

森林假单胞菌抑菌物稳定性及其成分分析*

梁文洪^{1,2} 赵倩^{1,3} 张良军¹ 赖国栋¹
凌斯全¹ 何静³ 徐金柱¹ 田龙艳¹(1. 广东省森林培育与保护利用重点实验室/广东省林业科学研究院, 广东 广州 510520;
2. 德庆县森林病虫害防治检疫站, 广东 肇庆 526600; 3. 甘肃农业大学 林学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要 森林假单胞菌 *Pseudomonas silvicola* 菌株 T1-3-2 对杉木炭疽病具有较强的防治效果, 为将其研发为林木炭疽病的生防制剂, 需进一步探明该菌抑菌谱、抑菌物质稳定性以及主要成分等, 以补充完善该菌的生防理论。文章通过平板对峙法、菌丝生长速率法、液相色谱/线性离子阱-静电场轨道阱高分辨质谱法 (UPLC/LTQ-Orbitrap MS) 和气相色谱-质谱法 (GC-MS) 分析了该菌的抑菌谱、抑菌物质的稳定性以及主要成分。结果表明, 菌株 T1-3-2 对 9 株供试病原真菌均具有较好的抑菌活性, 尤其对包括杉木炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 在内的多种林木炭疽病菌表现出较强的抑菌作用, 抑制率均达到 65% 以上; 其代谢产物粗提物对杉木炭疽病菌的孢子萌发和菌丝生长具有明显抑制作用; 温度 ≤ 70 °C、酸碱度以及紫外辐射对粗提物抑菌效果均无显著影响, 但高温处理 ($T > 70$ °C) 对抑菌效果影响显著; 粗提物主要含有 14 种化合物, 其中包含假单胞菌常见的 4 种吩嗪类抑菌物质, 即吩嗪、1, 6-二羟基吩嗪、10-乙酰基-3, 7-二羟基吩嗪和绿脓菌素; 挥发性气体 (VOCs) 中包含: 苯类、烯烃类、酮类等 13 种化合物。菌株 T1-3-2 具广谱抑菌特性, 其粗提物稳定性较好且具较强抑菌活性, 该菌株及其代谢物在林木炭疽病的防治中有很好的应用前景。

关键词 森林假单胞菌; 抑菌物质; 稳定性

中图分类号: S718.83 文献标志码: A 文章编号: 2096-2053 (2023) 06-0001-10

Stability and Composition Analysis of Antifungal Substances
of *Pseudomonas silvicola*LIANG Wenhong^{1,2} ZHAO Qian^{1,3} ZHANG Liangjun¹ LAI Guodong¹
LING Siqian¹ HE Jing³ XU Jinzhu¹ TIAN Longyan¹(1. Guangdong Provincial Key Laboratory of Silviculture, Protection and Utilization/Guangdong Academy of Forestry,
Guangzhou, Guangdong 510520, China;

2. Forest Pest Control and Quarantine Station of Deqing County, Deqing, Guangdong 526600, China;

3. Forestry College of Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract *Pseudomonas silvicola* T1-3-2 has stronger antagonistic effects on Chinese fir anthracnose. It is necessary to explore its inhibition spectrum, antifungal activity, and stability to implement the utilization and improve its biocontrol theory. In this study, its inhibition spectrum, the stability, and the main components of

* 基金项目: 广东省林业科技创新项目 (2023KJCX020), 国家自然科学基金 (32060341)。

第一作者: 梁文洪 (1974—), 男, 高级工程师, 主要从事森林病害防治检疫工作, E-mail: 479960658@qq.com。

通信作者: 田龙艳 (1989—), 女, 副研究员, 主要从事林木病害生物防治研究, E-mail: tianlongyan@sinogaf.cn。

the antifungal substance were analyzed by the plate confrontation method, mycelium growth rate method, and UPLC/LTQ-Orbitrap MS and GC-MS. The results showed that T1-3-2 had stronger antifungal activity against 9 pathogenic fungi, especially with an inhibition rate of more than 65% against anthracnose of *Cunninghamia lanceolata* and other trees. The crude extracts had a significant inhibitory on the spore germination and mycelial growth of *C. gloeosporioides*. They were substantially stable after the different treatments with pH, ultraviolet light, and temperature below 70 °C in the antifungal tests. The crude extract of strain T1-3-2 contains 14 compounds, including 4 kinds of phenazine and its derivatives (phenoxazine, 1, 6-dihydroxyphenazine, 10-acetyl-3, 7-dihydroxyphenazine, pyocyanin) of main antifungal substances reported in *Pseudomonas*. Volatile gases (VOCs) contain 13 compounds such as benzene, olefins, ketones, and so on. The strain T1-3-2 has broad-spectrum antifungal properties, and its crude extract had substantial stability and stronger antifungal activity, it shows that the strain and its metabolites have good application prospects in the prevention and control of forest anthracnose.

Key words *Pseudomonas silvicola*; Antifungal substance; Stability

杉木 *Cunninghamia lanceolata* 是我国长江以南地区主要速生用材树种之一,具有较高的经济价值^[1]。近些年频繁发生的真菌性病害严重影响杉木的健康生长^[2]。其中,炭疽菌属 *Colletotrichum* spp. 多种病原真菌引起的杉木炭疽病在栽培区普遍发生。杉木炭疽病常见发生于针叶、果实、枝干、幼苗甚至整株植物,常导致针叶、球果变褐枯死,危害严重时造成植株死亡^[3]。目前炭疽病的防治主要依赖于化学药剂,但化学药剂的频繁使用,致使农药残留、病原菌株耐药性等问题日益凸显^[3-6]。因此,寻找安全、无污染的防控措施已成为当务之急。生物防治由于其安全、经济、环保等优点成为病害绿色防控的研究热点。

假单胞菌属 *Pseudomonas* spp. 及其抑菌活性物质作为生物防治剂 (Biological control agents, BCAs) 用于真菌病害防治成效显著,其产生的 2, 4-二乙酰基间苯三酚 (2, 4-DAPG)、吩嗪 (PHZ) 及其衍生物、硝吡咯菌素 (PRN) 和氢氰酸 (HCN) 等抑菌活性产物在抑菌过程中起到重要作用^[7-11]。抑菌活性物质相较于菌株自身而言受限因素较少,可作为环境友好型微生物农药资源直接使用,安全环保,在林木病害防治中发挥着重要作用,受到广泛关注。

前期研究发现森林假单胞菌 *P. silvicola* 菌株 T1-3-2 对杉木炭疽病菌具有较强抑制作用^[4,12]。本文进一步完善了其抑菌谱,对其产生的抑菌物成分及其稳定性进行了分析,研究结果为应用该生

防菌防治林木炭疽病、开发新型生物农药的研制奠定了理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试拮抗菌:森林假单胞菌 *P. silvicola* T1-3-2, 保存于广东省微生物菌种保藏中心,菌株编号为 GDMCC 61843, 其 16S rRNA 基因序列 GenBank 登录号为 OM 920535。

供试病原真菌:杉木炭疽病菌 *Colletotrichum* spp. 菌株 T3-2-1 和 T3-4-1, 无瓣海桑炭疽病菌 *C. gloeosporioides* 菌株 wbhs-yb-2-1、wbhs-yk-1-1、油茶炭疽病菌 *Colletotrichum* spp. 菌株 B3-2 和 B0-2、木棉炭疽病菌 *Colletotrichum* sp. 菌株 MM-YB-1、细叶榕褐根病菌 *Phellinus noxius* 菌株 L1-0-2、杉木根腐病菌 *Fusarium* sp. 菌株 SM-LK-1, 均由广东省森林培育与保护利用重点实验室提供。

供试培养基: PDA、LB 和 KMB 培养基, TYB 培养基^[4]。

主要试剂: DNA Marker、Taq DNA 聚合酶 (2 × San Taq PCR Mix)、琼脂糖、TAE 缓冲液购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, CFW 荧光染色剂 (Calcofluor White Stain; CFW) 购自西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司。

主要设备: 线性离子阱-静电场轨道阱高分辨液质 (LTQ ORBITRAP VELOS PRO), 美国 Thermo Fisher Scientific; 高效液相色谱仪 (UltiMate 3000 UHPLC), 美国 Thermo Fisher Scientific; 气

相色谱-质谱联用仪 (8890-5977B GCMS), 美国 Agilent; 振荡培养箱, 上海知楚仪器有限公司; PCR 仪智能恒温循环器, 北京德天佑科技发展有限公司; 人工气候箱, 宁波莱福科技有限公司; 荧光显微镜, 徕卡显微系统 (上海) 贸易有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 抑菌谱及抑菌率的测定 以 T3-2-1 为指示菌, 采用平板对峙法^[4]测定 T1-3-2 在 PDA、LB、KMB 和 TYB 培养基的抑菌效果, 筛选最适抑菌培养基。采用筛选的培养基, 应用平板对峙法测定 T1-3-2 的抑菌谱, 同时采用平板倒扣法^[4]测定 T1-3-2VOCs 的抑菌谱, 计算抑菌率。

1.2.2 粗提物抑菌效果及稳定性测定 将 T1-3-2 在 PDA 上培养 13 d, 去除菌体后冷冻抽干发酵产物, 研磨至粉状, 采用甲醇浸提法^[4]按 1:5 (质量体积比) 提取 T1-3-2 产生的次生代谢产物, 分别将粗提物稀释 150, 300, 600, 1 000 倍, 即使用 $6.7 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $3.3 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.7 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.0 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的粗提物稀释液处理 T3-2-1 孢子悬浮液 ($1.0 \times 10^7 \text{ spores} \cdot \text{mL}^{-1}$), 以无菌水处理作对照, 显微观察粗提物对孢子萌发和菌丝生长的影响。利用 CFW 染色观察菌丝中几丁质的分布情况。

用菌丝生长速率法^[4]测定不同条件处理后粗提物的抑菌活性。用 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 溶液或 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液将粗提物 pH 值分别调至 1.0, 3.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 和 11.0, 置于 4 °C 冰箱过夜; 再将各 pH 值调回初始 pH (pH 7), 用于测定粗提物的酸碱稳定性^[13]。将粗提物置于波长 320 ~ 400 nm 的紫外灯 30 cm 处, 紫外线照射 12、24、36 h 后, 测定粗提物对紫外光的稳定性^[13]。将粗提物分别在 30, 50, 70, 100 °C 水浴加热 30 min, 用于测定粗提物的热稳定性^[13]。以 4 °C 未经处理的粗提物作对照, 每处理 3 个重复。

1.2.3 粗提物成分分析 样品制备: 取粗提物 (0.1 g) 于离心管中, 加入 50% 甲醇水溶液 (体积分数), 45 °C 超声 40 min 后取上清液, $13\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 经微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤后装入进样瓶, 得到分析样品, 以 PDA 培养基浸

提物为空白对照。

液相色谱条件: 色谱柱为 C_{18} (1.8 μm , 2.1 mm \times 100 mm), 以 0.1% 甲酸水溶液 (A) - 0.1% 乙腈水溶液 (B) 为流动相, 梯度洗脱, 程序如表 1。流速为 $0.4 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温为 45 °C; 进样量为 4 μL 。

质谱条件: 质量分析器 Orbitrap-MS, 电喷雾离子源 (H-ESI), 正离子模式 (ESI⁺), 扫描范围: m/z 50-900, 离子传输管温度 350 °C, 毛细管电压 35 V, 鞘气流速 35 单位, 辅助气流速 10 单位, 喷雾电压 4 kV, 二级采用动态数据依赖性扫描 (data dependent scan), 选取上一级丰度前三强的峰进行碰撞诱导解离 (CID) 碎片扫描, 以离子阱打拿极 (dynode) 检测。

表 1 流动相梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution procedure of mobile phase

时间/min Time	流动相比例/% Ratio of mobile phase	
	A	B
0.00	95	5
1.00	95	5
30.00	5	95
32.00	5	95
32.10	95	5
35.00	95	5

1.2.4 VOCs 成分分析 将 T1-3-2 接入 PDA 平板, 30 °C 密封培养 5 d, 采用固相微萃取顶空吸附 VOCs, GC-MS 检测 VOCs 的组分。以 PDA 板 VOCs 为对照。

气相色谱条件: 色谱柱 Agilent HP-5MS; 色谱程序: 初始温度 40 °C, 保持 1 min; $8 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 200 °C, 保持 1 min, $20 \text{ } ^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 280 °C 保持 10 min。质谱条件: EI 70 eV, 离子源 230 °C, 四极杆 150 °C, 35 ~ 800 amu 全扫描。将得到的挥发性成分质谱图与 NIST08.LIB 谱库对比, 查阅相关资料, 结合峰面积归一法得到各成分的相对百分含量^[14]。

1.3 统计分析

采用 SPSS 单因素方差分析和 Duncan 多重比较方法进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 T1-3-2 抑菌最适培养基

对峙试验结果显示：在不同培养基上菌株 T1-3-2 对炭疽病菌 T3-2-1 的抑菌活性依次为：PDA > LB > KMB > TYB (图 1a)；在 PDA 培养基上，T1-3-2 对 T3-2-1 的抑制效果最好，抑制率为 74.60% (图 1b)。因此，以 PDA 培养基作为 T1-3-2 的发酵培养基。

2.2 T1-3-2 的抑菌谱

平板对峙试验结果显示：T1-3-2 对 9 株林木病原真菌均有较强的抑制作用 (图 2a)，抑制率均达 65% 以上。其中对 7 株炭疽病菌 T3-2-1、T3-4-1、MM-YB-1、wbhs-yb-2-1、wbhs-yk-1-1、B3-2 和 B0-2 的抑制率达 75% 以上 (图 2b)，说明该菌株对常见林木炭疽病菌抑制效果显著。

平板倒扣试验结果显示：T1-3-2 的 VOCs 对炭疽病菌 T3-2-1 和 MM-YB-1 抑制作用较强，抑制率达 70% 以上，对其它菌株抑制效果不明显，抑制率为 10% ~ 40% (图 2b)。平板对峙试验和平皿倒扣试验中，菌株 T1-3-2 对杉木炭疽病菌 T3-2-1 拮抗作用最强。因此，以杉木炭疽病菌 T3-2-1 为指示菌进行后续研究。

由此可见，菌株 T1-3-2 及其 VOCs 对多株病原真菌均有表现出良好的抑菌效果，抑菌谱广。

2.3 T1-3-2 粗提物对杉木炭疽病菌 T3-2-1 生长的影响

孢子萌发试验结果表明：粗提物在一定浓度下可有效抑制杉木炭疽病菌孢子的萌发。即：粗提物浓度在 1.7×10^{-3} 至 $6.7 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间可有效抑制分生孢子萌发，在粗提物浓度达到 $6.7 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 基本完全抑制分生孢子萌发，抑制率可达 98% (表 2)。随着浓度降低抑制率显著降低，浓度低于 $1.0 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时与对照组无显著差异。

显微观察发现：对照组中孢子正常萌发，菌丝几丁质分布正常，细胞隔膜和菌丝尖端分布较多 (图 3a、b)；与对照组相比，经 $6.7 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的粗提物处理后，杉木炭疽病菌孢子明显畸形，不能萌发或萌发之后芽管畸形 (图 3c、d)。这表明高浓度粗提物影响了细胞内几丁质的分布，抑制了炭疽病菌孢子的萌发和菌丝的正常生长。

表 2 粗提物对炭疽病菌 T3-2-1 孢子萌发抑制效果

Tab. 2 Inhibition effect of crude extract on spore germination of strain T3-2-1

稀释倍数 Dilution ratio	质量浓度/ $(\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$ Concentration	抑制率/% Inhibition rate
150	6.7×10^{-3}	$98.00 \pm 2.20 \text{ a}$
300	3.3×10^{-3}	$35.04 \pm 5.67 \text{ b}$
600	1.7×10^{-3}	$17.58 \pm 3.27 \text{ c}$
1 000	1.0×10^{-3}	$3.61 \pm 2.80 \text{ d}$
CK	0	-

注：图中不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The different lowercase letter means significant difference ($P < 0.05$).

2.4 T1-3-2 粗提物的稳定性测定

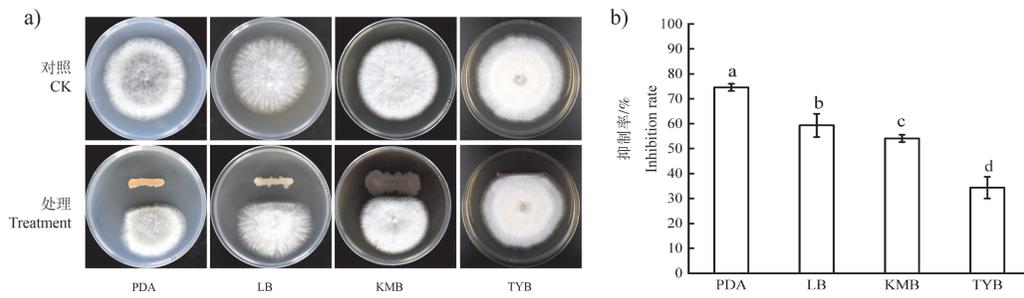
对 T1-3-2 粗提物的稳定性进行研究，结果表明：不同 pH、紫外线照射以及温度低于 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 处理时，粗提物抑菌效果稳定。经不同 pH 处理和不同时长紫外光照射后，粗提物对 T3-2-1 抑制率为 80% ~ 90%，与对照差异不显著 (图 4a、b)。经 $70 \text{ }^\circ\text{C}$ 及以下温度处理后的粗提物对 T3-2-1 抑制率为 80% ~ 90%，但经 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 温度处理后，其抑菌活性有明显下降，抑制率为 76% (图 4c)。

2.5 T1-3-2 粗提物 UPLC/LTQ-Orbitrap MS 分析

正离子模式下通过对 T1-3-2 粗提物中各化学成分保留时间 (RT) 和质谱信息进行分析，最终获得包括具抑菌活性的 2, 4-二乙酰基藤黄酚、3, 4-二氯- α -苯基-4'-[2-(1-吡咯烷基)乙氧基]查耳酮、根皮乙酰苯-4'-O-葡萄糖苷、吩嗪、1, 6-二羟基吩嗪、10-乙酰基-3, 7-二羟基吩嗪、绿脓菌素、根赤壳菌素和 4-羟基查耳酮在内的化合物共 14 种 (图 5、表 3)，其中吩嗪、1, 6-二羟基吩嗪、10-乙酰基-3, 7-二羟基吩嗪、绿脓菌素 4 种吩嗪类化合物为假单胞属拮抗菌已经报道的主要抑菌物质。

2.6 T1-3-2 VOCs GC-MC 分析

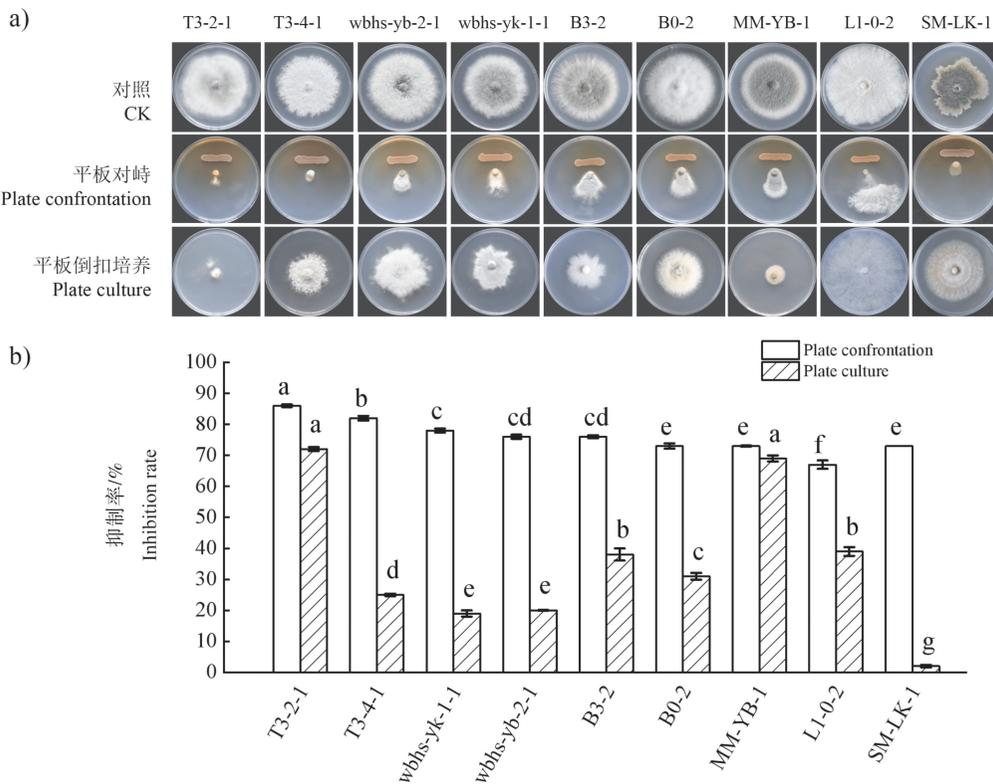
VOCs 经 GC-MC 分析，结果与标准图谱比对，按照 CPS (counts per second) $> 10^6$ ，鉴定可信度大于 90% 标准，排除 PDA 与 T1-3-2 + PDA 中的共有物质，共获得 13 种挥发性物质，依据化合物不同性质分为 2 种苯类、5 种烯炔类、2 种酮类、1 种菊环和 3 种未知化合物 (图 6、表 4)。



注：图中不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
 Note: The different lowercase letter means significant difference ($P < 0.05$).

图 1 T1-3-2 在不同培养基对炭疽病菌 T3-2-1 的抑菌效果及其抑制率

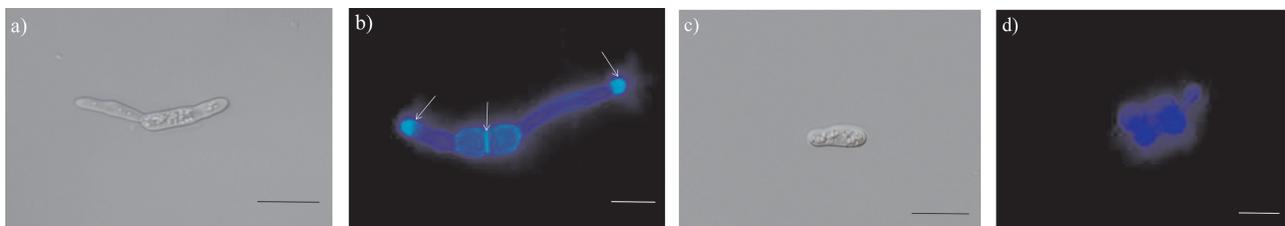
Fig. 1 The antifungal effect and inhibition rate of strain T1-3-2 on T3-2-1 in different culture



注：图中不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。
 Note: The different lowercase letter means significant difference ($P < 0.05$).

图 2 T1-3-2 对病原真菌的抑菌效果及其抑制率

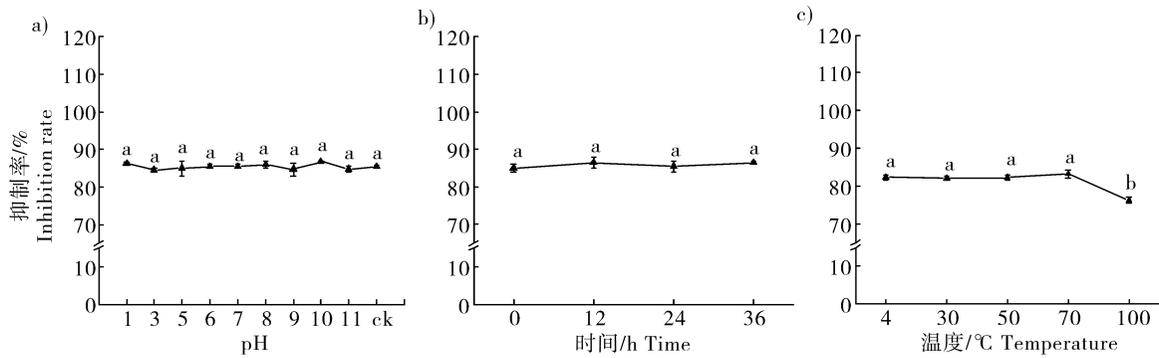
Fig. 2 The antifungal effect and inhibition rate of strain T1-3-2 on pathogenic fungi



注：a、b：对照，c、d：处理，标尺 = 10 μm 。
 Note: a, b: control, c, d: Treatment, bar = 10 μm .

图 3 粗提物对炭疽病菌 T3-2-1 孢子萌发的抑制效果

Fig. 3 Effect of crude extract on spore germination of strain T3-2-1



注：图中不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

Note: The different lowercase letter means significant difference ($P < 0.05$).

图4 不同 pH、紫外线和温度的粗提物抑菌活性差异

Fig. 4 The difference of antibacterial activity of crude extracts with different pH, ultraviolet, and temperature

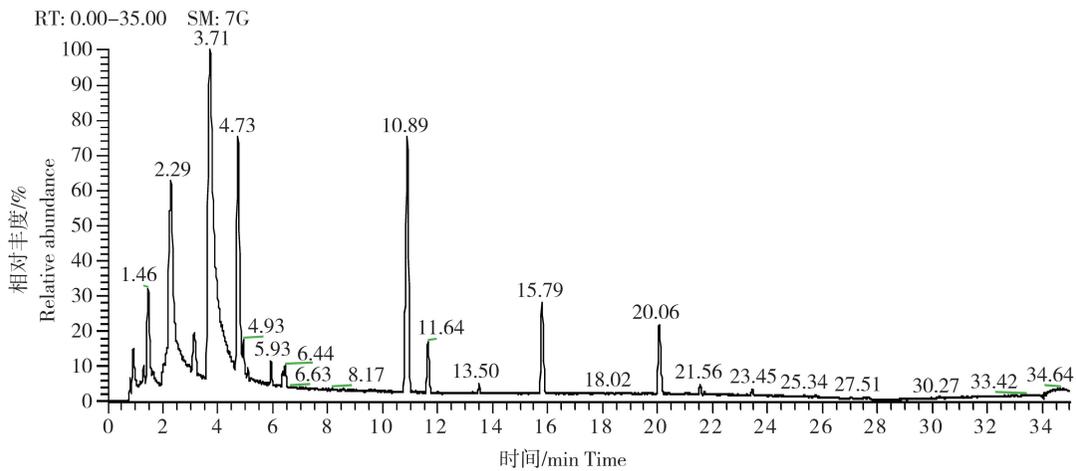


图5 粗提物正离子模式下总离子流

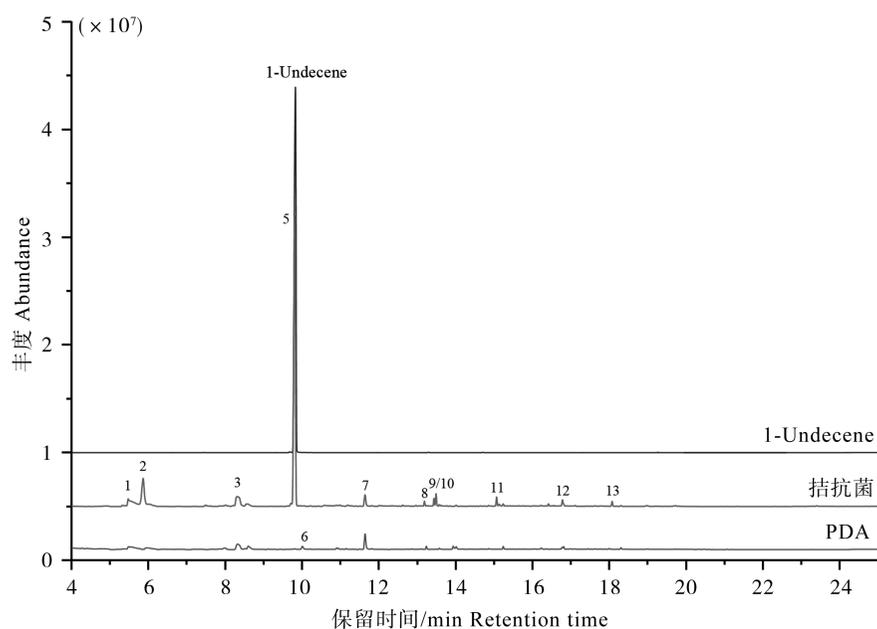
Fig. 5 Total ion current diagram of crude extract in positive ion mode

表3 T1-3-2 粗提物成分

Tab. 3 Components of crude extracts from T1-3-2

序号 NO.	化合物 Compound	分子式 Formula	质荷比/ (m/z) Apex	质量精度/ (mg · L ⁻¹) (m/z) Delta	相对含量/% Relative content	保留时间 /min RT
1	间苯三酚 Phloroglucinol	C ₆ H ₆ O ₃	127.038 36	-4.796 99	20.49	2.29
2	乙酰基间苯三酚 Phloroacetophenone	C ₈ H ₈ O ₄	169.048 71	-4.933 14	29.88	4.73
3	2, 4-二乙酰基藤黄酚 2, 4-Diacetylphloroglucinol	C ₁₀ H ₁₀ O ₅	211.059 14	-4.533 94	3.76	4.93
4	3, 4-二氯- α -苯基-4'-[2-(1-吡咯烷基)乙氧基]查耳酮 3, 4-Dichloro- α -phenyl-4'-[2-(1-pyrrolidinyl) ethoxy] chalcone	C ₂₇ H ₂₅ Cl ₂ NO ₂	225.090 09	-4.096 61	1.16	5.93

序号 NO.	化合物 Compound	分子式 Formula	质荷比/ (m/z) Apex	质量精度/ (mg · L ⁻¹) (m/z) Delta	相对含量/% Relative content	保留时间 /min RT
5	根皮乙酰苯-4'-O-葡萄糖苷 Acetylphenyl-4'-O-glucoside from root bark	C ₁₄ H ₁₈ O ₉	331.101 07	-3.883 33	1.46	6.44
6	邻乙酰氨基酚 O-acetamidophenol	C ₈ H ₉ NO ₂	152.069 95	-4.364 49	1.36	6.63
7	吩嗪 Phenoxazine	C ₁₂ H ₈ N ₂ O ₂	181.075 21	-4.470 1	0.50	6.63
8	1, 6-二羟基吩嗪 1, 6-dihydroxyphenazine	C ₁₅ H ₁₁ NO ₃	213.065 09	-3.548 23	6.69	8.17
9	7-(戊氧基)-3H-吩恶嗪-3-酮 7-(pentoxy)-3H-phenoxazin-3-ketone	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃	284.126 98	-3.999 45	0.09	10.89
10	10-乙酰基-3, 7-二羟基吩嗪 10-Acetyl-3, 7-dihydroxyphenazine	C ₁₄ H ₁₁ NO ₄	258.075 04	-4.019 26	0.32	11.64
11	绿脓菌素 Pyocyanin	C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O	211.085 89	-3.308 01	4.10	13.5
12	根赤壳菌素 Radicalol	C ₁₈ H ₁₇ ClO ₆	365.078 4	-0.658 33	27.88	15.79
13	赤芝萜酮 Lucidone	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	257.079 83	-3.913 23	0.56	20.06
14	4-羟基查耳酮 4-Hydroxychalcone	C ₁₅ H ₁₂ O ₂	225.090 09	-4.096 61	1.75	21.56



注：1-Undecene：1-十一烯标准品离子流色谱图；拮抗菌：T1-3-2 VOCs 离子流色谱图；PDA：PDA VOCs 离子流色谱图。
 Note: 1-Undecene: 1-undecene standard ion chromatogram; antagonistic bacteria: VOCs ion current chromatogram of strain T1-3-2; PDA: PDA VOC_s ion current chromatogram.

图6 T1-3-2 VOCs 的 GC-MS 总离子流色谱
 Fig. 6 GC-MS total ion chromatogram of VOC_s of strain T1-3-2

表 4 T1-3-2 VOCs 组分
Tab. 4 VOCs components of strain T1-3-2 strain

编号 NO.	保留时间/ min RT	挥发物名称 Volatiles	保留指 数 RI	相似度/% Similarity	峰面积 Peak area ($\times 10^7$)				拮抗菌/PDA 比值 Ratio
					拮抗菌 Antagonistic bacteria	标准 误差 SE	培养基 PDA	标准 误差 SE	
1	5.47	对二甲苯 Paraxylene	870	97	1.37	0.86	1.29	0.54	1.06
2	5.86	1-壬烯 1-Nonene	892	95	2.36	2.02	0.69	0.33	3.42
3	8.3	1, 4-二氯苯 1, 4-Dichlorobenzene	1 017	97	3.88	0.51	3.34	0.71	1.16
4	8.54	未知 Not identified	1 030	90	0.47	0.25	1.67	1.09	0.28
5	9.84	1-十一烯 1-Undecene	1 096	99	63.84	8.47	0.16	0.01	399.00
6	10.00	紫苏烯 Perillene	1 105	96	Tr	Tr	0.42	0.18	-
7	11.64	奥昔菊环 Azulene	1 193	95	2.85	0.58	2.32	0.55	1.23
8	13.18	(Z)-环十二烯 (Z)-Cyclododecene	1 279	-	0.61	0.12	0.28	0.09	2.18
9	13.43	1-十三烯 1-Tridecene	1 294	99	0.93	0.21	Tr	Tr	-
10	13.48	2-十一酮 2-Undecanone	1 296	97	1.89	0.45	Tr	Tr	-
11	15.06	未知 Not identified	1 391	-	1.53	0.43	Tr	Tr	-
12	16.77	2-十三烷酮 2-Tridecanone	1 499	98	1.61	0.37	0.52	0.08	3.10
13	18.06	未知 Not identified	1 586	-	0.90	0.25	0.16	0.05	5.63

注: Tr 为痕量。

Note: Tr – trace level.

3 讨论与结论

3.1 假单胞菌是一类具有较强生防潜力的细菌类群,能够防治多种植物病害,其产生的多种抗生素^[7]、酶^[15]和挥发物^[16]等抑菌代谢产物,已经用于生物农药的研发^[17]。稳定的抑菌物不仅利于工业化的大量生产,也能保证其在田间施用达到良好防效。有报道显示,假单胞菌对番茄匍柄霉 *Stemphylium lycopersici* (Enjoji) Yamamoto^[18]、苹果青霉病菌扩展青霉 *Penicillium expansum*^[19]和

柑桔绿霉病菌 *P. digitatum*^[20]均具有较强抑制作用。本研究发现森林假单胞菌 T1-3-2 对 9 株常见林木病原真菌尤其对是林木炭疽病菌具有较强的抑菌活性,对杉木炭疽病菌 T3-2-1 的抑制效果最优,这表明 T1-3-2 在防治林木炭疽病中具有良好的应用潜力。该菌的粗提物对杉木炭疽病菌有较强的抑制作用,且对温度(低于 70 °C)、紫外光辐射、pH 等均不敏感。抑菌代谢产物进一步的研究开发利用,将对杉木炭疽病的防治大有裨益。

明确拮抗菌主要抑菌物质成分对后期开发和

应用具有重要意义。假单胞菌产生的吩嗪类化合物应用广泛，如绿针假单胞菌 *P. chlororaphis* 分泌的抗生素-申嗪霉素已被应用于实践，其主要抑菌成分为吩嗪-1-羧酸 (PCA)^[20-23]。本研究发现 T1-3-2 粗提物中含有吩嗪、1, 6-二羟基吩嗪、10-乙酰基-3, 7-二羟基吩嗪和绿脓菌素 4 种吩嗪类化合物。在假单胞菌属中，合成 PCA 的基因簇 *phzA-CDEFG*，其中 *phzA*、*phzB* 在 PCA 的合成中并非必需，但在缺少 *phzA*、*phzB* 的条件下 PCA 的合成量会减少^[24-26]。此外，菌株 T1-3-2 也有报道存在 9 个与吩嗪类化合物相关的基因，包括基因 *phzC*、*phzD* (2 个拷贝)、*phzE* 和 *phzG* 参与调控吩嗪类化合物的合成；修饰蛋白基因 *phzH*，共 4 个拷贝^[12]；这些基因参与合成与修饰 4 种吩嗪类化合物生物合成过程，从而使 T1-3-2 具较强抑菌活性。此外检出的其他 10 种化合物是否单独作用或协同抑制病原菌的生长有待进一步分析验证，而且液质联用的结果准确性需进一步用标准品进行验证。

微生物挥发性有机化合物 (VOCs) 在抑制病原菌生长方面也有重要影响。已有研究报道的假单胞菌 *P. aurantiaca* ST-TJ4^[16] 和假单胞菌 *P. fluorescens* ZX^[27]、以及荧光假单胞菌 *P. fluorescens* MFE01 产生的挥发性有机化合物 1-十一烯可抑制嗜肺军团菌 *Legionella pneumophila* 的生长^[28]。此外，也有报道拮抗菌株南极海洋细菌 *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125^[29]、中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 产生的 VOCs 具有拮抗病原真菌的作用^[14]。本研究中 T1-3-2 的 VOCs 对杉木炭疽病菌 *C. gloeosporioides* 和木棉炭疽病菌 *Colletotrichum* sp. 抑制效果显著，通过 GC-MS 分析发现 VOCs 的 13 种化合物中烯烃类化合物 1-十一烯含量最高，但后期仅用一定浓度的 1-十一烯对杉木炭疽病菌并无显著抑菌效果。VOCs 中包含的对二甲苯、紫苏烯、奥昔菊环、2-十一酮、(Z)-环十二烯和 1-十三烯等化合物均具潜在抗菌活性，说明 1-十一烯含量最多但并不一定是抑制杉木炭疽病菌的主要成分，或其可能与其他化合物共同起协同增效作用。该菌 VOCs 中主要抑菌成分及其作用机制有待进一步研究。

3.2 森林假单胞菌 T1-3-2 具广谱抑菌特性，尤其对林木炭疽病菌有显著的抑制效果；其次代谢产物粗提物和挥发性气体均有一定的抑菌效果。粗提物稳定性好，对炭疽病菌 T3-2-1 孢子萌发以

及菌丝生长有较强的抑制作用。粗提物中主要有假单胞菌常见的 4 种吩嗪类抑菌物质。综上，菌株 T1-3-2 及其抑菌物极具开发为林木炭疽病生物防制剂的潜力。

参考文献

- [1] 胡德活, 林军, 王润辉, 等. 杉木第二代改良种子园营建技术及应用成效[J]. 林业与环境科学, 2019, 35(1): 23-28.
- [2] 田龙艳, 练涛, 柯思恺, 等. 粤北地区杉木真菌性病害种类[J]. 林业与环境科学, 2019, 35(4): 90-96.
- [3] 李冬琴, 谭益民, 路宗岩, 等. 杉木炭疽病拮抗菌 AM53 菌剂的研制及其林间防效[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2015, 44(2): 154-158.
- [4] 田龙艳, 黄华, 杨华, 等. 假单胞菌 T1-3-2 的抑菌特性及其对杉木的抗病促生作用[J]. 微生物学通报, 2022, 49(11): 4752-4765.
- [5] 冯江鹏, 邱莉萍, 梁秀燕, 等. 草莓胶孢炭疽菌拮抗细菌贝莱斯芽孢杆菌 JK3 的鉴定及其抗菌活性[J]. 浙江农业学报, 2020, 32(5): 831-839.
- [6] 桑建伟. 香蕉枯萎病拮抗内生芽孢杆菌 BEB17 的分离鉴定及生防潜力分析[D]. 海口: 海南大学, 2018.
- [7] 张力群, 张俊威. 假单胞菌产生的抗生素[J]. 中国生物防治学报, 2015, 31(5): 750-756.
- [8] AGARBATI A, CANONICO L, PECCI T, et al. Biocontrol of non-saccharomyces yeasts in vineyard against the gray mold disease agent botrytis cinerea[J]. Microorganisms, 2022, 10(2): 200-215.
- [9] PERUMAL S, GOVINTHARAJ V, VELLASAMY S, et al. Partial purification and characterization of 2, 4-diacetylphloroglucinol producing *Pseudomonas fluorescens* VSMKU3054 against bacterial wilt disease of tomato[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2021, 28(4): 2155-2167.
- [10] BIESSY A, FILION M. Phenazines in plant-beneficial *Pseudomonas* spp.: biosynthesis, regulation, function and genomics [J]. Environmental microbiology, 2018, 20(11): 1-36.
- [11] PAWAR S, CHAUDHARI A, PRABHA R, et al. Microbial Pyrrolnitrin: Natural Metabolite with Immense Practical Utility[J]. Biomolecules, 2019, 9(9): 443.
- [12] TIAN L Y, ZHANG Y F, YANG H, et al. Taxonomic description and complete genome sequencing of *Pseudomonas silvicola* sp. nov. isolated from *Cunninghamia laeolata*[J]. Forests, 2023, 14(6): 1089-1106.
- [13] 吴翔, 谢丽源, 甘炳成, 等. 一株烟草青枯拮抗细菌中活性物质稳定性和粗提物成分分析[J]. 西南农业学报, 2019, 32(7): 1549 - 1554.
- [14] 周连玉, 钟松, 朵红梅, 等. 中华羊茅内生真菌 *Epichloë*

- sp. 挥发性物质的抑菌活性及成分分析[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(9): 1543-1551.
- [15] 周寒梅, 陈丽洁, 翟忠英, 等. 沼泽红假单胞菌蛋白 Rhp-PSP 对烟草花叶病毒的系统抗性诱导及互作蛋白筛选[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(5): 1073-1081.
- [16] NI H, KONG W L, ZHANG Y, et al. Effects of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas aurantiaca* ST-TJ4 against *Verticillium dahliae*[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(7): 697-711.
- [17] VASSILEV N, VASSILEV M, LOPEZ A, et al. Unexploited potential of some biotechnological techniques for biofertilizer production and formulation[J]. Applied microbiology and biotechnology, 2015, 99(12): 1-14.
- [18] 黄艺烁, 谢学文, 石延霞, 等. 一株绿针假单胞菌桔黄亚种在防治番茄匍柄霉叶斑病中的应用[J]. 中国生物防治学报, 2021, 37(6): 1265-1275.
- [19] 王艳玲, 尚敏敏, 张素玮, 等. 假单胞菌 YL11 对扩展青霉的抑制作用及其机理初探[J]. 微生物学通报, 2019, 46(5): 1081-1091.
- [20] WANG Z, JIANG M, CHEN K, et al. Biocontrol of *Penicillium digitatum* on postharvest citrus fruits by *Pseudomonas fluorescens*[J]. Journal of Food Quality, 2021, 69(7): 2087-2098.
- [21] 娄海博, 王晓冰, 陈俊, 等. 拮抗青枯劳尔氏菌的荧光假单胞菌 SN15-2 分离鉴定及其生防能力分析[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(3): 12-18.
- [22] 邱薇, 刘磊, 康杰, 等. 假单胞菌属双组分信号转导系统调控吩嗪生物合成研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 352-362.
- [23] GONG A D, LEI Y Y, HE W J, et al. The inhibitory effect of *Pseudomonas stutzeri* YM6 on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxins production by the production of volatile dimethyl trisulfide[J]. Toxins, 2022, 14(11): 788-801.
- [24] LI L, LI Z H, YAO W T, et al. Metabolic Engineering of *Pseudomonas chlororaphis* Qlu-1 for the Enhanced Production of Phenazine-1-carboxamide[J]. Journal of agricultural and food chemistry, 2020, 68(50): 14832-14840.
- [25] 杨毅, 李治, 高玲霞, 等. 荧光假单胞菌抗生性代谢产物合成相关基因的研究现状[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(8): 100-106.
- [26] JIN X J, PENG H S, HU H B, et al. iTRAQ-based quantitative proteomic analysis reveals potential factors associated with the enhancement of phenazine-1-carboxamide production in *Pseudomonas chlororaphis* P3[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1): 27393.
- [27] SANNINO F, PARRILLI E, APUZZO G A, et al. *Pseudoalteromonas haloplanktis* produces methylamine, a volatile compound active against *Burkholderia cepacia* complex strains[J]. New Biotechnology, 2017, 35: 13-18.
- [28] WANG Z R, ZHANG T, CHEN K W, et al. Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* ZX and potential biocontrol of blue mold decay on postharvest citrus[J]. Food Control, 2021, 120(1): 1-39.
- [29] CORRE M H, MERCIER A, BOUTEILLER M, MATHILDE B, et al. Bacterial Long-Range Warfare: Aerial Killing of *Legionella pneumophila* by *Pseudomonas fluorescens*[J]. Microbiology spectrum, 2021, 9(1): e0040421.