

桃根癌病菌拮抗放线菌抑菌物质的 分离纯化与结构鉴定

侯柄竹 王树芳 马焕普 刘志民*

(北京农学院 植物科学技术学院 北京 102206)

摘要: 【目的】为明确根癌拮抗放线菌 G-19 的抑菌活性物质。【方法】采用 Sephadex LH-20 柱层析、高效液相色谱及中压制备色谱等技术,对桃根癌拮抗放线菌 G-19 发酵液中的抑菌活性成分进行分离纯化,并通过 LC-MS、NMR 对其结构进行鉴定。【结果】分离得到化合物 G-19-I 的结构为邻苯二甲酸二丁酯(DBP),化合物 G-19-II 的结构为 2-(4-羟基苯基)-3,4-二氢-2H-苯并吡喃-3,4,5,7-四醇,俗称无色天竺葵素。【结论】阐明了放线菌 G-19 抑菌活性成分的物质基础。

关键词: 桃树根癌病, 放线菌, 邻苯二甲酸二丁酯, 无色天竺葵素

Identification of antimicrobial composition isolated and purified from antagonistic actinomycetes against *Agrobacterium tumefaciens* of peach

HOU Bing-Zhu WANG Shu-Fang MA Huan-Pu LIU Zhi-Min*

(College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: [Objective] To isolate and identify the antimicrobial active component extracted from fermentation broth of antagonistic actinomycetes strain G-19 against peach crown gall (*Agrobacterium tumefaciens*). [Methods] Sephadex LH-20 chromatography, HPLC and mid-

基金项目: 北京市自然科学基金项目(No. 5112010); 北京市教委资助项目(No. KM200910020001)

*通讯作者: Tel: 86-10-80799136; 信箱: liuzhimin600@sina.com

收稿日期: 2012-12-24; 接受日期: 2013-02-04

dle-pressure chromatography were used for isolation and purification. LC-MS, NMR were applied to identify structure of the active component. [Results] Compound G-19-I was isolated and structurally identified as 1,2-benzenedicarboxylic acid, 1,2-dibutyl ester (DBP); compound G-19-II was isolated and structurally identified as 2-(4-hydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,4,5,7-tetrol, commonly known as leucopelargonidin. [Conclusion] The material basis of the antibacterial constituents in antagonistic actinomycetes strain G-19 was further clarified.

Keywords: Peach crown gall, Actinomycetes, Dibutyl phthalate, Leucopelargonidin

桃树根癌病(亦称冠瘿病)是一种世界范围的植物细菌肿瘤病害,是根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)通过自然转基因方式引发的基因病害^[1-4]。桃树根癌病在我国江苏、浙江、福建及上海郊区普遍发生,北京南口农场桃树根癌病发病率为58.2%–100%^[5]。桃树染病后在根及根茎部形成大小不等的肿瘤,影响根部的水分和养料吸收,病株常表现为叶黄、势弱,使果实产量和品质下降,严重的甚至毁园、绝收。

目前桃树根癌病在生产上主要以化学农药和抗生素防治为主,虽有一定效果,但经长期实践证明,应用生物菌株对根癌病进行生物防治效果更佳,且价格便宜,有利于保护环境和生态平衡。所以生物防治是解决根癌病的有效切入点。应用较早且非常有效的生物制剂是1972年Kerr从土壤杆菌中分离得到的放射土壤杆菌K84菌株,对核果类果树及其近源花卉的根癌病具有良好防效^[6]。近年来我国报道分离出的放射土壤杆菌HLB-2、E26和M115对葡萄根癌病菌有明显抑制作用,经大田试验防效为85%–100%^[7]。2004年王关林等筛选出高产细菌素的菌株WJK84-1,其产生的细菌素可抑制根瘤发生,抑瘤率达到83.4%左右^[8]。

G-19系本实验室从桃高发根癌病的再植土壤中以KCN为选择压力分离得到的一株生防放线菌,该菌株的发酵产物对桃根癌土壤杆菌具有

较明显的抑制作用^[9],采用蛋白沉淀法及液相色谱法对G-19菌株主要活性抑菌物质进行分离纯化,得到分子量范围为900–1300 Da含有糖基的抑菌肽^[10]。本文拟对G-19发酵产物的小分子活性组分进行分离纯化和鉴定,为开发高防效桃树根癌病的生物制剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病原菌:桃根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*),购于中国农业大学。

供试生防菌株:从桃高发根癌病的土壤中分离出的具有耐氰效应的放线菌G-19。

1.2 生防放线菌发酵液的制备

将菌株G-19接种到高氏1号液体培养基中,28℃、120 r/min摇床培养7 d后,滤除菌体和发酵残渣,取上清液加固体硫酸铵至60%饱和度,静置12 h后,4℃、12 000 r/min离心10 min,收集上清液部分。

1.3 萃取有机溶剂的筛选

将预处理过的G-19发酵上清液分别用等体积的乙酸乙酯、正丁醇、氯仿萃取2次,合并萃取液,40℃减压浓缩至干,得抑菌物质粗提物,经抑菌效果测定确定最佳有机溶剂种类。

1.4 生防放线菌抑菌物质的分离

采用Sephadex LH-20柱层析对抑菌粗提物进

行分离。用分段洗脱法,洗脱梯度水:甲醇(V/V)依次为 7:3、5:5、3:7、1:9。每个梯度用 1 倍体积洗脱液,流速控制在 0.8–1.0 mL/min。用核酸蛋白检测仪在 254 nm 下监测,并根据出峰情况分部收集。减压浓缩后,以根癌土壤杆菌为指示菌,采用 K-B 滤纸片法测定各组分抑菌效果,活性较强部分作为下一步骤的起始样品进一步纯化。

1.5 生防放线菌抑菌物质的纯化

抑菌活性组分分别经过高效液相色谱仪和中压制备色谱仪进行纯化和富集。样品经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,流动相:甲醇和水,梯度洗脱:30%甲醇,0–10 min;30%–60%甲醇,10–20 min;60%–80%甲醇,20–30 min;80%–90%甲醇,30–40 min;90%–50%甲醇,40–50 min;254 nm 紫外检测;柱温 25 $^{\circ}\text{C}$ 。高效液相色谱(Agilent 1100 型)的色谱柱为 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μm),流速为 1.0 mL/min,进样量为 10 μL ;中压制备色谱(PROSTAR210 型)的色谱柱为 Waters COSMOSIL 5C18-MS-II (20 mm \times 250 mm),流速为 10 mL/min,进样量为 200 μL 。经制备色谱后,收集冷冻干燥后的样品备用。

1.6 生防放线菌抑菌活性成分的结构鉴定

采用液质联用(LC-MS)和核磁共振(NMR)对所得纯品进行结构推断^[11]。

2 结果与分析

2.1 生防放线菌抑菌物质的最佳萃取溶剂

通过用正丁醇、乙酸乙酯和氯仿进行萃取,经生物活性测试,结果表明乙酸乙酯萃取的效果最好(表 1),故上清液的活性成分使用乙酸乙酯萃取。

2.2 生防放线菌抑菌物质分离后的抑菌活性

采用 Sephadex LH-20 层析柱对生防放线菌 G-19 的粗提物进一步分离,经过 254 nm 紫外检测,共分离得到 9 个组分,其抑菌活性测定结果见表 2。

从表 2 可以看出,对桃根癌土壤杆菌抑制作用较强的是组分 7,通过高效液相色谱分析发现,组分 7 的峰谱是由两个较大的色谱主峰和一些较小峰组成的杂峰组(图 1),经生物测定显示,保留时间在 4.802 min 和 21.946 min 时出现的较高峰有抑菌活性。

按照之前用 HPLC 确立的分析条件,调节流速至 10 mL/min 的情况下,用中压制备色谱对组分 7 进行纯化富集,得到较纯的化合物 G-19-I 共 100.9 mg, G-19-II 共 30.5 mg。将得到的纯品用分析型高效液相色谱仪分析,其纯度的分析图谱见图 2。

表 1 发酵液有机溶剂萃取后有机相与水相的抑菌作用

Table 1 Inhibition effect of the organic phase and water phase extracted by different solvents

抑菌作用 Bacteriostasis	乙酸乙酯 Acetic ether	正丁醇 N-butyl alcohol	氯仿 Chloroform
有机相抑菌圈直径 Organic bacteriostatic diameter (mm)	17.57	10.03	0
水相抑菌圈直径 Aqueous bacteriostatic diameter (mm)	0	8.35	20.24

注: 抑菌圈直径为 3 次重复平均值。

Note: The diameter of inhibition zone was the average value of 3 replicates.

表 2 G-19 抑菌粗提取物经 Sephadex LH-20 后所得组分对桃根癌土壤杆菌的抑制作用
Table 2 Inhibitory effect of fractions via Sephadex LH-20 against *A. tumefaciens*

组分 Fractions	外观性状 Appearance characters	得率 Yield (%)	抑菌圈直径 Bacteriostatic diameter (mm)
1	白色粉末	3.81	6.00 G
2	白色粉末	2.35	6.00 G
3	白色粉末	4.40	6.00 G
4	淡黄色絮状	5.57	6.86 E
5	淡黄色固体	18.18	6.63 F
6	黄棕色油状	22.58	11.28 B
7	浅黄色油状	11.85	21.81 A
8	浅黄色油状	9.68	7.45 D
9	浅黄色油状	21.58	9.32 C

注: 对照抑菌圈直径为 6.00 mm; 表中所列数据为 3 次重复的平均值; 数据后标有 A-G 不同大写字母表示在 1% 水平上有显著性差异.

Note: The antibacterial diameter of control is 6.00 mm; Data in the table are the average of 3 replicates; Data with A-G of different capital letters indicate the significant difference at 1% level.

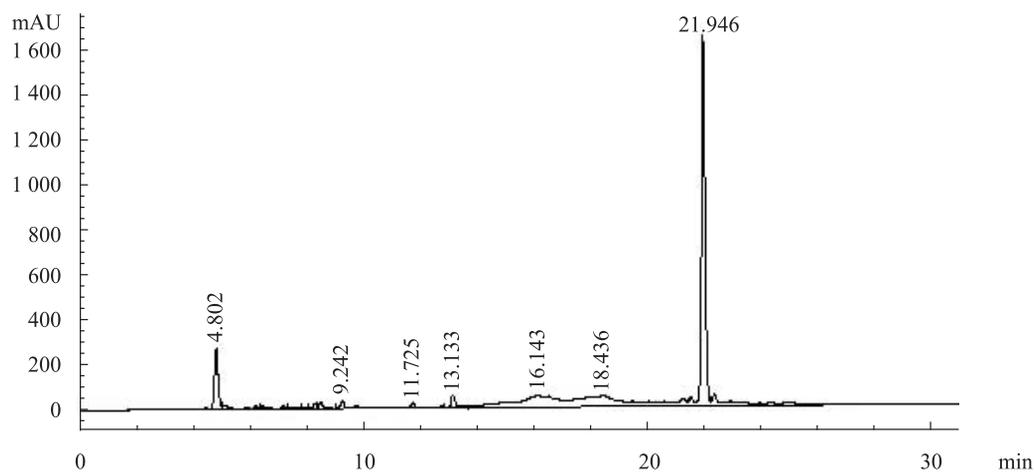


图 1 组分 7 的高效液相分析图

Fig. 1 HPLC chromatogram of constituent 7



图 2 组分 7 纯化得到的 G-19-I 和 G-19-II 纯品的高效液相分析图

Fig. 2 HPLC chromatogram of compound G-19-I and G-19-II from constituent 7

表3 化合物 G-19-I 的 δ 及其 HMQC 和 HMBC 相关信息
Table 3 The δ of compound G-19-I and its information of HMQC and HMBC

δ (ppm)	C 的类型 Type of C	HMQC 相关的 δ δ of relate to HMQC (ppm)	HMBC 相关的 δ δ of relate to HMBC (ppm)
167.87	C=O		7.71, 4.29
132.28	C		7.60, 7.71
131.00	-CH=	7.60	7.71
128.57	-CH=	7.71	7.60
65.03	CH ₂	4.29	1.72, 1.44
30.41	CH ₂	1.72	4.29, 1.44, 0.97
18.94	CH ₂	1.44	4.29, 1.72, 0.97
12.80	CH ₃	0.97	1.72, 1.44

2.3 化合物 G-19-I 的结构鉴定

化合物 G-19-I 为淡黄色油状液体, 易溶于甲醇、乙醚、丙酮等有机溶剂。ESI-MS 结果显示, $[M+Na]=301.27$, $[2M+Na]^+=579.07$, 推测该物质分子量 $M=278$ 。

化合物 G-19-I 的 ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) δ : 7.71 (2H, dd, $J=3.5, 5.5$ Hz, H-3, H-6), 7.60 (2H, dd, $J=3.5, 5.5$ Hz, H-4, H-5), 4.29 (4H, t, $J=6.6$ Hz, H-8, H-8'), 1.72 (4H, m, H-9, H-9'), 1.44 (4H, m, H-10, H-10'), 0.97 (6H, t, $J=7.3$ Hz, H-11, H-11')。其中在低场处显示出 2 组芳香质子信号 (δ 7.71, 7.60)。¹³C-NMR (CD₃OD, 150MHz) δ : 167.9 (C-7, C-7'), 132.3 (C-1, C-2), 131.0 (C-4, C-5), 128.6 (C-3, C-6), 65.0 (C-8, C-8'), 30.4 (C-9, C-9'), 19.0 (C-10, C-10'), 12.8 (C-11, C-11')。其中在高场处显示出 1 个甲基信号 (δ 12.8) 和 2 个亚甲基信号 (δ 19.0, 30.4), 此外还有 1 个连氧的亚甲基信号 (δ 65.0), 低场处显示 2 个次甲基信号 (δ 128.6, 131.0), 1 个季碳信号 (δ 132.3) 和 1 个羰基信号 (δ 167.9)。结合电喷雾质谱图得出的分子量, 推测该化合物可能为对称结构分子, 其分子式可能为 C₁₆H₂₂O₄。

化合物 G-19-I 的 HMQC、HMBC 和 COSY 谱图见表 3 和表 4。

依据 HMBC 和 COSY 显示的 C-H 远程相关

信息和 H-H 相关信息, 将该化合物的各个基团相连, 结合以上 NMR 数据分析, 确定化合物 G-19-I 为邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate), 分子量 278, 分子式 C₁₆H₂₂O₄, 结构式见图 3。

2.4 化合物 G-19-II 的结构鉴定

化合物 G-19-II 为橘黄色粉末, 易溶于甲醇。分子量 290, 分子式 C₁₅H₁₄O₆。

化合物 G-19-II 的 ¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ : 7.22 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2', H-6'), 6.79 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-3', H-5'), 5.91 (1H, s, H-6), 5.83 (1H, s, H-8), 4.59 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H-2), 4.41 (1H, dd, $J=10.8, 8.4$ Hz, H-4), 3.99 (1H, dd, $J=8.0, 8.4$ Hz, H-3)。¹³C-NMR (CD₃OD, 100 MHz) δ : 157.8 (C-8 α), 157.2 (C-7), 157.0 (C-5),

表4 化合物 G-19-I 的 ¹H-¹H COSY 信息
Table 4 The ¹H-¹H COSY information of compound G-19-I

δ (ppm)	H 的类型 Type of H	¹ H- ¹ H COSY
7.71	Phenyl-H	7.60
7.60	Phenyl-H	7.71
4.29	-OCH ₂ -	1.72
1.72	CH ₂	4.29, 1.44
1.44	CH ₂	1.72, 0.97
0.97	CH ₃	1.44

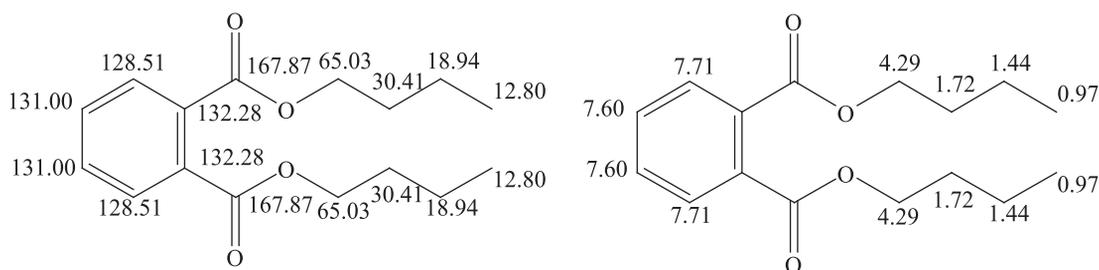


图3 化合物 G-19-I 的结构及其 C 和 H 的化学位移

Fig. 3 The structure of compound G-19-I and its δ of C and H

156.4 (C-4'), 130.9 (C-1'), 129.0 (C-2', C-6'), 115.4 (C-3', C-5'), 100.2 (C-4 α), 95.6 (C-6), 94.8 (C-8), 82.2 (C-2), 68.2 (C-3), 28.3 (C-4)。

从 $^1\text{H-NMR}$ 可见, 苯环区有 6 个 H, 其中 4 个双峰 H (δ 7.22, 7.22, 6.79, 6.79), 2 个单峰 H (δ 5.91, 5.83), 可见有 2 个苯环存在; 高场区有 3 个 H (δ 4.59, 4.41, 3.99), 表明为非苯环 H, 从峰形来判断应为黄烷醇类化合物。从 $^{13}\text{C-NMR}$ 可见, 苯环上有 3 个连氧取代基(δ 157.2, 157.0, 156.4)。结合以上 NMR 数据分析, 推测化合物 G-19- II 的结构为 2-(4-羟基苯基)-3,4-二氢-2H-1-苯并吡喃-3,4,5,7- 四醇, 俗称为无色天竺葵素 (Leucopelargonidin), 结构式见图 4。

3 讨论

邻苯二甲酸二丁酯, 又称 DBP, 曾在微生物的次级代谢产物中多次分离得到, 并显示出一定的生物活性。Savard E. 等^[12]从青霉菌 *Penicillium*

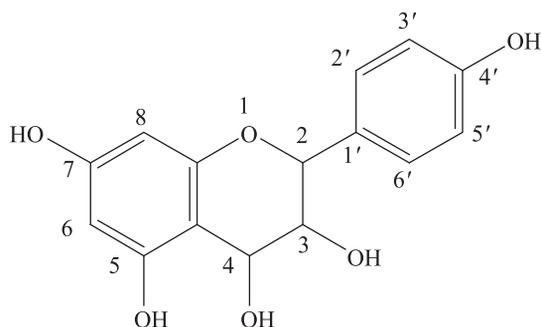


图4 化合物 G-19- II 的结构

Fig. 4 The structure of compound G-19- II

bilaii PB-50 的次级代谢产物中分离得到该化合物。EL-Naggar^[13]的研究表明链霉菌 *Streptomyces nasri submutant* H35 产生的邻苯二甲酸二丁酯具有抑菌活性。ROY 等^[14]报道了链霉菌 *S. albidoflavus* 产生的 DBP 对 G⁺细菌、G⁻细菌及单细胞和丝状真菌都有较强的抑制作用。刘伟等^[15]从一株海洋小链霉菌 DY2741 中分离出了主要抗菌物质 DBP, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有较好的抑菌效果。万伍卿等^[16]的研究表明 DBP 能抑制慢性白血病细胞系 K562 细胞增殖并诱导其凋亡。曲新颜等^[17]报道了海洋放线菌 3295 产生的邻苯二甲酸二丁酯对小鼠乳腺癌温敏型 tsFT210 细胞具有 G0/G1 期细胞周期抑制作用。

无色天竺葵素是一种无色花色素, 是花色素苷和其他类黄酮生物合成途径中的中间代谢产物^[18]。目前, 在花色素苷的抑菌性研究方面已经获得了许多研究成果。卢成瑛等^[19]研究表明槲木花红色素具有抗菌活性。王关林等^[20]报道了甘薯块根花青素对 3 种常见致病菌均有抑菌作用。杨晓玲等^[21]的研究表明, 彩叶草叶片色素对枯草芽孢杆菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌有较好的抑制作用。孙希云等^[22]研究表明, 红树莓花色苷粗提物对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌均有较好的抑制作用。本研究表明无色天竺葵素对桃根癌农杆菌有较强的抑菌作用, 但关于无色天竺葵素其他方面抑菌活性的报道尚未见到。

4 结论

本研究采用乙酸乙酯液液萃取、Sephadex LH-20 柱层析及制备高效液相色谱等技术对桃根癌拮抗放线菌 G-19 发酵液中的抑菌活性成分进行分离纯化,得到了 2 个抑菌活性化合物 G-19-I 和 G-19-II,经 LC-MS、NMR 分析,确定化合物 G-19-I 的结构为邻苯二甲酸二丁酯(DBP),化合物 G-19-II 的结构为 2-(4-羟基苯基)-3,4-二氢-2H-苯并吡喃-3,4,5,7-四醇,俗称无色天竺葵素。

参考文献

- [1] Decléene M, Deley J. The host range of crown gall[J]. Botanical Review, 1976, 42(4): 389-466.
- [2] Kerr A. Biological control of crown gall through production of agrocin 84[J]. Plant Disease, 1980, 64(1): 25-30.
- [3] Conner AJ, Dommissé EM. Monocotyledonous plants as hosts for *Agrobacterium*[J]. International Journal of Plant Sciences, 1992, 153(4): 550-555.
- [4] 马德钦, 王慧敏. 果树根癌病及其生物防治[J]. 中国果树, 1995(2): 42-44.
- [5] 王慧敏. 引进生防制剂防治我国果树根癌病[J]. 北京农业大学学报, 1991, 17(1): 91-94.
- [6] Kerr A, Panagopoulos CG. Biotypes of *Agrobacterium radiobacter* var. *tumefaciens* and their biological control[J]. Journal of Phytopathology, 1997, 90: 172-179.
- [7] 游积峰, 谢学梅, 陈培民, 等. 放射土壤杆菌防治葡萄根癌病的研究[J]. 中国果树, 1993(1): 10-12.
- [8] 王关林, 姜丹, 方宏筠, 等. 高产细菌素菌株 WJK84-1 的诱变筛选及其对植物病原菌抑菌机理的研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 23-28.
- [9] 焦秀颖, 刘志民, 马焕普, 等. 一株抗根癌菌的拮抗放线菌菌株的初步鉴定及培养条件研究[J]. 北京农学院学报, 2010, 25(1): 41-44.
- [10] 季敬霖, 刘志民, 马焕普. 桃根癌病菌拮抗放线菌抑菌活性物质的分离及其初步鉴定[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(15): 9013-9016.
- [11] 宁永成. 有机化合物结构鉴定与有机波谱学[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [12] Savard E, Blais L. Secondary metabolism of *Penicillium bilaii* strain PB-50[J]. Mycopathologia, 1994, 127(1): 19-27.
- [13] El-Naggar MM. Dibutyl phthalate and the antitumor agent F5A1, two metabolites produced by *Streptomyces nasri* submutant H35[J]. Biomedical Letters, 1997, 55: 125-131.
- [14] Roy RN, Laskar S, Sen SK. Dibutyl phthalate, the bioactive compound produced by *Streptomyces albidoflavus* 321.2[J]. Microbiological Research, 2006, 161(2): 121-126.
- [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.
- [16] 万伍卿, 刘瑛, 刘晓燕. 邻苯二甲酸正丁酯对 K562 细胞凋亡影响及其作用机制[J]. 医学临床研究, 2006, 23(8): 1221-1224.
- [17] 曲新颜, 顾谦群, 崔承彬, 等. 海洋来源的放线菌 3295 代谢产物的结构鉴定及抗肿瘤活性(I)[J]. 中国海洋药物, 2004, 23(6): 1-4.
- [18] 郭凤丹, 王效忠, 刘学英, 等. 植物花青素生物代谢调控[J]. 生命科学, 2011, 23(10): 938-944.
- [19] 卢成瑛, 唐克华, 唐慧, 等. 红檫木花红色素提取物抗菌活性研究初报[J]. 中国林副特产, 2005(3): 9-11.
- [20] 王关林, 岳静, 李洪艳, 等. 甘薯花青素的提取及其抑菌效果分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(11): 2321-2326.
- [21] 杨晓玲, 郭金耀, 黄玲. 五色彩叶草叶片色素的稳定性及抑菌性研究[J]. 食品科学, 2009, 30(19): 35-39.
- [22] 孙希云, 赵秀红, 张琦, 等. 红树莓花色苷粗提取物抗氧化性能与抑菌作用研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(3): 132-135.