



## 微杆菌 Sneb159 杀线虫活性物质的分离与鉴定

赵晶<sup>1</sup>, 邢志富<sup>1</sup>, 田茂雄<sup>2</sup>, 刘晓宇<sup>3</sup>, 王媛媛<sup>2</sup>, 刘丹<sup>1</sup>, 陈立杰<sup>1</sup>, 段玉玺<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁 沈阳 110866

<sup>2</sup>沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁 沈阳 110866

<sup>3</sup>沈阳农业大学理学院, 辽宁 沈阳 110866

**摘要:** 【目的】有关 *Microbacterium maritypicum* 在植物线虫生物防治方面的研究较少, 探究菌株 *M. maritypicum* Sneb159 的杀线虫活性, 明确菌株发酵液中具有杀线虫活性的物质, 为生物农药的开发提供理论依据。【方法】本研究检测了菌株 Sneb159 发酵液对大豆胞囊线虫二龄幼虫的触杀活性; 并以触杀活性为追踪, 采用有机溶剂萃取、硅胶柱层析及半制备高效液相色谱等技术对菌株 Sneb159 发酵滤液中的活性物质进行分离纯化; 采用核磁共振波谱对纯化物进行结构鉴定。【结果】菌株 Sneb159 具有杀线虫活性, 在 24 h 和 48 h 处理组中线虫的死亡率均显著高于对照组。从菌株 Sneb159 发酵滤液中分离得到杀线虫活性物质 A6, 经结构鉴定确定该物质为苯乙酰胺。【结论】首次发现 *M. maritypicum* 对大豆胞囊线虫的触杀作用, 并且明确活性物质为苯乙酰胺。结果表明菌株 *M. maritypicum* Sneb159 和苯乙酰胺在大豆胞囊线虫的生物防治方面具有较好的应用潜力。

**关键词:** 微杆菌, 苯乙酰胺, 大豆胞囊线虫, 杀线虫活性物质, 分离纯化

大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines* Ichinohe, soybean cyst nematode) 病是大豆生产中最常见的病害之一。该病害的发病特点为分布广泛、传播途径多、为害时间长, 严重影响大豆的产量和品质, 一般造成减产 10%–20%, 严重地块高达 70%–90%, 甚至颗粒无收<sup>[1]</sup>。大豆胞囊线虫病的防治手段有种植抗病品种、农业措施、化学防治

及生物防治。种植抗病品种是经济有效且简单易行的方法, 但是长期种植单一品种可能会造成抗性丧失, 因此还需要结合农业措施使用<sup>[2]</sup>。化学防治效果明显, 但是长期使用化学农药破坏环境危害人畜健康, 因此许多化学农药已经被禁止使用<sup>[3–4]</sup>。随着人们环保意识的增强, 植物线虫的防治也要朝向低毒、低残的方向发展。生物防治绿

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201503114-12)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-24-88487180; E-mail: duanyx6407@163.com

收稿日期: 2019-12-27; 修回日期: 2020-02-21; 网络出版日期: 2020-06-16

色环保对非靶标生物安全, 已经逐渐成为现阶段的研究热点。

近年来越来越多的研究表明微生物的代谢产物对植物线虫具有防治作用。条纹炭角菌(*Xylaria grammica*) KCTC 13121BP 产生的 *grammicin* 显著抑制南方根结线虫二龄幼虫的活性<sup>[5]</sup>。谭卓等<sup>[6]</sup>研究发现, 从委内瑞拉链霉菌 *Snea253* 的发酵液中分离出来的物质邻苯二甲酸二丁酯对南方根结线虫具有触杀活性。2,4-二乙酰基间苯三酚是荧光假单胞菌产生的次生代谢产物, 研究发现该物质对马铃薯胞囊线虫和爪哇根结线虫二龄幼虫的活性均具有抑制作用<sup>[7-8]</sup>。坚强芽孢杆菌(*Bacillus firmus*) DS-1 代谢产生的丝氨酸蛋白酶 *Sep1* 可以降解线虫的肠道和表皮相关蛋白<sup>[9]</sup>。

1998 年, Takeuchi 和 Hatano<sup>[10]</sup>首次提出将 *Flavobacterium maritypicum* 更名为 *Microbacterium maritypicum*。目前, 关于微杆菌在植物病害生物防治方面的研究较少。史应武等<sup>[11]</sup>于 2013 年申请了关于应用甜菜内生的微杆菌 *M. maritypicum* TNJK2011 防控甜菜病害的发明专利, 研究发现 *M. maritypicum* TNJK2011 对立枯病、根腐病、褐斑病和蛇眼病均有显著的防治效果。我们之前的研究发现, 采用 *M. maritypicum* Sneb159 的发酵液包衣处理大豆可以显著降低大豆胞囊线虫的胞囊数量, Sneb159 通过诱导大豆产生抗病性来减少线虫的侵染, 并且可以延缓线虫的发育<sup>[12]</sup>。

本研究检测了 Sneb159 发酵液的杀线虫活性; 采用有机溶剂萃取、硅胶柱层析和半制备高效液相色谱等技术对菌株 Sneb159 发酵滤液的杀线虫活性物质进行分离纯化; 以大豆胞囊线虫二龄幼虫为指示物进行活性追踪; 利用核磁共振波谱对活性物质进行结构解析。本研究为大豆胞囊线虫

的生物防治提供了更多的资源, 为生物农药的开发应用提供了理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要仪器与试剂

SMZ800 体式显微镜(日本 Nikon 公司), 旋转蒸发仪(瑞士 Buchi 公司), 冷冻干燥机(丹麦 Gene 公司), 高速冷冻离心机(美国 Thermo 公司), Agilent 7890B 分析用高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), Waters 600 半制备高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), Bruker Avance 600 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司)。

硅胶为 200–300 目(上海五四化学试剂厂), 色谱用乙腈(天津四友精细化学品有限公司), 其他化学试剂均采购自国药集团化学试剂有限公司。

### 1.2 供试线虫和细菌菌株的培养

供试线虫为大豆胞囊线虫 3 号小种, 胞囊土样采自沈阳农业大学大豆试验田<sup>[13]</sup>。供试菌株为 *M. maritypicum* Sneb159, 由沈阳农业大学北方线虫研究所提供。

菌株 Sneb159 发酵液的制备: 将保藏于 $-80^{\circ}\text{C}$  的菌株 Sneb159 接种于 LB 固体培养基,  $30^{\circ}\text{C}$  培养 48 h 后移接到新的 LB 固体培养基上, 重复此步骤 2 次, 保证菌株充分活化。将活化后的菌株 Sneb159 接种到 LB 液体培养基中, 以 200 r/min 转速振荡培养 48 h 得到种子液, 将种子液以 1% 的接种量接种到新的 LB 液体培养基中, 培养 72 h 后使用, 准备发酵液 9 L。

### 1.3 菌株 Sneb159 发酵液杀线虫活性测试

取 300  $\mu\text{L}$  的 Sneb159 发酵液加入到 0.5 mL 的离心管中, 加入大豆胞囊线虫二龄幼虫的虫悬

液 10  $\mu\text{L}$  (30 条), 26  $^{\circ}\text{C}$  黑暗条件下培养。以无菌蒸馏水为对照组, 每个处理 3 次重复, 试验重复 3 次。培养 24 h 和 48 h 后镜检, 统计线虫的死亡数量, 计算线虫的死亡率。

死亡率(%)=[(处理前活线虫数量-处理后活线虫数量)/处理前活线虫数量] $\times 100$

#### 1.4 杀线虫活性物质有机溶剂萃取

将发酵液在 4  $^{\circ}\text{C}$ 、6000 r/min 条件下离心 10 min 去除菌丝体, 上清液为发酵滤液。将发酵滤液经过旋转蒸发浓缩至原体积的 1/3, 加入 4 倍体积的无水乙醇, 搅拌均匀后 4  $^{\circ}\text{C}$  静置 24 h。将醇沉后的上清液抽滤, 在 50  $^{\circ}\text{C}$  的条件下旋转蒸发浓缩后冷冻干燥备用。

将干燥滤液用无菌蒸馏水溶解, 分别按照 3 倍体积的石油醚、氯仿、乙酸乙酯和正丁醇的顺序萃取, 分别收集石油醚层、氯仿层、乙酸乙酯层、正丁醇层及水层。将收集的各层溶液利用旋转蒸发进行浓缩, 加入少量无菌蒸馏水溶解后分别冻干, 冻干粉末用 1% DMSO 溶解, 配制成 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的工作液。以 1% DMSO 溶液为对照, 每个处理 3 次重复, 试验重复 3 次。培养 24 h 后镜检, 统计线虫的死亡数量, 计算校正死亡率, 校正死亡率的公式参考 Schneider-Orelli 公式<sup>[14-15]</sup>。

校正死亡率(%)=[(处理组死亡率%-对照组死亡率%)/(100-对照组死亡率%)] $\times 100$

#### 1.5 杀线虫活性物质硅胶柱层析分离

对有机溶剂萃取粗提取物中乙酸乙酯层组分采用硅胶柱层析法进行初步分离。称取 200-300 目硅胶 70 g 石油醚浸泡, 充分搅拌均匀。取 1 g 粗提取物加入少量甲醇溶解, 按照 1:1.5 加入硅胶, 干法上样, 硅胶柱的尺寸为 3.0 cm $\times$ 30 cm。用 10 种不同极性的洗脱液洗脱, 分别是石油醚-乙酸乙酯(9:1,

7:3, 5:5, 3:7, 1:9)和乙酸乙酯洗脱; 然后用乙酸乙酯-甲醇(1:9, 5:5)洗脱; 最后用甲醇和甲醇-水(8:2)洗脱, 同时为了减少拖尾现象在各层洗脱液中加入 0.1% 的甲酸。每管收集 40 mL, 采用薄层层析色谱法检测每个管中洗脱液组分, 将相同的斑点合并, 浓缩干燥后进行活性测试。

将各组分以 1% DMSO 溶液溶解, 配制成 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的工作液, 以 1% DMSO 溶液为对照, 每个处理 3 次重复, 分别检测 24、48、72 h 线虫的死亡情况, 计算校正死亡率。

#### 1.6 杀线虫活性物质分离及制备

将利用硅胶柱层析分离的活性组分溶解于甲醇中, 经过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤, 利用分析型高效液相色谱分析后, 再利用半制备高效液相色谱进一步分离制备。色谱条件为 Ultimate AQ-C<sub>18</sub> (10 mm $\times$ 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ), 流动相为乙腈和水(3:7), 检测波长为 213 nm, 流速为 2 mL/min, 进样量为 0.5 mL。收集吸收峰 A6 的洗脱液, 减压旋转蒸发除去乙腈, 冷冻干燥得到活性化合物。

#### 1.7 杀线虫活性物质纯度检测

取少量 A6 样品溶解于甲醇, 通过 0.45  $\mu\text{m}$  有机滤膜过滤后经过高效液相色谱检测。色谱条件为 Ultimate AQ-C<sub>18</sub> (4.6 mm $\times$ 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ), 乙腈和水为流动相(4:6), 检测波长为 213 nm, 流速为 1 mL/min, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ 。

#### 1.8 杀线虫活性物质结构鉴定

核磁共振波谱工作条件: 样品用氘代氯仿溶解后在 Bruker Avance 600 MHz 上扫描, 测定氢谱(<sup>1</sup>H NMR)和碳谱(<sup>13</sup>C NMR), 测试温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ , 氢谱的扫场范围为 -2-16 ppm, 碳谱的扫场范围为 -20-220 ppm。

## 2 结果和分析

### 2.1 菌株 Sneb159 发酵液杀线虫活性结果

经过菌株 Sneb159 发酵液处理大豆胞囊线虫二龄幼虫 24 h 和 48 h, 线虫的死亡率分别为 87.2% 和 93.7%; 对照组中线虫的死亡率分别为 11.8% 和 13.7% (图 1)。Sneb159 处理组中的线虫死亡率显著高于对照组。

### 2.2 菌株 Sneb159 有机溶剂萃取结果

利用不同极性的有机溶剂对菌株 Sneb159 的发酵滤液进行初步分离, 比较各层组分的杀线虫活性。结果表明(图 2), 其中乙酸乙酯层组分杀线虫活性最高, 校正死亡率为 75.4%; 水层组分杀线虫活性次之, 校正死亡率为 69.3%; 正丁醇层组分的杀线虫活性最低, 校正死亡率为 49.6%。因此, 对乙酸乙酯层组分进行下一步的分离。

### 2.3 有机溶剂萃取粗提物硅胶柱层析结果

对有机溶剂萃取试验中杀线虫活性最高的乙酸乙酯层组分进行硅胶柱层析分离, 共收集

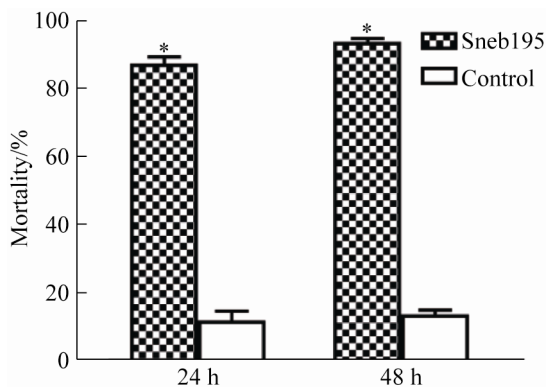


图 1. 菌株 Sneb159 发酵液对大豆胞囊线虫二龄幼虫的体外致死率

Figure 1. Nematicidal activity of Sneb159 against *Heterodera glycines* J2s in vitro. \* indicates significant differences at  $P < 0.05$  according to *t*-test.

112 管组分, 经过薄层层析检验, 合并获得 12 个组分。检测各组分在处理 24、48、72 h 的杀线虫活性, 结果表明(表 1), 其中组分 20–23 在各个时间点的杀线虫活性均为最高, 在 24、48、72 h 的

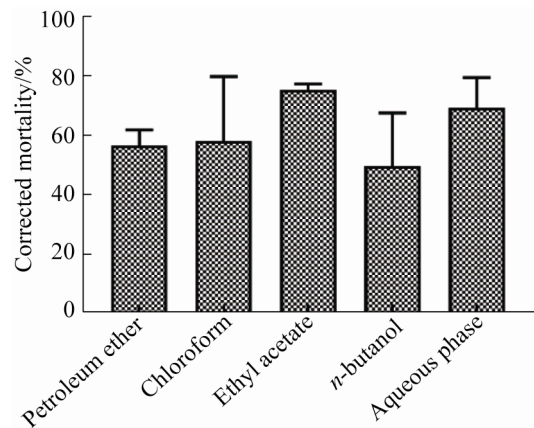


图 2. 菌株 Sneb159 有机溶剂萃取各组分对大豆胞囊线虫的致死效果

Figure 2. Nematicidal activity of the organic extraction components of strain Sneb159 against *Heterodera glycines*.

表 1. 不同组分处理大豆胞囊线虫的校正死亡率

Table 1. Corrected mortality of *Heterodera glycines* in the treatment of different components

Components	Corrected mortality of 24 h treatment/%	Corrected mortality of 48 h treatment/%	Corrected mortality of 72 h treatment/%
1–19	0.4	29.7	31.6
20–23	47.8	79.0	94.6
24–34	2.1	3.9	55.9
35–41	13.5	30.4	30.4
42–46	16.0	19.7	41.7
47–57	8.7	21.3	57.9
58–67	9.5	12.4	17.6
68–75	8.4	4.5	55.0
76–83	9.4	0.9	65.2
84–96	9.4	16.3	36.2
97–109	14.8	17.8	34.4
110–112	24.3	10.2	27.0

校正死亡率分别为 47.8%、79.0%和 94.6%。处理 72 h 线虫的校正死亡率高于 50%的组分有 24–34、47–57、68–75 和 76–83,校正死亡率分别为 55.9%、57.9%、55.0%和 65.2%。选择其中杀线虫活性最高的组分 20–23 进行下一步的分离。

## 2.4 组分 20–23 分离纯化结果

利用高效液相色谱对组分 20–23 分析,检测波长为 213 nm,洗脱液为乙腈和水。在洗脱 3–5 min 出现峰 A2 和 A4,为溶剂的吸收峰,8.22 min 开始出现单一样品吸收峰(图 3)。采用半制备高效液相色谱对该单一样品峰进行制备,合并收集管得到纯品物质 A6。利用高效液相色谱分析该物质的纯度,经检测该物质的含量为

90.27%,达到结构鉴定要求(图 4)。

## 2.5 组分 A6 化学结构鉴定

采用核磁共振波谱对 A6 进行结构鉴定,从图 5 可以看出: $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )谱图显示 7.272–7.342 ppm (5H, m, H-Ph)为苯环上的 H,说明苯环上为单取代结构;3.64 ppm (2H, s, H-2)为亚甲基质子信号。 $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )谱图显示(图 6):177.49 ppm 为羰基的特征信号;133.21、129.30、128.57 和 127.27 ppm 为一组苯环信号,进一步证明该苯环为单取代;40.97 ppm 为连有吸电子基团的亚甲基碳信号。根据核磁数据分析与宋福行等<sup>[16]</sup>的报道,鉴定该化合物为苯乙酰胺(图 7)。

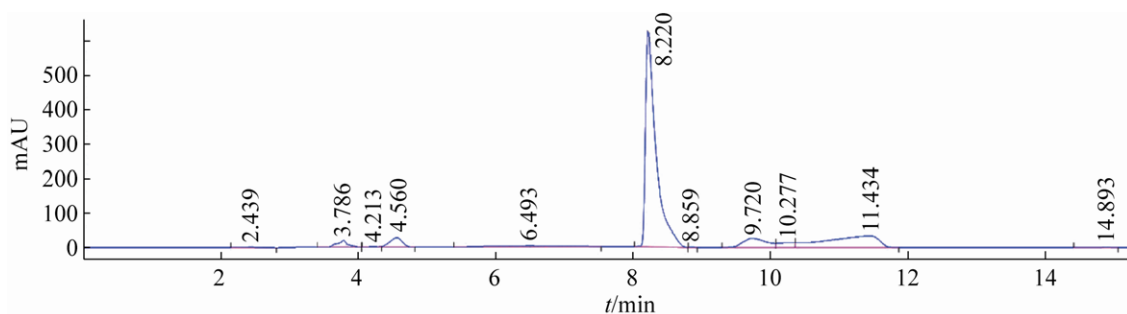


图 3. 组分 20–23 的高效液相色谱洗脱图谱

Figure 3. The HPLC elution spectrum of component 20–23.

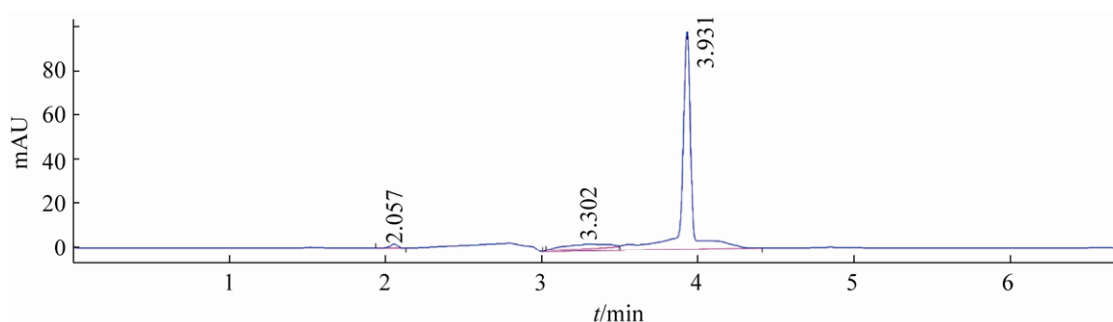


图 4. 组分 A6 的高效液相色谱纯度检验结果

Figure 4. Purity test of the compound A6 by HPLC.

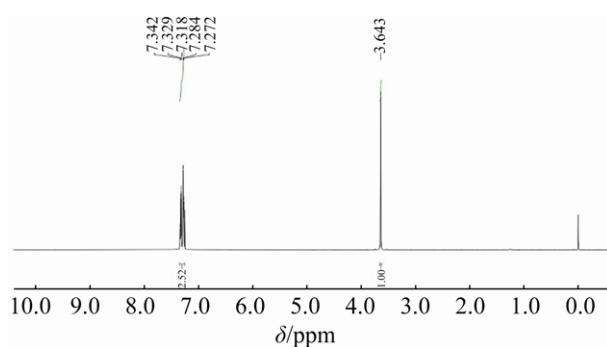


图 5. 组分 A6 的  $^1\text{H}$  NMR 谱图

Figure 5.  $^1\text{H}$  NMR spectrum of compound A6.

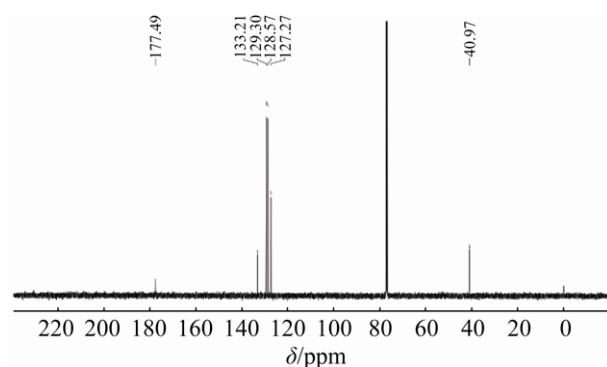


图 6. 组分 A6 的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱图

Figure 6.  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound A6.

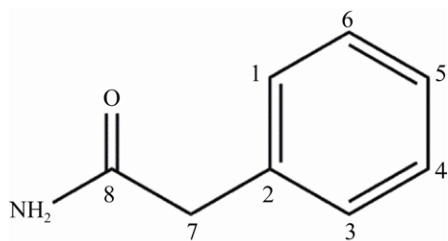


图 7. 苯乙酰胺的化学结构式

Figure 7. The chemical structural formula of phenylacetamide.

### 3 讨论

本研究发现 *M. maritypicum* Sneb159 的发酵液对大豆胞囊线虫二龄幼虫具有显著的致死作用。许多生防菌株都已经被报道具有毒杀线虫的

活性, Yang 等<sup>[17]</sup>检测了包括 *Trichoderma viride*、*T. harzinaum*、*T. hamatum* 和 *T. longbrachiatum* 等在内的 329 株木霉菌对全齿复活线虫 (*Panagrellus redivivus*) 和秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 的致死作用, 其中 15 株对全齿复活线虫具有杀线虫活性, 14 株对秀丽隐杆线虫具有杀线虫活性。用稀释 2 倍的黑曲霉菌 (*Aspergillus niger*) NBC001 和草酸青霉 (*Penicillium oxalicum*) NBC008 和 NBC012 的发酵液处理大豆胞囊线虫的二龄幼虫, 校正死亡率仍高于 85%<sup>[18]</sup>。Lu 等<sup>[19]</sup>的研究发现气生微杆菌 (*M. aerolatum*) 产生的挥发性气体对秀丽隐杆线虫和南方根结线虫均有致死作用。而关于 *M. maritypicum* 对大豆胞囊线虫的触杀作用, 本研究为首次报道。

本研究通过有机溶剂萃取、硅胶柱层析和半制备高效液相色谱等技术对 *M. maritypicum* Sneb159 发酵滤液中的杀线虫活性物质分离纯化, 得到一个活性物质苯乙酰胺。秦伟瀚等<sup>[20]</sup>从尼泊尔虫草中检测到 N,N-二乙基苯乙酰胺, 该物质是尼泊尔虫草与青海、西藏产冬虫夏草的差异成分, 可能是尼泊尔虫草的一个特异性成分。除此之外, 张应阔等<sup>[21]</sup>研究表明该物质还是驱虫剂的成分。侯宝宏<sup>[22]</sup>从解淀粉芽孢杆菌 TS-1203 中分离得到苯乙酰胺, 该物质对苹果树腐烂病菌的抑菌活性为 62.67%。关于苯乙酰胺防治植物线虫方面的研究较少, 仅有研究表明芽孢杆菌的代谢物苯乙酰胺对松材线虫和甘薯茎线虫均有触杀活性, 致死中浓度分别为 232.98  $\mu\text{g/mL}$  和 206.38  $\mu\text{g/mL}$ <sup>[23]</sup>。

## 参考文献

- [1] Wu HY, Yuan F, Chen LJ, Duan YX. Advances in soybean cyst nematode and mechanism of soybean resistance to *Heterodera glycines*. *Soybean Science*, 2001, 20(4): 285–289. (in Chinese)  
吴海燕, 远方, 陈立杰, 段玉玺. 大豆胞囊线虫病与大豆抗胞囊线虫机制的研究. *大豆科学*, 2001, 20(4): 285–289.
- [2] Yu BQ, Gao L. Occurrence and management of soybean cyst nematode. *Soybean Science & Technology*, 2012, (3): 29–33. (in Chinese)  
于宝泉, 高林. 大豆胞囊线虫病发生和防治研究进展. *大豆科技*, 2012, (3): 29–33.
- [3] Roskopf EN, Chellemi DO, Kokalis-Burelle N, Church GT. Alternatives to methyl bromide: a Florida perspective. *Plant Health Progress*, 2005, 6(1): 19.
- [4] Feng GM. Brief discussion about kinds and reasons of banned pesticides and their substitute. *Yantai Fruits*, 2007, (4): 6–7. (in Chinese)  
冯国民. 浅谈禁用农药种类、原因与替代农药品种. *烟台果树*, 2007, (4): 6–7.
- [5] Kim TY, Jang JY, Yu NH, Chi WJ, Bae CH, Yeo JH, Park AR, Hur JS, Park HW, Park JY, Park JH, Lee SK, Kim JC. Nematicidal activity of grammicin produced by *Xylaria grammica* KCTC 13121BP against *Meloidogyne incognita*. *Pest Management Science*, 2018, 74(2): 384–391.
- [6] Tan Z, Zhu F, Zhu XF, Yang CX, Wang YY, Duan YX, Liu XY, Chen LJ. Isolation, purification and structure identification of nematicidal metabolite from *Streptomyces venezuela* Snea253. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2017, 45(11): 81–84. (in Chinese)  
谭卓, 朱峰, 朱晓峰, 杨传旭, 王媛媛, 段玉玺, 刘晓宇, 陈立杰. 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. *江苏农业科学*, 2017, 45(11): 81–84.
- [7] Cronin D, Moenne-Loccoz Y, Fenton A, Dunne C, Dowling DN, O'Gara F. Role of 2, 4-diacetylphloroglucinol in the interactions of the biocontrol *Pseudomonad* strain F113 with the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(4): 1357–1361.
- [8] Siddiqui IA, Shahid Shaukat S. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2, 4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35(12): 1615–1623.
- [9] Geng C, Nie XT, Tang ZC, Zhang YY, Lin J, Sun M, Peng DH. A novel serine protease, Sep1, from *Bacillus firmus* DS-1 has nematicidal activity and degrades multiple intestinal-associated nematode proteins. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 25012.
- [10] Takeuchi M, Hatano K. Proposal of six new species in the genus *Microbacterium* and transfer of *Flavobacterium marinotypicum* ZoBell and Upham to the genus *Microbacterium* as *Microbacterium maritypicum* comb. nov.. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48(3): 973–982.
- [11] Shi YW, Yang HM, Gao Y, Zhang T, Lin Q, Chang W, Li YG, Mahemuti O, Lou K. A endophytic *Microbacterium* strain from beet and its application in the biological control of beet disease. CN: 201310660484.8. 2014-03-19. (in Chinese)  
史应武, 杨红梅, 高雁, 张涛, 林青, 常玮, 李玉国, 欧提库尔玛合木提, 娄恺. 一种甜菜内生微杆菌及其用于甜菜病害生物防治中的应用. 中国: 201310660484.8. 2014-03-19.
- [12] Zhao J, Liu D, Wang YY, Zhu XF, Xuan YH, Liu XY, Fan HY, Chen LJ, Duan YX. Biocontrol potential of *Microbacterium maritypicum* Sneb159 against *Heterodera glycines*. *Pest Management Science*, 2019, 75(12): 3381–3391.
- [13] 罗璇. 大豆胞囊线虫不同生理小种的致病性及其分子基础研究. 沈阳农业大学博士学位论文, 2011.

- [14] Ntalli NG, Ferrari F, Giannakou I, Menkissoglu-Spiroudi U. Synergistic and antagonistic interactions of terpenes against *Meloidogyne incognita* and the nematicidal activity of essential oils from seven plants indigenous to Greece. *Pest Management Science*, 2011, 67(3): 341–351.
- [15] Puntener W. Manual for field trials in plant protection. 2nd ed. Basle: Ciba-Geigy Limited, 1981.
- [16] Song FH, Fan X, Xu XL, Wang SJ, Li S, Yang YC, Shi JG. Studies on chemical constituents of the brown alga *Dictyopteris divaricata*. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2006, 31(2): 125–128. (in Chinese)  
宋福行, 范晓, 徐秀丽, 王素娟, 李帅, 杨永春, 石建功. 褐藻叉开网翼藻化学成分研究. *中国中药杂志*, 2006, 31(2): 125–128.
- [17] Yang ZS, Li GH, Zhao PJ, Zheng X, Luo SL, Li L, Niu XM, Zhang KQ. Nematicidal activity of *Trichoderma* spp. and isolation of an active compound. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(12): 2297–2302.
- [18] Jin N, Liu SM, Peng H, Huang WK, Kong LA, Wu YH, Chen YP, Ge FY, Jian H, Peng DL. Isolation and characterization of *Aspergillus niger* NBC001 underlying suppression against *Heterodera glycines*. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 591.
- [19] Lu H, Wang X, Zhang KQ, Xu YY, Zhou L, Li GH. Identification and nematicidal activity of bacteria isolated from cow dung. *Annals of Microbiology*, 2014, 64(1): 407–411.
- [20] Qin WH, Yang Y, Li Q, Wang YH, Guo YL, Hua L, Liu F. Analysis of chemical compositions from *Nepal Cordyceps* by UPLC-Q-TOF-MS. *Chinese Journal of New Drugs*, 2019, 28(13): 1574–1581. (in Chinese)  
秦伟瀚, 阳勇, 李卿, 王云红, 郭延垒, 花雷, 刘飞. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 分析尼泊尔产虫草化学成分. *中国新药杂志*, 2019, 28(13): 1574–1581.
- [21] Zhang YK, Qian WH, Wang TT, Shen JZ. Observation on prevention effect against mosquitoes of N, N-diethylphenylacetamide. *Journal of Medical Pest Control*, 2000, 16(3): 115–117. (in Chinese)  
张应阔, 钱万红, 王天桃, 沈建中. N, N-二乙基苯乙酰胺防蚊效果观察. *医学动物防制*, 2000, 16(3): 115–117.
- [22] 侯宝宏. 解淀粉芽孢杆菌 TS-1203 抑菌活性物质分析及制剂研制. 甘肃农业大学硕士学位论文, 2016.
- [23] Zeng LM, Jin H, Lu DX, Yang XY, Pan L, Cui HY, He XF, Qiu HD, Qin B. Isolation and identification of chemical constituents from the bacterium *Bacillus* sp. and their nematicidal activities. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(10): 1239–1244.



# Isolation and identification of nematicidal compound from *Microbacterium maritypicum* Sneb159

Jing Zhao<sup>1</sup>, Zhifu Xing<sup>1</sup>, Maoxiong Tian<sup>2</sup>, Xiaoyu Liu<sup>3</sup>, Yuanyuan Wang<sup>2</sup>, Dan Liu<sup>1</sup>, Lijie Chen<sup>1</sup>, Yuxi Duan<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning Province, China

<sup>2</sup> College of Biological Science and Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning Province, China

<sup>3</sup> College of Sciences, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning Province, China

**Abstract:** [Objective] Few studies have been reported about the biological control of plant parasitic nematodes by *Microbacterium maritypicum*. The purpose of this study was to determine the nematicidal activity of *M. maritypicum* Sneb159. In addition, nematicidal active compounds were separated from the culture supernatant of strain Sneb159. The study will provide fundamental knowledge about the development of biological pesticides. [Methods] We evaluated the direct antagonism to the second-stage juveniles (J2s) of *Heterodera glycines* *in vitro*. The nematicidal compound was separated and purified from culture supernatant of strain Sneb159 using organic solvent extraction, followed by silica gel chromatography and semi preparative high performance liquid chromatography according to the mortality of J2s. We characterized the compound by nuclear magnetic resonance spectrum. [Results] Strain Sneb159 showed strong nematicidal activity. The mortality of *H. glycines* J2s in Sneb159 treatment was significantly higher than that in the control after 24 h and 48 h incubation. One active compound, phenylacetamide, was obtained from culture supernatant of strain Sneb159. [Conclusion] To our knowledge, this is the first report to describe the nematicidal activity of *M. maritypicum* against *H. glycines*. The results suggested that strain Sneb159 and phenylacetamide have potential applications for biological control of *H. glycines*.

**Keywords:** *Microbacterium maritypicum*, phenylacetamide, *Heterodera glycines*, nematicidal compound, separation and purification

(本文责编: 李磊)

Supported by the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of China (201503114-12)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-24-88487180; E-mail: duanyx6407@163.com

Received: 27 December 2019; Revised: 21 February 2020; Published online: 16 June 2020