

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

周连玉^{1*}, 钟 松¹, 朵红梅², 乔 枫¹

¹青海省青藏高原药用动植物资源重点实验室 青海师范大学生命科学学院;

²青海省第四人民医院,西宁 810008

摘要:为测定中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质的抑菌活性和成分,依次采用挥发油提取器和乙酸乙酯萃取 *Epichloë* sp. 菌株的发酵产物,再采用琼脂扩散法、悬滴法和滤纸片扩散法测定其抑菌活性;基于顶空固相微萃取和气相质谱联用法分析挥发性物质成分。结果表明:挥发性物质、乙酸乙酯提取物、水相部分和发酵液可以抑制小麦根腐离蠕孢 (*Bipolaris sorokiniana*)、新月弯孢 (*Curvularia lunata*) 和黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 菌丝生长。高浓度的挥发性物质对四种真菌孢子萌发和芽管长度抑制效果显著高于低浓度 ($P < 0.05$)。结果表明,随着挥发性物质浓度的增加对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 的抑菌作用增强,同一挥发性物质浓度对金黄色葡萄球菌的抑制作用强于大肠杆菌。此外,从挥发性物质中鉴定出 32 种具有较高质谱匹配度的化合物,其中主要成分包括异山梨醇 (16.26%)、甲基叔丁基醚 (8.18%)、二氢甘露醇 (3.75%)、羟基丙酮 (2.99%)、乙酸 (1.22%)、己醇 (1.20%)、3-糠醛 (0.92%)、5-羟甲基二氢呋喃-2-酮 (0.86%)、5-羟基戊酸-2,4-二叔丁基苯酯 (0.86%) 和棕榈酸甲酯 (0.85%)。总之,中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质具有拮抗细菌和真菌的作用。

关键词:中华羊茅;内生真菌 *Epichloë* sp.; 挥发性物质; 抑菌活性; 组成成分

中图分类号:R284.2; Q939.99

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)9-1543-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.9.009

Antimicrobial activity and composition of volatile substance of *Epichloë* sp. endophyte isolated from *Festuca sinensis*

ZHOU Lian-yu^{1*}, ZHONG Song¹, DUO Hong-mei², QIAO Feng¹

¹Key Laboratory of Medicinal Plant and Animal Resources of the Qinghai-Tibetan Plateau in Qinghai Province, School of Life Science, Qinghai Normal University;

²The 4th Peoples Hospital of Qinghai Province, Xining 810008, China

Abstract: In order to investigate antimicrobial activity of volatile substance of *Epichloë* sp. isolated from *Festuca sinensis* and its components, its fermentation metabolites were partitioned by volatile oil extractor and ethyl acetate in turn and evaluated for *in vitro* antimicrobial activity using agar diffusion method, cavity slide method and filter paper diffusion, respectively. The volatile substance was analyzed by means of solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The results showed that volatile substance, ethyl acetate extract, water phase and fermentation liquid had different inhibitory effects against mycelial growth of fungi *Bipolaris sorokiniana*, *Curvularia lunata* and *Aspergillus niger*. The high concentrations of volatile substance inhibited significantly spore germination and germ tube length of the tested fungi compared to the low concentrations ($P < 0.05$). In addition, diameter of inhibition zone of bacteria *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were significantly increased by volatile substance treatment when compared with control ($P < 0.05$), with the inhibitory effect of the same volatile substance concentration on *S. aureus* being more than that of *E. coli*. Thirty-two compositions were identified from the volatile substance of *Epichloë* sp. endophyte by GC-MS analysis with high similarity. The main compositions were

收稿日期:2019-02-11 接受日期:2019-06-06

基金项目:国家自然科学地区科学基金(31760697);青海师范大学校级教学研究项目(qhnujy2018119, qhnujy2016136);青海省青藏高原药用动植物资源重点实验室项目(2017-ZJ-Y13)

*通信作者 E-mail:zly7604@163.com

isosorbide (16.26%), propane, 2-methoxy-2-methyl-(8.18%), dianhydromannitol (3.75%), 2-propanone, 1-hydroxy-(2.99%), acetic acid (1.22%), 1-hexanol (1.20%), 3-furaldehyde (0.92%), 5-hydroxymethyldihydrofuran-2-one (0.86%), pentanoic acid, 5-hydroxy-, 2,4-di-t-butylphenyl esters (0.86%) and hexadecanoic acid, methyl ester (0.85%). Fermentation metabolites of *Epichloë* sp. isolated from *F. sinensis* had antibacterial and antifungal activities.

Key words: *Festuca sinensis*; *Epichloë* sp. endophyte; volatile substance; antimicrobial activity; component

禾草内生真菌是指在禾草类植株内生长并完成全部或大部分生活周期,而不显示外部症状的一类真菌^[1],许多研究表明了禾草内生真菌能产生一些生物活性物质,如抗菌活性类^[2]、除草活性类^[3]等。因此,内生真菌可能成为生物防治中有潜力的生物制剂。

许多研究者从不同植物体中分离出多种内生真菌,以内生真菌、内生真菌培养液或发酵产物的提取物进行抑菌活性研究^[4,5],从真菌菌丝生长^[4]、菌丝形态^[6]、孢子萌发^[7]以及细菌生长^[8]和细菌细胞结构^[9]等方面证实了内生真菌的生物防治效果。挥发性物质主要包括挥发性生物碱、烃类、脂类、醇类、酸类、酯类、酮类、酚类和萜类物质。内生真菌代谢的挥发性成分发挥着溶栓活性^[10]、抑菌活性^[11]等多种功能。

中华羊茅(*Festuca sinensis*)是一种内生真菌侵染率高的多年生草本植物,具有适口性好、营养价值高、抗寒、抗旱、发病率低等优势^[12]。已有研究报道了中华羊茅内生真菌菌株的生物学与生理学特性、生物活性、形态多样性及分类学地位^[13-17]。前期的研究工作发现采用平板对峙培养中华羊茅内生真菌 *Epichloë* 菌株对一些病原菌有抑制作用,在离体叶片上其代谢产物的乙酸乙酯粗提物能控制植物病原菌的感病率和病情发展,并测定了乙酸乙酯粗提物的各组分含量,其中主要成分是一些挥发性物质^[15]。本研究以中华羊茅 *Epichloë* 菌株为材料,先测定其挥发性物质、乙酸乙酯粗提物、水相部分和发酵液对真菌菌丝体生长速率的作用;再进一步探讨其不同浓度的挥发性物质对真菌孢子萌发和芽管生长以及细菌生长的影响,并通过 GC-MS 技术分析其挥发性物质的化学成分;为开发利用新型熏蒸生物农药提供一定依据和参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 菌株^[15]、小麦根腐离蠕孢(*Bipolaris sorokiniana*)和新月弯孢(*Curvularia lunata*)由兰州大学草地农业科技学院草地保护所提供,黑曲霉(*Aspergillus niger*)、总状毛霉(*Mucor racemosus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)购于广东微生物研究所。

Epichloë sp. 菌株^[15]由兰州大学草地农业科技学院草地保护所提供,黑曲霉(*Aspergillus niger*)、总状毛霉(*Mucor racemosus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)和大肠杆菌(*Escherichia coli*)购于广东微生物研究所。

1.1.2 培养基

真菌培养基:纯化和活化菌株采用 PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL);液体种子培养基采用 PDB(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 000 mL);发酵培养基配方为山梨醇 100.0 g,酵母膏 3.0 g,葡萄糖 40.0 g,色氨酸 0.8 g,谷氨酸 10.0 g, KH₂PO₄ 0.3 g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 5.6;真菌孢子萌发采用水琼脂培养基(琼脂 15 g,蒸馏水 1 000 mL)。

细菌培养基:细菌固体培养采用牛肉膏蛋白胨固体培养基(牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 琼脂 15 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2 ~ 7.4);细菌液体培养采用牛肉膏蛋白胨液体培养基(牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2 ~ 7.4)。

1.2 方法

1.2.1 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 培养

将 3 块 4 mm 直径的菌块接种于种子培养基中,250 mL 三角瓶中装入培养液 100 mL,于 25 ± 1 °C, 130 rpm 振荡培养 15 天,所获培养液作为液体菌种。将 3 mL 液体菌种接种至发酵培养基中,250 mL 三角瓶中装入培养液 100 mL,25 ± 1 °C 条件下 130 rpm 振荡培养 55 天。

1.2.2 粗提物的提取

每次取 300 mL 研磨的发酵产物在挥发油提取器中 100 °C 条件下持续 4 h 蒸馏得到的挥发性物质,然后用乙酸乙酯萃取发酵产物,分别得到乙酸乙酯部分及水相部分,再用旋转蒸发仪于 50 °C 减压浓缩至干,得到浸膏用于抑菌活性测定。

1.2.3 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 发酵产物粗提物对菌丝生长的影响

采用琼脂扩散法测定挥发性物质、乙酸乙酯部

分、水相部分、发酵液稀释液对小麦根腐离蠕孢、新月弯孢、黑曲霉和总状毛霉 4 种真菌生长的影响。首先用约 2 mL 二甲基亚砜将粗提物(乙酸乙酯粗提物或水相部分)0.15 g 溶解,通过 0.45 μm 无菌滤膜定容至 2 mL,取 400 μL 至另一离心管,加 1 200 μL 二甲基亚砜,剩下 1 600 μL,分别加至 118.4 mL 50 °C 的无菌 PDA 培养基迅速混匀,再倒入 12 个 9 cm 平板中,即得粗提物浓度为 250 和 1 000 μg/mL 的培养基;对照为 1 600 μL 二甲基亚砜。挥发性物质或发酵液原液 1.5 mL 用二甲基亚砜溶解,步骤同上,分别得到 2.5、10 μL/mL。

将直径 4 mm 真菌菌块接种于培养皿中央,25 ± 1 °C 培养,第 4 天测定菌落直径。每个处理重复三次。计算公式如下:

$$\text{菌丝生长抑制率}(\%) = [(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / (\text{对照菌落直径} - \text{接种时菌块直径})] \times 100\%$$

1.2.4 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质对真菌孢子萌发和芽管长度的抑制效果

真菌接种于 PDA,25 ± 1 °C 培养 7 天后,将每个供试病原菌的培养皿内加入 10 mL 无菌水,用解剖针轻轻搅拌以洗脱孢子,用两层无菌纱布过滤,血球计数板检测孢子浓度,制备 10⁶ cfu/mL 孢子悬浮液。

采用悬滴法研究对真菌孢子萌发抑制作用,用无菌水稀释挥发性物质,得到不同浓度的挥发性物质(1.25、2.5、5、10、20、40 μL/mL),不同浓度的挥发性物质与孢子悬浮液等量混合,混匀后吸取 20 μL 混合液滴加到水琼脂上(水琼脂事先滴在玻片上),对照用孢子悬浮液与等量无菌水混合。每个处理重复三次。待干后放在垫有湿润滤纸的培养皿中将玻片倒置,于 25 °C 保湿培养 8 h,观察并计录视野中总孢子数和萌发孢子数,芽管长度用带有测微尺的显微镜校正后测量。

$$\text{孢子萌发抑制率}(\%) = [(\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}) / \text{对照孢子萌发率}] \times 100\%$$

$$\text{芽管长度抑制率}(\%) = [(\text{对照芽管长度} - \text{处理芽管长度}) / \text{对照芽管长度}] \times 100\%$$

1.2.5 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质对细菌的抑制效果

分别将金黄色葡萄球菌和大肠杆菌接到牛肉膏蛋白胨液体培养基中 37 °C 培养 24 h,采用血球计数板检测细菌浓度,制备 10⁶ cfu/mL 细菌悬浮液。

采用滤纸片扩散法(滤纸片直径 15 mm)测定

不同浓度的挥发性物质 1.25、2.5、5、10、20、40 μL/mL 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌作用。在无菌培养皿中倒入适量牛肉膏蛋白胨固体培养基,铺平凝固作为底层;将供试菌悬液与冷却至 50 °C 左右的牛肉膏蛋白胨固体培养基以 1:9 混合均匀,倾注到冷却牛肉膏蛋白胨培养基表面的培养皿中。将无菌的滤纸片放入平板中央,以无菌水作为阴性对照,吸取不同浓度的挥发性物质 20 μL 滴在灭菌的滤纸片,将处理好的平板置于 37 °C 培养 24 h 后观察滤纸片周围抑菌圈的大小,并测量其直径。每个处理重复三次。

1.2.6 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质化学成分测定

利用顶空固相微萃取对挥发性物质进行萃取,用 Agilent 7890 气相色谱-质谱联用仪配有 Agilent DB-Wax 毛细管柱(30 m × 250 μm × 0.25 μm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) 分析鉴定其各成分。将一定量的挥发性物质置于固相微萃取仪采样瓶中,于 60 °C 萃取 30 min 取出,快速移出萃取头并立即插入 240 °C GC-MS 进样口解吸 4 min。

柱温 40 °C 保留 2 min,以 5 °C/min 升温至 240 °C,保持 5 min;前进样口温度 240 °C;传输线温度 240 °C;载气为高纯氮气(99.999%);载气流量 1.0 mL/min;进样量 1 μL;不分流进样。质谱条件:离子源为 EI 源,离子源温度 230 °C;四极杆温度 150 °C;电子能量 70 eV;质量范围 33 ~ 500 amu。

对总离子流图的各峰经质谱计算机数据系统检索及 LECO-Fiehn Rtx5 数据库,确定各组挥发性化学成分,用峰面积归一化法计算各个组分的相对含量。

1.3 统计分析

试验数据结果均采用平均值 ± 标准差表示,各项指标采用 SPSS16.0 统计分析软件进行单因素方差分析(LSD, *P* < 0.05)。采用 SPSS 16.0 统计分析软件的线性回归方程计算真菌孢子萌发 IC₅₀ 半致死浓度和 IC₉₀ 极限浓度。

2 结果与分析

2.1 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 发酵产物粗提物对四种真菌菌丝生长的影响

采用琼脂扩散法测定挥发性物质、乙酸乙酯部分、水相部分、发酵液稀释液对小麦根腐离蠕孢、新月弯孢、黑曲霉和总状毛霉 4 种真菌菌丝生长的影响。从表 1 可见,4 种粗提物对总状毛霉无抑制作

用,对其他三种真菌均起到一定的抑制效果,且 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 浓度的挥发性物质抑制效果显著高于其他成分,其次是浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的乙酸乙酯提取

部分。由此可见,中华羊茅内生真菌发酵产物的抑菌活性主要存在挥发性物质和乙酸乙酯部分,且挥发性物质效果优于乙酸乙酯部分。

表 1 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 发酵产物粗提物对 4 种真菌菌丝生长的作用

Table 1 Effects of crude extracts of *Epichloë* sp. from *F. sinensis* on the radial growth of four fungi

| 粗提物 Crude extract | 浓度 Concentration | 菌丝生长抑制率 Mycelial growth inhibition (%) | | | |
|----------------------------------|-------------------------------|--|--------------------------|------------------------|-----------------------------|
| | | 小麦根腐离蠕孢 <i>B. sorokiniana</i> | 新月弯孢 <i>C. lunata</i> | 黑曲霉 <i>A. niger</i> | 总状毛霉 <i>M. racemosus</i> |
| 挥发性物质 Volatile substance | 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | 45.55 \pm 3.61c | 24.51 \pm 1.89b | 15.84 \pm 1.78b | 0 |
| | 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | 75.07 \pm 2.05a | 30.44 \pm 1.75a | 59.69 \pm 5.03a | 0 |
| 发酵液 Fermentation liquid | 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | 12.66 \pm 3.51e | 0c | 0d | 0 |
| | 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ | 23.95 \pm 2.02d | 0c | 14.54 \pm 4.61b | 0 |
| 乙酸乙酯粗提物 Ethyl acetate extract | 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 28.59 \pm 2.75d | 0c | 5.85 \pm 1.95c | 0 |
| | 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 59.90 \pm 9.17b | 28.20 \pm 2.29a | 13.49 \pm 1.23h | 0 |
| 水相部分 Water phase | 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 15.86 \pm 1.56e | 0c | 0d | 0 |
| | 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 24.33 \pm 0.25d | 25.52 \pm 1.75b | 12.83 \pm 2.99b | 0 |

注:数值为平均值 \pm 标准差,小写字母表示在 0.05 水平上不同提取物对同一真菌抑制率差异显著性($P < 0.05$)。

Note: Values are means \pm standard deviation (SD). Different lower case letters indicate a significant effect of different concentrations of crude extracts on radial growth of the tested fungus ($P < 0.05$).

2.2 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质对真菌孢子萌发和芽管长度的抑制效果

2.2.1 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质对真菌孢子萌发的抑制效果

采用悬滴法显微观察不同浓度的挥发性物质 1.25、2.5、5、10、20、40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 对小麦根腐离蠕孢、新月弯孢、黑曲霉和总状毛霉 4 种真菌孢子萌发率和芽管长度的作用。不同浓度的挥发性物质均对 4 种真菌孢子萌发有一定的抑制作用(表 2),随着浓度增加抑制孢子萌发率的效果增强,对同一真菌孢子萌发抑制率各浓度之间存在显著性差异($P < 0.05$),40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 挥发性物质抑制效果显著高于其

他各浓度($P < 0.05$)。挥发性物质浓度 1.25 ~ 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 对四种真菌孢子萌发抑制率大小依次为总状毛霉 > 新月弯孢 > 小麦根腐离蠕孢 > 黑曲霉,浓度在 5 ~ 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 范围内挥发性物质抑制真菌孢子萌发率为总状毛霉 > 小麦根腐离蠕孢 > 新月弯孢 > 黑曲霉。由真菌孢子萌发抑制率线性回归方程计算 IC_{50} 半致死浓度和 IC_{90} 极限浓度(表 2),对 4 种真菌孢子半致死浓度依次为总状毛霉 < 小麦根腐离蠕孢 < 新月弯孢 < 黑曲霉。不同浓度的挥发性物质对真菌孢子萌发在一定程度上均有抑制作用,就不同真菌而言,半致死浓度有差异,这就表明了针对不同真菌引起的病害应选择合适的挥发性物质剂量。

表 2 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质对真菌孢子萌发率的抑制作用与孢子萌发抑制率 IC_{50} 和 IC_{90} 值

Table 2 Effects of volatile substance of *Epichloë* sp. from *F. sinensis* on spore germination of the tested fungi and IC_{50} and IC_{90} values of the inhibiting spore germination

| 挥发性物质浓度 Volatile substance ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 小麦根腐离蠕孢 <i>B. sorokiniana</i> | | 新月弯孢 <i>C. lunata</i> | | 黑曲霉 <i>A. niger</i> | | 总状毛霉 <i>M. racemosus</i> | |
|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|--------------------------------------|--|
| | 孢子萌发 Spore germination rate | 孢子萌发抑制 Inhibition rate of spore germination |
| | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) | (%) |
| | | | | | | | | |
| 0 | 80.33 \pm 1.45a | - | 46.58 \pm 0.78a | - | 51.61 \pm 0.40a | - | 77.91 \pm 0.48a | - |
| | 72.67 \pm 2.31b | 9.17 \pm 2.89d | 40.36 \pm 0.37b | 13.34 \pm 0.80d | 49.49 \pm 0.46b | 4.12 \pm 0.89e | 57.03 \pm 4.73b | 26.20 \pm 5.40e |

续表2(Continued Tab. 2)

| 挥发性物质浓度 Volatile substance ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 小麦根腐离蠕孢 <i>B. sorokiniana</i> | | 新月弯孢 <i>C. lunata</i> | | 黑曲霉 <i>A. niger</i> | | 总状毛霉 <i>M. racemosus</i> | |
|--|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 孢子萌发 Spore germination rate (%) | 孢子萌发抑制 Inhibition rate of spore germination (%) |
| | 2.5 | 71.45 ± 1.86b | 10.69 ± 2.33d | 38.57 ± 0.93c | 17.20 ± 2.00d | 46.74 ± 0.83c | 9.44 ± 1.61d | 52.21 ± 2.71e |
| 5 | 53.98 ± 1.84c | 32.52 ± 2.31c | 35.02 ± 0.75d | 24.80 ± 1.62c | 45.56 ± 0.98cd | 11.72 ± 1.90cd | 48.19 ± 1.34d | 38.14 ± 1.72d |
| 10 | 51.22 ± 1.07c | 35.97 ± 1.34c | 33.97 ± 0.06d | 27.07 ± 0.13c | 44.27 ± 0.04d | 14.24 ± 0.07c | 42.22 ± 2.07e | 45.81 ± 2.66c |
| 20 | 46.15 ± 1.78d | 42.31 ± 2.23b | 31.62 ± 1.44e | 32.10 ± 3.08b | 39.17 ± 1.72e | 24.10 ± 3.32b | 32.11 ± 0.27f | 58.78 ± 0.34b |
| 40 | 36.67 ± 3.06e | 54.17 ± 3.82a | 26.61 ± 1.73f | 42.87 ± 3.72a | 34.27 ± 0.56f | 33.60 ± 1.09a | 22.16 ± 0.30g | 71.55 ± 0.39a |
| 抑制率 IC_{50} IC_{50} value ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | - | 27.49 | - | 89.41 | - | 120.53 | - | 10.10 |
| 抑制率 IC_{90} IC_{90} value ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | - | 674.70 | - | 14 520.00 | - | 3 605.00 | - | 551.77 |

注:数值为平均值 \pm 标准差,小写字母表示在同一列中各处理间在 0.05 水平上存在差异显著性。

Note: Values are means \pm standard deviation (SD). Non-matching small letters at the same column indicate a significant difference among treatments ($P < 0.05$).

2.2.2 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发油对芽管长度的抑制效果

所供试的 6 种挥发性物质浓度对 4 种真菌芽管生长有一定的抑制效果(表 3),高浓度抑制效果显著高于低浓度($P < 0.05$)。1.25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 和 20 ~ 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 挥发性物质抑制 4 种真菌芽管长度表现为小麦根腐离蠕孢 > 黑曲霉 > 新月弯孢 > 总状毛霉,

挥发性物质浓度为 2.5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 的抑制大小为黑曲霉 > 总状毛霉 > 小麦根腐离蠕孢 > 新月弯孢,5 ~ 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 挥发性物质抑制芽管生长的效果从大到小为小麦根腐离蠕孢 > 黑曲霉 > 总状毛霉 > 新月弯孢。不同浓度的挥发性物质对真菌芽管生长在一定程度上均起抑制作用,就不同真菌而言,表明了针对不同真菌引起的病害应选择合适的挥发性物质剂量。

表 3 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质对 4 种真菌孢子芽管长度的抑制作用Table 3 Effects of volatile substance of *Epichloë* sp. from *F. sinensis* on germ tube elongation of the tested four fungi

| 挥发性物 质浓度 Volatile substance ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 小麦根腐离蠕孢 <i>B. sorokiniana</i> | | 新月弯孢 <i>C. lunata</i> | | 黑曲霉 <i>A. niger</i> | | 总状毛霉 <i>M. racemosus</i> | |
|---|--|---|--|---|--|---|--|---|
| | 芽管长度 Length of germ tube (μm) | 芽管长度抑制率 Inhibition rate of germ tube growth (%) | 芽管长度 Length of germ tube (μm) | 芽管长度抑制率 Inhibition rate of germ tube growth (%) | 芽管长度 Length of germ tube (μm) | 芽管长度抑制率 Inhibition rate of germ tube growth (%) | 芽管长度 Length of germ tube (μm) | 芽管长度抑制率 Inhibition rate of germ tube growth (%) |
| 0 | 55.97 ± 0.82a | - | 46.47 ± 1.31a | - | 51.60 ± 1.40a | - | 66.13 ± 1.00a | - |
| 1.25 | 47.90 ± 1.42b | 14.42 ± 2.54d | 42.41 ± 0.41b | 8.68 ± 0.87f | 45.83 ± 1.21b | 11.18 ± 2.34d | 61.59 ± 0.47b | 6.87 ± 0.71e |
| 2.5 | 44.60 ± 2.79b | 20.31 ± 4.98d | 39.65 ± 0.48c | 14.62 ± 1.04e | 36.07 ± 1.95c | 30.10 ± 3.77c | 49.98 ± 0.71c | 24.41 ± 1.08d |
| 5 | 31.39 ± 3.62c | 43.91 ± 6.48c | 36.51 ± 0.94d | 21.38 ± 2.02d | 33.30 ± 1.98cd | 33.28 ± 0.35c | 47.40 ± 0.45cd | 28.32 ± 0.68cd |
| 10 | 27.00 ± 2.14d | 51.75 ± 3.83b | 31.73 ± 2.24e | 31.67 ± 4.82c | 31.42 ± 2.67d | 41.28 ± 1.84b | 44.96 ± 1.51d | 32.01 ± 2.29c |
| 20 | 23.87 ± 1.02d | 57.35 ± 1.82b | 25.74 ± 2.57f | 44.57 ± 5.52b | 28.42 ± 1.37e | 44.92 ± 2.65b | 39.33 ± 2.50e | 40.52 ± 3.78b |
| 40 | 16.89 ± 2.37e | 69.81 ± 4.22a | 21.93 ± 0.78g | 52.78 ± 1.68a | 20.99 ± 0.52f | 59.31 ± 1.01a | 31.25 ± 2.00f | 52.74 ± 6.05a |

注:数值为平均值 \pm 标准差,小写字母表示在同一列中各处理间在 0.05 水平上存在差异显著性。

Note: Values are means \pm standard deviation (SD). Non-matching small letters at the same column indicate a significant difference among treatments ($P < 0.05$).

2.3 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质对细菌的抑制效果

从表 4 可见, 所测试挥发性物质随着浓度的增加对供试细菌菌株的抑菌圈直径增加, 同一浓度的

挥发性物质对金黄色葡萄球菌的抑制作用强于大肠杆菌。金黄色葡萄球菌和大肠杆菌是常见食源性疾病病的病原菌, 而本试验的结果表明了中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质可抑制这两种细菌。

表 4 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌的抑菌圈直径 (cm)

Table 4 The inhibition zones of volatile substance of *Epichloë* sp. from *F. sinensis* against *S. aureus* and *E. coli* (cm)

| 挥发性物质浓度 Volatile substance ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i> | 大肠杆菌 <i>E. coli</i> |
|--|-----------------------------|------------------------|
| 0 | 1.50 ± 0.00f | 1.50 ± 0.00g |
| 1.25 | 1.80 ± 0.10e | 1.80 ± 0.03f |
| 2.5 | 2.05 ± 0.05d | 1.90 ± 0.04e |
| 5 | 2.18 ± 0.03c | 2.01 ± 0.04d |
| 10 | 2.27 ± 0.02c | 2.11 ± 0.03c |
| 20 | 2.40 ± 0.04b | 2.19 ± 0.03b |
| 40 | 2.59 ± 0.04a | 2.31 ± 0.03a |
| Control (Sterile water) | 0 | 0 |

注: 数值为平均值 ± 标准差, 小写字母表示在 0.05 水平上不同浓度的挥发性物质对同一细菌抑菌圈差异显著性 ($P < 0.05$)。

Note: Values are means ± standard deviation (SD). Different lower case letters indicate a significant effect of different concentrations of volatile substance on inhibition zones of the tested bacterium ($P < 0.05$).

2.4 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 挥发性物质的化学成分

从中华羊茅内生真菌挥发性物质中共检测出 400 个峰(图 1), 以匹配度大于 90% 为标准鉴定出 32 种化合物, 占挥发性物质总含量的 43.54%, 并通过峰面积归一化法确定各成分的相对百分含量(表 5)。中华羊茅内生真菌挥发性物质的组分复杂多样, 以烃类 6 种、酯类 5 种、醛类 5 种、醇类 4 种、酮类 4 种和吡啶类 4 种化合物为主。相对含量较高的有异山梨醇(16.26%)、甲基叔丁基醚(8.18%)、二氢甘露醇(3.75%)、羟基丙酮(2.99%)、乙酸(1.22%)、己醇(1.20%)、3-糠醛(0.92%)、5-羟甲基二氢呋喃-2 酮(0.86%)、5-羟基戊酸-2,4-二叔丁基苯酯(0.86%)和棕榈酸甲酯(0.85%), 还有两种相对含量超过 10% 的不确定化合物。

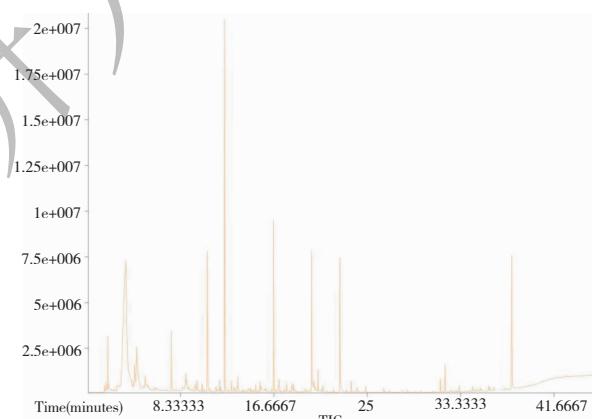


图 1 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 菌株挥发性物质的 GC-MS 总离子流色谱图

Fig. 1 Total ion chromatogram of the volatile substance of *Epichloë* sp. from *F. sinensis* by GC-MS

表 5 中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 菌株挥发性物质化学成分 GC-MS 分析

Table 5 Chemical components of volatile substance of *Epichloë* sp. from *F. sinensis* by GC-MS

| 编号 No. | 保留时间 Retention time (min) | 化合物 Compound | 分子式 Molecular formula | 相对含量 Relative content (%) |
|-----------|---------------------------------|------------------------------------|--|------------------------------|
| 1 | 1.68 | 正己烷 n-Hexane | C ₆ H ₁₄ | 0.33 |
| 2 | 1.83 | 甲基叔丁基醚 Propane,2-methoxy-2-methyl- | C ₅ H ₁₂ O | 8.18 |
| 3 | 2.42 | 乙酸甲酯 Acetic acid,methyl ester | C ₃ H ₆ O ₂ | 0.12 |
| 4 | 4.42 | 癸烷 Decane | C ₁₀ H ₂₂ | 0.03 |

续表 5 (Continued Tab. 5)

| 编号 No. | 保留时间 Retention time (min) | 化合物 Compound | 分子式 Molecular formula | 相对含量 Relative content (%) |
|-----------|---------------------------------|--|--|---------------------------------|
| 5 | 5.20 | 癸烯 1-Decene | C ₁₀ H ₂₀ | 0.53 |
| 6 | 6.15 | 十一烷 Undecane | C ₁₁ H ₂₄ | 0.20 |
| 7 | 7.92 | 间二甲苯 Benzene,1,3-dimethyl- | C ₈ H ₁₀ | 0.08 |
| 8 | 9.81 | 3-辛酮 3-Octanone | C ₈ H ₁₆ O | 0.79 |
| 9 | 10.44 | 2,6-二甲基吡啶 2,6-Lutidine | C ₇ H ₉ N | 0.52 |
| 10 | 11.67 | 4-甲基吡啶 Pyridine,4-methyl- | C ₆ H ₇ N | 0.49 |
| 11 | 11.81 | 羟基丙酮 2-Propanone,1-hydroxy- | C ₃ H ₆ O ₂ | 2.99 |
| 12 | 12.87 | 己醇 1-Hexanol | C ₆ H ₁₄ O | 1.20 |
| 13 | 13.09 | 2,3-二甲基吡啶 Pyridine,2,3-dimethyl- | C ₇ H ₉ N | 0.42 |
| 14 | 13.39 | 壬醛 Nonanal | C ₉ H ₁₈ O | 0.12 |
| 15 | 15.43 | 3-糠醛 3-Furaldehyde | C ₅ H ₄ O ₂ | 0.92 |
| 16 | 15.51 | 乙酸 Acetic acid | C ₂ H ₄ O ₂ | 1.22 |
| 17 | 15.83 | 3,5-二甲基吡啶 Pyridine,3,5-dimethyl- | C ₇ H ₉ N | 0.42 |
| 18 | 16.46 | 2-乙酰基呋喃 Ethanone,1-(2-furanyl)- | C ₆ H ₆ O ₂ | 0.57 |
| 19 | 17.07 | 反式-2-壬醛 2-Nonenal,(E)- | C ₉ H ₁₆ O | 0.21 |
| 20 | 18.08 | 5-甲基呋喃醛 2-Furancarboxaldehyde,5-methyl- | C ₆ H ₆ O ₂ | 0.20 |
| 21 | 18.53 | 十六烷 Hexadecane | C ₁₆ H ₃₄ | 0.09 |
| 22 | 25.93 | 1,4-丁二醇 1,4-Butanediol | C ₄ H ₁₀ O ₂ | 0.08 |
| 23 | 27.51 | 羟基苯磷酸 Phosphonic acid,(p-hydroxyphenyl)- | C ₆ H ₇ O ₄ P | 0.11 |
| 24 | 28.17 | 2-吡咯烷酮 2-Pyrrolidinone | C ₄ H ₇ NO | 0.64 |
| 25 | 31.53 | 棕榈酸甲酯 Hexadecanoic acid,methyl ester | C ₁₇ H ₃₄ O ₂ | 0.85 |
| 26 | 31.94 | 二氢甘露醇 Dianhydromannitol | C ₆ H ₁₀ O ₄ | 3.75 |
| 27 | 33.22 | 5-羟基戊酸-2,4-二叔丁基苯酯 Pentanoic acid,5-hydroxy-,2,4-di-t-butylphenyl esters | C ₁₉ H ₃₀ O ₃ | 0.86 |
| 28 | 35.13 | 硬脂酸甲酯 Methyl stearate | C ₁₉ H ₃₈ O ₂ | 0.19 |
| 29 | 35.95 | 5-羟甲基二氢呋喃-2-酮 5-Hydroxymethylidihydrofuran-2-one | C ₅ H ₈ O ₃ | 0.86 |
| 30 | 36.32 | 5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural | C ₆ H ₆ O ₃ | 0.25 |
| 31 | 37.01 | 1,2-苯二甲酸二(2-甲基-丙基)酯 1,2-Benzenedicarboxylic acid,bis(2-methylpropyl) ester | C ₁₆ H ₂₂ O ₄ | 0.06 |
| 32 | 37.90 | 异山梨醇 Isosorbide | C ₆ H ₁₀ O ₄ | 16.26 |
| 33 | 22.56 | 不确定化合物 | | 11.72 |
| 34 | 10.72 | 不确定化合物 | | 10.97 |

3 结论

在离体培养条件下,内生真菌的发酵代谢产物成分较为复杂,能抑制多种真菌的菌丝生长。周生亮等^[4]从薯蓣根茎和种子中分离出6株内生真菌菌株,利用生长速度法测定出6株菌株的发酵液对6种植物病原真菌有一定的抑菌效果,且随着浓度的增加抑制作用增强。分别用甲醇、乙酸乙酯和石油醚萃取冬青卫矛内生真菌2QR1菌株菌丝体以及乙酸乙酯萃取发酵液得到各部分粗提物,在500 μg/

mL浓度下发酵液乙酸乙酯粗提物对供试病原真菌抑菌活性最大,而菌丝体甲醇提取物和菌丝体石油醚提取物对个别供试病原真菌菌丝生长有较弱的抑制作用^[5]。此外,Yue等^[18]发现无性型(*Neotyphodium tembladerae*)和羊茅香烛菌(*Epichloë festucae*)液体培养物的粗提物对病原菌*Cryphonectria parasitica*具有很高的抑菌活性。本研究中以中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 发酵产物挥发性物质、乙酸乙酯粗提物、水相部分和发酵液稀释液对小麦根腐离孢子、新

月弯孢、黑曲霉和总状毛霉菌丝生长的作用(表1),发现挥发性物质和乙酸乙酯粗提物抑菌活性较好,而对个别供试真菌无抑制作用,挥发性物质的抑菌作用方式还需从多方面进行试验。

一些研究者从菌丝形态和孢子萌发动态方面研究内生真菌代谢产物的抑菌效果^[6,7]。采用孢子萌发法研究黑麦草4株内生真菌菌株发酵液对4种植物病原菌孢子萌发和芽管的作用,证实了内生真菌发酵液均有明显的抑制效果,且对小麦根腐离蠕孢抑制作用最大^[7]。Holzmann-Wirth等^[19]用不同的有机溶剂对草地羊茅内生真菌液体培养物和琼脂培养基上的菌丝体进行萃取,发现甲醇和水提取物对大刀镰孢的孢子具有明显的抑制或延迟萌发的作用。而本试验以中华羊茅内生真菌 *Epichloë* sp. 不同浓度挥发性物质对小麦根腐离蠕孢、新月弯孢、黑曲霉和总状毛霉孢子萌发率和芽管长度的作用(表2,3),结果表明挥发性物质对不同菌种的抑制作用具有差异性,且对总状毛霉抑制效果最大,随着挥发性物质的浓度增加其抑制孢子萌发率的效果越好;挥发性物质对四种供试真菌芽管生长有一定的抑制效果,且高浓度抑制效果显著高于低浓度。由此可见,内生真菌发酵产物对孢子萌发和芽管长度有抑制作用,就挥发性物质而言,针对不同真菌引起的病害应选择合适的挥发性物质剂量。

内生真菌发酵产生的挥发性物质对某些真菌和细菌均有一定的抑菌效果。采用水蒸气蒸馏法获得尖瓣海莲叶内生真菌 *Penicillium* sp. B21 挥发性物质,以挥发性物质的10和20 mg/L浓度处理,在20 mg/L时对大肠埃希氏菌和白色葡萄球菌有较好的抑菌效果^[20]。解修超等^[21]采用索氏提取法提取三尖杉内生真菌SR1-26的挥发性物质,用滤纸片扩散法测定不同浓度的挥发性物质对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌的抑制作用,浓度为1 000.0 mg/mL时对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌抑菌活性较高,而对枯草芽孢杆菌和白色念珠菌抑制作用较弱。本试验以滤纸片法测得不同浓度的挥发性物质对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌抑菌圈直径的作用(表4),在40 μL/mL时抑菌圈直径显著大于对照($P < 0.05$)。从这些研究中发现不同内生真菌产生的挥发性物质对细菌或真菌的抑制效果因菌种不同而异,可能是挥发性物质成分和含量存在差异性。

通常利用GC-MS技术测定内生真菌挥发性物

质的组分种类和相对含量。三尖杉内生真菌 SR1-26 挥发性物质主要为油酸、棕榈酸和油酸乙酯等化合物^[21],尖瓣海莲叶内生真菌 *Penicillium* sp. B21 挥发性物质主要为棕榈酸、丁基-异丁基-邻苯二甲酯、亚油酸乙酯、棕榈酸乙酯和硬脂酸^[20],菠萝内生真菌挥发性物质主要为2-甲基-丙酸甲酯、2-甲基丙酸、3-甲基丁醇、乙酸异戊酯、2-甲基丙酸-2-甲基丁酯和乙醇^[22]。由此可见,不同内生真菌产生的挥发性物质组分和含量均存在一定的差异性。本试验的挥发性物质经固相微萃取-气相质谱分析后,发现色谱峰数量较多(图1),而以匹配度高的质谱峰为标准仅鉴定出32种组分,占挥发性物质总含量的43.54%,其中与抑菌活性相关的化合物有乙酸、1,4-丁二醇、棕榈酸甲酯和硬脂酸甲酯等物质^[22-24]。异山梨醇是一种渗透性口服脱水利尿药,可作为聚合物改性及可降解聚合物制造的生物原料^[25];甲基叔丁基醚可应用于清洁汽油辛烷值改进剂^[26];还有二种组分含量超过10%的不能通过数据库检索确定(表5),这些匹配度较低的化合物有待进一步分离、鉴定。

总体上,目前的研究主要采用乙酸乙酯、正丁醇、甲醇、乙醇和石油醚等有机溶剂萃取内生真菌发酵产物,研究其对孢子萌发率、芽管长度、菌丝生长、菌丝形态和细菌等方面的作用,涉及内生真菌发酵产物挥发性物质部分对上述测定指标的研究还不多。而本试验从多个角度测定了中华羊茅内生真菌挥发性物质对微生物的作用,可为开发新的生物制剂提供一定的试验依据。

参考文献

- Siegel MR, Latch GCM, Johnson MC. Fungal endophytes of grasses [J]. Annu Rev Phytopathol, 1987, 25:293-315.
- Niones JT, Takemoto D. An isolate of *Epichloë festucae*, an endophytic fungus of temperate grasses, has growth inhibitory activity against selected grass pathogens [J]. J Gen Plant Pathol, 2014, 80:337-347.
- Song QY, Nan ZB, Gao K, et al. Antifungal, phytotoxic and cytotoxic activities of metabolites from *Epichloë bromicola*, a fungus obtained from *Elymus tangutorum* grass [J]. J Agr Food Chem, 2015, 63:8787-8792.
- Zhou SL, Chen SL, Fang XT, et al. Isolation of endophytic fungi from *Dioscorea zingiberensis* and its fungistasis to plant pathogenic fungi [J]. Jiangsu Agr Sci (江苏农业科学), 2007, 4:64-67.

- 5 Li HL, Yang CP, Wu JZ, et al. Antifungal metabolites of endophytic fungus of 2QR1 strain in *Euonymus japonicus* [J]. J Northwest A&F Univ; Nat Sci(西北农林科技大学学报: 自科版), 2007, 35: 135-140.
- 6 Zhang XW, Sang WJ, Xie X, et al. Antagonistic effect of four plant endophytic fungi on three pathogenic fungi of tobacco [J]. J Mountain Agr Biol(山地农业生物学报), 2010, 29: 296-299.
- 7 Ma MZ, Nan ZB. Effects of fungal endophytes from perennial ryegrass on the growth of plant pathogens [J]. Pratacul Sci (草业科学), 2011, 28: 962-968.
- 8 Han Z, Mei WL, Cui HB, et al. Antibacterial constituents from the endophytic fungus *Penicillium* sp. of mangrove plant *Cerbera manghas* [J]. Chem J Chin U (高等学校化学学报), 2008, 29: 749-752.
- 9 Zang HR, Meng SX, Cao J, et al. Antibacterial mechanisms of endophytic fungi from *Gynostemma pentaphyllum* on *Escherichia coli* [J]. Microbiol China(微生物学通报), 2015, 42: 157-162.
- 10 Ju XY, Feng YJ, Chen FM, et al. Volatile constituents and their fibrinolytic activity of endophytic fungus *Fusarium* sp. GI024 from *Ginkgo biloba* [J]. Microbiol China(微生物学通报), 2006, 33(6): 8-11.
- 11 Peng K, Mei WL, Wu J, et al. Volatile constituents and their antimicrobial activities of endophytic fungus *Aspergillus* sp. A14 from *Aquilaria sinensis* [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2011, 23(1): 85-88.
- 12 Tian P, Kuang Y, Nan ZB. The characteristics of *Festuca sinensis* and its breeding potential [J]. Pratacul Sci(草业科学), 2015, 32: 1079-1087.
- 13 Jin WJ, Li CJ, Nan ZB. Biological and physiological characteristics of *Neotyphodium* endophyte symbiotic with *Festuca sinensis* [J]. Mycosistema(菌物学报), 2009, 28: 363-369.
- 14 Zhong S, Wang WN, Zhou LY, et al. Effect of fermentation liquid of *Epichloë* isolated from *Festuca sinensis* on seed germination [J]. J Shanxi Agr Sci(山西农业科学), 2017, 45: 736-739.
- 15 Zhou LY, Zhang XX, Li CJ, et al. Antifungal activity and phytochemical investigation of the asexual endophyte of *Epichloë* sp. from *Festuca sinensis* [J]. Sci China Life Sci. 2015, 8: 821-826.
- 16 Yang Y, Chen N, Li CJ. The morphological diversity of endophytic fungus in *Festuca sinensis* in Gansu Province [J]. Pratacul Sci(草业科学), 2011, 28: 273-278.
- 17 Kuang Y, Wang JJ, Xu WB, et al. Analysis of actin sequences from *Epichloë* endophyte in *Festuca sinensis* [J]. Acta Pratacul Sinica(草业学报), 2016, 25: 125-131.
- 18 Yue Q, Miller CJ, White JF, et al. Isolation and characterization of fungal inhibitors from *Epichloë festucae* [J]. J Agr Food Chem, 2000, 48: 4687-4692.
- 19 Holzmann-Wirth A, Dapprich PD, Eierdanz S, et al. Antifungal substances extracted from *Neotyphodium* endophytes [C]. Proceedings of the 3rd International Conference on Harmful and Beneficial Microorganisms in Grassland, Pasture and Turf. Soest, Germany, 2000, 65-69.
- 20 Niu YY, Luo YP, Liu DD, et al. Volatile constituents and antibacterial activity of endophytic fungus *Penicillium* sp. B21 from *Bruguiera sexangula* [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae(中国实验方剂学杂志), 2016, 22(15): 70-74.
- 21 Xie XC, CHen WQ, Deng BW, et al. Volatile oil constituents and antimicrobial activity of endophytic fungus SR1-26 isolated from *Cephalotaxus fortunei* [J]. J Shanxi Uni Tech; Nat Sci(陕西理工学院学报: 自科版), 2013, 29(4): 56-60.
- 22 Mitchell AM, Strobel GA, Moore E, et al. Volatile antimicrobials from *Muscador crispans*, a novel endophytic fungus [J]. Microbiology, 2010, 156: 270-277.
- 23 Zhang J, Tian ZG, Wang JH, et al. Advances in antimicrobial molecular mechanism of organic acids [J]. Acta Vet et Zootechnica Sinica(畜牧兽医学报), 2011, 42: 323-328.
- 24 Wang HX, Hao YP, Wang HW. Indoor bioactivity of methyl palmitate acting on phytophagous mites and synergistic effect of industrial methyl palmitate mixed with Silwet L-77 [J]. Chin Agr Sci Bull(中国农学通报), 2013, 29: 184-187.
- 25 Shen XL, Wang ZQ, Wang QY, et al. Progress of bio-polymers based on isosorbide [J]. Petro Tech(石油化工), 2018, 47(1): 86-94.
- 26 Shen PF, Hou WJ, Xu MJ, et al. Markets status and progress in technology of MTBE [J]. Chem Eng(化学工程师), 2018, 32(1): 50-53.