

木霉菌株挥发性物质拮抗尖孢镰刀菌的效果及其鉴定

张雯雯^{1,2,3}, 国振宇², 赵晓迪², 龚明波², 李世贵^{2*}, 顾金刚^{2*}, 杨礼富^{3*}

1 海南大学环境与植物保护学院, 海南海口 570228

2 中国农业科学院农业资源与农业区划所 北京 100081
中国农业微生物菌种保藏管理中心

中国热带农业科学院橡胶研究所
3 农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南儋州 571737

摘要 采用对扣法研究 11 株木霉菌株挥发性物质对尖孢镰刀菌的抑制效果, 采用固相微萃取和气质联用技术对挥发性物质进行成分分析。结果表明, 不同木霉菌株产生的挥发性物质的种类和含量差异较大。11 株木霉共检出 257 种挥发性物质, 均能检测到六甲基环三硅氧烷、八甲基环四硅氧烷两种化合物; 聚类分析在相关系数距离为 19 时, 可将 11 株木霉菌株归为三大类; 257 种挥发性物质可简化为 3 个主成分, 包含 30 种挥发性物质, 不同木霉挥发性物质主成分得分与拮抗尖孢镰刀菌的抑菌率之间极显著相关, 表明 11 株木霉菌株对尖孢镰刀菌均有抑制作用。

关键词 木霉; 尖孢镰刀菌; 挥发性有机物; 抑菌率; 主成分分析

中图分类号 S432.4

文献标识码 A

Effect and Identification of Volatile Compounds from *Trichoderma* Against *Fusarium oxysporum*

ZHANG Wenwen^{1,2,3}, GUO Zhenyu², ZHAO Xiaodi², GONG Mingbo²,
LI Shigui^{2*}, GU Jingang^{2*}, YANG Lifu^{3*}

1 College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China

2 Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Science/
Agricultural Culture Collection of China, Beijing, 100081, China

3 Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology
and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract The inhibitory effects and compounds of volatile substances from 11 *Trichoderma* strains against *Fusarium oxysporum* were analyzed. The results showed that there were significant differences between the contents and types of volatile substances of different *Trichoderma* species. 11 species of *Trichoderma* were detected 257 kinds of volatile substances, Which can be detected hexamethyl cyclotrisiloxane, octamethyl cyclotetrasiloxane two compounds; When the cluster analysis in the correlation coefficient distance was 19 hours, the 11 *Trichoderma* could be divided into 3 components. The results showed that ACCC33104 had the highest total score of 30 volatile substances, and the difference of the volatile components of *T. viride* was different from that of its antagonistic effect on *F. oxysporum*. The effect of bacteria have a certain relevance. The results showed that *Trichoderma* had inhibitory effect on *F. oxysporum*.

Key words *Trichoderma*; *Fusarium oxysporum*; volatile organic compounds; antimicrobial rate; principal component analysis

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2017.04.019

尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)是一种世界性分布的土传病原真菌, 寄主范围广泛, 可引起瓜类、茄科、棉、豆科及花卉等多种植物枯萎病的发生, 如香蕉枯萎病就是由古巴尖孢镰刀菌引起的一

种土传病害^[1]。微生物能够产生多种挥发性的次级代谢产物^[2], 且具有分子量低、弱极性、低沸点和亲脂性等特点^[3-4], 能够长距离传播, 并介导有机体间非直接接触的相互作用。木霉菌是一类重要的

收稿日期 2017-01-19

修回日期 2017-03-27

基金项目 科技部863计划项目(No. 2013AA102805-05); 科技基础性工作专项项目(No. 2014FY120900); 中央级科研院所基本科研业务费(No. 2015-24)。

作者简介 张雯雯(1990—), 女, 硕士研究生; 研究方向: 微生物资源。*通讯作者(Corresponding author): 顾金刚(GU Jingang), E-mail: gujingang@caas.cn; 李世贵(LI Shigui), E-mail: lishigui@caas.cn; 杨礼富(YANG Lifu), E-mail: ylfri@126.com。

植物病害生防菌^[5]，不同种属的木霉产生的挥发性物质种类和含量不同，且对病原真菌有不同的抗菌活性^[6-7]。Klaus Fiedler^[8]等测定哈茨木霉和拟康宁木霉的挥发性物质，发现它们能够产生乙醇、3-甲基-1-丁醇、2-甲基-1-丁醇和3-辛酮等化合物，并且产生的倍半萜类显示了1个典型的特征图谱；Tarus^[9]等测定了哈茨木霉和长枝木霉的挥发性有机物及其对细菌和蜜环菌的抑制作用，结果表明6-戊基-2H-吡喃-2-酮具有最高的抗真菌和抗菌活性，且在200 ppm时完全抑制蜜环菌的生长；Samantha Lee等^[10]检测了生长5 d和14 d深绿木霉的挥发性物质，发现随着木霉的生长，有极少的挥发性物质不再能被检测，而产生了更多的新的挥发性物质，这就说明木霉产生的种类与木霉菌株本身的年龄有关。本研究针对香蕉枯萎病研究11株木霉所产生的挥发性物质对其的拮抗效果，同时对不同种属的木霉菌株产生的挥发性有机物进行成分分析，以探索木霉挥发性物质的种类和含量及其对尖孢镰刀菌抑制效果之间的相关性。

1 材料与方法

1.1 材料

木霉菌株保存在中国农业微生物菌种保藏管理中心和本实验室：*Trichoderma atroviride* 5-1P1（菌株编号：ACCC32804）、*T. atroviride* 16-1M2（菌株编号：ACCC32818）、*T. atroviride* 70-1M3（菌株编号：ACCC32866）、*T. harzianum* 71-1P2（菌株编号：ACCC32870）、*T. atroviride* 193-2P1（菌株编号：ACCC33007）、*T. atroviride* 222-2M1（菌株编号：ACCC33100）、*T. harzianum* 223-2M1（菌株编号：ACCC33104）、*T. harzianum* 226-2P1（菌株编号：ACCC33114）、*T. atroviride* 231-1M2（菌株编号：ACCC33124）、*T. atroviride* 247-2P2（菌株编号：ACCC33189）、*T. atroviride* 258-2M1（菌株编号：ACCC33205）。植物病原菌：香蕉枯萎病病原菌尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种FOC4（菌株编号：ACCC38875）作为靶标病原菌，由中国农业微生物菌种保藏管理中心提供，用于木霉挥发性物质对其抑制作用的研究。

1.2 方法

1.2.1 木霉挥发性物质对尖孢镰刀菌的作用 采用对扣法^[11]。用打孔器($d=0.5$ cm)在培养5 d的木霉菌菌落边缘打取菌龄相同的菌块，接种于PDA平板中央，在其上盖双层直径略大于10 cm的无菌玻璃纸，上方扣一个直径同为9 cm，中央刚接种尖

孢镰刀菌($d=0.5$ cm)的平板，用封口膜密封。以未接种供试木霉的PDA平板与接病原菌的平板对扣培养作为对照，每个处理设3个重复。5 d后用十字交叉法测量病原菌菌落直径，计算抑菌率。

抑菌率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(对照菌落直径-0.5)×100%

1.2.2 木霉挥发性物质的分离 将供试菌株接种在PDA培养基上，25℃培养7 d，用打孔器($d=0.5$ cm)取1块菌饼接种在二分隔培养皿一侧小室的PDA培养基上，用双层封口膜封住培养皿，25℃培养7 d。以不接种木霉的空白PDA平板作为对照。

首先将固相微萃取(SPME)针头插入气相色谱仪的进样口，推出萃取头，在氦气流中240℃老化20 min，然后将萃取头缩回保护针管，立即将SPME针头插入二分隔培养皿未培养木霉的一侧小室，推出萃取头，萃取挥发性物质45 min，再将SPME针头插入气相色谱仪的进样口，推出萃取头，解吸附30 s，随后取出SPME进样手柄和萃取头。

1.2.3 木霉挥发性物质的鉴定 色谱条件^[12]：用HP-5MS型毛细管柱分离挥发性物质，载气为氮气，流速为1 mL/min，不分流模式。升温程序：30℃维持2 min，再以5℃/min的速率升温至220℃；post run 270℃维持1 min。电离电压为70 eV，离子源温度230℃，质谱扫描速率为3.35 scans/s，质谱范围20~450 amu。

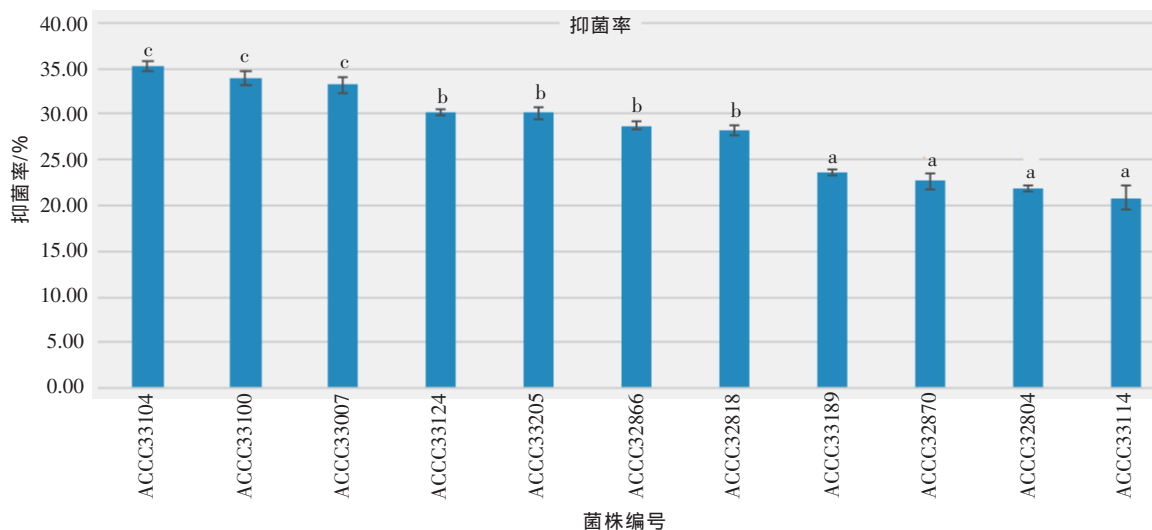
1.3 数据处理

数据分析与处理采用质谱化学工作站软件分析(MSD ChemStation G1701DA，安捷伦公司)，通过Agilent NIST13数据库鉴定挥发性物质，扣除对照组检测到的色谱峰，用峰面积归一化法测定了这些化学成分在各自样品中的相对含量。用SPSS 16.0软件进行抑菌率的统计分析以及挥发性物质的聚类分析、主成分分析以及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 挥发性物质拮抗效果分析

不同种属木霉产生的挥发性物质对尖孢镰刀菌菌丝生长的抑制率不同。其中，菌株ACCC33104、ACCC33100、ACCC33007、ACCC33124、ACCC33205这5株菌的抑菌率分别为35.29%、34.02%、33.19%、30.22%、30.17%；菌株ACCC32866、ACCC32818的抑菌率分别为28.77%、28.23%；菌株ACCC33189、ACCC32870、ACCC32804、ACCC33114的抑菌率则分别为23.61%、22.69%、21.88%、20.83%（见图1）。根据差异显著性分析，菌株



图中所标注的相同小写字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验，在 $P_{0.05}$ 水平上差异不显著。
Data in the figure noted by the same letters are not significantly different at $P_{0.05}$ by Duncan's multiple range test.

图1 木霉挥发性物质对尖孢镰刀菌的抑制效果

Fig. 1 Inhibitory effect of volatile compounds from *Trichoderma* on *F. oxysporum*

ACCC33104、ACCC33100、ACCC33007，菌株 ACCC33124、ACCC33205、ACCC32866、ACCC32818，菌株 ACCC33189、ACCC32870、ACCC32804、ACCC33114 这三组之间差异并不显著，其余均存在显著差异。

2.2 挥发性物质成分分析

通过对 GC-MS 谱图的 NIST 13 谱库搜索和人工解析，从 11 株木霉中共鉴定出 257 种挥发性物质，结果见表 1。其中，烷类 68 种，酯类 47 种，烯类 36 种，醇类 29 种，酮类 23 种，苯类 9 种，醚类 7 种，其他 44 种，分别占检出挥发性物质的 26.46%、18.29%、14.01%、11.28%、8.95%、

3.50%、2.72% 和 17.12%，就种类的多样性而言，木霉产生的挥发性物质主要是烷类、酯类，其次是烯类、醇类和酮类；就含量的多样性而言，木霉产生的挥发性物质主要是醇类。其中，在 11 株木霉中均能检测到六甲基环三硅氧烷、八甲基环四硅氧烷两种化合物，其相对含量范围分别为 0.5409%~6.1115%、0.3452%~4.4308%。

2.3 挥发性物质聚类分析

从表 1 可见，不同种属木霉产生的挥发性物质的种类和含量存在较大差异，甚至同一种属木霉产生的挥发性物质的种类和含量也不同。由图 2 可见，相关系数距离为 19 时，可以把 11 株木霉分成三大

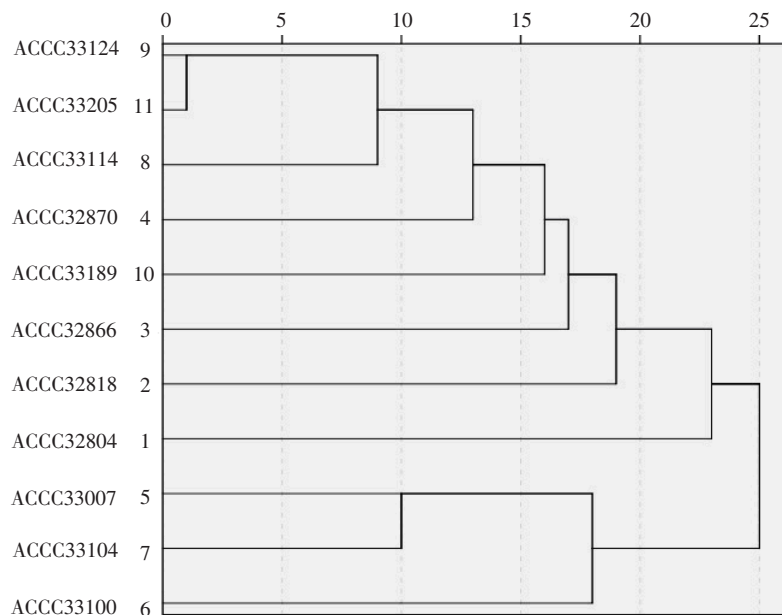


图2 11株木霉挥发性物质聚类图

Fig. 2 The dendrogram of volatile compounds from *Trichoderma*

表1 11株木霉菌产生的挥发性物质成分的相对含量
Table 1 The relative content of *Trichoderma* volatile compounds

成分	ACCC32804	ACCC32818	ACCC32866	ACCC32870	ACCC33007	ACCC33100	ACCC33104	ACCC33114	ACCC33124	ACCC33189	ACCC33205	%
乙醇	55.580 6	69.487 7	69.854 8	72.242 1				71.388 0	58.638 7	69.940 0	25.093 1	
2-甲基-1-丙醇	1.239 4											
二甲基-硅烷二醇	1.162 3		0.256 7	0.519 0	0.595 5	0.715 7		0.518 0	0.329 2	0.520 2		
3-甲基-1-丁醇	4.483 9		2.555 0	8.746 1				5.412 2		4.529 6	0.753 6	
双环[3.1.0]己-2-醇	0.104 4		0.175 6									
环辛烷甲醇	0.048 0											
二十八醇	0.061 5											
2-(乙烯氧基)-乙醇										0.282 5		
2-甲基-1-丁醇		3.974 9										1.033 7
α -甲基-环丁烷甲醇		0.032 2										
1,4-环己二醇		0.098 8										
6,6-二甲基-双环[3.1.1]庚-2-烯-2-甲醇		0.046 2										
2-甲基-1-丙醇			0.693 2		0.049 5							0.901 5
3-甲基-1,2-环戊二醇			0.109 4									
O-三氟乙酰基-异薄荷醇				0.237 5								
2,2-二甲基-1-己醇				0.142 7								
6,10,14-三甲基-十五烷-2-醇				0.117 2								
(Z)-2-丁烯-1,4-二醇					6.505 6							
2-亚甲基-环庚醇					0.119 0							
1,1,3,3,5,5,7,7,9,9-十甲基-9-(2-甲基丙氧基)五硅氧烷-1-醇								0.032 6				
正十三烷-1-醇					0.080 4							
1H-吡啶-5-醇					0.200 6							
正二十四烷醇-1					0.142 2							
2-己基-1-十二烷醇					0.188 5							
2,4-二甲基-环己醇					0.138 6							
2-乙基-1-己醇						0.119 5						
3-己烯-1-醇										0.047 1		
(+)-5-甲基-2-己醇											0.604 3	
1-十六醇						0.161 4						
乙酸乙酯	0.590 4											3.216 0
甲氧基-乙酸乙酯	0.898 3											
乙酸异丁酯	1.458 0											
丁酸乙酯	10.378 3											
1-丁醇,2-甲基-乙酸酯	0.235 2											
草酸,异丁基戊酯	0.029 7											
五氟丙酸,十六烷基酯	0.038 6											
亚硫酸,环己基甲基十五烷基酯	0.138 2											
草酸,环己基甲基辛酯	0.134 2											
甲酸乙酯								2.127 0				
丁酸乙酯								0.088 3				
碳酸,辛基乙烯基酯									0.069 5			
碳酸,壬基丙-1-烯-2-基酯			0.074 8									
亚硫酸,环己基甲基十六烷基酯				0.238 0								
草酸,环己基甲基异己酯					0.225 3							
亚硫酸,2-乙基己基十六烷基酯		0.049 6				0.076 2				0.071 9		
亚硫酸,环己基甲基十二烷基酯		0.078 4										

续表1 11株木霉产生的挥发性物质成分的相对含量
Table 1 The relative content of *Trichoderma* volatile compounds (continued) %

成分	ACCC32804	ACCC32818	ACCC32866	ACCC32870	ACCC33007	ACCC33100	ACCC33104	ACCC33114	ACCC33124	ACCC33189	ACCC33205
2,2,3,3-四甲基环丙烷羧酸, 4-甲基环己基酯	0.185 9										
草酸, 异丁基壬基酯	0.097 4										
碳酸, 十六烷基丙-1-烯-2-基酯	0.093 5										
2-亚甲基-环丙烷甲酸甲酯	0.226 8										
亚硫酸, 2-乙基己基十七烷基酯	0.079 9					0.093 5					
碳酸, 双(2-乙基己基)酯	0.063 4			0.078 2							
亚硫酸, 环己基甲基十七烷基酯	0.112 5										
草酸, 环己基十四烷基酯	0.065 0										
巯基乙酸2-乙基己酯			0.159 9								
草酸, 烯丙基壬基酯			0.073 9								
碳酸, 异丁基十八烷基酯			0.125 0								
亚硫酸, 环己基甲基十一烷基酯						0.303 6					
十五氟辛酸, 2-乙基己酯				0.177 7							
碳酸癸基丙-1-烯-2-基酯				0.136 3							
(E)-2-丁烯酸, 2-甲基-3-甲基-2-丁烯基酯				0.139 4							
亚硫酸, 丁基十七烷基酯				0.128 9							
己酸, (E)-2-己烯基酯				0.164 5							
甲酸, 2-乙基己酯				0.155 4							
亚硫酸, 环己基甲基十八烷基酯								0.171 5			
琥珀酸, 2-甲基戊-3-基壬-3-烯-1-基酯								0.078 7			
草酸, 烯丙基十二烷基酯						0.122 4					
碳酸, 十四烷基乙烯基酯							0.249 3				
亚硫酸, 癸基2-乙基己酯								0.029 9			
草酸, 异己基新戊基酯										0.228 3	
亚硫酸, 环己基甲基异己酯								0.101 1			
草酸, 环丁基十三烷基酯									0.123 9		
草酸, 环丁基壬基酯										0.073 7	
碳酸, 丙-1-烯-2-基十一烷基酯										0.165 4	
草酸, 2-乙基己基己酯										0.060 1	
环戊烷羧酸, 4-十六烷基酯										0.254 1	
1-甲氧基-2-甲基-丙烷	0.214 6										
六甲基-环三硅氧烷	1.143 7	1.228 2	2.240 0	3.115 6	4.477 9	6.111 5	5.738 7	1.610 3	3.702 2	2.057 6	0.540 9
1-硝基-戊烷	0.064 9										
2,2,6,6-四甲基-4-亚甲基-庚烷	0.142 4										
八甲基-环四硅氧烷	1.191 7	1.713 8	2.258 9	2.667 8	3.869 3	4.038 4	4.430 8	1.663 3	3.019 3	3.311 6	0.345 2
1-亚甲基-4-(1-甲基乙烯基)-环己烷	0.247 5										
(反式)2,4-二甲基-1,5-二氮杂双环[3.1.0]己烷	0.184 5										
4-乙基-2-甲基-己烷	0.066 8							0.084 9			
1-氟壬烷	0.075 4										
1,4-二异丙基环己烷	0.038 7										
顺-1,1,3,5-四甲基-环己烷	0.066 2										
十甲基-环戊硅氧烷	0.261 7	0.337 2	0.387 9	0.456 1	0.545 8	0.651 2	0.608 7	0.317 0	0.452 4	0.473 5	
十二烷	0.146 8	0.172 7	0.176 6	0.255 6	0.263 8	0.344 6	0.287 0	0.122 7	0.241 6	0.208 4	

续表1 11株木霉产生的挥发性物质成分的相对含量
Table 1 The relative content of *Trichoderma* volatile compounds (continued) %

成分	ACCC32804	ACCC32818	ACCC32866	ACCC32870	ACCC33007	ACCC33100	ACCC33104	ACCC33114	ACCC33124	ACCC33189	ACCC33205
1,1'-氧双-辛烷	0.027 7										
十三烷	0.220 3	0.372 7			0.399 3	0.520 7	0.391 1		0.400 5	0.352 5	
十二甲基-环己硅氧烷	0.135 0	0.191 5	0.230 8	0.298 1	0.412 4	0.526 8	0.598 6	0.220 4	0.371 7	0.425 0	
2,6,10-三甲基-十二烷	0.208 6		0.204 8	0.339 0		0.564 0			0.413 3	0.432 1	
十四烷	0.363 2	0.335 4	0.234 8	0.458 7	0.704 1	0.825 1	0.684 6	0.506 9	0.595 8	0.572 6	
2,3,6-三甲基-癸烷	0.156 7										
1-亚甲基-2b-羟甲基-3,3-二甲基-4b-(3-甲基丁-2-烯基)-环己烷	0.038 3										
双(2-丙酮基氨基)甲烷	0.047 7										
1-甲基-2-戊基-环己烷		0.195 1		0.173 1							
1-(己氧基)-5-甲基-己烷		0.135 6									
6-甲基-1,5-二氮杂双环[3.1.0]己烷		0.091 2									
反式-1,1,3,5-四甲基-环己烷		0.043 3									
2-溴-辛烷		0.034 9									
三烯丙基硅烷		0.089 0									
2,6,10,14-四甲基-十六烷		0.228 6					0.499 6	0.206 9			
十二甲基-五硅氧烷		0.055 3					0.112 0				
3-乙基-庚烷			0.132 4								
顺-1,1,3,4-四甲基-环戊烷			0.064 5							0.129 2	
十九烷			0.222 8				0.279 0				
顺式-1-甲基-3-正壬基环己烷			0.061 3								
1-乙基-1-甲基-环己烷			0.157 8								
3-异丙氧基-1,1,1,7,7,7-六甲基-3,5,5-三(三甲基甲硅烷氧基)四硅氧烷			0.100 5					0.057 0			
2,2-二甲基-丁烷				0.091 9							
2,2,3,5,6,6,7-七甲基[1,4,2,3,5,6,7]二氧杂戊烷				0.449 9	0.601 1	0.624 1	0.706 6	0.214 0	0.454 2	0.550 6	
4-七氟丁酰氧基十六烷				0.094 0							
环庚烷				0.048 9							
2,4,6-三甲基-辛烷				0.352 3				0.088 3			
(R*,R*)-(+/-)-1,1'-[1,2-双(1,1-二甲基乙基)-1,2-乙二基]双-环己烷				0.102 0		0.130 3				0.096 6	
(1S,2R,4R,7R)-4-异丙基-7-甲基-3,8-二氧杂三环[5.1.0.0 4,4]辛烷				0.212 0							
[1R-(1 α ,5 α ,6 β)]-6-甲基-2-亚甲基-6-(4-甲基-3-戊烯基)-双环[3.1.1]庚烷				0.173 3							
2,6-二甲基-十一烷				0.176 4							
十六烷				0.084 0							
1,1-二甲基-环己烷										0.150 0	
1-(己氧基)-4-甲基-己烷						0.169 5					
丙基-环戊烷					0.081 3						
二十六烷					0.220 1						
2-甲基-辛烷					0.459 3						

续表1 11株木霉产生的挥发性物质成分的相对含量
Table 1 The relative content of *Trichoderma* volatile compounds (continued) %

成分	ACCC32804	ACCC32818	ACCC32866	ACCC32870	ACCC33007	ACCC33100	ACCC33104	ACCC33114	ACCC33124	ACCC33189	ACCC33205
2,6,10-三甲基十三烷				0.308 8							0.274 0
二十七烷				0.249 0		0.154 5					
1-(2-丙烯氧基)-戊烷					0.184 2						
4-环己基-十一烷					0.179 7			0.108 9			
1,3-氧硫杂环戊烷					0.068 3						
6,9-二甲基-十四烷					0.315 9						
2-甲基-十八烷					0.338 0						
2,4-二甲基-戊烷							0.081 1				
6,6-二甲基-十一烷							0.067 3				
2-异氰基-2,4,4-三甲基-戊烷							0.091 0				
3-环己基-十一烷							0.143 8				
1,1'-氧代双-庚烷										0.187 2	
1,7-二甲基-4-(1-甲基乙基)环癸烷								0.070 3			
1,1-二甲基-环丙烷									4.997 9		
3,5-二甲基-庚烷									0.244 5		
4-亚甲基-1-(1-甲基乙基)- 双环[3.1.0]己烷									2.468 9		
顺-1,2-二甲基-环己烷									0.146 2		
癸烷									0.236 2		
3-羟基丁酮	0.371 1	0.830 3	0.801 7					0.592 3			
6-戊基-2H-吡喃-2-酮	10.236 4	4.037 0				0.785 2		2.836 2	2.114 6		19.601 5
2-乙基-环丁酮		2.732 3	6.359 3								
4-异丙基-1,3-环己二酮		0.086 4									
八氢-7 α -羟基-1H-茛-1-酮		0.435 2									
3-甲基-1,2-环戊二酮		0.071 9									
6-甲基-6-[3-甲基-3-(1-甲基乙 烯基)-1-环丙烯-1-基]-2-庚酮		0.156 2									
2-乙基-环己酮			0.193 4								
2-丁基-环己酮			0.146 8								
3,4-二甲基-异恶唑-5(4H)-酮			0.087 4								
3-亚甲基-2-戊酮				0.073 6							
3-乙基-环己酮				0.081 2							
3-氨基-2-环己烯酮				0.082 0	0.137 9						
3,3-二甲基-2-氧杂环丁酮					0.443 1	3.148 7					
5-甲基-2-(1-甲基乙基)-环己酮					0.123 2						
4-氨基-1,2,4-三唑烷-3,5-二酮					0.112 3						
3-甲基环戊烷-1,2-二酮							0.082 1				
四氢-2(1H)-嘧啶硫酮							0.130 6				
4-羟基-2-丁酮								0.104 9			
2,4-二氢-5-甲基-3H-吡唑-3-酮								0.070 4			
2-壬酮									0.458 1	0.778 6	
3-丁基环己酮										0.245 8	
2-庚酮											18.632 8
1,3-二甲基-苯	0.298 0	0.022 4	0.831 5	0.364 4	0.824 1	0.450 3	1.085 8	0.181 8	1.179 0	0.872 6	
丁基化羟基甲苯	0.950 4	1.205 8	0.801 6	1.117 7	1.276 1	1.909 0	1.325 5	0.861 5	1.493 9	1.424 6	
乙苯		0.266 7	0.106 6						0.094 0		
1-乙基-4-甲基-苯			0.135 4								
1-异氰酸基-3-甲基-苯					0.216 5						

续表1 11株木霉产生的挥发性物质成分的相对含量
Table 1 The relative content of *Trichoderma* volatile compounds (continued) %

成分	ACCC32804	ACCC32818	ACCC32866	ACCC32870	ACCC33007	ACCC33100	ACCC33104	ACCC33114	ACCC33124	ACCC33189	ACCC33205
1-乙基-2-甲基-苯						0.072 8					
1-叠氨基-2-甲基-苯						0.101 1					
(1-甲基乙基)-苯									0.164 3		
1-(十二烷氧基)-2-硝基-苯								0.069 1			
苯乙烯	3.791 6	4.477 7	7.758 1	4.939 8	8.113 1	8.106 6	10.430 8	3.876 3	15.441 0		1.870 4
(1R)-2,6,6-三甲基双环 [3.1.1]庚-2-烯	0.232 3			0.294 8							
3,4,4-三甲基-2-戊烯	0.132 8										
2-仲丁基-3-甲基-1-戊烯	0.068 7					0.177 8					
(E)- β -法呢烯	0.040 1										
[S-(E,Z,E,E)]-3,7,11-三甲基 -14-(1-甲基乙基)-1,3,6,10- 环十四碳四烯	1.708 0	3.562 7						0.974 7			
双环[4.2.0]辛-1,3,5-三烯									0.118 8	7.841 1	
D-柠檬烯				0.147 4							
(E)-3-十二碳烯	0.225 9					0.183 4				0.110 5	
(E)-2,2-二甲基-3-癸烯			0.106 6								
2,4,4-三甲基-1-戊烯								0.105 3			
反式-香柠檬烯	0.260 8				0.653 5	1.593 5	1.022 9		0.929 5		
顺式-香茅烯										0.207 6	
(S,E)-8,12,15,15-四甲基-4-亚甲 基双环[9.3.1]十五碳-7,11-二烯											1.696 7
α -蒎烯	0.255 8	0.290 9									
柠檬烯	0.357 4										
2,2,4,6,6-五甲基-3-庚烯	0.151 2		0.067 0			0.089 1					
2,4,4,6,6,8,8-七甲基-2-壬烯	0.154 2								0.195 4		
2,3,6-三甲基-1,5-庚二烯	0.039 1										
(S)-1-甲基-4-(1-甲基乙烯基) -环己烯			0.228 4								
(E)-5-十二碳烯			0.111 0								
(E)-2,5-二甲基-3-己烯				0.164 4							
5-甲基-2-十一碳烯				0.103 3							
反式- β -辛烯										0.179 6	
β -水芹烯					6.459 5		5.270 7	4.410 1			
2-辛炔					0.067 3						
γ -榄香烯								0.056 6			
(1S)-2,6,6-三甲基双环[3.1.1] 庚-2-烯						0.148 6		0.125 7			
4-甲基-1-(1-甲基乙基)- 双环[3.1.0]己-2-烯						5.875 3				2.055 6	
4-乙烯基-1,5,5-三甲基-环戊烯								0.047 2			
2,4,6,8-四甲基-1-十一碳烯								0.063 2			
(Z)-5,5-二甲基-2-己烯								0.054 2			
1-丁基-环己烯											0.447 3
3-(2-甲基丙基)-环己烯										0.185 9	
(Z)-6-十二碳烯										0.113 9	

续表1 11株木霉产生的挥发性物质成分的相对含量
Table 1 The relative content of *Trichoderma* volatile compounds (continued) %

成分	ACCC32804	ACCC32818	ACCC32866	ACCC32870	ACCC33007	ACCC33100	ACCC33104	ACCC33114	ACCC33124	ACCC33189	ACCC33205
(E)-5-十八碳烯											0.092 9
癸基庚基醚	0.074 4										
丁基十六烷基醚			0.068 8		0.148 3						
18-甲基-十九烷-1,2-二基三甲基甲硅烷基醚					0.048 7						
丁基二十四烷基醚									0.091 2		
十六烷基辛基醚						0.212 8					
十二烷基异丁基醚							0.134 0				
庚基十四烷基醚											0.143 9
2-戊基-咪喃	0.189 2	1.119 5	0.471 2	0.351 0	1.267 5	1.112 4	1.263 6	0.137 0	0.385 1	0.582 1	
2,3-二氢-2-甲基-5-乙基咪喃									0.086 8		
2,4,4-三甲基-1-戊醇, 三氟乙酸盐	0.106 5										0.108 9
甲醛, (2-丁烯基)甲基脞	0.177 0		0.113 2								
1-丁醇, 3-甲基-甲酸						0.500 8					
2-乙基-4,5-二氢-4-甲基-1H-咪唑			0.055 5								
1-甲基-2-氨基-1H-咪唑		0.149 9									
N-[(五氟苯基)亚甲基]- β ,3,4-三[(三甲基甲硅烷基)氧基]-苯乙胺		0.032 7									
3,5-二甲基-异恶唑			0.159 1								
2,2-二甲基-3-戊醇, 氯二氟乙酸盐			0.083 8					0.057 8			
3,4-二羟基扁桃酸, 乙酯, 三-TMS			0.033 5								
(2-氨基苯基)氨基甲酸叔丁酯, 2TMS衍生物				0.063 9							
二氧化碳					8.616 1	18.717 9	25.022 5				11.959 4
D-丙氨酸					11.090 8						
dl丙氨酸					40.034 2						
1,5-己二炔					0.116 6						
4-(硝基亚甲基)-2-苯基-4H-1-苯并吡喃			0.316 3								
乙醛, 2-丁烯基脞											0.142 2
3,3-二甲基-2-丁胺						12.192 0	29.526 3				
2-己胺						29.021 9	5.283 5				
六亚甲基亚胺						0.108 7					
高哌嗪						0.279 1					
阿莫地嗪						0.065 1	0.056 9			0.044 7	
2-氟-乙酰胺							0.206 7				
3-甲基-1,2-苯并异恶唑							0.225 1				
3-氟-吡啶							0.206 0				
2-甲基-丙酸								0.033 3			
1,3,3-三甲基-二氮丙啶								0.093 5			
1-丁基-1H-1,2,4-三唑								0.050 5			
2-氟吡啶								0.085 9			
1-乙酰基-4,5-二氢-1H-吡唑								0.080 9			
恶唑										0.111 1	
(-)-肾上腺素, 3TMS衍生物											0.045 1

续表1 11株木霉产生的挥发性物质成分的相对含量

Table 1 The relative content of *Trichoderma* volatile compounds (continued)

成分	ACCC32804	ACCC32818	ACCC32866	ACCC32870	ACCC33007	ACCC33100	ACCC33104	ACCC33114	ACCC33124	ACCC33189	ACCC33205
11-溴-1-十一烷醇,TMS衍生物											0.068 7
3-(3-甲氧基苯基)-2-甲基-丙烯酰胺											0.128 8
2,6-双(4-吗啉基甲基)-苯酚											0.056 7
乙醛											5.813 8
氟-乙炔											6.711 0

类，第一类包括 ACCC33124、ACCC33205、ACCC33114、ACCC32870、ACCC33189、ACCC32866、ACCC32818；第二类包括 ACCC32804；第三类包括 ACCC33007、ACCC33104、ACCC33100；聚类结果表明：每一类别中木霉产生的挥发性物质较为接近。进一步分析表明：木霉产生的挥发性物质种类与木霉种属之间无相关性。

2.4 11株木霉挥发性物质的主成分分析

选取30种物质对11株木霉产生的挥发性物质进行主成分分析，从主成分特征值和贡献率(表2)可见，前3个主成分的贡献率分别为43.396%、15.892%、13.615%，累积贡献率达到72.903%。因此，提取3个主成分，即 $m=3$ 。从旋转后的因子载荷矩阵表(表3)可知，3个主成分包含的挥发性物质反映了11株木霉挥发性物质的主要信息。

从表3可知，第1主成分主要反映乙醇、2-甲基-1-丙醇、六甲基-环三硅氧烷、八甲基-环四硅氧烷、十甲基-环戊硅氧烷、十二烷、十三烷、十二甲基-环己硅氧烷、十四烷、2,2,3,5,6,6,7-七甲基[1,4,2,3,5,6,7]二氧杂戊烷、3-羟基丁酮、6-戊基-2H-吡喃-2-酮、1,3-二甲基-苯、丁基化羟基甲苯、苯乙烯、反式-香柠檬烯、2-戊基-咪喃、二氧化碳、阿莫地啶等成分的信息；第2主成分主要反映亚硫酸，2-乙基己基十六烷基酯、乙苯、[S-(E,Z,E,E)]-3,7,11-三甲基-14-(1-甲基乙基)-1,3,6,10-环十四碳四烯、(E)-3-十二碳烯、2,2,4,6,6-五甲基-3-庚烯等成分的信息；第3主成

分主要反映二甲基-硅烷二醇、3-甲基-1-丁醇、三甲基-十二烷、2,6,10,14-四甲基-十六烷、(R^* , R^*)-(./-)-1,1'-[1,2-双(1,1-二甲基乙基)-1,2-乙二基]双-环己烷、 β -水芹烯等成分的信息。

第1主成分主要是以烷类为主，第2主成分主要是以烯类为主，第3主成分主要以烷类和醇类为主，这与总成分分析得出的种类多样性结果基本相符，因此这些主成分具有较强的代表性，可以作为评价木霉产生挥发性物质种类的重要指标。

根据各主成分的贡献率可以得到主成分综合评价指数，在本研究中，主成分综合评价指数 $F=0.60F_1+0.22F_2+0.19F_3$ 。

11株木霉的挥发性物质的3个主成分得分见表4，可见综合排名 ACCC33104 为第一，其次为 ACCC33100 和 ACCC33007。

2.5 相关性分析

将11株木霉挥发性物质的主成分得分与拮抗尖孢镰刀菌的抑菌率进行相关性分析，结果表明(表5)，挥发性物质的主成分得分与抑菌率之间的相关性系数为0.869，对应的显著性为0.001，表明二者之间的相关性达到极显著水平。这就说明 ACCC33104 菌株在拮抗尖孢镰刀菌和产生挥发性物质上都具有较强的优势。

3 讨论

本文以香蕉枯萎病病原菌尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种 FOC4 为靶标，对木霉菌株所产生

表2 主成分的特征值及贡献率

Table 2 The latent root and accumulative contributor ratio of the principal component

成分	特征值	贡献率/%	累积百分率/%
1	13.019	43.396	43.396
2	4.768	15.892	59.289
3	4.084	13.615	72.903
4	2.767	9.222	82.125
5	1.675	5.582	87.707
6	1.345	4.485	92.192

表3 正交旋转的因子载荷矩阵表
Table 3 Rotated Factor Matrix of aroma volatile compounds

成分	因子负载量		
	第1主成分	第2主成分	第3主成分
乙醇	-0.571	0.399	-0.372
二甲基-硅烷二醇	0.106	0.064	-0.630
3-甲基-1-丁醇	-0.334	0.052	-0.674
2-甲基-1-丙醇	-0.585	-0.359	0.115
亚硫酸, 2-乙基己基十六烷基酯	0.394	0.724	-0.166
六甲基-环三硅氧烷	0.943	-0.187	0.076
八甲基-环四硅氧烷	0.966	-0.086	0.002
十甲基-环戊硅氧烷	0.943	0.101	-0.055
十二烷	0.932	0.141	-0.113
十三烷	0.784	0.274	0.203
十二甲基-环己硅氧烷	0.973	-0.052	0.009
三甲基-十二烷	0.434	0.257	-0.759
十四烷	0.929	0.049	-0.089
2,6,10,14-四甲基-十六烷	0.232	-0.028	0.711
2,2,3,5,6,6,7-七甲基 [1,4,2,3,5,6,7] 二氧杂戊烷	0.909	-0.221	-0.140
(R*,R*) - (+/-) -1,1'- [1,2-双 (1,1-二甲基乙基) -1,2-乙二基] 双-环己烷	0.458	0.361	-0.649
3-羟基丁酮	-0.508	0.479	0.348
6-戊基-2H-吡喃-2-酮	-0.691	-0.195	0.110
1,3-二甲基-苯	0.635	-0.417	-0.083
丁基化羟基甲苯	0.877	0.376	-0.151
乙苯	-0.346	0.683	0.534
苯乙烯	0.530	-0.298	0.235
[S- (E, Z, E, E)] -3,7,11-三甲基-14- (1-甲基乙基) -1,3,6,10-环十四碳四烯	-0.364	0.713	0.427
(E) -3-十二碳烯	0.252	0.889	0.157
反式 - 香柠檬烯	0.845	-0.022	0.220
2,2,4,6,6-五甲基-3-庚烯	0.101	0.844	0.214
β-水芹烯	0.337	-0.472	0.478
2-戊基-呋喃	0.752	0.238	0.501
二氧化碳	0.561	-0.336	0.419
阿莫地嗪	0.752	0.094	-0.023

表4 11株木霉的挥发性物质主成分得分表
Table 4 principal component scores for volatile compounds from 11 strains of *Trichoderma*

菌株	F1	F2	F3	F(排名)
ACCC32804	-9.755 46	9.362 07	-10.674 77	-5.821 82(10)
ACCC32818	-9.850 63	13.545 28	-10.707 24	-4.964 79(7)
ACCC32866	-8.343 13	11.786 42	-12.720 04	-4.829 67(6)
ACCC32870	-9.010 99	12.617 29	-15.924 05	-5.656 36(9)
ACCC33007	6.972 26	-4.116 28	4.440 17	4.121 40(3)
ACCC33100	8.804 00	-4.084 66	4.866 17	5.308 35(2)
ACCC33104	10.495 04	-6.909 51	8.254 14	6.345 22(1)
ACCC33114	-10.027 74	11.860 37	-13.081 14	-5.892 78(11)
ACCC33124	-4.076 87	8.151 34	-9.004 14	-2.363 61(4)
ACCC33189	-8.682 50	12.902 89	-14.706 49	-5.165 10(8)
ACCC33205	-5.426 66	0.697 31	-1.085 83	-3.308 89(5)

表5 相关性分析
Table 5 Correlation analysis

		挥发性物质	抑菌率
挥发性物质	Pearson 相关性	1	.869**
	显著性(双侧)		.001
	N	11	11
抑菌率	Pearson 相关性	.869**	1
	显著性(双侧)	.001	
	N	11	11

说明: ** 在0.01 水平(双侧)上显著相关。

Note: ** significant correlations at 0.01 level (bilateral).

发性物质的抑菌效果以及成分进行分析。研究结果表明, *T. atroviride* 5-1P1 等 11 株木霉挥发性物质对尖孢镰刀菌均有明显的抑制作用。从 11 株木霉中共鉴定出 257 种挥发性物质, 其中烷类 68 种, 酯类 47 种, 烯类 36 种, 醇类 29 种, 酮类 23 种, 苯类 9 种, 醚类 7 种, 其他 44 种, 多于现有的研究报道^[4,13-14]。木霉挥发性物质与拮抗尖孢镰刀菌的抑菌率显著相关。不同种属的木霉在挥发性物质的种类和含量上存在一定差异, 这种差异与木霉本身的性质、营养条件以及萃取方法的不同都有一定的关系^[13,15]。Wheatley^[16]等测定了拟康宁木霉和绿色木霉在两种不同培养基上的挥发性物质, 发现不同的木霉种属和培养基类型能够产生不同种类和含量的挥发性物质, 这与本研究得到的结果相符。截至目前, 尽管大量的木霉产生的挥发性物质已被鉴定, 但仅少数挥发性物质的功能被证实。6-戊基-2H-吡喃-2-酮, 具有特征的甜椰子状香味的聚酮化合物, 其主要生物学功能包括减少霉菌毒素的产生^[17-18]、抗真菌活性^[19]以及促进生长等^[20], 本研究中能够产生该物质的木霉有 6 株, 含量从 0.79%~19.6%, 该物质在康宁和哈茨木霉中均有报道, 但本研究中有 4 株深绿木霉中首次被检出。通过深入研究, 有望揭示木霉挥发性物质拮抗尖孢镰刀菌的作用机制, 为研发由尖孢镰刀菌引起的作物土传病害生物防治技术奠定理论基础。

参考文献

- [1] 黎永坚, 于莉. 香蕉枯萎病发病机制及其防治技术研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(8): 515-519.
- [2] Daniela Minerdi, Simone Bossi, Maria Lodovica Gullino, et al. Volatile organic compounds: a potential direct long-distance mechanism for antagonistic action of *Fusarium oxysporum* strain MSA 35[J]. Environmental Microbiology, 2009, 11(4): 844-854.
- [3] Richard Hung, Samantha Lee, Joan W Bennett. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds[J]. Fungal Ecology, 2013, 6: 19-26.
- [4] Morath S U, Hung R, Bennett J W. Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential[J]. Fungal Biology Reviews, 2012, 26: 73-83.
- [5] Druzhinina I S, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, et al. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success[J]. Nature Reviews Microbiology, 2011, 9: 749-759.
- [6] Wilkins K, Larsen K, Simkus M. Volatile metabolites from mold growth on building materials and synthetic media[J]. Chemosphere, 2000, 41: 437-446.
- [7] Bruce A, Verrall S, Hackett C A, et al. Identification of volatile organic compounds (VOCs) from bacteria and yeast causing growth inhibition of sapstain fungi[J]. Holzforschung, 2004, 58: 193-198.
- [8] Fiedler K, Schütz E, Geh S. Detection of microbial volatile organic compounds (MVOCs) produced by moulds on various materials[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2001, 204: 111-121.
- [9] Tarus P K, Lang'at-Thoruwa C C, Wanyonyi A W, et al. Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachiatum*[J]. Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia, 2003, 17: 185-190.
- [10] Lee S, Hung R, Yap M, et al. Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth[J]. Archives of Microbiology, 2015, 197: 723-727.
- [11] Muthukumar A, Eswaran A, Sanjeevkumar K. Exploitation of *Trichoderma* species on the growth of *Pythium Aphanidermatum* in chilli[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2011, 42: 1598-1607.
- [12] Hexon Angel Contreras-Cornejo, Lourdes Macías-Rodríguez, Alfredo Herrera-Estrella, et al. The 4-phosphopantetheinyl transferase of *Trichoderma virens* plays a role in plant protection against *Botrytis cinerea* through volatile organic compound emission[J]. Plant and Soil, 2014, 379: 261-274.
- [13] Norbert Stoppacher, Bernhard Kluger, Susanne Zeilinger, et al. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS[J]. Journal of Microbiological Methods, 2010, 81: 187-193.
- [14] Henryk Jele, Lidia Blaszczyk, Jerzy Chelkowski, et al. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species [J]. Mycological Progress, 2014, 13: 589-600.
- [15] Nemčovič M, Jakubíková L, Viden I, et al. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp.[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 284: 231-236.
- [16] Wheatley R, Hackett C, Bruce A, et al. Effect of substrate composition on the production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 1997, 39(2-3): 199-205.
- [17] Horace G Cutler, Richard H Cox, Farris G Crumley, et al. 6-Pentyl- α -pyrone from *Trichoderma harzianum*: Its plant growth inhibitory and antimicrobial properties [J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1986, 50: 2943-2945.
- [18] Cooney J M, Lauren D R, Di Menna M E. Impact of competitive fungi on trichothecene production by *Fusarium graminearum*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2001, 49: 522-526.
- [19] Scarselletti R, Faull J L. In vitro activity of 6-pentyl- α -pyrone, a metabolite of *Trichoderma harzianum*, in the inhibition of *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*[J]. Mycological Research, 1994, 98: 1 207-1 209.
- [20] Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E L, et al. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2008, 72: 80-86.

责任编辑：沈德发