4] 杨合同, 唐文华, Ryder M. 山东科学, 1999, 12(4): 7 ~ 16.
- [5] 杨合同, 唐文华, 李纪顺, 等. 中国生物防治, 2004, 20(3): 182 ~ 186.
- [6] Yang H T, Tang W H, Ryder M. Shandong Science, 2005, 18(3): 85 ~ 91.
- [7] 蓝希钊, 谢洁, 袁志辉, 等. 微生物学通报, 2005, 32(6): 16 ~ 19.
- [8] Moss M O, Jackson R M, Rogers D. Phytochemistry, 1975, 14: 2706 ~ 2708.
- [9] 孙冬梅, 杨谦, 宋金柱. 天然产物研究与开发, 2005, 17(6): 691 ~ 695.
- [10] 刘任, 程东美, 卢鹏飞, 等. 仲恺农业技术学院学报, 2005, 18(4): 25 ~ 28.
- [11] Cooney J M, Lauren D R. Applied Microbiology, 1998, 27: 283 ~ 286.
- [12] Mumpuni A, Sharma H S S, Brown A E. Applied Environmental Microbiology, 1998, 64(12): 5053 ~ 5056.
- [13] Nielsen M N, Sørensen J, Fels J, et al. Applied Environmental Microbiology, 1998, 64(10): 3563 ~ 3569.
- [14] 于新, 田淑慧, 徐文兴, 等. 中山大学学报(自然科学版), 2005, 44(2): 86 ~ 90.
- [15] Christopher R, Thornton, Pitt D, et al. Microbiology, 2002, 148: 1263 ~ 1279.
- [16] Parker S R, Cutler H G, Jacyno J M, et al. Agriculture Food Chemistry, 1997, 45: 2772 ~ 2776.
- [17] Cooney J M, Hotter G S, Lauren D R. Phytochemistry, 2000, 53(4): 47 ~ 50.
- [18] Dickinson J M. Natural Product Reports, 1993, 10: 71 ~ 98.