

农抗 702 及其单体组分 对尖孢镰刀菌的抗菌毒力测定

何建 阮彩彪 涂晓嵘 涂国全*

(江西农业大学 生物科学与工程学院 南昌市发酵应用技术重点实验室 江西 南昌 330045)

摘要:探索农抗 702 及其两个单体组分对香蕉枯萎病菌尖孢镰刀菌古巴专化型 1 号和 4 号生理小种(FOC1、FOC4)的抗菌活性的毒力测定。分别以农抗 702、其中两个单体组分 Dzp8 和 Dzp9 以及那他霉素为供试材料,以 FOC1、FOC4 为靶标菌。抗菌活性的测定方法采用菌丝生长速率法。那他霉素对 FOC1、FOC4 的 EC₅₀和 EC₉₀分别为 2.08、1.71、6.6、11.96 μg/mL;样品 Dzp9 对 FOC1、FOC4 的 EC₅₀和 EC₉₀分别为 4.67、3.41、21.54、53.09 μg/mL;农抗 702 对 FOC1、FOC4 的 EC₅₀和 EC₉₀分别为 20.98、16.84、50.68、62.18 μg/mL。那他霉素、Dzp9 样品和农抗 702 这 3 种抗生素对供试的靶标菌有较好的抑菌作用,而供试靶标菌对 Dzp8 样品不敏感。

关键词:农抗 702;尖孢镰刀菌古巴专化型;抗真菌活性;毒力测定

中图分类号:S482.2 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)03-0493-05

A Study on Antibiotic Toxicity of Ag-antibiotic 702 and Its Monomers to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*

HE Jian, RUAN Cai-biao, TU Xiao-rong, TU Guo-quan*

(Department of Bioengineering, Nanchang Key Laboratory of Fermentation Application and Technology, JAU, Nanchang 330045, China)

Abstract: Objective: To probe antibiosis activities and toxicity of agricultural antibiotic 702 and its two monomer components to *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* race 1 and race 4 (FOC1, FOC4). Methods: Ag-antibiotic 702 and its' two monomer components Dzp8 and Dzp9 sample along with Natamycin were used as the test material, FOC1, FOC4 as the target fungi. The method for teshing the antibiosis activities was the turf growth rate method. The results were the EC₅₀ and EC₉₀ from Natamycin to FOC1, FOC4 were 2.08 mg/mL, 1.71 mg/mL and 6.6 mg/mL, 11.96 mg/mL respectively; the EC₅₀ and EC₉₀ from Dzp9 to FOC1, FOC4 were 4.67 mg/mL, 3.41 mg/mL and 21.54 mg/mL, 53.09 mg/mL respectively; the EC₅₀ and EC₉₀ from agricultural antibiotic 702 to FOC1, FOC4 were 20.98 mg/mL, 16.84 mg/mL and 50.68 mg/mL, 62.18 mg/mL respectively. The target fungi were sensible to Natamycin, sample Dzp9 and agricultural antibiotic 702, and they showed quite good antimicrobial activities, while the target fungi were insensitive to sample Dzp8.

Key words: Ag-antibiotic 702; *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*; antibiosis activities; toxicity test

收稿日期:2010-12-12 修回日期:2011-03-10

基金项目:国家自然科学基金项目(30960011、31071724);江西省自然科学基金项目(32009GZN0030、2010GZN0037)和江西省科技支撑计划项目(2007BN14002)

作者简介:何建(1985—),女,硕士生,主要从事微生物次级代谢产物研究, E-mail: hejianreb@126.com; * 通讯作者:涂国全,教授, E-mail: tuguoquan@263.net。

农抗 702 是江西农业大学生物工程系以棉花枯萎病为靶目标,从土壤中分离筛选到的一株链霉菌(简称链霉菌 702)所产生的具有较强生物活性的抗真菌活性物质,对其稳定性进行研究:发酵液中生物活性物质在 pH 3~12 条件下稳定,耐热性强,在 100 °C 处理 10 h,121 °C 处理 1 h,其抑菌活性不会减弱^[1-2]。抗菌性研究得出:其对霉菌、酵母菌及 14 种植物病原真菌具有较强的抗菌性^[3]。从链霉菌 702 所产抗真菌活性物质中分别分离提取其单体组分和通过波谱学图谱检测及化学结构鉴定,其中组分 Dzp9 的分子式为 C₃₅H₅₈O₁₂,分子量 670 Da,组分 Dzp8 的分子式为 C₃₅H₆₀O₁₄,分子量 704 Da。通过美国化学学会的 Scifinder 从 CAS 已发表的 4 000 多万种化合物中分别检索,链霉菌 702 菌株所产抗真菌活性物质单体组分 Dzp9 和 Dzp8 均为新型多烯类大环内酯类抗生素。

香蕉枯萎病是一个世界性毁灭性的病害,是国内外检疫对象,在我国香蕉种植区均有发生,该病由尖孢镰刀菌 [*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*(E. F. Smith) Snyder et Hansen (anamorph)] 引起的,该菌有 4 个生理小种,在我国有 1 号和 4 号小种,其中以 4 号小种的危害性最大^[4-9]。近年来,国内外的学者分离得到的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)^[10-11]、链霉菌 (*Streptomyces violaceusniger*)^[12]、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)^[13] 对香蕉枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) 都具有明显的抑制作用。吴庆菊^[14] 通过研究了 45 种放线菌发酵液的 10 倍浓缩液对香蕉枯萎病的抑菌作用,得到对香蕉枯萎病病原菌的生长抑制率达 94.64%、94.12%、84.28%、82.88% 等不同菌株。薛应钰^[15] 研究了 6 种杀菌剂对镰刀菌的室内毒力测定,以 40% 福星乳油的抑制作用最好,EC₅₀ 为 0.053 8 μg/mL。

本文报道了链霉菌 702 所产抗真菌活性物质对尖孢镰刀菌古巴专化型 FOC1 和 FOC4 两个生理小种的抗菌活性测定结果。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试抗真菌活性物质 链霉菌 702 发酵液甲醇萃取浓缩液中抗真菌活性物质,简称农抗 702,从链霉菌 702 发酵液甲醇萃取浓缩液中分离提取抗真菌单体组分(光谱纯度达 90% 以上) Dzp8 和 Dzp9 样品;那他霉素(含量 50%);以上均由江西农业大学生物工程系应用微生物实验室提供。

1.1.2 测定靶标菌 香蕉枯萎病菌尖孢镰刀菌古巴专化型 1 号和 4 号生理小种 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race1 and race 4, FOC1、FOC4),由中国热带农业科学院热带生物技术研究提供。

1.1.3 培养基 靶标菌斜面和平板培养基为 PDA 培养基。

1.1.4 仪器设备 Adventurer™ 电子精密天平;手提式蒸汽压力灭菌锅;无菌操作工作台;LRH-250A 型生化培养箱。

1.2 试验方法

1.2.1 FOC1、FOC4 菌块的制备 将尖孢镰刀菌古巴专化型的两个生理小种 FOC1、FOC4 分别接种于 PDA 平板上,于 28 °C 恒温培养 5 d 后,用直径 8~10 mm 的打孔器打取菌落边缘菌块,制备 FOC1、FOC4 菌块作为接种物。

1.2.2 抗菌活性的毒力测定——菌丝生长速率法^[16-20] 分别将农抗 702、抗真菌单体组分 Dzp9 和 Dzp8 等按比例配制成系列浓度,吸取 2 mL 不同浓度的抗生素与 18 mL PDA 培养基混匀配制成含不同浓度的含药平板,分别以添加相应浓度的那他霉素和无菌水的平板作为阳性和空白对照,将制备好的菌块移至平板中央,28 °C 恒温培养,待到空白对照菌落约布满培养皿的 2/3 时,采用十字交叉法测量和记录菌落直径,并计算各药物对 FOC1、FOC4 的抑制率,同一处理 3 个重复。

1.2.3 抗菌活性 菌丝净增长量 = 菌落直径 - 菌块直径 (1)

菌丝生长抑制率 = 1 - [(药剂处理的菌落直径 - 菌块直径) / (空白对照菌落直径 - 菌块直径)] × 100% (2)

毒力方程:根据生物统计几率值换算表,将抑菌率换算为几率值,以几率值作为依变量,浓度的对数作为自变量建立毒力回归方程,通过方程求算的几率值为 5 时的浓度即为 EC₅₀,几率值为 6.281 6 时的浓度为 EC₉₀。

2 结果与分析

2.1 农抗 702 及其单体组分对 FOC1 的抗菌活性和毒力方程的测定结果

农抗 702、单体组分 Dzp8、Dzp9 和那他霉素对靶标 FOC1 抗菌活性和毒力方程的测定结果见表 1。

表 1 农抗 702 及其单体组分对 FOC1 的抗菌活性和毒力方程的测定结果

Tab.1 The Results of Antibiosis Activities and toxicity of Ag – antibiotic 702 and its Monomer to FOC1

供试抗生素 Antibiotics		菌落直径/mm Colony diameter				抑制率	毒力回归方程	EC ₅₀ /	EC ₉₀ /
名称	浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	1	2	3	均值	/%	及 r 值	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Name	Concentration				Average	Inhibitory rate	Toxicity regression equations and r value		
那他霉素 (Natamycin)	8	10.00	11.40	12.30	11.23	96.11	$y = 2.5203x + 4.2239$ $r = 0.9651$	2.08	6.6
	6	15.50	16.10	16.15	15.92	85.29			
	4	21.35	20.00	19.50	20.28	75.20			
	2	36.20	36.20	38.10	36.83	36.96			
	1	39.20	39.50	41.00	39.90	29.88			
Dzp9 样品 Dzp9 sample	32.2	10.50	11.00	11.55	11.02	96.61	$y = 1.8858x + 3.8025$ $r = 0.9685$	4.67	21.54
	25.76	13.40	13.00	13.20	13.20	91.56			
	19.32	14.10	15.00	15.80	14.97	87.49			
	12.88	19.50	19.00	18.70	19.07	78.01			
	6.44	24.70	25.00	22.10	23.93	66.77			
农抗 702 Agantibiotic 702	39.05	16.80	17.55	16.85	17.07	82.63	$y = 3.365x + 0.555$ $r = 0.9963$	20.98	50.68
	31.24	22.40	22.55	22.5	22.48	70.12			
	23.43	29.15	26.30	25.50	26.98	59.72			
	15.62	42.60	39.50	39.10	40.40	28.73			
	9.76	47.00	47.15	46.15	46.77	14.02			
Dzp8 样品 Dzp8 sample	24	47.20	47.00	46.90	47.03	13.39	$y = 2.1981x + 0.532$ $r = 0.8709$	107.81	412.78
	20	51.00	51.40	51.80	51.40	3.30			
	16	51.40	53.25	51.10	51.92	2.11			
	12	52.00	51.20	53.00	52.07	1.76			
	8	54.00	51.00	52.35	52.45	0.9			
阴性对照(negative control)		54.4	51.65	52.45	52.83	0			
FOC1 菌块(germ piece)		9.55	9.55	9.55	9.55				

2.2 农抗 702 及其单体组分对 FOC4 的抗菌活性和毒力方程的测定结果

农抗 702、单体组分 Dzp8、Dzp9 和那他霉素对靶标 FOC4 抗菌活性和毒力方程的测定结果见表 2。

2.3 农抗 702 和单体组分对 FOC1 ,FOC4 抗菌效果

农抗 702、单体组分对 FOC1 ,FOC4 的抗菌效果见图 1。

3 结论与讨论

本试验结果表明,供试 4 种抗生素中那他霉素、农抗 702、Dzp9 对尖孢镰刀菌古巴专化型 FOC1 ,FOC4 生理小种均有较强的抑菌活性。以那他霉素的抑菌活性最强,那他霉素对 FOC1 ,FOC4 的 EC₅₀ 和 EC₉₀ 分别为 2.08 ,1.71 ,6.6 ,11.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。农抗 702 及其单体组分 Dzp9 对 FOC1 ,FOC4 也表现出较强的抑菌活性,当农抗 702 抗菌活性物质浓度为 39.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 FOC1 ,FOC4 的抑菌率分别达到 82.63% 和 82.49% ,单体组分 Dzp9 浓度为 19.32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 FOC1 的抑菌率便达到 87.49% ,当浓度为 25.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 FOC4 的抑菌率为 82.63% 。

单体组分 Dzp8 对 FOC1 ,FOC4 的抑菌效果不明显,对 FOC1 ,FOC4 的 EC₅₀ 和 EC₉₀ 分别为 107.81 ,412.78 ,94.89 ,553.36 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

仅从两组份 Dzp9 和 Dzp8 的分子式非常相似,Dzp8 分子量比 Dzp9 多 34 Da ,相当于多两个“OH”基,但两组分抗菌活性差异显著。分析两组分的化学立体结构可能会不相同,有待于进一步通过 X 衍射结果来确定两组分化学立体结构的差异,并从化学立体结构上的差异来说明两组分抗菌活性不同的原因。



其中 1、2 和 3、4 分别为 FOC1 和 FOC4 在农抗 702 处理浓度分别为 39.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 9.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5、6 和 7、8 分别为 FOC1 和 FOC4 在那他霉素处理浓度分别为 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 9、10 和 11、12 分别为 FOC1 和 FOC4 在 Dzp9 处理浓度分别为 32.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 6.44 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 13、14 和 15、16 分别为 FOC1 和 FOC4 在 Dzp8 处理浓度分别为 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 17 和 18 为 FOC1 和 FOC4 分别在不含药物浓度的 PDA 平板菌落大小。

Among them , 1 2 and 3 4 FOC1 and FOC4 respectively concentration in the ag - antibiotic 702 39.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 9.76 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5 6 and 7 8 FOC1 and FOC4 respectively concentration in the natamycin 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 9 ,10 and 11 ,12 FOC1 and FOC4 respectively concentration in the Dzp9 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 13 ,14 and 15 ,16 FOC1 and FOC4 respectively concentration in the Dzp8 24.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 17 and 18 , respectively , for the FOC1 and FOC4 in free drug concentration in the colony size of the PDA plate.

图 1 FOC1 和 FOC4 分别在供试的 4 种药剂和不同浓度的 PDA 平板上菌落大小

Fig.1 FOC1 and FOC4 at respectively , four for testing pharmaceutical and different concentrations of the PDA plate colony size

表 2 农抗 702 及其单体组份对 FOC4 的抗菌活性和毒力方程的测定结果

Tab.2 The Results of Antibiosis Activities and Toxicity of Ag - antibiotic 702 and its monomer to FOC4

供试抗生素 Antibiotics		菌落直径/mm Colony diameter				抑制率	毒力回归方程	EC ₅₀ /	EC ₉₀ /
名称	浓度	1	2	3	均值	%	及 r 值	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Name	Concentration				Average	Inhibitory rate	Toxicity regression equations and r value		
那他霉素 (Natamycin)	8	14.70	13.10	13.90	13.90	89.06	$y = 1.5898x + 4.6286$ $r = 0.9795$	1.71	11.96
	6	19.50	20.00	20.30	19.93	76.13			
	4	21.90	22.40	24.10	22.80	69.98			
	2	29.10	31.90	28.10	29.70	55.18			
	1	37.20	38.70	39.40	38.43	36.45			
Dzp9 样品 (Dzp9 sample)	32.20	15.30	15.00	15.90	15.40	85.85	$y = 0.0818x + 4.8019$ $r = 0.9619$	3.41	53.09
	25.76	17.50	16.40	16.80	16.90	82.63			
	19.32	19.65	18.20	18.65	18.83	78.48			
	12.88	21.10	20.80	21.00	20.97	73.90			
	6.44	22.55	21.55	23.00	23.03	69.48			
农抗 702 (Agantibiotic 702)	39.05	17.40	16.20	17.30	16.97	82.49	$y = 2.1581x + 2.3536$ $r = 0.9679$	16.84	62.18
	31.24	24.21	25.01	25.29	24.83	65.62			
	23.43	29.00	27.31	26.31	27.53	59.83			
	15.62	31.61	31.25	30.59	31.15	52.07			
	9.76	40.59	42.29	42.29	41.73	29.38			
Dzp8 样品 (Dzp8 sample)	24	47.79	47.02	52.01	48.93	13.93	$y = 1.6736x + 1.6909$ $r = 0.9763$	94.89	553.36
	20	48.01	48.49	48.85	48.45	14.97			
	16	52.01	49.69	50.00	50.57	10.44			
	12	50.75	52.45	54.59	52.59	6.08			
	8	52.39	56.39	52.45	52.45	3.01			
阴性对照 Negative control		56.69	54.39	55.21	55.43	0			
FOC4 菌块 Ggerm piece		8.80	8.80	8.80	8.80				

农抗 702 及其单体组份 Dzp8 和 Dzp9 对尖孢镰刀菌的毒力测定未见报道,本文对防治由尖孢镰刀菌引起的植物病害有一定的科学和实践指导意义。

参考文献:

- [1]蔡华静,文英,涂国全.链霉菌702所产活性物质稳定性测定研究[J].江西农业大学学报,2003,25(6):929-933.
- [2]黎循航,刘妹,涂国全.链霉菌702所产生物活性物质抑菌活性的初步研究[J].江西农业大学学报,2002,24(6):829-832.
- [3]周云,张智平,涂国全等.农抗702抗真菌活性的测定[J].江西农业大学学报,2009,31(6):1127-1132.
- [4]Luis Pérez - Vicente. *Fusarium* wilt (panama disease) of bananas: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent[J]. FITOSANIDAD 2004 8(4):27-38.
- [5]Ploetz R C ,Pegg K G. *Fusarium* wilt of banana and Wallace' s line: Was the disease originally restricted to his Indo - Malayan region [J]. Australas Plant Pathol ,1997 26: 239-249.
- [6]Ploetz R C. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Phytopathology 2006 96(2):653-656.
- [7]林时迟,张绍升,周乐锋,等.福建省香蕉枯萎病鉴定[J].福建农业大学学报,2000,29(4):465-469.
- [8]Hwang S C ,KoW H. Cavendish banana cultivars resistant to fusarium wilt acquired through somaclonal variation in Taiwan [J]. Plant Disease ,2004 88(6):580-588.
- [9]王振中.香蕉枯萎病及其防治研究进展[J].植物检疫,2006,20(3):198-200.
- [10]Thandavelu R ,Paaniswami A ,Doriswamy S ,et al. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on induction of defence enzymes and phenolics in banana [J]. BioPlantarum 2003 46(1):107-110.
- [11]Nautiyal C S ,Singh J K. Survival of the rhizosphere - competent biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* NBRI2650 in the soil and phytosphere [J]. Canadian Journal of microbiology 2002 48(7):588-601.
- [12]Cetha K ,Vikneswry S. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race4 [J]. Journal of industrial microbiology and biotechnology 2002 28(6):303-306.
- [13]CHEN CHAO - YING , WANG YI - HUI. Enhancement of the antifungal activity of *Bacillus subtilis* F29 - 3 by *Bacillus circulans* chi A gene [J]. Canadian Journal of microbiology 2004 51(6):451-455.
- [14]吴庆菊,曾会才,何娜.45种放线菌发酵液对香蕉枯萎病菌的室内毒力测定[J].广东农业科学,2008(11):65-66.
- [15]薛应钰,徐秉良,齐旭先.6种杀菌剂对镰刀菌的室内毒力测定[J].甘肃农业科技,2006(8):34-35.
- [16]杨建卿,许大风,檀根甲.5种抑霉剂对储藏片烟霉菌的抑制效果[J].安徽农业大学学报,2006,33(2):222-225.
- [17]檀根甲,祝建平.杀菌剂生物测定计算方法及应用[J].安徽农学通报,1998,4(1):27-28.
- [18]孔庆彬,郝双红,孟昭礼.仿生杀菌剂20% BMOC WP的配方研制及抑菌毒力测定[J].河南农业科学,2010(4):73-76.
- [19]赵善欢.植物化学保护[M].北京:中国农业出版社,1999:114-146.
- [20]陈年春.农药生物测定技术[M].北京:北京农业大学出版社,1991:161-162.