

刘彩云, 高秀清, 赵静. 近缘毛壳 *Chaetomium subaffine* LB-1 抑菌物质存在部位及提取方法 [J]. 华南农业大学学报, 2023, 44(2): 280-286.
LIU Caiyun, GAO Xiuqing, ZHAO Jing. Existing position and extraction of antifungal substance produced by *Chaetomium subaffine* LB-1[J]. Journal of South China Agricultural University, 2023, 44(2): 280-286.

近缘毛壳 *Chaetomium subaffine* LB-1 抑菌物质 存在部位及提取方法

刘彩云✉, 高秀清, 赵 静

(潍坊学院 种子与设施农业工程学院, 山东 潍坊 261061)

摘要:【目的】对近缘毛壳 *Chaetomium subaffine* 菌株 LB-1 产生抑菌物质的部位及提取方法进行研究, 为开发生防菌株 LB-1 防治植物病害奠定基础。【方法】以番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum* 为指示菌, 采用平板密封培养法检测菌株 LB-1 是否产生挥发性抑菌物质; 采用菌体超声破碎和液态培养的方式检测菌株 LB-1 产生的非挥发性抑菌物质存在的部位; 采用含毒培养基法和滤纸片法检测菌株 LB-1 培养液的硫酸铵沉淀、盐酸沉淀和有机溶剂萃取物的抑菌效果, 以确定菌株 LB-1 培养液中抑菌物质的提取方法。【结果】菌株 LB-1 与 2 种供试病原菌密封共培养时, 对病原菌的生长没有明显影响, 表明菌株 LB-1 不能产生挥发性抑菌物质。菌株 LB-1 菌体胞内提取物的抑菌活性与对照无差异, 但其培养液对 *B. cinerea* 和 *E. turcicum* 的生长有较强的抑制作用, 表明菌株 LB-1 产生的抑菌物质存在于菌体细胞外。菌株 LB-1 培养液的硫酸铵沉淀和盐酸沉淀对 2 种供试植物病原真菌的生长均无抑制效果, 但有机溶剂萃取可获得菌株 LB-1 培养液中的抑菌物质, 其中正丁醇萃取物抑菌效果最好, 当其质量浓度为 0.1 mg/mL 时, 对 *B. cinerea* 和 *E. turcicum* 的生长抑制率分别高达 59.80% 和 58.37%。【结论】菌株 LB-1 通过产生胞外非挥发性物质抑制植物病原真菌的生长, 培养液中的抑菌物质可通过正丁醇萃取获得。

关键词: 近缘毛壳; 抑菌物质; 培养液; 正丁醇粗提物

中图分类号: S435

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2023)02-0280-07

Existing position and extraction of antifungal substance produced by *Chaetomium subaffine* LB-1

LIU Caiyun✉, GAO Xiuqing, ZHAO Jing

(College of Seed and Facility Agricultural Engineering, Weifang University, Weifang 261061, China)

Abstract: 【Objective】The existing position and extraction method of antifungal substance produced by *Chaetomium subaffine* strain LB-1 were studied in order to lay a foundation for the development of the strain LB-1 to control plant diseases. 【Method】With *Botrytis cinerea* and *Exserohilum turcicum* as test plant pathogens, the sealed plate assay was used to detect whether the strain LB-1 could produce volatile antifungal substance. The hyphae ultrasonic breaking and liquid culture methods were used to detect the existing position of nonvolatile antifungal substance produced by the strain LB-1. The extraction method of antifungal substance was determined by detecting the inhibitory effects of ammonium sulfate precipitation, hydrochloric acid precipitation

收稿日期: 2022-04-12 网络首发时间: 2023-01-03 15:22:00

首发网址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20230103.1215.001.html>

作者简介: 刘彩云, 副教授, 博士, 主要从事植物真菌病害及防治研究, E-mail: changyj2004@126.com

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2021MC144)

and organic solvents extracts of strain LB-1 culture broth via poison plate assay and filter paper disc assay. 【Result】 The strain LB-1 did not have obvious inhibitory effect on the growth of the two test plant pathogens when being co-cultured in a sealed plate with each plant pathogen, indicating that strain LB-1 could not produce volatile antifungal substance. The antifungal activity of the intracellular extract of the strain LB-1 was not different from that of the control, but its culture broth had a strong inhibitory effect on *B. cinerea* and *E. turcicum*, indicating that the antifungal substances produced by the strain LB-1 existed outside the mycelium. Neither ammonium sulfate precipitate nor hydrochloric acid precipitate of strain LB-1 culture broth showed inhibitory effect on *B. cinerea* and *E. turcicum*, but the organic solvent extract of strain LB-1 culture broth showed antifungal effect, and the inhibition rate of n-butanol extract was the highest. When the concentration was 0.1 mg/mL, the inhibition rates against *B. cinerea* and *E. turcicum* growth were 59.80% and 58.37% respectively. 【Conclusion】 The strain LB-1 inhibited the growth of plant pathogenic fungi by producing extracellular nonvolatile antifungal substances, and the antifungal substance in the culture broth can be extracted by n-butanol.

Key words: *Chaetomium subaffine*; Antifungal substance; Culture broth; Crude extract of n-butanol

真菌是植物病害生物防治的重要组成部分。子囊菌门毛壳菌属 *Chaetomium* Kunze 的球毛壳 *C. globosum*、角毛壳 *C. cupreum*^[1]、螺旋毛壳 *C. spirale*^[2] 和金色毛壳 *C. aureum*^[3] 对植物病害具有较好的防治作用, 该属的真菌可通过生存竞争、重寄生、产生抑菌物质、促生和诱导抗病性等方式发挥生防作用^[4-5], 其中, 产生抑菌物质是其重要的作用方式^[6-10]。

生防菌产生的抑菌物质可存在于菌体细胞内, 也能分泌到菌体细胞外发挥生防作用。存在于细胞内的抑菌物质可通过菌体超声或研磨破碎提取, 然后进行抑菌活性检测; 产生于菌体外的抑菌物质则可通过对菌体培养液的抑菌活性进行检测分析^[11-12]。生防菌产生的胞外抑菌物质有挥发性和非挥发性的。挥发性抑菌物质通常采用平板密封培养法检测, 而非挥发性抑菌物质则可通过培养液的盐析沉淀、酸沉淀、有机溶剂萃取等途径获得^[13-14]。

不同生防菌产生的抑菌物质不同, 有效提取方法也不同。许乐等^[15]通过硫酸铵沉淀、盐酸沉淀法提取了多黏类芽孢杆菌 *Paenibacillus polymyxa* DS-R5 中的抑菌物质, 结果发现其培养液的硫酸铵沉淀物无抑菌活性, 但盐酸沉淀物对腐皮镰刀菌 *Fusarium solani* 孢子萌发有明显抑制作用。杨廷雅等^[16]发现, 短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis* HAB-5 培养液的硫酸铵沉淀、有机溶剂(石油醚、氯仿、乙醚、乙酸乙酯和正丁醇)萃取物均无明显抑菌活性, 但有机溶剂萃取后的水相部分对炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz C7-2 有较高的抑菌活性。Phong 等^[17]和 Yan 等^[18]通过甲醇、正己

烷和乙酸乙酯萃取, 分别从球毛壳菌株 CG05 和 CDW7 中获得了抑菌活性物质。

菌株 LB-1 是我们从龙柏鳞叶小枝中分离的 1 株近缘毛壳 *C. subaffine* 生防菌, 前期研究发现, 菌株 LB-1 对玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和玉米小斑病菌 *Bipolaris maydis* 等多种植物病原菌有拮抗作用, 其拮抗作用与产生的抑菌物质密切相关^[19], 但目前鲜见近缘毛壳抑菌物质的研究报道。基于此, 本研究拟对菌株 LB-1 抑菌物质存在部位及提取方法进行分析, 以期对菌株 LB-1 防治植物病害研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

近缘毛壳 *C. subaffine* 菌株 LB-1、番茄灰霉病菌 *B. cinerea*、玉米大斑病菌 *E. turcicum* 均为潍坊学院园林实验室保存的菌种。

马铃薯葡萄糖琼脂 (Potato dextrose agar, PDA) 培养基用于菌株 LB-1 和 2 种供试植物病原真菌的活化以及菌株 LB-1 抑菌物质的检测, 其配方为: 去皮土豆 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 17~20 g、蒸馏水 1 000 mL; 马铃薯葡萄糖 (Potato dextrose broth, PDB) 培养液用于菌株 LB-1 的液态培养。PDA 培养基和 PDB 培养液用高压灭菌 (121 ℃、20 min)。

1.2 菌株 LB-1 产生的抑菌物质及存在部位

1.2.1 菌体胞内抑菌物质的检测方法

参照梁建根等^[12]的方法, 将在 PDA 平板上培养 3 d 的菌株 LB-1 的菌丝用 8.5 g/L NaCl 溶液冲洗、悬浮, -20 ℃

条件下保存 24 h, 然后超声破碎处理 30 min, 破碎液在 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min, 上清液即为菌体胞内提取物。

参照罗琳等^[20]的含毒培养基法检测菌体胞内提取物的抑菌作用。将菌株 LB-1 胞内提取物用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤, 然后以体积比 1:3 的比例加入 PDA 培养基, 制成含菌株 LB-1 胞内提取物的 PDA 平板; 接种供试病原菌菌饼 (直径 6 mm) 于平板中央, 置于光照培养箱中培养 (25 ℃、自然光照) 6 d, 测定菌落直径, 并计算抑制率。对照培养基平板中加入与处理等量的 8.5 g/L NaCl 溶液。对照和处理各设 3 次重复。

1.2.2 菌体胞外抑菌物质的检测方法 将在 PDA 平板上培养 3 d 的菌株 LB-1 的菌饼 (直径 6 mm) 接种至灭菌后的 50 mL PDB 培养液中, 振荡培养 (25 ℃、130 r/min) 3、7、10、15、20 d 后, 培养液用 2 层纱布过滤, 滤液在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min, 上清液即为无菌体培养液。采用“1.2.1”的含毒培养基法检测不同培养天数培养液的抑菌活性, 以正常 PDA 培养基为对照。

参照 Landum 等^[13]的平板密封培养法检测菌株 LB-1 是否产生挥发性抑菌物质。用打孔器获取在 PDA 培养基上培养 3 d 的菌株 LB-1、番茄灰霉病菌和玉米大斑病菌菌饼 (直径 6 mm), 接种在新制备的 PDA 平板中央, 置于光照培养箱中培养 2 d (25 ℃、自然光照), 然后把含有菌株 LB-1 菌饼的培养皿分别与含有 2 种供试病原菌菌饼的培养皿底部对扣、密封, 继续培养 5 d, 观察病原菌生长情况, 测量处理和对照培养皿中病原菌菌落直径, 并计算抑制率。对照为病原菌菌饼单独培养。对照和处理各设 3 次重复。

1.3 菌株 LB-1 培养液中的抑菌物质提取方法

1.3.1 盐析沉淀 参照周瑚等^[21]的方法, 将在 PDB 培养基中 25 ℃、130 r/min 振荡培养 15 d 的菌株 LB-1 培养液用 2 层纱布过滤, 滤液在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min, 获得无菌体培养液。在培养液中加入硫酸铵至 80% 饱和度, 振荡混匀, 4 ℃静置 48 h, 然后 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min, 沉淀物用 PBS 缓冲液溶解、定容, 获得硫酸铵沉淀物溶液。

1.3.2 酸沉淀 参照梁建根等^[12]的方法, 将菌株 LB-1 的培养液 (培养方法同“1.3.1”), 用 1 mol/L 盐酸溶液将 pH 调至 3~4, 4 ℃静置过夜, 然后在 4 ℃、12 000 r/min 条件下离心 20 min, 沉淀物用 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH=7.0) 溶解、定容, 获得

盐酸沉淀物溶液。

1.3.3 有机溶剂提取 参照马桂珍等^[22]的方法, 将菌株 LB-1 的培养液 (培养方法同“1.3.1”) 分别与等体积的正丁醇、乙酸乙酯、石油醚、三氯甲烷混匀, 静置 30 min, 收集水相和有机相; 水相用旋转蒸发器蒸发、浓缩 10 倍后备用; 有机相旋转蒸发, 蒸干提取物用二甲基亚砜 (Dimethylsulfoxide, DMSO) 溶解、定容, 获得有机相粗提物溶液。

1.3.4 抑菌效果检测 含毒培养基法检测: 将菌株 LB-1 培养液的硫酸铵沉淀、盐酸沉淀、有机相粗提物和水相浓缩液分别加入 PDA 培养基中 (水相浓缩液以体积比 1:3 的比例加入, 硫酸铵沉淀、盐酸沉淀和有机相粗提物在 PDA 平板中的质量浓度均为 0.1 mg/mL), 制成含有不同提取物的 PDA 平板, 在平板中央分别接种供试番茄灰霉病菌和玉米大斑病菌菌饼, 置于光照培养箱中培养 6 d (25 ℃、自然光照), 测量病原菌菌落直径, 并计算抑制率。为消除不同提取物溶剂的干扰, 设 PBS 缓冲液、磷酸缓冲液和 DMSO 以及正常 PDA 平板为对照。处理和对照各设置 3 次重复。

滤纸片法复检: 分别将番茄灰霉病菌和玉米大斑病菌菌悬液 0.3 mL 均匀地涂抹在 PDA 平板上, 然后将直径 6 mm 的滤纸片分别放置于含菌 PDA 平板中轴两端的相对位置, 一端滤纸片中分别加入 100 μL 0.1 mg/mL 的 LB-1 菌株培养液的硫酸铵沉淀物溶液、盐酸沉淀物溶液和有机溶剂粗提物, 另一端滤纸片分别加入 100 μL 溶解硫酸铵沉淀物的 PBS 缓冲液、溶解盐酸沉淀物的溶剂磷酸缓冲液以及溶解 4 种有机溶剂粗提物的溶剂 DMSO, 然后置于光照培养箱中培养 (25 ℃、自然光照), 3 d 后观察滤纸片周围菌落生长情况。每种处理设置 3 个重复。

1.4 数据分析

数据采用 SAS 8.1 软件进行统计分析, 应用最小显著差异法 (Least significant difference, LSD) 进行差异显著性检验。

$$\text{抑制率} = (D_{\text{对照}} - D_{\text{处理}}) / D_{\text{对照}} \times 100\%,$$

式中, $D_{\text{处理}}$ 、 $D_{\text{对照}}$ 分别表示处理和对照病原菌菌落的直径, mm。

2 结果与分析

2.1 菌株 LB-1 产生的抑菌物质及其存在的部位

近缘毛壳 LB-1 菌丝超声破碎提取物对供试番茄灰霉病菌和玉米大斑病菌生长的抑制作用与 8.5g/L NaCl 溶液相当 (表 1), 表明 LB-1 菌体胞内

表 1 菌株 LB-1 菌体胞内提取物质对病原菌生长的抑制效果				
Table 1 Inhibitory effects of intracellular extract of strain LB-1 on the growth of plant pathogens				
处理 Treatment	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>		玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	
	菌落直径/mm Diameter of colony	抑制率 ¹⁾ /%	菌落直径/mm Diameter of colony	抑制率 ¹⁾ /%
菌体胞内液 Intracellular extract	59.17±1.44	2.25a	61.17±1.89	1.47a
8.5 g/L NaCl	59.33±1.26	2.00a	60.83±1.26	1.96a
空白对照 Blank control	60.67±1.53		62.17±1.26	

1) 同列数据后的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, LSD法)

1) Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$, LSD method)

提取物无抑菌作用, 说明菌株 LB-1 产生的抑菌物质不在菌体细胞内。

菌株 LB-1 在 PDB 培养液中振荡培养不同天数的胞外培养液对 2 种供试植物病原真菌的生长

均有抑制作用, 且随着培养天数的增加, 其抑菌率不断增加, 但培养 15 d 后的抑菌率与培养 20 d 的无显著差异 (表 2), 表明菌株 LB-1 产生的抑菌物质存在于菌体胞外的培养液中。

表 2 菌株 LB-1 不同培养天数的培养液对病原菌生长的抑制效果				
Table 2 Inhibitory effects of culture broth of strain LB-1 on the growth of plant pathogens				
培养时间/d Incubation time	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>		玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	
	菌落直径/mm Diameter of colony	抑制率 ¹⁾ /%	菌落直径/mm Diameter of colony	抑制率 ¹⁾ /%
3	54.00±0.10	10.00c	46.92±0.04	22.37c
7	48.17±0.06	18.75b	46.33±0.20	23.23c
10	45.37±0.16	22.95b	42.50±0.36	28.85b
15	35.33±0.15	38.00a	35.67±0.03	38.88a
20	34.67±0.08	39.00a	35.17±0.10	39.61a
空白对照 Blank control	60.67±1.53		62.17±0.13	

1) 同列数据中的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, LSD法)

1) Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$, LSD method)

平板密封培养发现, 2 种供试病原菌和菌株 LB-1 对扣共培养的菌落直径与病原菌单独培养的菌落直径之间无明显差异。番茄灰霉病菌单独培养的菌落直径为 60.17 mm, 与菌株 LB-1 共培养的菌落直径为 59.00 mm; 玉米大斑病菌单独培养的菌落直径为 67.17 mm, 与菌株 LB-1 共培养的菌落直径为 65.00 mm。这表明菌株 LB-1 不产生挥发性的抑菌物质。

2.2 菌株 LB-1 培养液粗提物的抑菌效果

2.2.1 盐析沉淀、酸沉淀提取物的抑菌效果 含毒培养基法检测发现, 硫酸铵和盐酸提取菌株 LB-1 培养液获得的沉淀物 (质量浓度 0.1 mg/mL) 对供试的 2 种病原菌生长的抑制效果与缓冲液的相当 (表 3), 表明盐析沉淀、酸沉淀不能有效提取菌株 LB-1 培养液中的抑菌物质。

2.2.2 有机溶剂萃取物及水相的抑菌效果 含毒培养基法检测发现, 菌株 LB-1 在 PDB 中振荡培养 15 d 获得的培养液通过正丁醇、乙酸乙酯、石油醚和三氯甲烷萃取后, 其水相浓缩液对供试番茄灰霉病菌和玉米大斑病菌的生长无明显抑制效果, 但 0.1 mg/mL 的正丁醇、乙酸乙酯、石油醚和三氯甲烷萃取物对 2 种病原真菌的生长有抑制作用, 抑制效果最好的是正丁醇萃取物, 对番茄灰霉病菌和玉米大斑病菌生长的抑制率分别高达 59.80% 和 58.37%, 而其余 3 种有机溶剂萃取物的抑菌率较小 (表 4)。

2.2.3 滤纸片法复检的抑菌效果 菌株 LB-1 培养液的硫酸铵沉淀物、盐酸沉淀物和有机溶剂萃取物, 其抑菌活性的滤纸片法复检结果与含毒培养基法检测结果相似, 在含有硫酸铵沉淀物、盐酸沉淀

表 3 菌株 LB-1 培养液的硫酸铵沉淀物和盐酸沉淀物对病原菌生长的抑制效果

Table 3 Inhibitory effects of ammonium sulfate precipitation and hydrochloric acid precipitation of culture broth of strain LB-1 on the growth of plant pathogens

处理 Treatment	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>		玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	
	菌落直径/mm	抑制率 ¹⁾ /%	菌落直径/mm	抑制率 ¹⁾ /%
	Diameter of colony	Inhibition rate	Diameter of colony	Inhibition rate
硫酸铵沉淀	60.33±1.53	1.24a	62.17±2.02	2.15a
Ammonium sulfate precipitate				
PBS缓冲液	59.67±1.61	2.23a	62.83±1.15	1.20a
PBS buffer solution				
盐酸沉淀	60.50±1.50	0.99a	63.17±1.04	0.72a
Hydrochloric acid precipitate				
磷酸缓冲液	60.67±1.61	0.74a	62.83±1.15	1.20a
Phosphate buffer solution				
空白对照	61.17±1.26		63.67±1.53	
Blank control				

1)同列数据后的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, LSD法)
1)Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$, LSD method)

表 4 菌株 LB-1 培养液的有机溶剂萃取物及水相对病原菌生长的抑制效果

Table 4 Inhibitory effects of organic extracts and its aqueous phase of culture broth of strain LB-1 on the growth of plant pathogens

处理 Treatment	番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>		玉米大斑病菌 <i>Exserohilum turcicum</i>	
	菌落直径/mm	抑制率 ¹⁾ /%	菌落直径/mm	抑制率 ¹⁾ /%
	Diameter of colony	Inhibition rate	Diameter of colony	Inhibition rate
正丁醇粗提物	21.00±1.32	59.80a	23.00±1.80	58.37a
Crude extract of n-butanol				
乙酸乙酯粗提物	47.67±1.26	20.10b	50.00±1.32	19.62b
Crude extract of ethyl acetate				
石油醚粗提物	51.17±1.89	14.89c	54.67±0.38	12.92c
Crude extract of petroleum ether				
三氯甲烷粗提物	49.17±2.02	17.87bc	52.67±1.26	15.79c
Crude extract of chloroform				
正丁醇水相	60.00±1.00	1.74d	63.17±1.76	0.72d
Aqueous phase of n-butanol				
乙酸乙酯水相	60.33±1.89	1.24d	63.00±1.80	0.96d
Aqueous phase of ethyl acetate				
石油醚水相	59.67±0.76	2.23d	62.83±2.02	1.20d
Aqueous phase of petroleum ether				
三氯甲烷水相	59.17±2.25	2.98d	62.36±1.30a	1.88d
Aqueous phase of chloroform				
二甲基亚砜	59.83±1.44	1.99d	62.41±1.36	1.81d
Dimethylsulfoxide				
空白对照	61.17±1.26		63.67±1.53	
Blank control				

1)同列数据后的不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$, LSD法)
1) Different lowercase letters in the same column indicate significant difference ($P < 0.05$, LSD method)

物的滤纸片周围无透明区域,而在含有有机溶剂萃取物的滤纸片周围有不同程度的透明区域,其中以正丁醇萃取物的透明区域表现最为明显(图 1),表明菌株 LB-1 培养液中的抑菌物质可通过有机溶剂萃取,正丁醇是萃取菌株 LB-1 培养液抑菌物质的最佳有机溶剂。

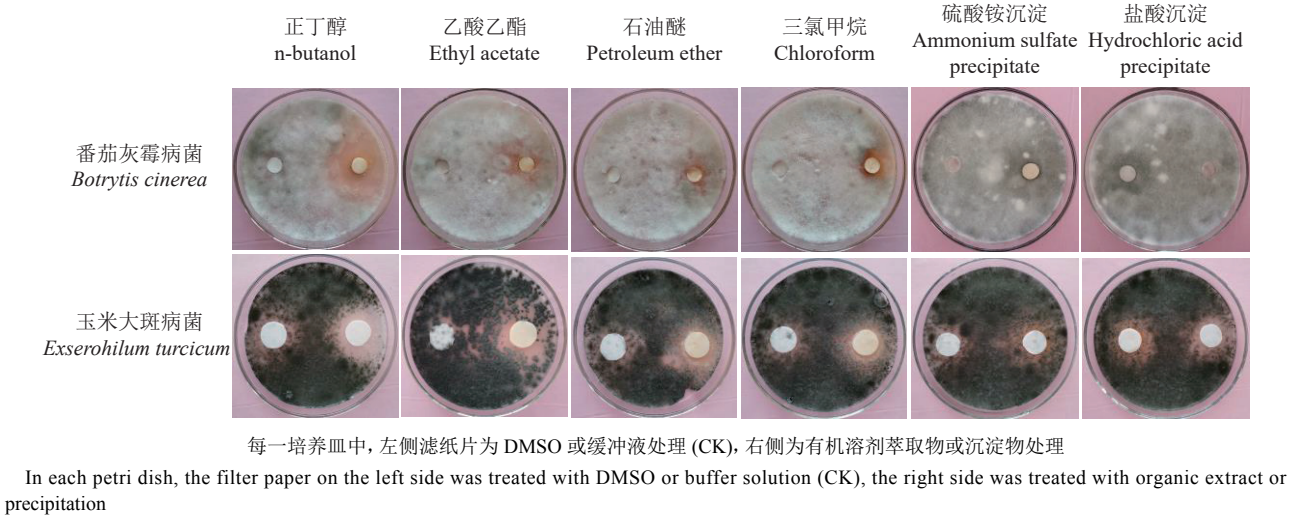


图 1 滤纸片法检测的菌株 LB-1 培养液不同提取物对病原菌生长的抑制效果

Fig. 1 Antifungal effects of different extracts from culture broth of strain LB-1 on the growth of plant pathogens by filter paper disc assay

3 讨论与结论

赵德立等^[11]、梁建根等^[12]通过菌体超声破碎提取、培养液盐析沉淀和有机溶剂萃取研究芽孢杆菌菌株 BH-2 和 JW-725 产生的抑菌物质, 结果发现这些菌株产生的抑菌物质均存在于培养液中, 而菌体破碎提取的胞内物不具有抑菌活性。本研究的结果与前人的研究结果相似, 菌株 LB-1 的菌体超声破碎提取物无抑菌活性, 但是其培养液能够明显抑制 2 种供试病原真菌的生长, 说明菌株 LB-1 产生的抑菌物质可分泌到菌体细胞外的培养液中发挥其生防作用。菌株 LB-1 胞内物无明显的抑菌活性, 可能是抑菌物质在胞内存在量极少难以检测到, 也可能是抑菌物质在胞内产生后立即通过某种途径分泌到细胞外, 这些问题还有待于进一步研究。

生防菌产生的抑菌物质可能是挥发性的, 也可能是非挥发性的^[13, 23]。Toghueo 等^[24]通过平板密封培养检测、乙酸乙酯萃取和琼脂孔检测发现, 绿色木霉 *Trichoderma atroviridae* 能够产生抑制腐皮镰刀菌的挥发性和非挥发性抗菌物质, 但 Munjal 等^[25]从巨大芽孢杆菌 *Bacillus megaterium* BP17 中仅检测到了挥发性抑菌物质。本研究通过平板密封培养未检测到菌株 LB-1 产生挥发性抑菌物质, 但其培养液有明显抑菌效果, 表明菌株 LB-1 产生的是非挥发性抑菌物质。

盐析沉淀、酸沉淀和有机溶剂萃取是生防菌代谢活性物质提取的常见方法。盐析沉淀主要利用抑菌物质在饱和盐溶液中析出的特点分离蛋白类物质, 酸沉淀主要用来分离大分子脂肽类物质, 而有机溶剂萃取是利用物质在 2 种互不相溶的溶剂中

分配系数或溶解度的差异从而对抑菌物质进行分离^[7]。萃取生防菌抑菌物质的有机溶剂通常有正丁醇、乙酸乙酯、石油醚、三氯甲烷、二氯甲烷、正己烷、石油醚等, 其中正丁醇极性最大^[26]。本研究结果发现, 菌株 LB-1 培养液中的抑菌物质可用有机溶剂萃取, 而硫酸铵沉淀和盐酸沉淀不能获得菌株 LB-1 培养液中的抑菌物质, 且有机溶剂萃取后的水相也没有明显抑菌活性, 推测菌株 LB-1 产生的抑菌物质不属于蛋白和脂肽类, 而且不溶于水。

毛壳菌是一类能够产生丰富代谢物质的生防菌类群, 目前已从球毛壳中获得了抗菌物质 chaetoviridin^[27]、chaetomugilin^[28]、chaetoglobosin^[29-30]等, 从角毛壳中获得了卵孢菌素^[31]。本研究发现, 近缘毛壳 LB-1 培养液正丁醇萃取物具有较强的抗菌活性, 因此, 需要对菌株 LB-1 培养液正丁醇萃取物进行分离、提纯和鉴定, 以确定其活性成分和结构; 同时还要研究该抑菌物质对植物病害的防治作用, 从而为研究菌株 LB-1 生防菌剂防治植物病害奠定基础。

参考文献:

[1] HUANG P M, WATTANACHAI P, KASEM S, et al. Efficacy of *Chaetomium* species as biological control agents against *Phytophthora nicotianae* root rot in citrus[J]. *Mycobiology*, 2015, 43(3): 288-296.

[2] 万 慧, 刘晓光, 曹荣花, 等. 螺旋毛壳 ND35 抗生素的产生及其在病害生物防治中的作用[J]. *植物保护学报*, 2007, 34(1): 51-56.

[3] 刘永亮, 尹成林, 田叶韩, 等. 拮抗真菌 HTC 的鉴定及其对辣椒疫病的生物防治潜力[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(5): 437-444.

[4] SOYTONG K, KANOKMEDHAKUL S,

- KUKONGVIRIYAPA V, et al. Application of *Chaetomium* species (Ketomium[®]) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article[J]. *Fungal Diversity*, 2001, 7: 1-15.
- [5] 张蕊, 田叶韩, 李超, 等. 球毛壳菌 ND35 对黄瓜种子萌发和胚根生长的影响[J]. *北方园艺*, 2020(23): 1-9.
- [6] FATIMA N, MUHAMMAD S A, KHAN I, et al. *Chaetomium* endophytes: A repository of pharmacologically active metabolites[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2016, 38(6): 1-18.
- [7] 梁海林, 童志武, 朱 筠. 球毛壳菌次级代谢产物及其生物活性研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2018, 30: 702-707.
- [8] 印容, 高慧娟, 赵秀云. 球毛壳菌及其产生的鞘氨醇对油菜根肿病的室内生防作用[J]. *华中农业大学学报*, 2016, 35(5): 58-62.
- [9] SHYLAJA G, SASIKUMAR K, SATHIAVELU A. Antimycobacterial potential of resorcinol type lipid isolated from *Chaetomium cupreum*, an endophytic fungus from *Mussaenda luteola*[J]. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 2018, 13: 114-119.
- [10] GUO Q F, YIN Z H, ZHANG J J, et al. Chaetomadrasin A and B, two new cytotoxic cytochalasins from desert soil-derived fungus *Chaetomium madrasense* 375[J]. *Molecules*, 2019, 24(18): 3240-3249.
- [11] 赵德立, 曾林子, 李 晖, 等. 多粘芽孢杆菌 JW-725 抗菌活性物质及其发酵条件的初步研究[J]. *植物保护*, 2006, 32(1): 47-50.
- [12] 梁建根, 吴吉安, 竺利红, 等. 生防菌 BH-2 发酵液中抑菌成分的定位及提取研究[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(11): 324-327.
- [13] LANDUM M C, DO ROSÁRIO FÉLIX M, ALHO J, et al. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L. against *Colletotrichum acutatum*[J]. *Microbiological Research*, 2016, 183: 100-108.
- [14] SILVA M, PEREIRA A, TEIXEIRA D, et al. Combined use of NMR, LC-ESI-MS and antifungal tests for rapid detection of bioactive lipopeptides produced by *Bacillus*[J]. *Advances in Microbiology*, 2016, 6: 788-796.
- [15] 许乐, 王子强, 张 爽, 等. 丹参根腐病拮抗细菌筛选、鉴定及生防机理研究[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 37(4): 846-854.
- [16] 杨廷雅, 孙 亮, 周婷婷, 等. 短短芽孢杆菌 *Brevibacillus brevis* HAB-5 主要抑菌活性成分的分析及其特性研究[J]. *中国生物防治学报*, 2021, 30(2): 222-231.
- [17] PHONG N H, PONGNAK W, SOYTONG K. Antifungal activities of *Chaetomium* spp. against *Fusarium* wilt of tea[J]. *Plant Protection Science*, 2016, 52(1): 10-17.
- [18] YAN W, CAO L L, ZHANG Y Y, et al. New metabolites from endophytic fungus *Chaetomium globosum* CDW7[J]. *Molecules*, 2018, 23(11): 1-7.
- [19] 刘彩云, 季洪亮, 王 瑞, 等. 生防菌株 LB-1 对几种常见植物病原真菌的拮抗作用及其生长适应性分析[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(2): 332-339.
- [20] 罗 琳, 周玲璇, 刘 娅. 毕赤酵母 G5 拮抗葡萄灰霉病机理初探[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(9): 210-215.
- [21] 周 瑚, 邹秋霞, 胡 玲, 等. 特基拉芽孢杆菌 JN-369 的分离鉴定及其抑菌物质分析[J]. *农药学报*, 2019, 21(1): 52-58.
- [22] 马桂珍, 吴少杰, 付泓润, 等. 海洋放线菌 BM-2 菌株抗真菌活性物质的分离纯化与结构鉴定[J]. *中国生物防治学报*, 2014, 30(3): 393-401.
- [23] JUNIOR W J F L, BOVO B, NADAI C, et al. Biocontrol ability and action mechanism of *Starmerella bacillaris* (Synonym *Candida zemplinina*) isolated from wine musts against gray mold disease agent *Botrytis cinerea* on grape and their effects on alcoholic fermentation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1-12.
- [24] TOGHUEO R M K, EKE P, ZABALGOGUEAZCOA I, et al. Biocontrol and growth enhancement potential of two endophytic *Trichoderma* spp. from *Terminalia catappa* against the causative agent of common bean root rot (*Fusarium solani*)[J]. *Biological Control*, 2016, 96: 8-20.
- [25] MUNJAL V, NADAKKAKATH A V, SHEORAN N, et al. Genotyping and identification of broad spectrum antimicrobial volatiles in black pepper root endophytic biocontrol agent, *Bacillus megaterium* BP17[J]. *Biological Control*, 2016, 92: 66-76.
- [26] MCMULLIN D R, SUMARAH M W, BLACKWELL B A, et al. New azaphilones from *Chaetomium globosum* isolated from the built environment[J]. *Tetrahedron Letters*, 2013, 54: 568-572.
- [27] PARK J H, CHOI G J, JANG K S, et al. Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 252(2): 309-313.
- [28] YAMADA T, MUROGA Y, JINNO M, et al. New class azaphilone produced by a marine fish-derived *Chaetomium globosum*: The stereochemistry and biological activities[J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2011, 19(13): 4106-4113.
- [29] JIAO W X, FENG Y J, BLUNT J W, et al. Chaetoglobosins Q, R and T, three further new metabolites from *Chaetomium globosum*[J]. *Journal of Natural Products*, 2004, 67(10): 1722-1725.
- [30] ZHENG Q C, KONG M Z, ZHAO Q, et al. Chaetoglobosin Y, a new cytochalasin from *Chaetomium globosum*[J]. *Fitoterapia*, 2014, 93: 126-131.
- [31] 何海清, 钟 娟, 周金燕, 等. 角毛壳菌 CH-1 产生的抗真菌活性化合物的纯化和鉴定[J]. *中国生物防治学报*, 2015, 31(4): 592-597.