

2M3P 灵菌红素对植物病原菌的抑制作用及其机制

维尼拉·吾甫尔, 古丽祖热·佐努尼, 帕孜来提·拜合提, 吾甫尔·米吉提*

新疆大学 生命科学与技术学院, 乌鲁木齐 830046

摘要: 本研究以从中国新疆塔尔巴哈台山上的有毒植物——块根芍药(*Paeonia anomala*)中分选获得一株产红色素的植物内生菌 *Serratia marcescens* XJU-PA-6 为研究对象, 首先通过琼脂扩散法将 *Serratia marcescens* XJU-PA-6 的发酵获得的色素粗提物分别和 11 种常见作物病原真菌进行拮抗实验, 结果表明, 色素粗提物对黄瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌、油菜菌核病菌、棉花黄萎病菌、西瓜枯萎病菌和苹果斑点落叶病菌均有较强的抑菌作用, 其中对苹果斑点落叶病菌的抑菌作用为最稳定; 然后, 采用紫外光谱、核磁共振氢谱碳谱分析及 GC 分析确认 XJU-PA-6 所产生的红色素为 2-甲基-3-戊基灵菌红素(2M3PPG); 最后结合扫描电镜、透射电镜和气质联用技术, 通过分析发现, 2M3PPG 可通过抑制苹果斑点落叶病菌中 14- α -去甲基化酶活性, 来抑制真菌细胞膜上重要成分——麦角固醇的生物合成, 从而造成真菌细胞膜中甾醇含量的降低, 进而造成细胞膜结构和功能消失, 最终导致真菌死亡。本研究结果初步证明, 2M3PPG 在生物农药方面具有较好地应用潜力。

关键词: 2M3P 灵菌红素; 作物病原菌; 苹果斑点落叶病菌; 抑制作用; 机制

中图分类号: R961; S482.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.4.021

Inhibitory Effect and Mechanism of 2-Methyl-3-pentyl prodigiosin (2M3PPG) producing by *Serratia marcescens* XJU-PA-6 against Crop pathogens

WENERA Ghopur, GULZIRE Zunun, PAZILAT Bahti, GHOPUR Mijit*

College of Life Science and Technology of Xinjiang University, Urumqi 830046, China

Abstract: Endogenous bacterium *Serratia marcescens* XJU-PA-6 isolated from *Paeonia anomala* (grown in Tarbarha Taishan, Xinjiang), which can produce haematochrom, was used in this work. Firstly, haematochrom was isolated from the broth of XJU-PA-6 using fermentation method. And then the antagonistic effect of isolated haematochrom against 11 common crop pathogenic fungi was explored with agar plate diffusion method. The results showed that haematochrom produced by *S. marcescens* XJU-PA-6 can strongly against *Fusarium oxysporum* f. *Sp.*, *Alternaria mali*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* and *Fusarium oxysporum* f. *sp. niveum*, especially for *Verticillium dahlia*. Following, the haematochrom producing by *S. marcescens* XJU-PA-6 was identified as 2-methyl-3-pentylcitamin (2M3PPG) by UV spectroscopy, nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and GC-MS. Also, the antagonistic mechanisms of 2M3PPG to *Verticillium dahliae* was carried out using scanning electron microscopy (SEM), transmission electron microscopy (TEM) and GS-MS analysis, the results revealed 2M3PPG can inhibit the biosynthesis of erythropoietin, this event probably happened via inhibiting the activity of 14- α -demethylase in *Verticillium dahlia*. The results of this work showed that 2M3PPG has a very good potential application as biopesticide.

Key words: 2M3P Prodigiosin; Crop pathogens; *Alternaria mali*; inhibitory effect; mechanism

植物病害对农作物有着重要的影响: 病害发生时, 不仅造成农作物的生长受阻、产量下降、品质降低, 严重时甚至导致农作物的死亡和绝收^[1]。近年来, 随着部分植物病原菌开始对化学农药产生抗性,

尤其是化学农药对人体和环境均有危害作用, 目前从天然产物中筛选出新型的生物农药来替代传统的化学农药已成为一个研究热点^[2]。植物内生菌 (Endophyte) 是指在其生活史中的某一阶段或全部阶段生活在植物组织内, 对植物组织不引起明显病害症状的细菌、真菌、放线菌等。由于有些植物内生菌拥有丰富的代谢途径, 可产生一些结构新颖、作用独特的抗菌活性物质, 已经成为新医(农)药活性物

收稿日期: 2017-04-05 接受日期: 2017-10-30

基金项目: 国家自然科学基金(31160015)

* 通信作者 Tel: 86-991-8582554; E-mail: gmijit@163.com

质的潜在资源^[3]。

灵菌红素(Prodigiosins, PGs)是一组具有吡咯环结构的红色色素类天然产物的总称,这些色素是由一些微生物如链霉菌属(*Streptomyces*)、沙雷氏菌属(*Serratia*)、假单胞属(*Pseudomonas*)和其他海洋细菌产生的^[3]。1929年首次从*S. marcescens*中分离并纯化出灵菌红素,但早期研究用 prodigiosin(PG)这一名称来命名灵菌红素,随后,灵菌红素类似物(或灵菌红素衍生物, prodigiosinses, PGs)的家族逐渐增加^[4,5],至今已发现的灵菌红素类化合物有近10种^[6]。近年来,灵菌红素作为一种极具潜力的抗肿瘤药物,已经引起科研工作者的极大关注^[7]。但是,关于灵菌红素在生物农药方面的应用价值及其对作物病原菌的抑制作用机制方面的研究鲜有相关报道。

2005年本实验室从生长在中国新疆塔尔巴哈台山上的有毒植物——块根芍药(*Paeonia anomala*)中分选获得产生一种灵菌红素的一株内生菌*S. marcescens* XJU-PA-6^[8],灵菌红素结构鉴定结果表明,该色素属于灵菌红素家族中非环状灵菌红素,即2-甲基-3-戊基吡咯作为它的C环,分子式为 $C_{20}H_{25}N_3O$ (2M3P灵菌红素, 2M3PPG)^[9,10]。针对目前缺乏灵菌红素在抗植物病害方面报道这一现状,本文开展了2M3P灵菌红素对部分常见农作物病原菌的抑制作用以及对苹果斑点落叶病菌的作用机制方面研究工作,为2M3P灵菌红素在生物农药领域中的潜在应用提供科学依据与参考。

1 材料与仪器

1.1 供试菌株

本实验室特有的块根芍药(*Paeonia anomala*)内生菌 XJU-PA-6——粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*),其国家专利号为200806030001。植物致病真菌菌株:黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Cucumerinum*),棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Vasinfectum*);西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *Niveum*),苹果斑点落叶病菌(*Alternaria mali*),葡萄白腐病菌(*Coniothyrium diplodiella*),稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*),番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*),油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*),小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*),棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*),玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)等农作物致病菌均购自中国农业科学院农业资源与农业区划研究所菌种中心。

1.2 培养基

LB培养基、MEA培养基、PDA培养基均按钱存柔等^[11]的方法配制。

1.3 供试病原菌悬浮液的制备

致病真菌菌悬液按东秀珠等^[12]的方法制备:采用马铃薯葡萄糖液体培养基(PDA:马铃薯200g、葡萄糖20g、定容于1000mL),灭菌。将病原真菌接在PDA液体培养基中,28℃下恒温振荡培养72h后,常温保存备用。

1.4 待测样品制备

所分离菌株发酵液按东秀珠等^[12]的方法制备:采用LB液体培养基(蛋白胨10g,酵母提取物5g, NaCl 10g,调pH=7.0),灭菌。菌株接种于LB培养液中,37℃振荡培养5d,4000rpm离心10min,取上清,4℃冰箱保存备用。

1.5 试剂

石油醚,三氯甲烷,乙酸乙酯,丙酮,甲醇,柱层析硅胶(200-300目),小牛血清,0.1M PBS缓冲液(pH7.4),3%戊二醛,1%钼酸,无水乙醇,丙酮,氟康唑注射液,PG提取溶液。

1.6 仪器

GF₂₅₄薄层层析荧光硅胶板,真空旋转浓缩仪,电热恒温鼓风干燥箱,调温电热套,恒温震动摇床,恒温培养箱,超低温冰箱,真空冷冻干燥仪,紫外光谱仪,飞行时间质谱TOF-MS型质谱仪,400M及600M ZAB-HS超导核磁共振波谱仪,台式恒温振荡培养箱(上海跃进医疗器械厂),扫描电镜,高速离心机,透射电镜,紫外分光光度计,隔水式电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂),气相色谱-质谱联用仪。

2 实验方法

2.1 2M3P灵菌红素(2M3PPG)的分离及鉴定

2.1.1 分离提纯

参照阿依努尔和阿布都热合曼等人^[8,9]的方法对内生菌XJU-PA-6进行二级发酵,总共发酵20L液体培养基,合并发酵液,离心(8000g,15min),弃上清,收集菌体,真空冷冻干燥仪中进行干燥;超声波破碎细胞,添加酸性甲醇-丙酮(7:2)混合溶剂抽提,浓缩,获得粗制品,最后用反复硅胶柱层析,薄层层析再分,收集R_f为0.6的红色素,最后即得到紫黑干粉状制品。

2.1.2 色素的结构表征

分别采用LAMBDA 17 UV/VIS可见紫外吸收

光谱,400 M 及 600M ZAB-HS 超导核磁共振波谱仪,飞行时间质谱 TOF-MS 型质谱分析对所得紫黑干粉状制品进行结构表征。

2.2 色素的抗菌作用及机制检测

2.2.1 色素粗提物对致病菌的拮抗实验

采用琼脂扩散法^[12,13],用色素粗提物对 11 种作物致病菌进行拮抗实验。即将 80 μL 红色素粗提取物液作实验组,无菌水作为对照进行抑菌实验。

2.2.2 色素(2M3PPG)最适抑菌浓度的测定

将 2M3PPG 粗提取物与甲醇按不同比例溶解,配制成不同浓度的 2M3PPG 粗提取物溶液(5、10、20、30、40、50 mg/mL)。通过琼脂扩散法,甲醇及无菌水作为对照,对苹果斑点落叶病菌进行抑菌实验。

2.2.3 对真菌菌丝生长能力的影响

苹果斑点落叶病菌真菌与不同浓度的 2M3PPG 粗提取液共培养 48 h 后,离心收集菌体,将氟康唑作为阳性对照。用扫描电镜观察真菌菌丝生长情况及药物影响。

2.2.4 细胞形态观察

苹果斑点落叶病菌与 PG(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和氟康唑注射(40 mg/mL),分别振荡培养 8、24、48、96 h 后,离心,收集菌体相关处理后在透射电镜下观察并照相。

2.2.5 甾醇成分分析——GS-MS 检测

分别取处于指数生长期后期的苹果斑点落叶病菌接种于 PDA 培养液中调整真菌浓度至 5×10^8 个/mL,取菌液 1 mL 于 250 mL 三角瓶,加 PDA 培养液 50 mL,药物和对照组分别加入 PG 粗提物(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)和氟康唑注射液(40 mg/mL),28 $^{\circ}\text{C}$,180

rpm 振荡培养 24 h 后,用 3000 rpm 转速离心 10 min,收集菌体用 PBS 缓冲液洗涤至上清无色,称各菌湿重。各精密称取湿菌约 0.5 g 于 50 mL 管中,加 PBS 2.5 mL 和新鲜配制的皂化剂 6 mL,混匀,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴皂化 60 min。加石油醚(沸程 30 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$)6 mL 提取 3 次,合并提取液,加水 6 mL 洗涤,醚层于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴挥干,得未皂化脂(nonsaponifiablelipids, NSLs),加环己烷使溶液体积为 1 mL/g, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。苹果斑点落叶病菌与氟康唑注射液(40 mg/mL)和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PG 共培养 24 h,分别提取未皂化脂后,经衍生化后用 GC-MS 分析其细胞膜中甾醇组分含量。

色谱条件;HP50(50% 苯基-50% 甲基聚硅氧烷 交联柱)30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm ,柱温:程序升温 150-290 $^{\circ}\text{C}$,起始温度 150 $^{\circ}\text{C}$,按 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$,升至 290 $^{\circ}\text{C}$ 恒定;检测器温度 280 $^{\circ}\text{C}$;进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$;载气:氮气;1.0 mL/min;质谱检测器:EI 电离源,电离电压 70 eV,源温 200 $^{\circ}\text{C}$;质谱标准库:NIST 库;每个样品进样量 0.5 μL ;分流比为 15:1。

3 结果与分析

3.1 内生菌 XJUPA-6 发酵液对作物致病菌的拮抗实验结果

基于琼脂扩散法分别进行内生菌 *S. marcescens* XJUPA-6 发酵液的色素粗提物与 11 种常见作物病原真菌之间的拮抗实验,实验结果如表 1 所示,从表 1 中可以看出,发酵液对黄瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌、油菜菌核病菌、棉花黄萎病菌、西瓜枯萎病菌和苹果斑点落叶病菌均有较强的抑菌作用。其中对苹

表 1 块根芍药内生菌 XJUPA-6 发酵液对 11 种常见作物病原真菌的拮抗实验结果

Table 1 Testing results of antagonistic effect of fermentation broth for endophyte XJUPA-6 (isolated from *P. anomala*) against 11 common crop pathogenic fungi

作物病原菌 Pathogenic fungi	XJUPA-6 发酵液的抑菌效果 Antagonistic effect of fermentation broth for endophyte XJUPA-6
黄瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Cucumerinum</i>	+ + + +
棉枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>Vasinfectum</i>	+ +
苹果斑点落叶病菌 <i>Alternaria mali</i>	+ + + +
葡萄白腐病菌 <i>Coniothyrium diplodiella</i>	+ +
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i>	+
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	+ + + +
油菜菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	+ + + +
小麦赤霉病菌 <i>Gibberella zeae</i>	N
棉花黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	+ + + +
西瓜枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	+ + + +
玉米小斑病菌 <i>Bipolaris maydis</i>	+ +

注:“ + + + + ”表示抑菌圈直径大于 20 mm;“ N ”表示无拮抗作用。

Note:“ + + + + ” indicated that the diameter of bacteriostatic circle \geq 20mm;“ N ”: no antagonistic activity.

果斑点落叶病菌的抑菌作用为最稳定。

3.2 2M3P 灵菌红素的分离提纯及鉴定

按阿依努尔和阿布都热合曼等人^[8,9]的方法从 20 L 发酵液中得到色素粗膏为 6.434 g, 进一步纯化后得干粉状红色素(2M3P 灵菌红素)制品为 1.306 mg, 并对其结构进行检测确认: 即通过质谱分析以及 UV、MS、¹H NMR、¹³C NMR 对比分析鉴定结果表明, 该色素属于灵菌红素家族中非环状灵菌红素, 2-甲基-3-戊基吡咯作为它的 C 环, 分子式为 C₂₀H₂₅N₃O(2M3P 灵菌红素, 2M3PPG)^[8,10]。

N₃O(2M3P 灵菌红素, 2M3PPG)^[8,10]。

3.3 抗菌作用及机制

3.3.1 2M3PPG 最适抑菌浓度的测定

用甲醇及无菌水作对照, 进行不同浓度的 2M3PPG 溶液对苹果斑点落叶病菌进行抑菌实验, 结果如表 2 所示, 从表中可以看出, 当浓度在 10 ~ 30 mg/mL 时其抑菌效果最好。当抑制浓度高于此浓度范围时, 其抑菌效果不仅没有增强, 反而还出现抑菌活性有所下降, 其原因有待进一步分析。

表 2 2M3P 灵菌红素对苹果斑点落叶病菌最适抑菌浓度的测定结果

Table 2 Testing results of optimum inhibitory concentration for 2M3PPG against *Alternaria mali*

	2M3P 灵菌红素拮抗作用浓度 Inhibitory concentration for 2M3PPG					
	5 mg/mL	10 mg/mL	20 mg/mL	30 mg/mL	40 mg/mL	50 mg/mL
抑菌效果 Antagonistic effect	++	++++	++++	++++	+++	+++

注: “++++”表示抑菌圈直径大于 20 mm

Note: “++++” indicated that the diameter of bacteriostatic circle \geq 20 mm

3.3.2 对真菌菌丝生长能力的影响

真菌菌丝形成能力与其感染能力和致病能力紧密相关。以苹果斑点落叶病菌为列, 本研究利用扫描电镜技术, 观测分析了氟康唑和不同浓度 2M3P 灵菌红素(2M3PPG)对苹果斑点落叶病菌菌丝生长能力的影响(见图 1)。由图 1-A1、A2 可知, 苹果斑点落叶病菌在含小牛血清的 PDA 培养液中培养, 可

产生交联完整的菌丝。在 40 mg/mL 氟康唑注射液的作用下(图 1-B1、B2), 菌丝表面光滑, 还保持原来形态, 只出现断裂成几个小节的情况。在 5 mg/mL 浓度的 2M3P 灵菌红素作用下(图 1-C1、C2), 菌丝开始出现萎缩, 菌丝表面稍有粗糙。当浓度提高到 50 mg/mL 时(图 1-D1、D2), 菌丝萎缩程度加重, 并开始变形。当浓度达到 500 mg/mL 时(图 1-E1、E2),

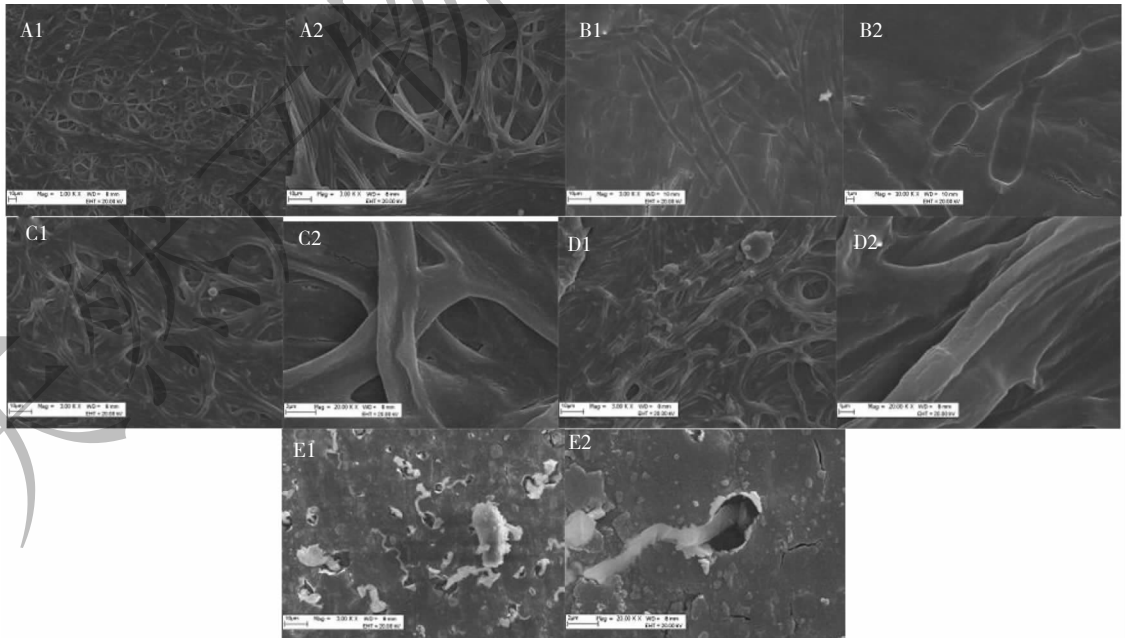


图 1 对照组(A1、A2)、40 mg/mL 氟康唑注射液处理组(B1、B2)、5 mg/mL(C1、C2)、50 mg/mL(D1、D2)及 500 mg/mL(E1、E2)2M3PPG 处理组的扫描电镜图

Fig. 1 SEM micrographs of *A. mali* in control group (A1, A2), 40 mg/mL fluconazole group (B1, B2), 5 mg/mL (C1, C2), 50 mg/mL (D1, D2) and 500 mg/mL (E1, E2) 2M3P prodigiosin groups

菌丝表面粗糙,断裂,观察不到正常形态。

3.3.3 细胞形态观察

接着通过透射电镜技术研究了在氟康唑, 2M3PPG 分别处理不同时间段后,对苹果斑点落叶病菌超微结构产生的影响。将细胞培养 8 h 后可看到对照组细胞的细胞膜,细胞壁光滑完整(图 2-A);与苹果斑点落叶病菌的正常超微结构相比,用氟康唑处理 8 h 后的真菌细胞,虽然细胞壁仍然完整,细胞质没出现外溢现象,胞质电子密度没受到影响,但是部分细胞膜皱缩,核酸部分降解(图 2-B);用 PG 处理苹果斑点落叶病菌 8 h 时,细胞膜模糊,染色质聚在一起,成团,胞质电子密度下降(图 2-C)。

当时间达到 24h 后,再进行观察,对照组有完整的细胞壁,开始出现菌丝体(图 3-A1、A2);氟康唑处理组细胞结构完整,只是部分细胞膜皱缩,细胞质基本完整,细胞膜部分开始腐烂(图 3-B1、B2、B3);PG 处理组(图 3-C1、C2、C3)细胞膜完全受损,细胞开始变形,细胞内容物外泄,胞质向外分泌,导致胞质电子密度下降,细胞质变的透明。

处理 48 h 后观察结果见图 4 所示。对照组细胞结构完整(图 4-A)。氟康唑处理组细胞部分变形,细胞膜皱缩,部分细胞内容物外泄,菌丝体消失,胞内电子密度下降(图 4-B1、B2)。而 2M3PPG 处理组可见细胞壁有缺损,胞质不均匀,有空泡状物及斑片状低电子密度区形成(图 4-C1、C2、C3)。

当处理时间达到 96 h,再次观察细胞形态时发现对照组中细胞开始出现老化,没有出现太大变化(图 5-A1、A2、A3)。氟康唑处理组,细胞结构没有发生改变,部分细胞细胞膜完全受损(图 5-B1、B2、B3);而 2M3PPG 处理组,细胞已完全失去完整形态,细胞壁界限模糊,几乎观察不到正常细胞,部分溶解,细胞核碎裂,细胞器溶解,胞质成碎渣样(图

5-C1、C2、C3、C4、C5、C6)。

3.3.4 甾醇成分分析——GC-MS 检测

将苹果斑点落叶病菌分别在含 40 mg/mL 氟康唑和 20 $\mu\text{g/mL}$ 2M3PP 的培养液中培养 24 h,分别提取未皂化脂后,经衍生化后采用气相色谱分离并分析其细胞膜中甾醇组分,各组经 GC-MS 确定结构。见图 6。

羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶(CYP51)是真菌细胞膜麦角甾醇生物合成过程中的一个关键酶。而麦角甾醇是真菌细胞膜基本组成成分,它的缺乏将导致膜结构和功能消失,最终导致真菌死亡。氟康唑等三唑类抗菌药物主要是通过控制这个靶酶来抑制麦角甾醇的合成,进而发挥其抗菌作用。氟康唑和灵菌红素对苹果斑点落叶病菌内羊毛甾醇等的含量影响如表 3 所示。从表 3 中可以看出,与空白对照组和氟康唑处理组相比,用 2M3PP 处理后,苹果斑点落叶病菌 CYP51 酶受抑制,其细胞膜中麦角甾醇相对含量降低,而合成麦角甾醇的前体物质羊毛甾醇和 24(28)-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇,即 24-methylenelanost-8-en-3-ol 成分均相对增加。该结果表明:2M3P 灵菌红素可以通过抑制 CYP51 酶而影响真菌细胞膜中羊毛甾醇的合成,进而抑制了苹果斑点落叶病菌生长。

3 讨论与结论

本研究通过琼脂扩散法研究了 XJU-PA-6 菌株发酵中色素物质对 11 种常见作物病原真菌进行拮抗效果,实验结果表明:色素物质其对黄瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌、油菜菌核病菌、棉花黄萎病菌、西瓜枯萎病菌和苹果斑点落叶病菌均有较强的抑菌作用,其中对苹果斑点落叶病菌的抑菌作用为最稳定。

三唑类杀菌剂是在临床上适用范围最广的真菌

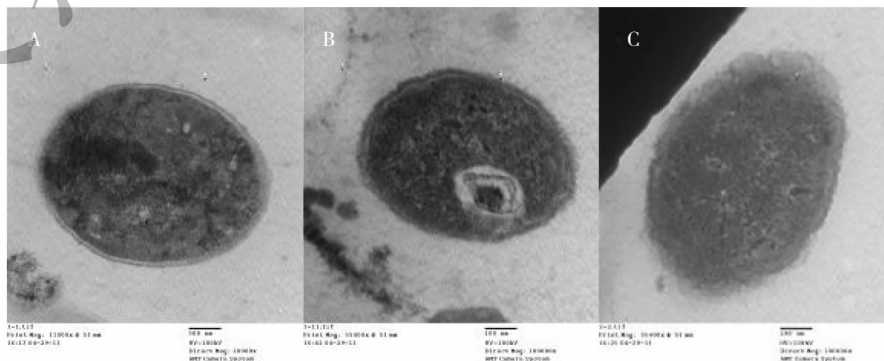


图 2 对照组(A)、氟康唑处理组(B)及 2M3PPG 处理组(C)处理 8h 后苹果斑点落叶病菌细胞透射电镜图

Fig. 2 Cell ultrastructure plots of *A. mali* in control group (A), fluconazole group (B) and 2M3P prodigiosin group (C) after 8 h treatment

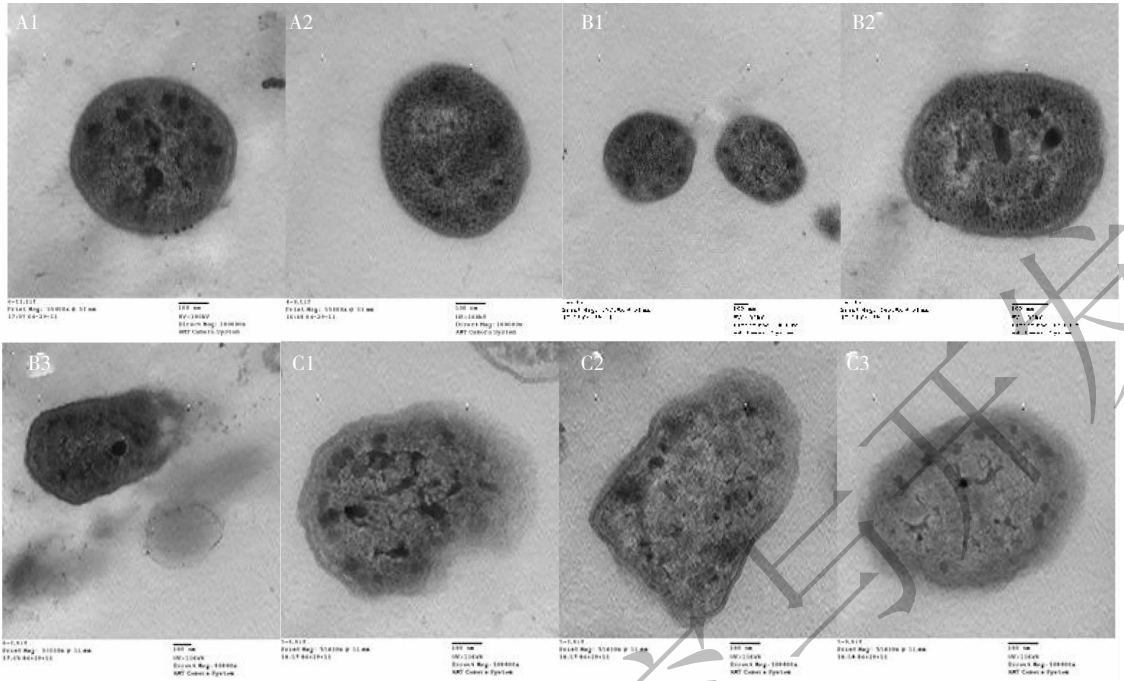


图3 对照组 (A1、A2)、氟康唑处理组 (B1、B2、B3) 及2M3PPG 处理组 (C1、C2、C3) 处理 24 h 后的苹果斑点落叶病菌细胞透射电镜图

Fig. 3 Cell ultrastructure plots of *A. mali* in control group (A1, A2), fluconazole group (B1, B2, B3) and 2M3P prodigiosin group (C1, C2, C3) after 24 h treatment

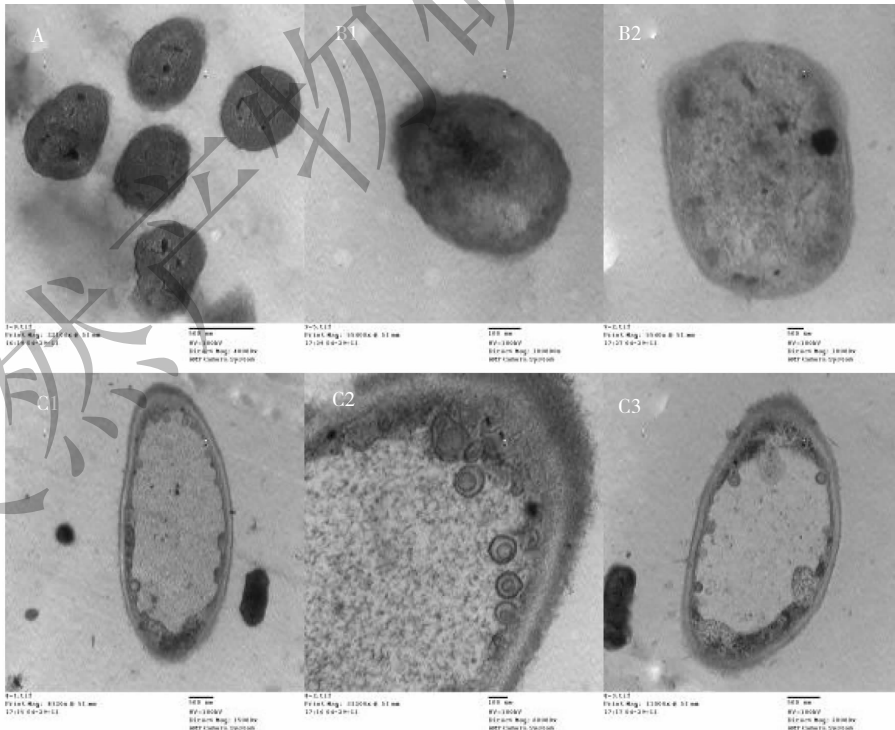


图4 对照组 (A)、氟康唑处理组 (B1、B2) 及2M3PPG 处理组 (C1、C2、C3) 处理 48 h 后苹果斑点落叶病菌细胞透射电镜图

Fig. 4 Cell ultrastructure plots of *A. mali* in control group (A), fluconazole group (B1, B2) and 2M3P prodigiosin group (C1, C2, C3) after 48 h treatment

杀菌药物, 氟康唑 (fluconazole) 为三唑类杀菌剂代表之一, 主要对子囊菌纲、担子菌纲和半知菌类有效, 是既能治疗严重真菌感染、又不会产生明显不良反应的少数抗真菌药之一^[14]。因此, 在临床治疗中

得到广泛使用。在农药方面主要用于防治苹果黑星病和白粉病菌、禾谷类的白粉黑腔菌、壳针孢属菌、葡萄钩丝壳菌、葡萄球座菌、以及甜菜等多种作物上的各种病原菌^[13,14]。利用电镜技术来观察抗菌药

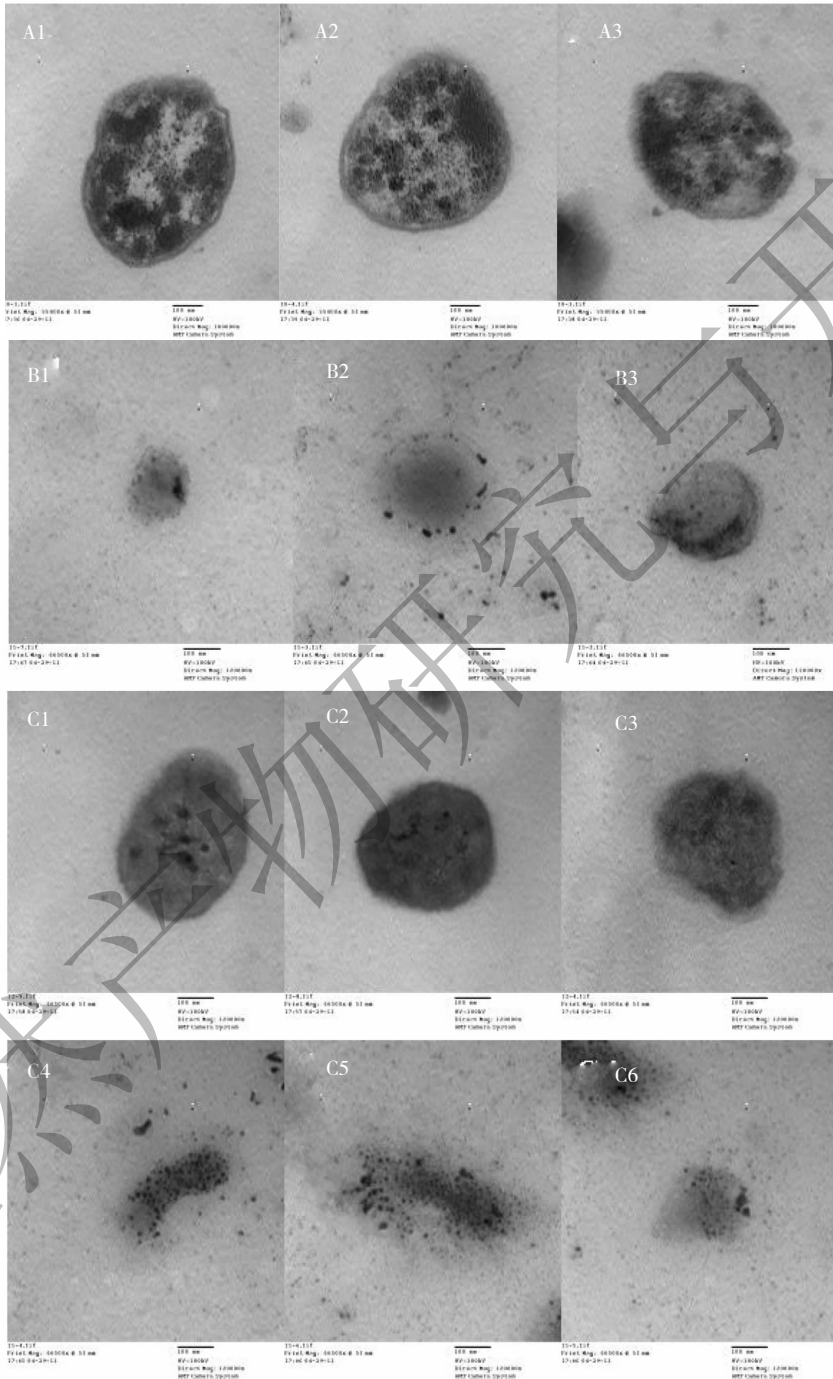


图 5 对照组 (A1、A2、A3) 氟康唑处理组 (B1、B2、B3) 及 2M3PP 处理组 (C1、C2、C3、C4、C5、C6) 处理 96 h 后苹果斑点落叶病菌细胞透射电镜图

Fig. 5 Cell ultrastructure plots of *A. mali* in control group (A1, A2, A3), fluconazole group (B1, B2, B3) and 2M3P prodigiosin group (C1, C2, C3, C4, C5, C6) after 96 h treatment

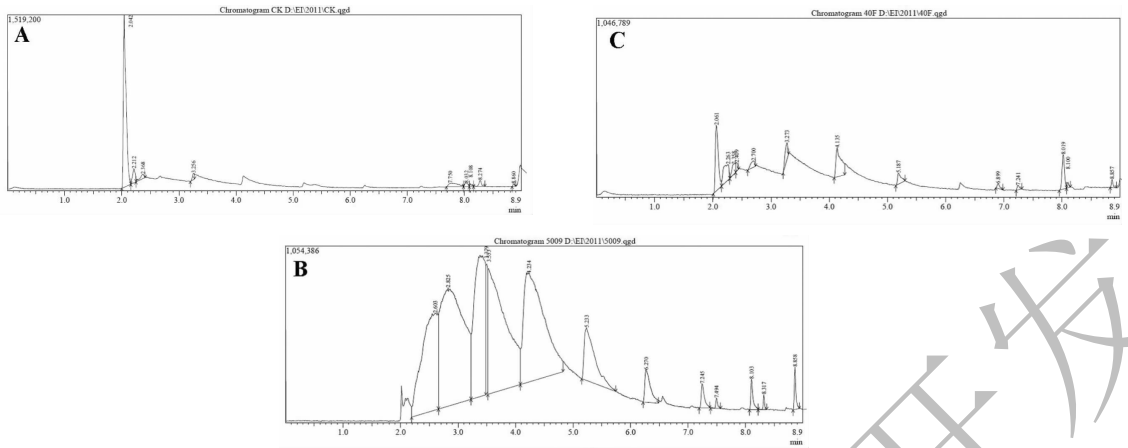


图6 对照组(A)、40 mg/mL 氟康唑组(B)及20 μg/mL 2M3P 灵菌红素组(C)的GC-MS色谱图

Fig.6 GC-MS chromatograms in control group (A), 40 mg/mL fluconazole group (B), 20 mg/mL 2M3P prodigiosin groups (C)

表3 三种甾醇成分含量变化 GC-MS 检测结果表

Table 3 GC-MS analysis results of content changes of three sterols

	甾醇成分 Sterol components	R. Time	I. Time	F. Time	TIC 峰 Peak Report TIC			
					Area	Area (%)	Height	Height (%)
对照组 Control	麦角甾醇	2.042	2.000	2.158	4971373	77.00	1489180	79.87
	羊毛甾醇	2.212	2.158	2.250	391446	6.06	122111	6.55
24(28)-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇 灵菌红素组 Prodigiosin group	0	0	0	0	0	0	0	0
	麦角甾醇	2.603	2.192	2.658	11379293	14.04	578406	12.14
	羊毛甾醇	2.825	2.658	3.225	19712898	24.31	707738	14.86
	24(28)-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇	4.234	4.083	4.825	16214456	20.00	647766	13.60
氟康唑组 Fluconazole group	麦角甾醇	2.061	2.008	2.150	1347772	26.11	383617	29.64
	羊毛甾醇	2.263	2.150	2.292	670860	12.99	90872	7.02
	24(28)-亚甲基-24,25-二氢羊毛甾醇	4.135	4.083	4.267	1056339	20.46	169153	13.07

物对致病真菌细胞结构的影响,已经成为阐明抗菌药物抗菌机理的重要而不可缺少的手段之一。有文献报道,在抗真菌药物氟康唑的作用下,用透射电镜可观察到真菌细胞壁表面隆起物的形成,细胞膜变薄及其降解的现象^[15]。本研究分别用扫描电镜及透射电镜技术,以氟康唑作为阳性对照,研究了灵菌红素对于致病真菌菌丝生长及细胞结构的变化带来的影响。通过透射电镜观察发现,与氟康唑相比,灵菌红素对致病真菌菌丝生长及细胞超微结构的影响更显著:随着处理时间的延长灵菌红素对真菌的菌丝形成抑制能力越强。而通过扫描电镜,则观察可以看到:与氟康唑相比,灵菌红素处理后致病真菌菌丝形成能力受到明显抑制。

麦角甾醇是真菌细胞膜特有的脂质,又是其重要的结构组成成分,它在确保膜结构的完整性,膜结合酶的活性,膜流动性,细胞活力及物质运输等方面

起着重要作用^[16]。目前大部分抗真菌药物主要是通过抑制真菌细胞中麦角甾醇生物合成来达到抑菌目的,是通过作用于麦角甾醇生物合成通路中的不同环节,使真菌麦角甾醇生物合成受阻,进而造成细胞膜结构完整性受损,从而抑制真菌的生长繁殖^[17]。羊毛甾醇 14 α -去甲基化酶(CYP51)是麦角甾醇生物合成过程中的一个关键酶,氟康唑等三唑类抗菌药物都是通过控制这个靶酶来发挥抗菌作用的。因此,测定真菌细胞中甾醇成分含量,考察比较抗菌药物处理后这些成分的含量变化,即可研究抗真菌药物抑菌活性及抑菌机制。本研究采用气质联用的方法,测定灵菌红素处理组和空白对照组中真菌细胞内甾醇组分含量差异,结果显示,灵菌红素处理后麦角甾醇含量相对降低,而 14- α -甲基甾醇(固醇)在苹果斑点落叶病菌细胞内的相对含量明显提高。而 14- α -去甲基酶主要负责催化 14- α -甲基甾醇

(固醇)生成麦角固醇。这表明:2M3PP 应该是抑制了 14- α -去甲基酶的活性,从而造成苹果斑点落叶病菌细胞内过量积累 14- α -甲基甾醇(固醇)和抑制麦角固醇的合成,导致真菌苹果斑点落叶病菌细胞膜中甾醇含量的降低,细胞膜结构功能凌乱,细胞膜通透性增加,最终造成致病菌苹果斑点落叶病菌的死亡。本研究为 2M3P 灵菌红素在生物农药和医药方面的开发应用提供一定科学理论依据和参考。

参考文献

- Kang ZS(康振生). Current status and development strategy for research on plant fungal diseases in China[J]. *Plant Protect* (植物保护), 2010, 36(3):9-12.
- Lu XY(鹿秀云), Li SZ(李社增), Li QS(栗秋生), et al. Screening of bacteria as biocontrol agent against corn leaf spot and study on its optimal culture medium[J]. *Chin J Biol Control*(中国生物防治), 2006, 22:47-53.
- He RQ(赫荣乔). A novel endophytic bacteria H-6 with antifungal activity from *Huperzia serrata*-*Burkholderia* sp[J]. *Microbiol Bull* (微生物学通报), 2008, 35:511.
- Beatriz M, Ricardo P. Prodigiosin-induced apoptosis in human colon cancer cells[J]. *Life Sci*, 2001, 68:2025-2036.
- Shieh WY, Chen YW, Chaw SM, et al. A red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water[J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, 53:479-484.
- He TH(何天豪), Qiu JP(裘娟萍), Zhang ZB(张正波). Studies on the structure and bioactivity of natural fenitrothrin compounds[J]. *Sci Technol Bull* (科技通报), 2013, 29(11):56-63.
- Williamson NR, Fineran PC, Leeper FJ, et al. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginines[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2006, 12:887-899.
- Yu PP(于蘋蘋), Abdurahman A(阿依努尔·阿不都热合曼), Maimaiti G(古力山·买买提), et al. Isolation and identification of XJU-PA-6, a red pigment endophytic bacteria from roots of peony[J]. *Biotechnology* (生物技术), 2008, 18(5):34-36.
- Abdulla A(阿布都热合曼·阿布都拉), Khadir B(布佐热古力·喀地尔), Mijit G(吾甫尔·米吉提). The research progress of separation, purification and application of prodigiosin[J]. *Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2015, 43:102-105.
- Khadir B(布佐日古丽·喀地尔), Zunun G(古丽祖热·佐努尼), Mijit G(吾甫尔·米吉提). Optimization of fermentation condition for prodigiosin by *Paenonina anamala* endophytic bacteria XJU-PA-6 from Xinjiang[J]. *Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2015, 43(18):26-28.
- Qian CR(钱存柔). An experimental course in Microbiology (微生物实习课)[M]. Beijing: Peking University Press, 2003-03.
- Dong XZ(东秀珠), Cai MY(蔡妙英). Handbook of systematic identification of common bacteria (常见细菌系统鉴定手册)[M]. Beijing: Science Press, 2001.
- Luo K(罗坤), Hu LF(胡利锋), Liu KL(刘开林), et al. Screening and identification of antagonistic bacteria against tomato bacterial wilt[J]. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2015, 43:171-172.
- Wu SX(吴绍熙), Liao WQ(廖万清), Guo NR(郭宁如), et al. Study on pathogenic fungi in china -a dynamic epidemiological survey[J]. *J Clin Dermatol* (临床皮肤科杂志), 1999, 28(1):1-44.
- Huang J(黄静), Zhang TT(张天托). Advances in resistance *Candida albicans* to fluconazole[J]. *Med Rev* (医学综述), 2004, 10:756-758.
- Terrel CL. Antifungal agents, part II, the azoles[J]. *Mayo Clin Proc*, 1999, 74:78-100.
- Cai LL(蔡玲玲), Zhang FC(张丰川), Li YW(李元文), et al. Inhibition of matrine on ergosterol biosynthesis of *Malassezia sympodialis*[J]. *Global Tradit Chin Med* (环球中医药), 2016, 9:299-302.