

谭卓,朱峰,朱晓峰,等. 委内瑞拉链霉菌 Snea253 杀线虫活性化合物的分离纯化与结构鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):81-84. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.022

委内瑞拉链霉菌 Snea253 杀线虫活性化合物的分离纯化与结构鉴定

谭卓¹, 朱峰¹, 朱晓峰¹, 杨传旭¹, 王媛媛³, 段玉玺¹, 刘晓宇², 陈立杰¹

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学理学院, 辽宁沈阳 110866;

3. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110866)

摘要:为研究委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*) Snea253 发酵液中具有杀线虫活性的脂溶性化学成分,利用薄层层析、柱层析、高效液相色谱等技术对其活性成分进行分离与纯化,以南方根结线虫二龄幼虫为靶标进行活性跟踪,通过 HRMS、¹H-NMR、¹³C-NMR 等现代波谱技术,鉴定其结构为邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate,简称 DBP)。进一步检测 DBP 对 9 种植物病原真菌和 3 种细菌的抑菌活性发现,该化合物对粉红聚端孢菌(*Trichothecium roseum*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)也具有抑制作用。

关键词:委内瑞拉链霉菌 Snea253; 邻苯二甲酸二丁酯; 结构解析; 南方根结线虫; 粉红聚端孢菌; 巨大芽孢杆菌

中图分类号: S432.4⁺5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0081-04

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是我国乃至世界农业生产上影响最大的一类线虫病害,严重影响蔬菜、水果和其他各种农林作物的生产^[1]。目前针对线虫病害的高效化学农药如涕灭威、溴甲烷等因环境安全问题陆续被禁用或被限制使用,因此寻找替代高效低毒、低残留的有效杀线虫剂成为当今世界的研究热点。放线菌中以链霉菌属产生的生物活性物质最多,如阿维菌素是灰色链霉菌(*Streptomyces avermitilis*)发酵产生的大环内酯类抗生素^[2],已被证明具有高效广谱杀线虫活性。尼可霉素是从唐德链霉菌(*St. tendae*)的发酵液中分离的一种核苷基抗生素^[3],含有 20 多个组分,很多组分有活性,可以有效防治线虫,且对动物、蜜蜂和植物安全。梅岭霉素是由南昌链霉菌(*St. nanchangensis*)产生的十六元大环内酯类抗生素,与阿维菌素母核一致^[4],具有广谱杀虫活性,尤其对小杆线虫具有非常好的活性,只需要 5 mg/L 即可达 100% 的

致死率^[5]。

委内瑞拉链霉菌(*Streptomyces venezuelae*) Snea253 菌株(ZL200810010465.X)是本研究团队前期研究发现的高效杀线虫菌株,其代谢物对大豆胞囊线虫(*Heterodera glycines*)、南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*)、北方根结线虫(*M. hapla*)的二龄幼虫均具有较高的生物活性^[6-7]。李玲玉等通过萃取操作将 Snea253 的发酵液分为水溶性和脂溶性 2 部分,并从水溶性部分中分离纯化得到具有杀线虫活性的氨基糖类化合物^[8]。本研究采用薄层层析、柱层析、高效液相色谱等技术从 Snea253 发酵液中分离纯化具有杀线虫活性的脂溶性化合物,通过 HRMS、¹H NMR、¹³C NMR 等现代波谱技术进行结构解析,并进一步检测该化合物对农业常见致病菌的抑制活性,为该菌株的产业化生产奠定理论研究基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试菌株 委内瑞拉链霉菌(*S. venezuelae*) Snea253 菌株,已经获得国家发明专利授权(ZL200810010465.X)^[6]。由沈阳农业大学北方线虫研究所提供。

1.1.2 供试病原菌 真菌:粉红聚端孢菌(*Trichothecium roseum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、茄腐镰孢(*Fusarium solani*)、白头翁叶斑病菌(*Ascochyta anemones*)、人参黑斑病菌(*Alternaria panax*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)、向日葵菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*),均由沈阳农业大学

收稿日期:2016-03-03

基金项目:国家自然科学基金(编号:31171823,31471748);天柱山学者支持计划(编号:20120101)。

作者简介:谭卓(1989—),女,辽宁阜新人,硕士,研究方向为植物线虫学,E-mail:1053161197@qq.com;共同第一作者,朱峰(1985—),男,山东济宁人,博士,研究方向为植物线虫学,E-mail:zhufeng0726@163.com。

通信作者:陈立杰,博士,教授,博士生导师,主要从事植物病理学和植物线虫学的教学和科研工作,E-mail:chenlijie0210@163.com;刘晓宇,博士,副教授,主要从事天然产物化学研究,E-mail:xlwkitty@tom.com。

[13] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL - X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 4876-4882.

[14] 符丹丹,庄杰丽,张荣,等. 苹果炭疽病病原菌 ISSR-PCR 反

应体系的优化及遗传多样性分析[J]. 植物保护学报, 2013, 40(3): 231-236.

[15] 余贤美,侯长明,王洁,等. 次郎甜柿炭疽病菌的分离鉴定及其 rDNA-ITS 序列分析[J]. 经济林研究, 2014, 32(1): 45-50.

植物保护学院真菌课题组提供。

细菌:恶臭假单胞杆菌(*Pseudomonas putida*)、丛毛单胞菌(*Comamonas terrigena*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*),均由沈阳农业大学北方线虫研究所提供。

1.1.3 培养基 高氏一号培养基(可溶性淀粉 20 g、NaCl 0.5 g、KNO₃ 1.0 g、K₂HPO₄·3H₂O 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、FeSO₄·7H₂O 0.01 g、琼脂 15.0 g、纯净水 1 000 mL, pH 值 7.1~7.3);PDA 培养基(马铃薯 200 g、葡萄糖 20.0 g、琼脂 15.0 g、纯净水 1 000 mL);NA 培养基(牛肉膏 3 g、蛋白胨 5 g、酵母浸膏 1 g、琼脂 20 g、蔗糖 10 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 值 = 7.0)

1.1.4 主要仪器与试剂 发酵罐 GUGS-50(镇江东方生物工程设备有限公司);分析型高效液相色谱系统:Waters 600 Controller 高效液相色谱仪,以溶剂峰为内标;Waters 2487 紫外检测器;Bruker Avance 600 MHz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司);四级杆飞行时间质谱仪(德国 Bruker 公司)。

柱层析硅胶(200~300目,青岛海洋化工有限公司)、甲醇为色谱级(沈阳市新光化工厂)、石油醚和乙酸乙酯等化学试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 Snead253 发酵液的制备 种子液制备:将 Snead253 菌株接种于高氏一号培养基上,置于 28℃ 恒温箱培养 5 d,而后接种于高氏一号液体培养基中,于 180 r/min、28℃ 振荡培养 48 h,制备种子液。

发酵液的制备:20 mL 种子液接种于装液量 35 L 高氏一号液体培养基的发酵罐中,于 28℃、220 r/min 条件下培养 7 d。

1.2.2 杀线虫活性物质的分离 发酵液预处理:35 L Snead253 发酵液,经 10 000 r/min 离心,去除菌丝体,上清液在 40℃ 条件下旋转蒸发浓缩至原体积的 1/5,向其中加入 5 倍体积的无水乙醇,充分搅拌后置于 -4℃ 冰箱内静止 48 h,滤除沉淀取上清液,旋转蒸发浓缩。所得浓缩液经乙酸乙酯萃取 3 次,合并有机层,加入无水硫酸钠,干燥过夜,抽滤除去无水硫酸钠,并用乙酸乙酯充分洗涤,将滤液旋转蒸发去除溶剂获得脂溶性粗提物。

活性组分分离:将粗提物用少量乙酸乙酯溶解经硅胶柱层析分离(石油醚-乙酸乙酯系统),薄层色谱(thin layer chromatography,简称 TLC)检测合并,所得流经减压浓缩后测定活性。经柱层析获得具有杀线虫活性的流分,经 TLC 检测,斑点少且各斑点迁移率相差较大,故采用制备型薄层层析进一步分离纯化,展开剂为石油醚:乙酸乙酯 = 10:1。将分离所得组分置于 -20℃ 保存备用,进行活性检测。

1.2.3 化合物的结构鉴定 采用高分辨质谱(high-resolution mass spectrometer,简称 HRMS)和核磁共振波谱技术,对 Snead253 杀线虫活性组分进行结构解析。

HRMS 工作条件:扫描模式是正离子模式,*m/z* 扫描范围为 50~3 000,毛细管电压为 4 500 V,雾化器压力为 30 000 Pa,干燥器温度为 180℃,流速为 4.0 L/min。

核磁共振工作条件:样品用三氯甲烷溶解,在 Bruker Avance 600 MHz 仪器上进行扫描,测定氢谱和碳谱,测试温度为 25℃,以溶剂峰为内标,¹H-NMR 谱测试谱宽为

12 335.526 Hz,¹³C-NMR 谱测试谱宽为 39 062.500 Hz。

1.2.4 活性组分对南方根结线虫二龄幼虫的活性检测 准确称取 50 mg 活性组分(Snea253-I-1),加入 0.8 mL 甲醇,充分溶解后加入 0.2 mL 吐温 80 获得浓度为 50 mg/mL 母液,用无菌水将母液分别稀释为浓度 1~5 mg/mL 等 5 个梯度的药液,测定其对南方根结线虫二龄幼虫的致死率和致死中量 LC₅₀。取洁净灭菌的贝氏小皿,加入 20 条南方根结线虫二龄幼虫,再向其中滴加 300 μL 不同浓度的药液混匀。以 1 mL 甲醇与吐温 80(4:1)作为空白母液,依据对应的测试液用无菌水稀释作为对照(CK),每个处理重复 3 次。24 h 镜检并统计结果,计算线虫死亡率及校正死亡率。

$$\text{线虫死亡率} = \frac{\text{线虫死亡数}}{\text{供试线虫数}} \times 100\%$$

$$\text{校正死亡率} = \frac{\text{处理线虫死亡率} - \text{对照线虫死亡率}}{1 - \text{对照线虫死亡率}} \times 100\%$$

1.2.5 Snead253 活性组分的抑菌活性测定 抑制病原真菌的活性测定:采用菌丝生长速率法和牛津杯法。准确称取 50 mg 活性组分,用 0.8 mL 甲醇充分溶解,再加入 0.2 mL 吐温 80 配成母液,用无菌水稀释成不同浓度的药液,以甲醇加吐温 80 的溶剂和蒸馏水为 2 个空白对照,分别加 100 μL 于牛津杯内,重复 3 次,28℃ 恒温箱中培养 72~96 h,观测计量抑菌活性。

抑制细菌的活性测定采用划线法和牛津杯法,操作方法同上。

2 结果与分析

2.1 Snead253 发酵液活性物质的分离纯化

25 L Snead253 发酵液经离心、浓缩、醇沉、浓缩和萃取操作共获得 1.5 g 褐色浆状物,为脂溶性粗提物。粗提物经硅胶柱层析获得 3 个流分:Snea253-I(300 mg)、Snea253-II(450 mg)、Snea253-III(400 mg),其中仅 Snea253-I 具有杀线虫活性。利用薄层层析技术分析 Snea253-I,发现有 2 个高含量组分,迁移率分别为 0.24、0.49,间距相差较大,适宜用制备薄层层析继续分离纯化。活性组分 Snea253-I 通过制备薄层层析进一步分离,得到 2 个组分 Snea253-I-1(150 mg)、Snea253-I-2(45 mg)。结果表明,Snea253-I-1 有明显的杀线虫活性。高效液相色谱法(high performance liquid chromatography,简称 HPLC)检测 Snea253-I-1 纯度可达 95% 以上(图 1),可以用于高分辨质谱和核磁共振仪器的测定。

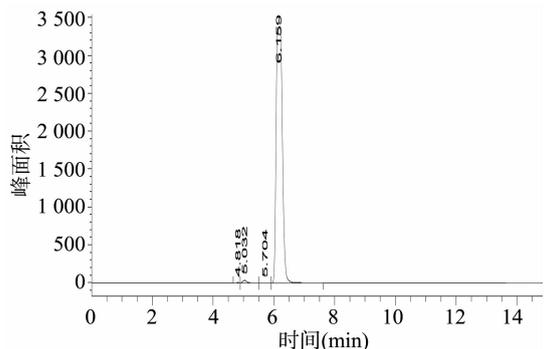


图1 Snead253-I-1的HPLC检测

2.2 Snead253 杀线虫活性组分 Snead253-I-1 的结构解析

2.2.1 Snead253-I-1 的高分辨质谱检测 正离子模式下, Snead253-I-1 的高分辨质谱中 $[M+Na]^+$ 离子峰的质核比为 301.1411 (理论值: 301.1416)。由此可初步确定, 活性物质 Snead253-I-1 的分子式为 $C_{16}H_{22}O_4$, 相对分子量为 278 u (图 2)。

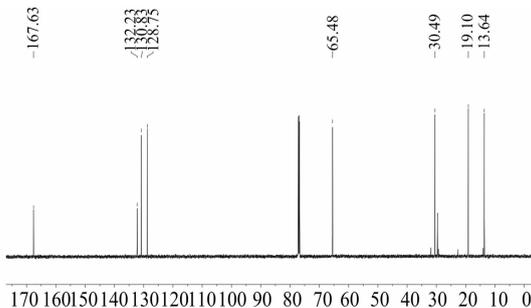


图3 Snead253-I-1 的核磁碳谱

表1 Snead253-I-1 的¹³C-NMR 谱数据分析结果

δ_C	归属
167.01	C-7/C-12
132.23	C-1/C-6
130.83	C-3/C-4
128.75	C-2/C-5
65.48	C-8/C-13
30.49	C-9/C-14
19.10	C-10/C-15
13.64	C-11/C-16

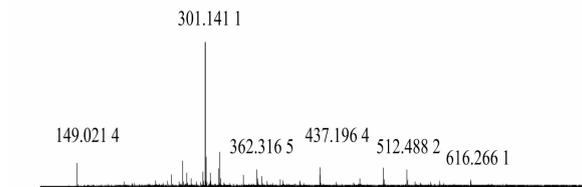


图2 Snead253 活性物质 Snead253-I-1 组分的高分辨质谱结果

2.2.2 Snead253-I-1 的核磁共振波谱检测结果 Snead253-I-1 的¹³C-NMR 图谱中有 8 个碳信号, 而其分子式为 $C_{16}H_{22}O_4$, 因此可判断 Snead253-I-1 为对称结构 (图 3)。其中 δ 132.23, δ 130.83, δ 128.75 为苯环碳信号; δ 167.01 为酯羰基碳信号; δ 65.48 为连氧亚甲基碳信号; δ 30.49、 δ 19.10 为亚甲基碳信号; δ 13.64 为甲基碳信号。相关归属如表 1 所示。

化合物 Snead253-I-1 的¹H-NMR 图谱如图 4 所示。 δ 7.716 (2H, dd, $J=6.0$ Hz, H-2, 5) 和 δ 7.527 (2H, dd, $J=6.0$ Hz, H-3, 4) 为典型的二取代苯环上的氢信号峰; 在高场

区, δ 0.962 (6H, t, $J=7.2$ Hz, H-11, 16), 该信号裂分为三重峰, 说明与亚甲基相连; δ 4.308 (4H, t, $J=7.2$ Hz, H-8, 13) 为连氧亚甲基, 裂分为三重峰, 说明也与亚甲基相连。 δ 1.719 (4H, m, H-9, 14) 和 δ 1.443 (4H, m, H-10, 15) 的 2 组多重峰的亚甲基, 根据其裂分情况, 判断它们位于连氧亚甲基和甲基之间 (表 2)。

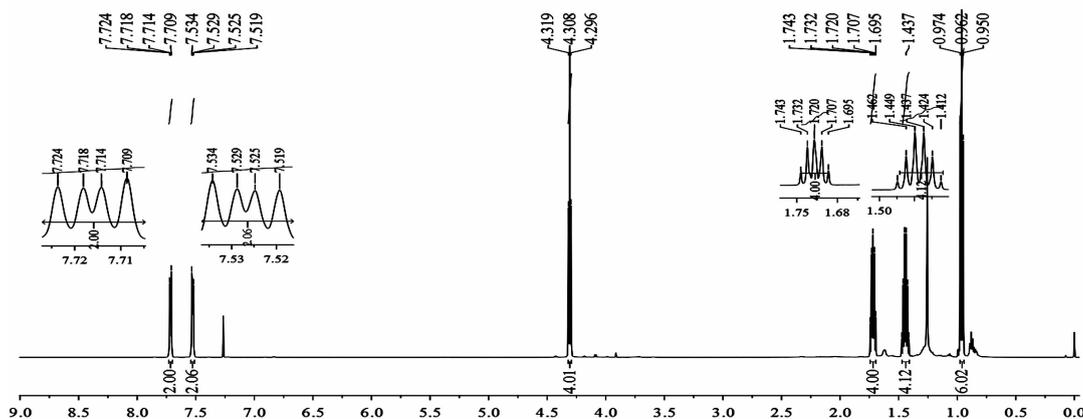


图4 Snead253-I-1 的核磁氢谱

表2 Snead253-I-1 组分的¹H-NMR 谱数据分析结果

δ_H	裂分	归属
7.716	dd, $J=6.0, 3.0$ Hz	H-2/H-5
7.527	dd, $J=6.0, 3.0$ Hz	H-3/H-4
4.308	t, $J=7.2$ Hz	H-8/H-13
1.719	m	H-9/H-14
1.443	m	H-10/H-15
0.962	t, $J=7.2$ Hz	H-11/H-16

依据上述 HRMS、¹H-NMR、¹³C-NMR 谱图解析结果, 经分析确定 Snead253-I-1 化合物的结构为邻苯二甲酸二丁酯 (DBP), 结构式如图 5 所示。

2.3 Snead253-I-1 活性检测结果

2.3.1 Snead253-I-1 杀线虫活性的检测结果 以南方根结线虫二龄幼虫为靶标进行活性检测, 结果 (图 6) 表明, Snead253-I-1 (DBP) 在各个浓度梯度下杀线虫活性均高于粗提物和 Snead253-I。

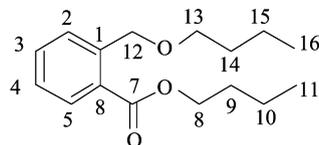


图5 Snead253-I-1 组分的化学结构式

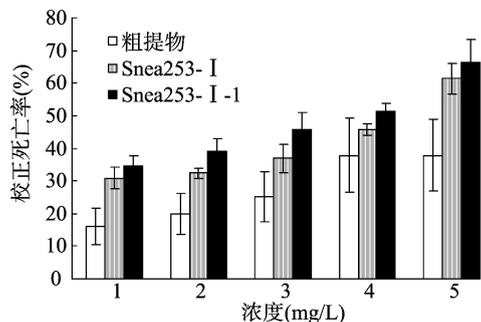


图6 Sneae253 活性组分对根结线虫的致死效果

2.3.2 Sneae253 - I - 1 的抑菌活性 活性组分的抑菌试验结果表明,在供试的 9 种病原真菌中,Snea253 - I - 1 只对粉红聚端孢菌 (*Trichothecium roseum*) 具有明显的抑制作用,而对玉米大斑病菌等其他 8 种病菌均不具有明显的抑制作用。在供试的 3 种细菌中,仅对巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) 具有一定的抑制作用,而对其他 2 种细菌无效果。

3 讨论

生物农药的开发和应用是未来农业病害防治的趋势。利用生物活体或其代谢物杀灭或抑制农业有害生物,可以保护生态环境,减少人畜伤害,促进农业可持续发展^[9-10]。近几年,研究人员在微生物农药的研究与开发过程中,通过高通量筛选获得了大量具有各种生物活性的微生物,它们的代谢物所表现的高活性通常是多种化合物的协同作用^[11],因此分离纯化代谢物中的重要活性成分并明确化学结构是生物农药开发和利用过程中的重点研究方向。它不仅可以指导代谢调控的方向,更重要的是可以从中发现新型农药合成的先导化合物,为绿色农药的开发提供结构基础。

委内瑞拉链霉菌 Sneae253 是一株高效杀线虫菌株,我们期望通过基因组调控使其产生大量高活性物质,提高活性和稳定性,进而将其开发为可商品化的生物农药。因此在前期的研究中,李玲玉等从 Sneae253 发酵液的水溶性组分中分离纯化得到具有杀线虫活性的氨基糖类化合物,明确了水溶性组分中的有效成分^[8]。而本研究侧重于对脂溶性组分中有效成分的探索,首次从 Sneae253 发酵液的脂溶性组分中分离并得到兼具杀线虫活性和抑菌活性的化合物,该化合物的结构通过高分辨质谱仪 (high resolution mass spectrum, 简称 HRMS) 和核磁共振 (nuclear magnetic resonance, 简称 NMR)^[12] 进行鉴定,确定其结构为邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)。

目前,国内外已经报道了有关微生物产邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 的研究,Roy 等研究表明,链霉菌 (*Streptomyces albidoflavus*) 321.2 产生的 DBP 对 G⁺ 细菌、G⁻ 细菌及 *Saccharomyces cerevisiae*、*Aspergillus niger*、*Curvularia pallenscens* 等真菌均具有较强的抑制作用^[13]。马桂珍等从海洋放线菌 BM - 2 菌株分离的 DBP 对禾谷镰刀菌具有较强的抑制作用^[14]。刘伟等

从海洋小链霉菌 DY2741 的代谢产物中分离获得的 DBP 对金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 具有抑制作用^[15]。研究结果表明,DBP 本身有较好的抑菌活性。

本研究从 Sneae253 中分离获得的 DBP 不仅具有一定的抑菌活性同时还具有一定的杀线虫活性,最重要的是其化学结构具有衍生化和改变结构的发展潜力,为活性基团的修饰提供很好的结构基础,可作为先导化合物进行杀线虫农药的合成。本研究结果为 Sneae253 发酵液作为杀线虫生物农药的研发奠定了化学结构的基础,相关的研究工作仍在进行中。

参考文献:

- [1] 段玉玺. 植物线虫学[M]. 北京: 科学出版社, 2011: 1-3.
- [2] Mrozik H, Eskola P, Linn B O, et al. Discovery of novel avermectins with unprecedented insecticidal activity[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 1989, 45(3): 315-316.
- [3] 陈蔚, 谭华荣. 尼可霉素 (Nikkomycins) 多组分结构及其生物合成相关基因的研究进展[J]. 生物工程学报, 2000, 16(5): 548-550.
- [4] 孙宇辉, 周秀芬, 涂国全, 等. 南昌链霉菌代谢产物与代谢工程研究现状的回顾与展望[J]. 生命科学, 2005, 17(3): 207-210.
- [5] 左一鸣, 王开运, 姜兴印. 4 种抗生素类杀虫剂对小菜蛾不同龄期幼虫的毒力和杀卵作用[J]. 农药, 2004, 43(1): 25-27.
- [6] 陈立杰, 陈井生, 段玉玺. 具毒杀植物线虫活力的链霉菌的制备方法及其应用: CN101225370[P]. 2008-07-23.
- [7] 陈井生, 陈立杰, 段玉玺, 等. 放线菌 Sneae253 代谢产物杀线虫谱研究[J]. 上海农业学报, 2010, 26(3): 80-82.
- [8] 李玲玉, 赵迪, 刘晓宇, 等. 放线菌 Sneae253 代谢产物及寡糖对南方根结线虫活性的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(1): 117-122.
- [9] 何树文, 达世彩. 生物农药的国内外发展动态[J]. 湖北植保, 2013(5): 60-62.
- [10] 张爱华, 任志成, 王壮, 等. 不同生物源农药对西洋参主要病害的室内抑菌活性及田间防效[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 197-200.
- [11] 刘长令, 李正名. 以天然产物为先导化合物开发的农药品种 (I)——杀线剂[J]. 农药, 2003, 42(11): 1-4.
- [12] 田靖, 王玲. 核磁共振技术在农业中的应用研究进展[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(1): 12-15.
- [13] Roy R N, Laskar S, Sen S K. Dibutyl phthalate the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2 [J]. Microbiological Research, 2006, 161(2): 121-126.
- [14] 马桂珍, 吴少杰, 付泓润, 等. 海洋放线菌 BM - 2 菌株抗真菌活性物质的分离纯化与结构鉴定[J]. 中国生物防治学报, 2014, 30(3): 393-401.
- [15] 刘伟, 徐涛, 蔡敬民, 等. 海洋小链霉菌 DY2741 抗菌物质的溶解性质及分离纯化[J]. 食品科学, 2010, 31(15): 177-180.