

杀线虫放线菌 DA09202 的鉴定及其 活性物质的解析

占宝林^{1,2} 曾庆飞^{1,2} 吴晓鹏¹ 朱军¹ 鲍时翔¹ 黄惠琴^{1*}

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所 海南 海口 571101)

(2. 海南大学农学院 海南 海口 570228)

摘要: 从海南热带植物园土壤样品中分离获得一株具有较强杀线虫活性的放线菌菌株 DA09202, 通过形态特征、生理生化特征、16S rDNA 序列测定及其系统发育分析, 初步鉴定为金色链霉菌。菌株 DA09202 发酵液采用溶剂萃取、硅胶柱层析、Sephadex LH-20 凝胶过滤和制备薄层板层析, 从中分离得到杀线虫活性化合物 A23-1 和 A46-2。化合物 A23-1 经光谱和波谱分析(UV、¹H-NMR、¹³C-NMR、DEPT、¹H-¹H COSY、HMBC、HSQC)以及文献对照, 鉴定为 4',7-二羟基异黄酮, 化合物 A46-2 的结构正在鉴定中。

关键词: 放线菌, 菌株鉴定, 杀线虫活性物质, 结构测定

Identification of Nematicidal Actinomycetes DA09202 and Active Compounds

ZHAN Bao-Lin^{1,2} ZENG Qing-Fei^{1,2} WU Xiao-Peng¹ ZHU Jun¹
BAO Shi-Xiang¹ HUANG Hui-Qin^{1*}

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, CATAS, Haikou, Hainan 571101, China)

(2. College of Agriculture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Strain DA09202 with nematicidal activity was isolated from soil sample collected from Hainan Tropical Botanical Garden. Based on the mycelium morphology, physiological property, biochemical property and 16S rDNA phylogenetic tree, strain DA09202 was identified as *Streptomyces aureus*. The results indicated that the strain DA09202 has nematicidal activity, the active compounds A23-1 and A46-2 were purified from its fermentation broth by means of solvent extraction, column chromatography, Sephadex LH-20 and preparation TLC, and the structure of the A23-1 was elucidated as 4',7-Dihydroxyisoflavone by spectrum analysis, and the structure of A46-2 is been elucidating.

Keywords: Actinomycetes, Identification, Nematicidal compounds, Structure elucidation

基金项目: 国家 973 计划前期研究专项项目(No. 2010CB134506); 中央级公益性科研院所基金资助项目(No. ITBBZX2008-1-2); 海南省研究生创新课题基金项目(No. Hxwby2009-06); 博士科研启动费项目(No. ITBBqd0801)

* 通讯作者: Tel: 86-898-66890695; ✉ huanghq21@yahoo.com.cn

收稿日期: 2010-03-09; 接受日期: 2010-04-28

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

根结线虫是十大植物寄生线虫之一,种类繁多,呈世界性分布,对农业、园艺等产业造成巨大损失,其危害已超过细菌和病毒,仅次于真菌。据报道根结线虫(*Meloidogyne* spp.)仅对世界上重要经济作物每年造成的损失就高达数百亿美元^[1-2]。我国热带、亚热带地区都有根结线虫病的发生,一般造成作物减产 10%–20%^[3]。目前根结线虫病主要采用化学杀线虫剂防治,但由于化学药物存在环境污染、人畜中毒、污染地下水源及食品、破坏生态平衡等诸多弊端,化学杀线虫剂的应用正在逐步受到限制^[4],生物防治线虫病害显得尤为重要和迫切。

放线菌是微生物的重要资源,约 50%的抗生素是由放线菌产生的^[5]。一些放线菌的代谢产物对根结线虫具有抑制或毒杀作用,具有很大的开发价值。本课题组以南方根结线虫为靶线虫,筛选获得一批具有杀线虫活性的放线菌菌株。本文报道了菌株 DA09202 的鉴定以及活性物质的分离和结构鉴定过程。

1 材料与方法

1.1 供试线虫及菌株来源

南方根结线虫,本实验室培养;菌株 DA09202 从海南热带植物园土壤样品中分离获得。

1.2 培养基

菌株鉴定采用高氏一号合成培养基、PDA 培养基、JCM 培养基、甘油天门冬素培养基、无机盐淀粉培养基;发酵培养基:葡萄糖 1%,可溶性淀粉 0.5%,黄豆粉 1%,酵母膏 1.5%, KH_2PO_4 0.05%,pH 7.2。

1.3 菌株鉴定

参照阎逊初^[6]方法进行菌株的培养及形态特征的观察。参考 Lechevalier 的方法^[7]进行生理生化特征的鉴定。参照曾庆飞等^[8]的方法以 16S rDNA 扩增序列为基础进行系统发育分析。

1.4 测定方法

供试样品(约 0.5 mg)用少量 DMSO 溶解后,再用清水稀释 10 倍(10 mL),吸取 1 mL 加入到有线虫悬浊液(0.2 mL,约 200 条)的 24 孔细胞培养板中,混匀,清水对照,28℃ 放置 12 h 后显微镜观察并计算校正死亡率。

1.5 菌种 DA09202 的发酵

菌种 DA09202 接种于高氏一号培养基,28℃ 培

养 7 d,挑取单菌落接种于装有 50 mL 种子培养基(与发酵培养基相同)的 500 mL 三角烧瓶,28℃ 培养 2 d 后,接种于发酵培养基,接种量为 8%,摇床转速 200 r/min,28℃ 培养 156 h 后,终止发酵。

1.6 杀线虫活性物质的分离纯化

发酵液经菌丝体过滤后,收集上清液,乙酸乙酯萃取 3 次,萃取液在 50℃ 下减压浓缩得棕黄色浸膏。通过 200–300 目硅胶柱层析、Sephadex LH-20 等,对所得浸膏进行分离纯化。在纯化过程中,采用上述 1.4 所述的测定方法进行活性跟踪以确定活性部分。然后对活性部分进行薄层层析分析(层析板采用紫外和碘显色),合并层析带型相同及相似的组分,同时进行纯度检测。

采用 UV、MS 和 NMR 等技术,结合相关文献,对分离到的活性化合物进行结构鉴定。

2 结果与分析

2.1 菌株 DA09202 的分类鉴定

2.1.1 形态和培养特征:菌株 DA09202 在高氏一号合成培养基、甘油天门冬素培养基、土豆培养基、无机盐淀粉培养基、酵母粉-麦芽提取物培养基、燕麦汁培养基上生长良好,形成丰富的的气生菌丝和基内菌丝,菌落边缘整齐,无突起,在土豆培养基、高氏一号合成培养基、酵母粉-麦芽提取物培养基中菌丝为粉状,边缘菌丝与培养基结合较紧密。气生菌丝为树枝状,有色素产生(图 1)。



图 1 DA09202 菌株在高氏一号培养基上的菌落特征
Fig. 1 Cultural characteristics of strain DA09202 on Gause's synthetic agar

2.1.2 生理生化特征:明胶液化,牛奶不凝固但胨化,淀粉水解,不产硫化氢,不产黑色素,不还原硝酸盐,纤维素上不生长。利用 D-葡萄糖、肌醇、D-甘露醇、L-阿拉伯糖、D-木糖、D-果糖、蔗糖、鼠李糖、棉子糖。

2.1.3 16S rDNA 序列及系统发育分析: 对菌株 DA09202 的 16S rDNA 扩增获得了 1429 bp 的序列, BLAST 相似性分析表明, 与菌株 DA09202 同源性的菌株均为链霉菌属, 通过系统发育树分析, 菌株 DA09202 与 *Streptomyces longisporoflavus*、

Streptomyces aureus 在同一个分支上, 且序列相似性均达 99%(图 2)。

根据形态培养特征、生理生化特征以及 16S rDNA 序列的对比分析, 初步将 DA09202 鉴定为金色链霉菌。

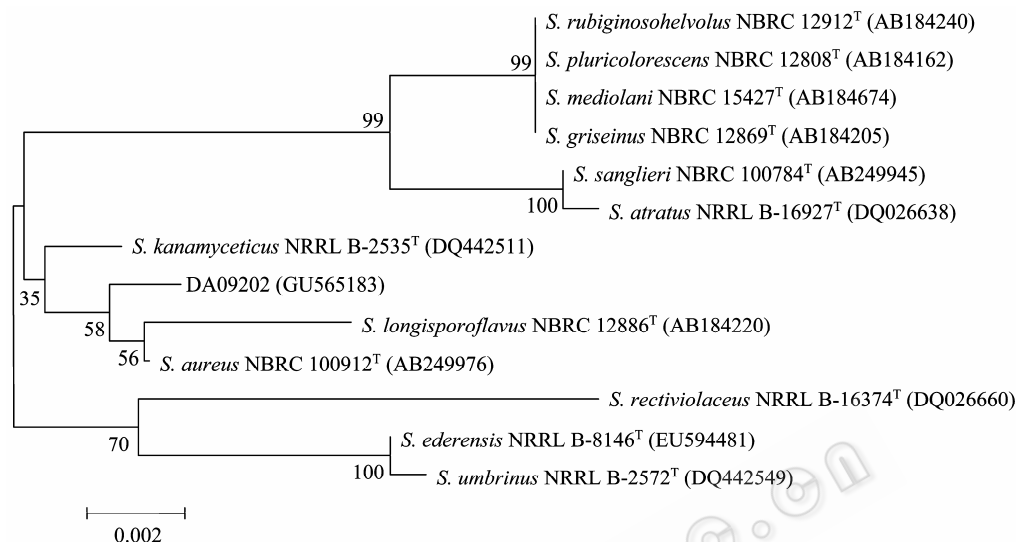


图 2 基于 16S rDNA 构建的链霉菌 DA09202 的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of strain DA09202 based on 16S rDNA

2.2 杀线虫活性物质的分离纯化

发酵共得 25 L 发酵液, 采用硅胶柱层析, 以氯仿: 甲醇 = (50:1, 45:1, 40:1...1:1, V/V), 逐渐加大甲醇比例梯度洗脱得 80 个组分, 减压浓缩收集各组分, 对各组分进行杀线虫活性检测, 合并活性部分。发现 23、28、46 组分有杀线虫活性。

收集的第 23 个组分采用 Sephadex LH-20 柱层析(甲醇:氯仿=1:1, V/V, 为洗脱剂), 收集活性组分, 采用硅胶薄层板制备(展开剂氯仿:丙酮=4:1, V/V), 得到白色化合物 A23-1。经正相 TLC 分析, 分别采用 3 种展开剂(氯仿:丙酮 = 3:1, 环己烷:丙酮 = 2:2, 石油醚:氯仿 = 1:6, V/V)检验其纯度, 结果为一个斑点, 反相 TLC 分析表明也为一个斑点(展开剂为甲醇:水 = 1:3, V/V)。

收集的第 46 个组分反复采用 Sephadex LH-20 柱层析(甲醇洗脱), 收集活性部位, 发现化合物 A46-2 有杀线虫活性, 校正死亡率达 80%以上。

2.3 杀线虫活性物质的结构鉴定

2.3.1 杀线虫活性物质 A23-1 结构鉴定: DA09202 产杀线虫活性物质 A23-1 为白色粉末, 分子量为 254, HR-TOF-MS: $m/z = 277.0476[M+Na]^+$, 分子式

为 $C_{15}H_{10}O_4Na$, $\Omega = 11$ 。 1H -NMR 显示出 10 个质子信号, δ 9.57 和 δ 10.62 均为活泼氢信号; δ 8.29 (1H, s)为一个 CH 信号, δ 7.97 (1H, d, $J = 8.76$ Hz), δ 6.92 (1H, dd, $J = 8.76, 2.24$ Hz)和 δ 6.85 (1H, d, $J = 2.24$ Hz), 说明该分子结构中存在 AMX 耦合系统; δ 7.39 (2H, d, $J = 8.68$ Hz), δ 6.79 (2H, d, $J = 8.68$ Hz), 说明该分子结构中存在 AA'BB'耦合系统; ^{13}C -NMR 显示出一个羰基, 7 个 CH, 7 个季碳(表 1); 综合以上信号初步推测该化合物为异黄酮类化合物, 结合 HSQC、HMBC、 1H - 1H COSY 和文献数据, 最终确定该化合物为 4',7-二羟基异黄酮(图 3)。

2.3.2 杀线虫活性物质 A46-2 结构初步分析: 化合物 A46-2 为白色粉末, HR-TOF-MS: $m/z = 637.3803[M-H]^-$, 分子式为 $C_{31}H_{58}O_{13}$, $\Omega = 3$ 。在化合物 A46-2 的图谱中 C (δ 175.2)无任何相关 H, 可能其在结构中多个氧原子相连, 该 C 为醛基或羧基结构, 不连接 H。C (δ 143.3) Dept 中无信号, 显示 C=C 双键的该侧 C 为双取代, C 与 H (δ 1.12)相关联(HMBC), H (δ 1.12)与 C (δ 25.7)相接, H (δ 1.12)为 3 个 H, s 峰, C (δ 25.7)的 Dept 中正峰, 可以认为是甲基结构, 即 C (δ 143.3)连一甲基。C (δ 121.9)正峰, C=C 双键 C 为

单取代, HMQC 图确定相连接 H ($\delta 5.17$)。H ($\delta 5.17$) s 峰, 1 个 H, 说明另一取代原子上无 H, 为 O 或季 C。通过 SCI-Finder 数据库检索发现, 化合物 A46-2 可能为一新化合物。由于此化合物分子量较大, 结构复杂, 无相关图谱资料参照, 故其结构还在进一步的解析中。

表 1 A23-1 的 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz)和 $^{13}\text{C-NMR}$ 的信号归属
Table 1 The data of A23-1 of $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$

No.	$^1\text{H-NMR}$ Δppm (DMSO)	$^{13}\text{C-NMR}$ Δppm (DMSO)
C-2	8.30	153.3
C-3	—	123.9
C-4	—	175.2
C-5	7.97	127.7
C-6	6.92	106.0
C-7	—	163.0
C-8	6.86	102.5
C-9	—	157.9
C-10	—	117.9
C-1'	—	117.9
C-2'	7.39	130.9
C-3'	6.80	115.4
C-4'	—	157.6
C-5'	6.80	115.4
C-6'	7.39	130.5
4'-OH	9.58	
7-OH	10.63	

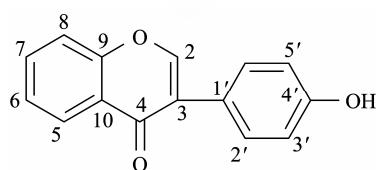


图 3 A23-1 的化学结构式

Fig. 3 The Structure of A23-1

3 结论与讨论

由微生物产生次生代谢产物周期短、操作简单、可控性强、成本低、环境危害小, 与动植物相比其优点是不言而喻的。有文献报道金色链霉菌经变异后能产生几十种代谢产物, 变异菌株到底能产生哪些代谢产物, 尚待进一步研究。化合物 A23-1 为

4',7-二羟基异黄酮, 主要存在于豆科、鸢尾科植物中, 但由微生物发酵产生的并不多见^[8]。1999 年, 孟晓峰等从微生物中分离得到, 并首次证实其杀线虫活性^[9]。化合物 A46-2 极有可能是新的杀线虫化合物, 这对金色链霉菌产次生代谢产物的研究及应用具有一定的意义。

4',7-二羟基异黄酮毒性低、生理活性多样, 具有很大的开发应用价值, 已成为研究开发热点。其生理活性主要有: (1) 抗缺氧及抗心率失常作用, 对高血压病人的头痛、头晕、颈项强痛等症状有明显的改善; (2) 对于治疗心绞痛、突发性耳聋等也有一定疗效; (3) 雌性激素作用; (4) 抑制肿瘤细胞活性, 如白血病细胞、黑色素瘤细胞; (5) 杀线虫活性等。金色链霉菌尚未见产 4',7-二羟基异黄酮的报道, 本研究为 4',7-二羟基异黄酮产生提供了一种新的微生物来源。

参考文献

- [1] 张猛, 张天宇, 张玉娜. 植物寄生线虫生防因子研究进展. 山东农业大学报, 2004, **35**(2): 311-314.
- [2] Hesamedin R. Effect of different initial population densities of *Meloidogyne incognita* on the growth of *Cicer arietinum*. *Commun Agric Appl Biol Sci*, 2006, **71**(3A): 669-674.
- [3] 刘维志. 植物病原线虫学. 北京: 中国农业出版社, 2000: 56-58.
- [4] 肖顺, 张绍升. 根结线虫的寄生菌物生物多样性. 福建林业大学学报, 2004, **33**(4): 434-437.
- [5] 姜怡, 唐蜀昆, 张玉琴, 等. 放线菌产生的生物活性物质. 微生物通报, 2007, **34**(1): 188-190.
- [6] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社, 1992: 268-1048.
- [7] Lechevalier MP, Lechevalier HA. The chemotaxonomy of Actinomycetes in Actinomycete Taxonomy. Arlington: Society for industrial microbiology, 1980.
- [8] 曾庆飞, 李传浩, 黄惠琴, 等. 根结线虫拮抗放线菌菌株 DA07118 的筛选、鉴定及发酵条件的优化. 中国生物防治, 2009, **25**(3): 255-259.
- [9] 孟晓峰, 张礼萍, 龚炳永. 抗虫活性菌株 SIPI-9764 的产物研究. 中国抗生素杂志, 1999, **24**(3): 173-225.