

# 抗玉米病原真菌的内生放线菌 PC-F1 的分离及活性物质鉴定

李云龙

(黑龙江省农业科学院 绥化分院,黑龙江 绥化 152000)

**摘要:**放线菌是一类具有分支状菌丝形态的细胞,革兰氏呈阳性,与人类的生产、生活密切相关,被医药行业广泛应用的抗生素,其中 70% 都是从放线菌的代谢产物中获得。近年来,从新分离环境中获得稀有放线菌,并研究其活性代谢产物逐渐成为热点。本试验以从农业生境中采集的昆虫为研究对象,对其稀有放线菌进行筛选。结果表明:分离得到一株活性较好的内生放线菌 PC-F1,并对其活性成分进行鉴定,初步判断是一种巴弗洛霉素系列化合物-巴弗洛霉素 B1。

**关键词:**放线菌;活性代谢产物;巴弗洛霉素 B1

**中图分类号:**Q939.96 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)10-0064-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2016.10.0064

放线菌为一类具有分枝菌丝形态的细菌域中的重要类群,随着 16S rRNA 基因序列分析在放线菌系统进化研究<sup>[1]</sup>中的不断应用,其定义也逐渐演变为一群革兰氏阳性、细胞 DNA 的 G+C 含量高的(> 55%)细菌。放线菌与其它微生物资源相比<sup>[2]</sup>,其次生代谢产物中生物活性物质的种类较为丰富,自链霉素(*Streptomycin*)被发现已

来,目前被应用于医药行业的抗生素中 70% 是从放线菌所产生次生代谢产物中所获得,因此放线菌已然成为抗生素的主要生产者。但随着以微生物为资源的抗生素研究的不断发展,新型抗生素的开发面临着去重复难度大,开发周期长,投资巨大等问题不断浮现。此外,病原菌的抗药性不断增强,对肿瘤和艾滋病等重大疾病仍然束手无策,新抗生素药物的开发越来越困难。目前,仍有大量放线菌未被纯培养。从新分离环境中获得稀有放线菌并发现新的活性次级代谢产物<sup>[3]</sup>为解决此类问题的有效途径。从 20 世纪 50 年代以来,已

收稿日期:2016-09-21

**作者简介:**李云龙(1986-),男,黑龙江省绥棱县人,硕士,研究实习生,从事作物育种研究。E-mail:lyl\_5082@126.com。

[12] 许琰丹,孙志峰,黄照岗,等. 浙江淡竹黑腐病的室内药剂筛选及毒力测定[J]. 浙江农业科学,2008,1(2): 219-222.

[13] 陈小飞,黄敏,胡守林,等. 10 种杀菌剂及其混配剂对骏枣黑斑病室内毒力测定[J]. 中国农学通报,2013,29(4): 200-205.

[14] 崔娜,黄思良,岑贞陆,等. 杀菌剂对细交链孢菌的室内抑菌效果[J]. 广西农业科学,2006,37(4): 394-396.

[15] 付余波. 我国四省区梨主要病害的病原鉴定、分子检测与药剂筛选研究[D]. 南京:南京农业大学,2010.

## Determination of Inhibition Effect of 15 Kinds of Fungicides on *Alternaria alternata*

CHANG Hao, HAN Yu-tong, MU Ming, LI Yun-peng, ZHANG Jun-hua

(College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

**Abstract:** In order to screen out the fungicide with low toxicity and high efficient to prevent rice brown panicle disease, taking 15 fungicides as materials, and their inhibition to *A. alternata* were determined by mycelium growth rate method. Five fungicides which have the inhibitory effect on *A. alternata* were selected. Pyraclostrobin, oxime-tebuconazole and prochloraz had the obviously inhibitory effect on the mycelial growth of *A. alternata*, their  $EC_{50}$  were 0.047 5, 0.145 3 and 0.884 1  $\mu g \cdot mL^{-1}$ , respectively. Pyraclostrobin, ethylin and Polyoxin had the higher inhibitory effect on the spore germination of *A. alternata* effectively, their  $EC_{50}$  were 0.000 2, 0.000 5, 0.041 2  $\mu g \cdot mL^{-1}$ , respectively. Pyraclostrobin had inhibitory effect on the mycelial growth and spore germination of *A. alternata*.

**Keywords:** rice brown panicle disease(*Alternaria alternata*); fungicide; growth rate method; toxicity test

有些稀有放线菌的活性代谢产物被应用到临床,如庆大霉素(*Gentamicin*)、红霉素(*Erythromycin*)与安莎环类(*Ansamacrolides*)等。目前,只有不到 10% 的放线菌种类被人类认知到,开发放线菌微生物药物还有相当大的发展空间。

昆虫作为已知物种资源最为丰富的一类动物,目前已发现的昆虫种类约为 100 多万种,约为地球植物种类的 3 倍;其分布极为广泛,踪迹几乎遍布地球上的各个角落。经过漫长的进化演变,昆虫会与许多功能特殊的共生微生物形成独有的生存关系,这些共生微生物<sup>[4]</sup>在昆虫生命周期中扮演着重要角色。它们通过合成一系列特殊的代谢产物来帮助宿主昆虫完成某些特殊生理过程,如宿主昆虫对营养物质的消化及吸收;抵御宿主昆虫的致病微生物和天敌等,有研究报道发现,这些特殊代谢产物还具有其它生物活性功能,如抗肿瘤、抗病毒和抗病原菌,具有成为新型的抗生素药物并应用到现代医疗或现代农业生产的潜力。

本研究从农业生境中昆虫样本为研究对象,对其稀有放线菌进行了筛选,并分离得到一株活性较好的内生放线菌,对其进行了活性成分的初步鉴定。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

昆虫样本的采集:异色瓢虫样本均捕捉于东北农业大学园艺站附近,取样原则是选取农作物生境附近的昆虫作为内生放线菌研究的分离源。

供试真菌:玉米丝黑穗病(*Sphacelotheca reiliana*),玉米弯孢菌叶斑病(*Curvularia lunata*),玉米大斑病(*Exserohilum turcicum*),玉米小斑病(*Helminthosporium maydis*)。

主要培养基:①分离培养基,HVG、高氏一号培养基;②纯化培养基,高氏一号培养基、燕麦片培养基(ISP 3);③发酵培养基,种子培养基、发酵培养基;④生测培养基,土豆琼脂(PDA)培养基。

### 1.2 方法

1.2.1 样品采集及前处理 从东北农业大学园艺站实验田间取样,对获得的昆虫样本进行体表消毒:①灭菌水清洗昆虫体表。②70%乙醇洗涤(放入搅拌)1~2 min。③3.5%次氯酸钠浸泡 30 s。④最后用灭菌水洗涤 3 次。

1.2.2 昆虫样品的内生放线菌的分离、纯化 ①

利用灭菌解剖刀将表面消毒的昆虫样本分部解剖。②分别研磨昆虫样本的头、胸、腹。③用 500  $\mu\text{L}$  无菌水将昆虫样本的研磨液悬浮。④使用移液枪将悬浮液加入灭菌过的 1.5 mL EP 管中。⑤恒温 28  $^{\circ}\text{C}$  摇床 150  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  温养 30 min。⑥分别向含有放线菌酮(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和萘啶酮酸(20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的筛选培养基上涂布 200  $\mu\text{L}$  菌液。⑦清洗昆虫样本的无菌水作为阴性对照,涂布到相应的含有放线菌酮(50  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )和萘啶酮酸(20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的筛选培养基上。⑧恒温 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 14~21 d,将长出的放线菌菌落转接到 ISP 3 培养基上纯化并记录编号,分离平板继续培养至 28~42 d,陆续转接记录新出现的菌落。

1.2.3 抗菌生物活性检测 ①发酵液预处理:将纯培养后的内共生放线菌菌株发酵培养 7 d,通过光学显微镜观察有无污染现象,并检测其生物量,测试发酵液 pH,充分了解发酵液的相关信息。将没有被污染的发酵液 5 500  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 4  $^{\circ}\text{C}$ , 离心 10 min。弃上清,用等体积的无水甲醇加入到发酵液沉淀,震荡离心管使沉淀物均匀悬浮,放入 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱浸泡 24 h。低温离心后弃上清液, -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存备用。

②发酵液粗提物抗真菌活性检测:利用交叉法对共生放线菌的发酵液粗提物进行抑制真菌活性的检测。主要测试玉米丝黑穗病(*S. reiliana*)、玉米弯孢菌叶斑病病原菌(*C. lunata*)、玉米大斑病病原菌(*E. turcicum*)、玉米小斑病病原菌(*H. maydis*)等病原真菌,筛选出生物活性较好的共生放线菌进行活性天然产物的分离。

1.2.4 放线菌 PC-F1 活性代谢产物的分离 ①菌体的发酵:将放线菌接种至 ISP 3 斜面培养基, 28  $^{\circ}\text{C}$ , 连续培养 5 d。然后将 PC-F 接种到种子培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、250  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 连续培养 2 d。4% 的接种量将种子转接到发酵培养基中, 28  $^{\circ}\text{C}$ , 250  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 连续培养 7 d。

②放线菌 PC-F1 活性代谢产物的分离纯化:将 30 L 发酵液进行过滤,收集上清。菌体沉淀用乙醇浸泡处理,浸泡两次,每次 1 h,收集浸液。发酵上清液与 HP-20 型大孔吸附树脂均匀混合进行吸附,用无菌水将吸附树脂洗净,然后,用乙醇进行洗脱并将洗脱液收集备用。将浸泡液和洗脱液混合均匀,50  $^{\circ}\text{C}$  减压浓缩至干。

将培养上清液浓缩样上硅胶(100~200 目)柱,用石油醚/丙酮(100:0~50:50)梯度洗脱,TLC 检测(氯仿:甲醇=9:1)得到 4 个活性流份。将有活性的流份上凝胶 Sephadex LH-20,用氯仿:甲醇=1:1 进行洗脱,TLC 检测(氯仿:甲醇=9:1)得到部分活性流份。将活性流份与硅胶混合,用石油醚/丙酮(100:0~50:50)进行洗脱用将有活性的流份用半制备液相进行制备,制备比例为甲醇:水=90:10,得到相应的活性化合物。

1.2.5 活性化合物的结构鉴定 ①UV 光谱。用紫外-可见光扫描,记录波长的吸收图谱。

②IR 光谱。在干燥的玛瑙研钵中加入 2 mg 化合物,在红外灯干燥的环境下加入 KBr 约 0.5 g,碾匀,压片,用傅立叶红外光谱仪进行扫描,扫描范围 400~4 000  $\text{cm}^{-1}$ 。

③ $^{13}\text{C}$  NMR/ $^1\text{H}$  NMR 光谱。取 0.01 mg 活性化合物,溶剂为丙酮,分别做其 $^{13}\text{C}$  NMR/ $^1\text{H}$  NMR 光谱,内标为 TMS。

④LC-MS 联用。用 1 mL 丙酮 0.000 5 g 活性化合物溶解,过 0.45  $\mu\text{m}$  尼龙微孔滤膜后,进样分析。LC-MS 进样色谱质谱条件:Waters ZQ-4000/2695 LC-MS 仪;波长:254 nm;流速:1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ;进样量:20  $\mu\text{L}$ ;流动相组成: $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=80:20$ ;离子模式:ESI+3.0KV、ESI-2.8KV,离子源温度 120  $^\circ\text{C}$ ,脱溶剂温度 350  $^\circ\text{C}$ ,脱溶剂气流速 250  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$ ,质量测定范围 50~1 000  $\text{m/e}$ 。

## 2 结果与分析

从异色瓢虫样本中一共分离得到 13 株内生放线菌,经形态特征、培养特性及部分 16S rRNA 分析,初步将这 13 株菌归类为放线菌的 2 个属,

包括链霉菌属(*Streptomyces*)和小单孢菌属(*Micromonospora*)。其中菌株 PC-F1 对四株玉米病原真菌展现出一定的活性,其中对玉米大斑病原菌(*E. turcicum*)表现出较好的活性。然后将 PC-F1 进行发酵培养,其发酵上清液及菌体的甲醇浸提液对植物病原真菌表现出良好的抑制活性(见图 1 和图 2)。

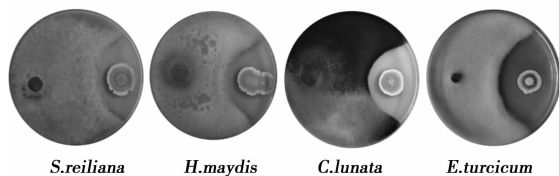
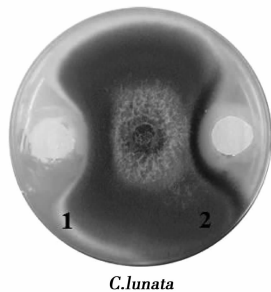


图 1 PC-F1 对植物病原真菌的抗性

Fig. 1 Antimicrobial activity against plant pathogenic fungi of strain PC-F1

对 PC-F1 的代谢产物进行分离、纯化和化学结构鉴定,经过质谱及部分核磁结果进行分析并和已知化合物数据库进行比对(见图 3、图 4 和图 5),发现菌株 C24 的发酵液中含有一种巴佛洛霉素系列化合物-巴佛洛霉素 B1(Bafilomycin B1)。



1:上清液;2:菌体甲醇浸提液  
1: Supernatant; 2: Formaldehyde leaching solution of *C. lunata*

图 2 PC-F1 发酵产物对真菌的抑制活性  
Fig. 2 Antimicrobial activity against plant pathogenic fungi of fermentation products of strain PC-F1

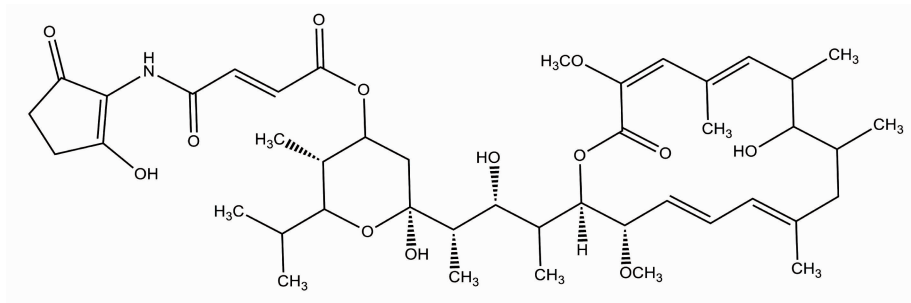


图 3 巴佛洛霉素 B1 的结构

Fig. 3 Structure of the Bafilomycin B1

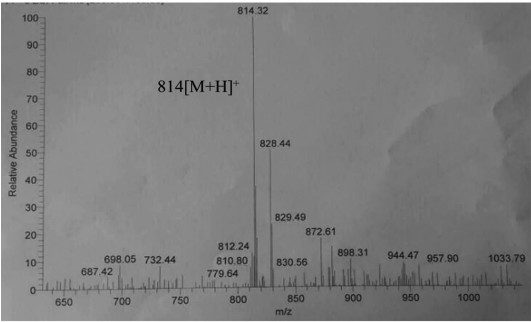


图 4 巴佛洛霉素 B1 的质谱图

Fig. 4 The ESI-MS spectrum of Bafilomycin B1

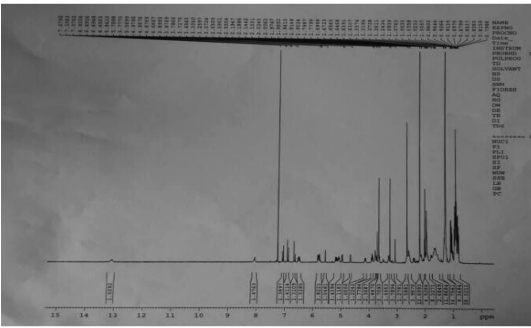


图 5 巴佛洛霉素 B1 的<sup>1</sup>H-NMR 谱图

Fig. 5 <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Bafilomycin B1

3 结论与讨论

巴佛洛霉素 B1 为 1984 年 Werner 等从 *S. griseus*(TU 1922, TU 2437, TU 2599)中分离得到的一种 16 元环的大环内酯类化合物,这种化合物表现出较强的抗真菌活性,并且为 ATPase 酶具有选择性抑制作用<sup>[5-6]</sup>。2010 年魏刚从海洋放线菌 Y12-26 中分离得到 3 种巴佛洛霉素的类似物,其中包括巴佛洛霉素 A1 和巴佛洛霉素 D,以及新化合物巴佛洛霉素 K , 这些化合物对黄瓜灰

霉病菌,黄瓜炭疽病菌和玉米小斑病菌表现出良好的抑制作用,这与本研究中分离得到的巴佛洛霉素 B1 的活性相吻合,表明巴佛洛霉素系列化合物有成为新型农药的可能。2011 年 Poulsen 等对两种泥蜂进行共生放线菌分离,在这些样本中共分离得到 200 多株链霉菌,此后又对这些共生放线菌的相关功能基因簇进行鉴定,分析得到多种活性化合物有可能存在于这些共生放线菌,这些化合物中就包含有巴佛洛霉素 B1<sup>[7]</sup>。

参考文献:

[1] 张玉便,张改云. 南大西洋深海沉积物中可培养放线菌的多样性[J]. 应用海洋学学报,2014,33(4): 509-515.

[2] 李春霞,苏俊. 黑龙江省玉米主要病害的发生因素分析及其防治对策[J]. 黑龙江农业科学,2001(6): 38-39.

[3] 魏刚. 海洋放线菌 Y12-26 活性次级代谢产物的分离纯化、结构鉴定及其菌种鉴定 [D]. 上海:华东理工大学,2010.

[4] Frändberg Emma, Petersson Carl, Lundgren L N, et al. *Streptomyces halstedii* K<sub>122</sub> produces the antifungal compounds bafilomycin B1 and C1 [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2000, 46(8): 753-758.

[5] Werner G, Hagenmaier H, Drautz H, et al. Metabolic products of microorganisms. 224. Bafilomycins, a new group of macrolide antibiotics. Production, isolation, chemical structure and biological activity [J]. Journal of Antibiotics, 1984, 37(2): 110-117.

[6] Bowman e J, Siebers A, Altendorf K. Bafilomycins: a class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cells, and plant cells [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85(21): 7972-7976.

[7] Poulsen M, OH D-C, Clardy J, et al. Chemical Analyses of Wasp-Associated *Streptomyces* Bacteria Reveal a Prolific Potential for Natural Products Discovery [J]. PLoS ONE, 2011, 6(2): e16763.

Isolation of the Endosymbiotic Actinobacteria PC-F1 and Identification Active Metabolites Against Pathogenic Fungi of Maize

LI Yun-long

(Suihua Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Suihua, Heilongjiang 152000)

**Abstract:** Actinomycetes are a class of branched hyphae cell morphology, Gram-positive. Closely related to the production of human life, antibiotics are widely used in the pharmaceutical industry, of which 70% were obtained from actinomycetes metabolites. In recent years, the new environment, access to scarce isolated actinomycetes, and to study its active metabolites become a hot spot. The test collected from agricultural habitats for the study of insects, rare screening of its actinomycetes, good activity was isolated strain within actinomycetes PC-F1, and identify its active ingredient, preliminary judgment was one kind Bafilomycin series compounds-Bafilomycin B1.

**Keywords:** actinomycetes; active metabolites; Bafilomycin B1