

网络出版日期:2018-05-09
网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180509.1604.022.html

苹果树腐烂病菌挥发性代谢物及其毒素活性

李思南¹,秦 辰²,王 惠³,黄丽丽⁴

(1. 西北农林科技大学 植物保护学院,陕西杨凌 712100;2. 西北农林科技大学 农学院,陕西杨凌 712100;
3. 西北农林科技大学 化学与药学院,陕西杨凌 712100;4. 西北农林科技大学 植物保护学院,
旱区作物逆境生物学国家重点实验室,陕西杨凌 712100)

摘 要 研究苹果树腐烂病菌代谢产生的挥发性物质及其毒素活性。通过在树皮培养基中培养苹果树腐烂病菌,采用普通蒸馏法收集其培养滤液中的挥发性代谢产物,利用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)分离各个成分,将各组分质谱图与数据库标准物质质谱图对比,初步进行结构定性,并利用苹果枝条对其标准物质进行毒素活性测定。结果表明,苹果树腐烂病菌在发酵过程中产生 5 种挥发性物质,分别为 2-氟丙烯、异戊醇、2-苯乙醇、4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚,其中异戊醇、2-苯乙醇、4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚均对苹果树枝具有毒素活性。苹果树腐烂病菌产生的挥发性代谢产物对苹果树具有毒素活性,为苹果树腐烂病菌致病机理的探索提供新的思路与方向。

关键词 苹果树腐烂病菌;挥发性代谢产物;毒素活性;GC-MS

中图分类号 S432.4⁺4 **文献标志码** A **文章编号** 1004-1389(2018)05-0692-07

苹果树腐烂病(*Valsa mali* Miyabe et Yamada),俗称臭皮病、烂皮病、串皮病,是由黑腐皮壳属(*Valsa mali*)真菌引起的树枝干皮层腐烂病害^[1],目前由于对其致病机理还不十分清楚,导致该病的防治比较盲目。为了搞清楚其致病机理,必须对其分泌的毒素活性物质进行研究。目前对苹果树腐烂病菌代谢产物的研究主要集中在酶类物质^[2-4]、根皮苷的降解产物^[5-7]、有机酸类^[8]等。有研究还发现,苹果树腐烂病菌分泌的蛋白类物质也有致病活性^[9]。但关于其发酵产生的挥发性成分是否在致病过程中具有作用尚未见报道。有研究表明生物体产生的一些挥发性代谢物质具有一定生物活性^[10]。关于挥发性代谢产物的研究,当前主要用 GC-MS 方法^[11]。旱区作物逆境生物学国家重点实验室果树病害病原生物学及综合防控研究团队曾利用该方法对苹果树腐烂病菌在 MS 培养基中的挥发性成分进行研究,并发现 2 个毒素活性成分。在此基础上,进一步对该病菌在树皮培养基中的挥发性成分进行分离提取,利用 GC-MS 对各个成分进行分离和结构定性,初

步确定其代谢的挥发性成分与毒素活性的关系,以期为该病菌致病机理的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与培养基 菌株:苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)由西北农林科技大学植物病害综合治理实验室提供,4 ℃保存。

树皮培养基:取苹果树皮 150 g,葡萄糖 10 g,于 1 000 mL 沸水中煮 30 min,纱布过滤。

1.1.2 仪器与试剂 气相色谱-质谱联用仪:QP201V1tra 型。乙酸乙酯:质谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司;异戊醇,2-苯乙醇,4-乙基苯酚,4-乙基-2-甲氧基苯酚均为市售分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 培养滤液的制备 先将苹果树腐烂病菌接种至 PDA 培养基上,于 25 ℃培养 3 d。再用直径 5 cm 的打孔器沿菌落边缘打出菌株长势均匀的菌饼,接种于树皮培养基中,并设置一空白对照,置于 25 ℃进行培养,每天摇瓶 20 min(120

收稿日期:2017-05-04 修回日期:2017-08-30
基金项目:公益性行业(农业)科研专项(201203034)。
第一作者:李思南,女,在读本科生,研究方向为植物保护。E-mail: lisinan77777@163.com
通信作者:王 惠,女,教授,研究方向为天然农用活性物质。E-mail: wanghuiab@sina.com
黄丽丽,女,硕士,教授,研究方向为植物病害综合防治。E-mail: lilyhuangk@163.com

r/min),培养 15 d。用布氏漏斗抽滤得到培养滤液。

1.2.2 培养滤液中挥发性代谢产物的收集 取上述培养滤液 300 mL 于圆底烧瓶中,进行普通蒸馏,用 10 mL 乙酸乙酯收集馏分,收集液封口保存于 4 ℃冷藏箱中。各进行 3 次重现试验。

1.2.3 挥发性代谢产物的定性分析 取上述收集液在如下 GC-MS 条件下进行分析测定,通过与谱库标准物质质谱图对照初步确定收集液中各成分的结构。GC-MS 条件:石英毛细管柱(30.0 m×0.25 mm),升温程序 40~90 ℃(3 ℃/min),90~230 ℃(10 ℃/min,230 ℃保留 3 min),进样口温度 240 ℃,进样量 2 μL,载气 He,进样方式为不分流,柱流量 1.11 mL/min,吹扫流量 3 mL/min。EI 源,离子源温度 200 ℃,接口温度 220 ℃,电子能量 70 eV,扫描质量范围:50~500。

1.2.4 4 种挥发性物质的标准物质的毒素活性测定方法 苹果树枝条的准备:取粗细和长短相等且长势相近的健康苹果树枝 30 支,用 φ=0.6% 的次氯酸钠溶液浸泡 10 min 进行消毒,然后用无菌水漂洗 3 次,于超净工作台上晾干,用石蜡封在形态学上端以防止过多水分散失,用湿润棉花包裹形态学下端保湿,保证试验过程中枝条存活。

活性测定:先用灼烧后的打孔器在每个枝条

中间表面造成伤口,然后用微量注射器在枝条伤口处分别滴异戊醇 10 μL、2-苯乙醇 10 μL、4-乙基苯酚 10 μg、4-乙基-2-甲氧基苯酚 10 μL,每个样品处理 3 个枝条。以未滴加任何物质的带伤枝条和伤口处接苹果树腐烂病菌菌饼的枝条分别作为对照(ck-a 和 ck-b),保存在密封的培养皿中,置于 25 ℃恒温室中培养,80 h 后进行病斑大小测定。病斑大小以长直径与短直径的乘积表示。

1.2.5 数据分析 用 SPSS 软件(SPSS 16.0 版)进行统计分析,采用 LSD 法进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 挥发性代谢产物成分分析

用 GC-MS 对供试菌株的培养滤液收集液和纯培养基滤液收集液分别进行定性分析,得到的色谱图见图 1。从图 1 可以看出,供试菌株的培养滤液收集液与纯培养基滤液收集液(ck)相比,前者明显多出①、②、③、④ 和 ⑤ 5 个色谱峰,表明供试菌株产生挥发性物质。图 2-A、2-B、2-C 和图 3-A、3-B 分别是图 1 中①、②、③、④ 和 ⑤ 相应的质谱图及谱库中相似度较高的相应标准物质质谱图,其相应的中英文名称见图 2 和图 3 注,对应的各物质的结构见图 4。

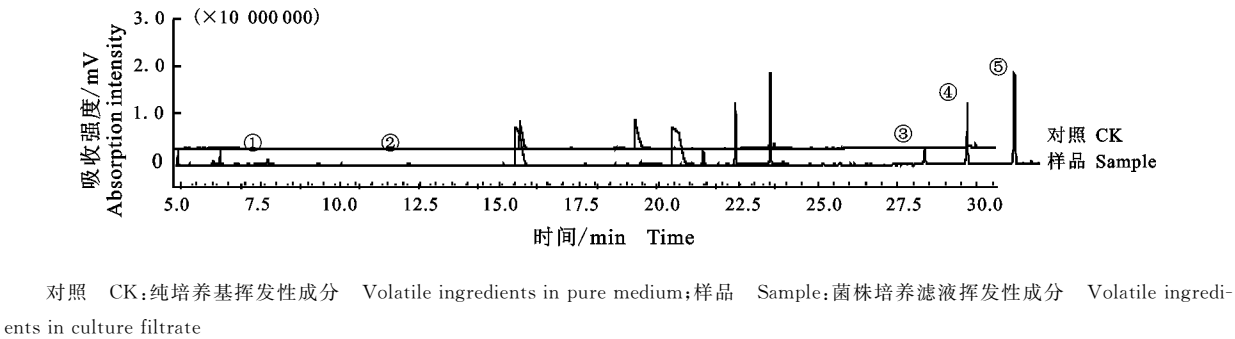


图 1 苹果树腐烂病菌树皮培养基培养滤液中挥发性代谢物的色谱图

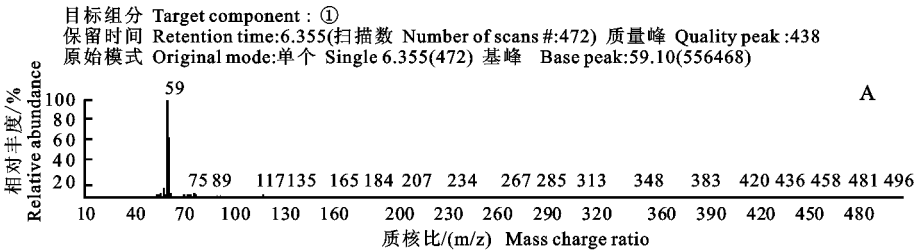
Fig. 1 Chromatography spectra of volatile metabolites in culture filtrate of Valsa mali

2.2 4 种挥发性物质的标准物质对苹果树枝条的毒素活性测定结果

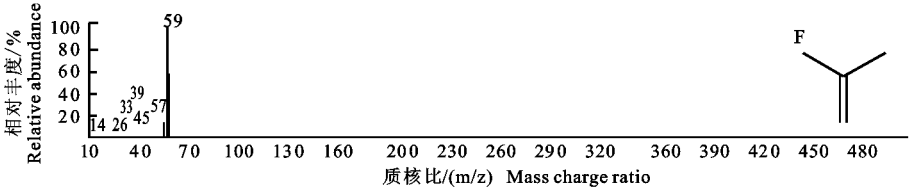
利用苹果枝条作为生测对象,检测 4 种挥发性物质的标准物质的生物活性,结果见图 5。可以看出,图 5-B 的病斑明显大于图 5-A,说明本试验中的苹果树腐烂病菌具有明显的致病性。另外,图 5-A 枝条上没有显示出病斑,表明只有伤口不会产生病斑,而在伤口上分别滴加 4 种物质

处理(图 5-C、5-D、5-E 和 5-F)的枝条上明显有病斑出现,表明 4 种化合物均对苹果树枝具有毒素活性。

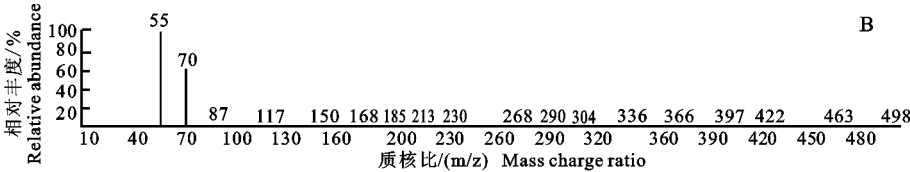
对图 5 中各处理的致病斑面积进行统计,结果见表 1。表 1 中的 5-A 与处理 5-C、5-D、5-E 和 5-F 均差异显著($P<0.05$),进一步表明异戊醇、2-苯乙醇、4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚对苹果树枝均具有明显的毒素活性。



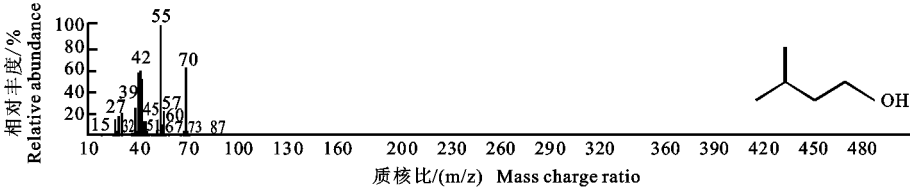
谱库 Spectral library :NIST14.lib SI:94 分子式 Molecular formula:C₃H₅F CAS:1184-60-7 摩尔质量 Molar mass:60
保留指数 Retention index:260 组分名称 Composition name:2-Fluoroprop-1-ene



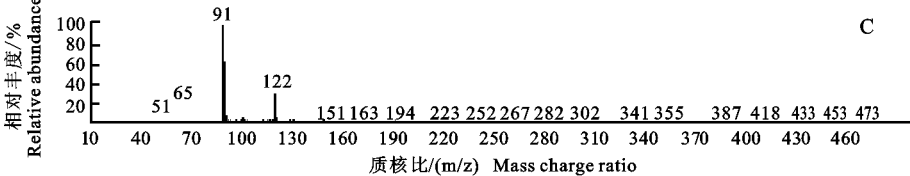
目标组分 Target component : ②
保留时间 Retention time: 10.795 (扫描数 Number of scans #:1360) 质量峰 Quality peak : 426
原始模式 Original mode:单个 Single 10.795(1360) 基峰 Base peak: 55.10(167663)



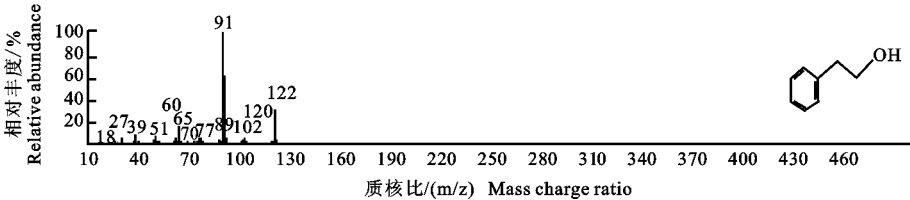
谱库 Spectral library :NIST14.lib SI: 98 分子式 Molecular formula: C₅H₁₂O CAS: 123-51-3 摩尔质量 Molar mass: 88
保留指数 Retention index: 697 组分名称 Composition name: 3-methylbutan-1-ol



目标组分 Target component : ③
保留时间 Retention time: 27.015 (扫描数 Number of scans #:4604) 质量峰 Quality peak : 438
原始模式 Original mode:单个 Single 27.015(4604) 基峰 Base peak: 91.10(348412)



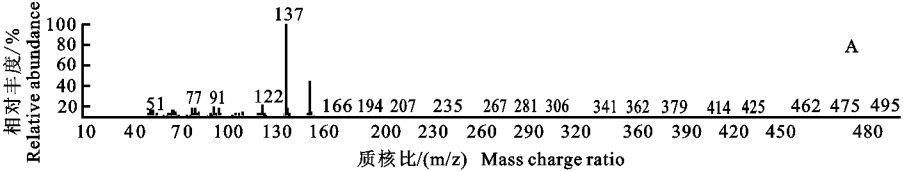
谱库 Spectral library :NIST14.lib SI: 94 分子式 Molecular formula: C₈H₁₀O CAS: 60-12-8 摩尔质量 Molar mass: 122
保留指数 Retention index: 1136 组分名称 Composition name: 2-phenylethan-1-ol



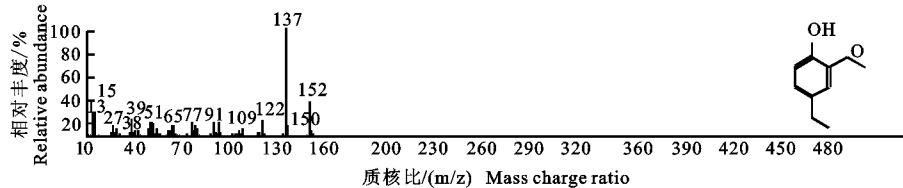
A. “2-氟-1-丙烯”及标准物质质谱图 Mass spectra of 2-fluoro-1-propene and standard compound; B. “异戊醇”及标准物质质谱图 Mass spectra of 3-methylbutan-1-ol and standard compound; C. “2-苯乙醇”及标准物质质谱图 Mass spectra of 2-phenylethan-1-ol and standard compound

图 2 苹果树腐烂病菌树皮培养基发酵液挥发性代谢产物中组分的质谱图及其数据库标准物质质谱图
Fig. 2 The mass spectrum of volatile metabolite from *Valsa mali* in medium with apple-tree-rind and standard compound

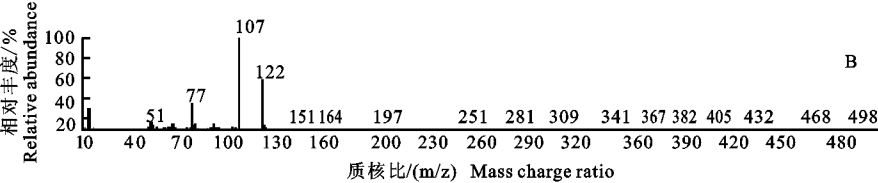
目标组分 Target component : ④
保留时间 Retention time: 28.320 (扫描数 Number of scans #:4865) 质量峰 Quality peak : 429
原始模式 Original mode: 单个 Single 28.320(4865) 基峰 Base peak: 137.15(6073223)



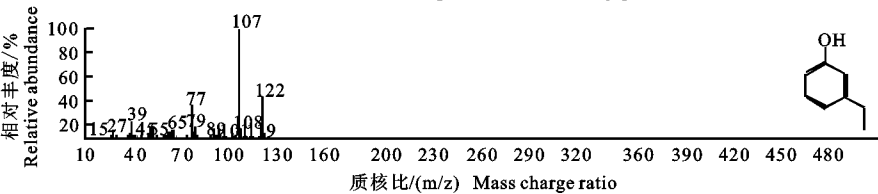
谱库 Spectral library: NIST14.lib SI: 93 分子式 Molecular formula: C₉H₁₀O₂ CAS: 2785-89-9 摩尔质量 Molar mass: 152
保留指数 Retention index: 1303 组分名称 Composition name: 4-ethyl-2-methoxyphenol



目标组分 Target component : ⑤
保留时间 Retention time: 29.800 (扫描数 Number of scans #:5161) 质量峰 Quality peak : 436
原始模式 Original mode: 单个 Single 29.800(5161) 基峰 Base peak: 107.15(8324001)



谱库 Spectral library: NIST14.lib SI: 95 分子式 Molecular formula: C₉H₁₀O CAS: 620-17-7 摩尔质量 Molar mass: 122
保留指数 Retention index: 1114 组分名称 Composition name: 3-ethylphenol



A. “4-乙基-2-甲氧基-苯酚”及标准物质质谱图 Mass spectra of 4-ethyl-2-methoxyphenol and standard compound; B. “4-乙基苯酚或3-乙基苯酚”及标准物质质谱图 Mass spectra of 4-ethylphenol or 3-ethylphenol and standard compound

图 3 苹果树腐烂病菌树皮培养基发酵液挥发性代谢产物中组分的质谱图及其数据库标准物质质谱图
Fig. 3 The mass spectrum of volatile metabolite from *Valsa mali* in medium with apple-tree-rind and standard compound

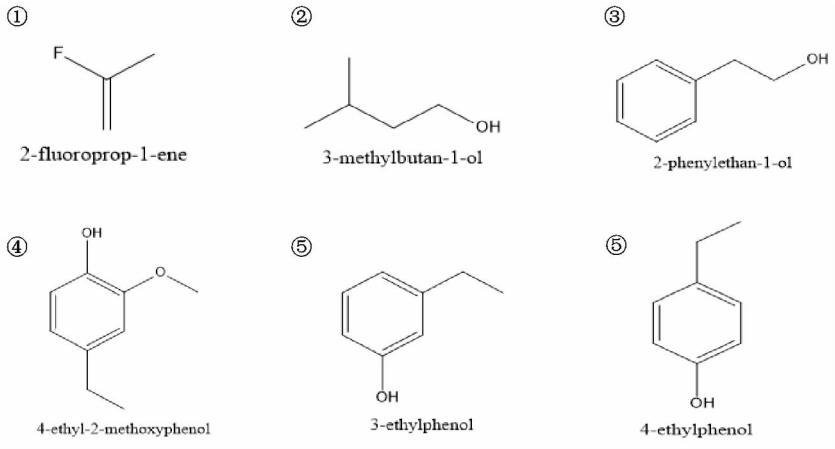
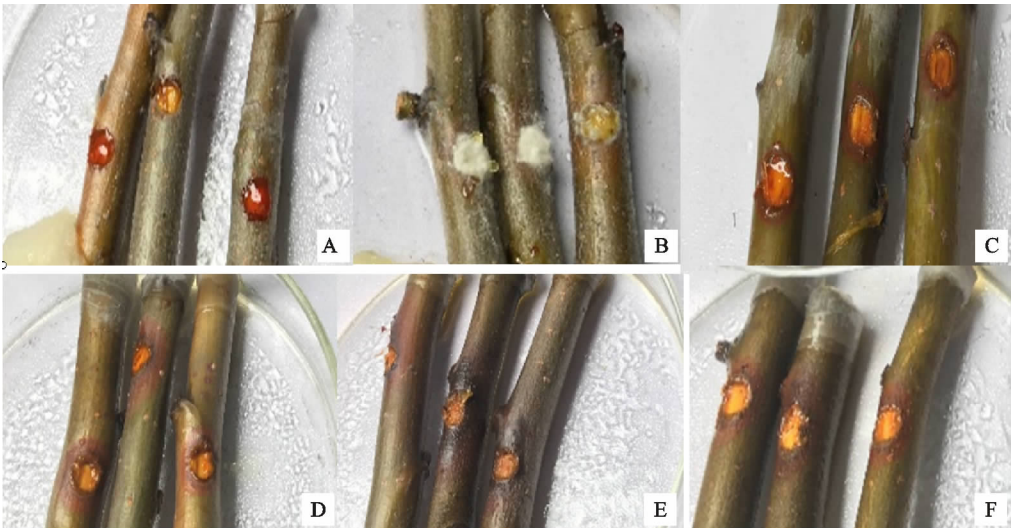


图 4 苹果树腐烂病菌树皮培养滤液中 5 种挥发性代谢物的结构
Fig. 4 Structures of 5 volatile metabolites from *Valsa mali* in medium with apple-tree-rind



A. 仅在苹果枝条上造成伤口 Only a wound on the apple branches;B. 在苹果枝条上造成伤口并接菌饼(苹果树腐烂病菌) A wound on the apple branches and inoculated *Valsa mali*;C. 处理为在苹果枝条上造成伤口并滴加异戊醇试剂 A wound on the apple branches and drop the 3-methylbutan-1-ol;D. 在苹果枝条上造成伤口并滴加 2-苯乙醇 A wound on the apple branches and drop the 2-phenylethan-1-ol;E. 在苹果枝条上造成伤口并滴加 4-乙基苯酚 A wound on the apple branches and drop the 4-ethylphenol;F. 在苹果枝条上造成伤口并滴加 4-乙基-2-甲氧基苯酚 A wound on the apple branches and drop the 4-ethyl-2-methoxyphenol

图 5 4 种物质对苹果枝条的坏死现象观察结果

Fig. 5 Bioactivity of 4 volatile metabolites on apple shoots

表 1 4 种物质对苹果枝条的坏死斑大小的测量结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Lesion size on apple branches after treated with 4 volatile metabolites

代号 Code	处理 Treatment	病斑面积平均值/cm ² Average area of lesion area
5-A	伤口 Wound	0.25 ± 0.02
5-B	伤口+菌饼 Wound + <i>Valsa mali</i>	1.47 ± 0.43 [△]
5-C	伤口+异戊醇 Wound + 3-methylbutan-1-ol	0.58 ± 0.04 [*]
5-D	伤口+2-苯乙醇 Wound + 2-phenylethan-1-ol	1.40 ± 0.67 [*]
5-E	伤口+4-乙基苯酚 Wound + 4-ethylphenol	3.32 ± 0.74 [*]
5-F	伤口+4-乙基-2-甲氧基苯酚 Wound + 4-ethyl-2-methoxyphenol	1.14 ± 0.24 [*]

注:菌饼接种苹果树腐烂病菌;与 ck-a 相比,△: $P<0.05$;与 ck-b 相比, *: $P<0.05$ 。5-A、5-B、5-C、5-D、5-E 和 5-F 同图 5 的 A、B、C、D、E 和 F。

Note: Agar disk containing mycelium inoculated *Valsa mali*; compared with “ck-a”, △: $P<0.05$; compared with “ck-b”, *: $P<0.05$. 5-A, 5-B, 5-C, 5-D, 5-E and 5-F respectively correspond to A, B, C, D, E and F in Fig. 5.

3 讨论

3.1 异戊醇、2-苯乙醇为苹果树腐烂病菌自身代谢的产物

苹果树腐烂病菌在树皮培养基发酵滤液中分离得到异戊醇、2-苯乙醇两种挥发性物质。在之前研究中,旱区作物逆境生物学国家重点实验室果树病害病原生物学及综合防控研究团队通过在 MS 液体培养基中培养苹果树腐烂病菌,采用普通蒸馏法收集其培养滤液中的挥发性代谢产物,

利用 GC-MS 对各个成分进行初步结构定性,发现苹果树腐烂病菌在 MS 培养基发酵滤液中也分离得到异戊醇、2-苯乙醇这两种挥发性物质,表明异戊醇、2-苯乙醇是苹果树腐烂病菌自身的代谢产物,与培养基无关。

3.2 2-氟丙烯、4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚可能为苹果树腐烂病菌分解树皮中物质产生的

苹果树腐烂病菌在树皮培养基发酵液中分离得到 2-氟丙烯、4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚,这 3 种挥发性物质在 MS 培养基发酵滤液中

尚未发现。表明这 3 种挥发性物质并非致病菌自身代谢产生。再者王建华等^[5]、Natsume 等^[6]、Koganezawa 等^[7]都曾报道过苹果树腐烂病菌能分解树皮中根皮苷。因此推测,这 3 种挥发性物质可能是苹果树腐烂病菌在自身生长过程中分解树皮中的物质产生的。

3.3 异戊醇、2-苯乙醇、4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚是苹果树腐烂病菌代谢产生的毒素活性物质

本试验发现,异戊醇、2-苯乙醇、4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚都对苹果树枝条表现出毒素活性,表明它们是苹果树腐烂病菌的毒素活性物质。本试验检测到 2-氟丙烯这一挥发性物,因在市场上没有购买到其分析纯试剂,未进行毒素活性试验。2-氟丙烯是否具有毒素活性,有待进一步研究。

4 结 论

本试验以苹果树腐烂病菌为材料,结合普通蒸馏的方法和 GC-MS 联用仪的使用,分离提取并分析苹果树腐烂病菌在树皮培养基中培养产生的挥发性代谢产物。经分析得知,苹果树腐烂病菌在该条件下培养产生的挥发性代谢产物有 5 种,分别为 2-氟丙烯、异戊醇、2-苯乙醇、4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚。利用苹果枝条作为生测对象,对异戊醇、2-苯乙醇、4-乙基苯酚、4-乙基-2-甲氧基苯酚的标准物质进行生物毒素活性测定,发现该 4 种挥发性物质均对苹果树枝条具有毒素活性。本试验首次发现苹果树腐烂病菌产生的挥发性代谢产物对苹果树具有毒素活性,为该致病菌致病机理的探索提供新的思路与方向。

参考文献 Reference:

[1] WANG X, WEI J, HUANG L, *et al.* Re-evaluation of pathogens causing *Valsa* canker on apple in China [J]. *Mycologia*, 2011, 103(2): 317.

[2] 刘福昌, 李美娜, 王永淦. 苹果树腐烂病菌致病因素——果胶酶的初步探讨[J]. 中国果树, 1980(4): 45-48.

LIU F CH, LI M N, WANG Y J. Preliminary study on pathogenicity of apple rot disease-pectinase [J]. *Chinese Fruit Tree*, 1980(4): 45-48.

[3] 王 娟, 马 强, 庄 霞, 等. 苹果树腐烂病病原菌分泌物中果胶酶的测定[J]. 内蒙古农业科技, 2009(4): 39-40.

WANG J, MA Q, ZHUANG X, *et al.* Determination of pec-

tinase in fungi secretion of apple tree canker [J]. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*, 2009(4): 39-40.

[4] 何媛媛, 于 哲, 王海英, 等. 不同碳氮源对苹果树腐烂病菌胞外果胶酶活性的影响[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014, 42(11): 81-86.

HE Y Y, YU ZH, WANG H Y, *et al.* Effects of different carbon and nitrogen sources on activity of extracellular pectinase of *Valsa mali* var. *mali* [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2014, 42(11): 81-86.

[5] 王建华, 柯希望, 黄以超, 等. 苹果树腐烂病菌发酵液中根皮苷主要降解成分的分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(8): 89-94.

WANG J H, KE X W, HUANG Y CH, *et al.* Component analysis of *Valsa mali* var. *mali* fermentation liquid degrading phlorizin [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2012, 40(8): 89-94.

[6] NATSUME H, SETO H, OTAKE N. Studies on apple canker disease. The necrotic toxins produced by *Valsa ceratosperma* [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1982, 46(8): 2101-2106.

[7] KOGANEZAWA H, SAKUMA T. Possible role of breakdown products of phloridzin in symptom development by *Valsa ceratosperma* [J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1982, 48(4): 521-552.

[8] TRAQUAIR J A. Oxalic acid and calcium oxalate produced by *Leucostoma cincta* and *L. persoonii* in culture and in peach bark tissues [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1988, 65(9): 1952-1956.

[9] 王建华. 苹果树腐烂病菌致病物质的初步研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2012.

WANG J H. Studies on the pathogenic substances produced by *Valsa mali* [D]. Yangling Shaanxi: Northwest A&F University, 2012.

[10] 田治国, 王 飞, 刘 洋, 等. 西北地区常见的 6 种植物挥发性物质抑菌效果研究[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(6): 124-128.

TIAN ZH G, WANG F, LIU Y, *et al.* Effect of antibacterium of volatiles from six kinds of plants in Northwest China[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2009, 24(6): 124-128.

[11] 史睿杰, 谢寿安, 赵 薇, 等. 青海云杉针叶和枝条的挥发性化合物的固相微萃 GC/MS 分析[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(6): 95-99.

SHI R J, XIE SH A, ZHAO W, *et al.* Analysis of volatile components in the needle and branch of *Picea crassifolia* by SPME/GC/MS [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2011, 26(6): 95-99.

Volatile Metabolites and Toxin Activity of *Valsa mali*

LI Sinan¹, QIN Chen², WANG Hui³ and HUANG Lili⁴

(1. College of Plant Protection of Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 2. College of Agronomy of Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China; 3. College of Science of Northwest A&F University, State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling Shaanxi 712100, China; 4. College of Protection of Northwest A&F University, State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract In order to study the volatile metabolites and its toxin activity of *Valsa mali*, *Valsa mali* was cultured in a medium with apple-tree-rind, the cultural-filtrate were distilled and the volatile-distilled were collected in ethyl acetate. The collected volatile was isolated by GC-MS, and its structures were characterized by comparing mass spectrum with that of standard compounds in the database. The toxin activity was bio-assayed on apple shoots. These results showed that 5 volatile compounds were produced by *Valsa mali* during fermentation in the apple-tree-rind medium, namely 2-fluoroprop-1-ene, 3-methylbutan-1-ol, 2-phenylethanol, 4-ethylphenol and 4-ethyl-2-methoxyphenol. The last four compounds showed toxicity to apple shoots in bio-assay. the all results indicated that the four volatile compounds metabolized by *Valsa mali* were toxin to apple-tree, and this provides a new idea and direction for investigating the pathogenesis of *Valsa mali*.

Key words *Valsa mali*; Volatile metabolites; Toxin activity; GC-MS

Received 2017-05-04 **Returned** 2017-08-30

Foundation item Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest(No. 201203034).

First author LI Sinan, female, undergraduate student. Research area: plant protection. E-mail: lisi-nan77777@163.com

Corresponding author WANG Hui, female, professor. Research area: natural active substances for agricultural use. E-mail: wanghuiab@sina.com

HUANG Lili, female, master, professor. Research area: integrated prevention of plant diseases. E-mail: lilyhuangk@163.com

(责任编辑:郭柏寿 Responsible editor: GUO Baishou)