



独岛枝芽胞杆菌 MCCC 1A00493 产生的 4-乙烯基苯酚鉴定和作用南方根结线虫特性研究

黄典¹, 余豪¹, 陈稳¹, 程万里¹, 邵宗泽², 张吉斌^{1*}

1 华中农业大学生命科学技术学院, 微生物农药国家工程研究中心, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北武汉 430070

2 自然资源部第三海洋研究所, 海洋生物遗传资源重点实验室, 福建 厦门 361005

黄典, 余豪, 陈稳, 程万里, 邵宗泽, 张吉斌. 独岛枝芽胞杆菌 MCCC 1A00493 产生的 4-乙烯基苯酚鉴定和作用南方根结线虫特性研究. 微生物学报, 2022, 62(1): 346–356.

Huang Dian, Yu Hao, Chen Wen, Cheng Wanli, Shao Zongze, Zhang Jibin. Identification and characteristics of 4-vinylphenol from *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493 against *Meloidogyne incognita*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(1): 346–356.

摘要:【目的】根结线虫危害严重, 难防难控, 前期研究发现一株深海来源的独岛枝芽胞杆菌 (*Virgibacillus dokdonensis*) MCCC 1A00493 对南方根结线虫具有良好的体外拮抗效果, 本研究分离鉴定菌株发酵液中杀线虫活性物质, 对其作用线虫的多种模式进行研究, 为菌株有效控制植物病原线虫的应用奠定理论基础。【方法】采用硅胶柱层析和半制备高效液相色谱对独岛枝芽胞杆菌发酵上清液中的杀线虫活性物质进行分离纯化, 采用液相色谱质谱联用、核磁共振对纯化物进行结构鉴定; 并对其趋避、诱杀、熏杀和卵孵化抑制活性进行检测。【结果】结构鉴定确定独岛枝芽胞杆菌 MCCC 1A00493 发酵液中分离的杀线虫活性物质为 4-乙烯基苯酚。4-乙烯基苯酚对线虫具有触杀、熏杀、卵孵化抑制和高浓度驱避低浓度引诱活性, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4-乙烯基苯酚 72 h 触杀线虫校正死亡率为 71.23% \pm 9.06%; 20 mg/mL 4-乙烯基苯酚 24 h 熏杀线虫死亡率达 100%; 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 4-乙烯基苯酚作用线虫卵 10 d 后, 卵孵化抑制率达 66.2%; 在琼脂平板上, 10 mg/mL 的 4-乙烯基苯酚对线虫有驱避作用, 1 mg/mL 的 4-乙烯基苯酚对线虫有引诱作用; 在 Pluronic 凝胶中, 25 mg/mL 的 4-乙烯基苯酚驱避线虫, 5 mg/mL 和 10 mg/mL 的 4-乙烯基苯酚引诱并杀死线虫。【结论】首次报道 4-乙烯基苯酚对植物病原线虫具有多种作用模式, 尤其是高浓度下对根结线虫具有趋避作用而

基金项目: 中国大洋矿产资源研究开发协会大洋“十三五”“深海生物资源计划”(DY135-B2-17); 湖北省技术创新专项重大项目(2017ABA072)

Supported by the Project of China Ocean Mineral Resources Research and Development Association (DY135-B2-17) and by the Major Projects of Technological Innovation in Hubei Province, China (2017ABA072)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87287701; Fax: +86-27-87287254; E-mail: zhangjb@mail.hzau.edu.cn

Received: 28 April 2021; Revised: 26 July 2021; Published online: 8 November 2021

低浓度下具有诱杀作用的新特性。因此, 4-乙烯基苯酚可以作为一种潜在的生物杀线虫剂。

关键词: 南方根结线虫; 独岛枝芽胞杆菌; 4-乙烯基苯酚; 杀线虫活性; 作用模式

Identification and characteristics of 4-vinylphenol from *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493 against *Meloidogyne incognita*

HUANG Dian¹, YU Hao¹, CHEN Wen¹, CHENG Wanli¹, SHAO Zongze², ZHANG Jibin^{1*}

¹ State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, National Engineering Research Center of Microbial Pesticides, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China

² Key Laboratory of Marine Biogenetic Resources, Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, Fujian, China

Abstract: [Objective] Root-knot nematode is destructive and difficult to be controlled. *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493 is antagonistic to *Meloidogyne incognita* *in vitro*. In this study, we isolated and identified the nematicidal compound in the fermentation broth of MCCC 1A00493 and explored the modes of action, aiming at laying a theoretical foundation for the effective control of plant pathogenic nematodes. [Methods] The nematicidal compound in the supernatant of MCCC 1A00493 fermentation broth was isolated and purified by silica gel column chromatography and semi-preparative high-performance liquid chromatography, and the structure of the purified product was identified by liquid chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance. The repellent activity, trapping activity, fumigation activity, and egg hatching-inhibiting activity of the compound were tested. [Results] The compound was identified to be 4-vinylphenol, which had the contact activity, fumigation activity, egg hatching-inhibiting activity, repellent activity at high concentration, and trapping activity at low concentration against the nematodes. At 15 $\mu\text{g/mL}$, 4-vinylphenol demonstrated contact activity, as manifested by the high corrected death rate ($71.23\% \pm 9.06\%$) of *M. incognita* after 72 h. At 20 mg/mL, it showed fumigation activity and the death rate was 100% after 24 h. Inhibition rate of *M. incognita* egg hatching reached 66.2% after 10 days of exposure to 100 $\mu\text{g/mL}$ 4-vinylphenol. Nematodes were repelled by 10 mg/mL, but attracted by 1 mg/mL 4-vinylphenol on agar plates. In Pluronic gel, nematodes were repelled by 25 mg/mL, and attracted and killed by 5 and 10 mg/mL 4-vinylphenol. [Conclusion] The compound 4-vinylphenol, identified from *V. dokdonensis*, possessed multiple modes of action against *M. incognita*, especially the repellent effect at high concentration and trapping effect at low concentration. Thus, it can be used as a potential bionematicide.

Keywords: *Meloidogyne incognita*; *Virgibacillus dokdonensis*; 4-vinylphenol; nematicidal activity; mode of action

根结线虫, 如南方根结线虫(*Meloidogyne incognita*), 是世界上破坏性最大的植物寄生线虫之一, 给许多作物造成严重的产量损失^[1]。

线虫通过吸取植物的营养直接造成作物损失, 并通过抑制植物抗性和与真菌和细菌形成复合物感染间接造成作物损失^[2]。在科学和经济重

要性排名前 10 位的植物寄生线虫中,根结线虫 (*Meloidogyne spp.*)排名第一^[3]。

根结线虫生长在根际或周围土壤中,寄主范围广,存活时间长,一般药物难以直达线虫,因此很难控制。我国对农作物病原线虫的防治主要依靠化学农药,在保障农作物高产稳产中发挥了重要作用。然而,这些杀线虫剂可能对健康和环境产生潜在的负面影响^[4]。近年来,生物衍生杀线虫剂越来越受到人们的关注。许多微生物,如放线菌、苏云金芽胞杆菌和荧光假单胞菌,能够产生杀线虫的代谢物^[5-7]。然而,只有少数商业产品得到了广泛的应用。因此,寻找防治根结线虫的新活性物质具有重要意义。

枝芽胞杆菌属是由 Heyndrickx 等首次报道的^[8]。到目前为止,只有少数枝芽胞杆菌属菌株表现出生物活性。据报道,一种嗜盐细菌 *V. marismortui* M3-23 对草莓灰霉病具有抗真菌活性^[9]。从 *V. salexigens* 的培养上清中沉淀出来的产物对革兰氏阳性细菌表现出广泛的抑制作用,包括典型的食源性单核增生李斯特菌^[10]。我们以前报道过 *V. dokdonensis* 对水稻黄单胞菌的抗性^[11]。通过气相色谱质谱我们从 *V. dokdonensis* 还发现了 4 种具有杀线虫活性的挥发性有机化合物^[12]。

本研究采用硅胶柱层析和半制备高效液相色谱对独岛枝芽胞杆菌发酵上清液中的活性物质进行分离纯化,采用液相色谱质谱联用、核磁共振分析对纯化物进行结构鉴定。并对其趋避、诱杀、熏杀和卵孵化抑制活性进行检测。为菌株有效控制植物病原线虫的应用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、线虫和化合物

独岛枝芽胞杆菌(*Virgibacillus dokdonensis*)

MCCC 1A00493 由中国海洋微生物菌种保藏管理中心(MCCC)提供。*V. dokdonensis* MCCC 1A00493 发酵液如报道所述进行制备^[11],并用于随后的活性物质提取实验。南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*)由南京农业大学李红梅教授提供。在温室番茄根上进行繁殖。用解剖针将线虫卵块从感染番茄根上的根结中取出置于水中在 20 °C 孵化,直到二龄幼虫(J2)孵化。J2 用于所有杀虫活性测定。化合物 4-乙烯基苯酚首先从 *V. dokdonensis* MCCC 1A00493 中提取,然后购买商品化产品(95%,百灵威科技有限公司)用于体外研究。

1.1.2 主要仪器和试剂

SIGMA 3K15 高速冷冻离心机,OLYMPUS 倒置显微镜(Olympus, IX73),广州菲罗门科学仪器有限公司 Phenomenex Luna NH₂ 100A (5 μm, 250 mm×4.60 mm) 分析色谱柱和 Phenomenex Luna NH₂ 100A (5 μm, 250 mm×10.00 mm)半制备色谱柱,安捷伦科技中国有限公司 Agilent ODS C₁₈ (5 μm, 250 mm×10.00 mm) 半制备色谱柱,日本岛津 LC-20AT 型液相色谱仪,美国安捷伦 Agilent 6540 型液相色谱-质谱联用仪,德国布鲁克 DRX 600 核磁共振波谱仪,色谱级乙腈和甲醇采购自北京迈瑞达科技有限公司,其余化学试剂均购自国药集团。

1.2 杀线虫活性物质的分离纯化

将 MCCC 1A00493 发酵上清 14 L 用甲醇沉淀后,将上清旋蒸浓缩得到粗提液,再将粗提物分 3 次进行正相硅胶柱(柱内径 53 mm,装柱高度约 20 cm,柱体积约 440 mL,样品层高度约 3 cm,吸附样品的硅胶约 60 mL)层析分离,每次采用石油醚充分过柱活化硅胶颗粒并平衡,石油醚:乙酸乙酯(1:1) 2 L 过柱洗脱小极性杂质,乙酸乙酯:甲醇(1:1) 1.5 L 过柱洗脱含目标化合物组分和甲醇 500 mL 先后洗脱。共回收 12 组样品,其中石油醚洗脱为组分 1 (400 mL),

石油醚:乙酸乙酯(1:1)洗脱为组分 2-5 (每个组分 400 mL), 乙酸乙酯:甲醇(1:1)洗脱为组分 6-11 (每个组分 250 mL), 甲醇洗脱为组分 12 (400 mL), 回收组分经真空旋蒸浓缩, 适量水溶解, 冷冻干燥后用 5 mL 水复溶, 0.22 μm 过滤器过滤备用, 测定不同组分对秀丽隐杆线虫毒力。将上述有杀虫活性的组分每次取 2 mL 进行反向硅胶柱层析分离纯化, 用甲醇活化并平衡反向硅胶柱材料, 用 10%乙腈洗脱, 共得到 50 组样品(每管 5 mL), 分组旋蒸浓缩用 4 mL 水溶解, 取 150 μL 进行秀丽隐杆线虫生测实验, 剩余冷冻干燥后用 1.5 mL 水复溶。将反向硅胶柱层析分离纯化得到的活性组分进一步用高效液相色谱进行半制备氨基柱(250 mm \times 10 mm)分离纯化, 流动相为 80%乙腈水溶液, 色谱柱柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 流动相流速为 4.0 mL/min, 洗脱时间为 20 min, 单次进样量为 100 μL , 检测器为示差折光检测器 RID-10A。根据液相色谱图回收各峰物质, 真空旋蒸浓缩, 冷冻干燥后用水复溶进行杀虫生测实验判断活性组分。

为了得到纯的杀线虫化合物, 我们进一步采用半制备型高效液相色谱法, 在 LC-20AT 系统中使用 Agilent ODS C₁₈ (250 mm \times 10.00 mm) 柱。溶剂体系为 40%–70%梯度甲醇, 洗脱时间为 0–20 min, 洗脱速度为 4 mL/min, 紫外检测器波长为 258 nm。

1.3 杀线虫活性物质的结构鉴定

对高效液相色谱分离杀线虫活性组分所在峰回收溶液进行 Q-TOF LC/MS 鉴定, 流动相 0–2 min 5%乙腈水溶液, 2–10 min 梯度升高到 90%乙腈水溶液, 12.1 min 后恢复 5%乙腈水溶液, 流速 0.3 mL/min, 进样量 1 μL , 质谱条件如下: 双源 ESI, 干燥温度 350 $^{\circ}\text{C}$, 干燥气流 9 L/min, 喷雾器压力 40 psig。色谱柱规格 100 mm \times 2.1 mm。使用 Agilent MassHunter workstation 计算杀线虫化合物的分子量和分子式。

为了进行核磁共振分析, 将大约 10 mg 纯化的杀线虫剂样品, 溶解在 600 μL 氘代甲醇 (MeOD) 溶液中, 并转移到 5 mm 核磁共振管中。分别在 298 K 和 600 MHz 和 151 MHz 下进行 ^1H -NMR 和 ^{13}C -NMR 核磁共振分析。 ^1H 和 ^{13}C 的化学位移参考氘代甲醇残留溶剂信号(δ_{H} 3.31/ δ_{C} 49.00)。

1.4 杀线虫活性检测

收集南方根结线虫 J2 期, 清洗得到线虫悬浮液, 取待测液用 0.22 μm 过滤器过滤除菌, 在 96 孔板中加入 200 μL 终浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的待测样品, 加入 2 μL 氯霉素(30 mg/mL)和约 50 头线虫, 水做阴性对照, 阿维菌素做阳性对照, 每组 3 个重复; 置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养, 倒置显微镜下观察线虫生存和死亡情况并计数, 自由移动或通过移动身体的头部或尾巴来响应敲击 96 孔板的线虫被认为是活虫。

线虫死亡率=死亡线虫数/供试线虫总数 \times 100%

线虫校正死亡率=(处理组线虫死亡率-对照组线虫死亡率)/(1-对照组线虫死亡率) \times 100%

1.5 熏杀线虫活性检测

收集根结线虫 J2 期幼虫于离心管得到线虫悬浮液; 在 96 孔板其中一个孔中加入浓度分别为 1、5、10、20 mg/mL 样品 200 μL , 以溶剂为空白对照, 周围 4 个孔各加线虫悬浮液 100 μL (约 40 头线虫), 封口膜密封, 置于恒温培养箱; 于 6、24 h 观察线虫生存和死亡情况并计数^[12]。

1.6 线虫卵孵化抑制检测

挑取番茄根上的卵块, 收集在一起, 放入 1%次氯酸钠溶液消毒 3 min, 用无菌水洗掉次氯酸钠残留, 在水里摇晃使卵从卵块中脱落, 获得含卵悬浮液; 用无菌水冲洗, 将含卵的悬浮液分别通过筛孔尺寸依次为 200、325、500 目的筛子, 最后卵保留在 500 目的筛子上, 再次用无菌水小心冲洗筛子上的卵, 并收集;

在 96 孔板中加入线虫卵约 150 个/孔，每孔中加入 4-乙烯基苯酚溶液，使终浓度为 5、10、40、100 $\mu\text{g/mL}$ ，每组处理 3 个重复，水为对照，观察结果。

卵孵化率(%)=孵化线虫数/卵总数 \times 100%

卵孵化抑制率(%)=(对照组卵孵化率-处理组卵孵化率)/对照组卵孵化率 \times 100%

1.7 线虫趋化性检测

配制浓度 10、1 mg/mL 的 4-乙烯基苯酚，0.22 μm 细胞过滤器过滤除菌备用；取直径 9 cm 一次性细胞培养皿置于超净台上，均匀倒入约 10 mL 2% (W/V) 水琼脂培养基。室温凝结。每块琼脂趋化平板在距离平板中心 2.0 cm 的对称位置等间距作 2 个标记点，在标记点处放置直径 1.12 cm 的灭菌滤纸片，左右两边分别滴加 10 μL 4-乙烯基苯酚和 10 μL 水，将平皿平分成为 2 个区域(实验区及对照区)。另外，中心线左右 0.4 cm 范围为缓冲区；在平板中心加入约 100 头根结线虫二龄幼虫，用封口膜密封平板，置于 20 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱，遮光，8 h 后在倒置显微镜下观察并统计缓冲区两侧实验区和对照区的线虫数^[12]。

取适当数量 60 mm 平板，在其底部中央画一条等分线，在垂直距离其中点 1 cm 处，画两条平行于等分线的约 1.5 cm 的线，作为化学分配器的放置位置，并在其一端标记空白组和实验组。使用 50 mL 小烧杯量取 10 mL 23% Pluronic-127 胶，倒入平板中，加入约 3 500 条 J2 期根结线虫。将明胶和线虫混匀，放置于酒精灯旁备用。取适当数量化学分配器，将对照组和实验组物质注入其中(对照组为不添加 4-乙烯基苯酚的明胶，实验组为添加不同浓度 4-乙烯基苯酚的明胶)。将化学分配器放入平板对应的区域，待其凝固，放置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中。分别在 30 min、4 h、8 h、12 h、24 h 和

48 h，利用体式显微镜进行观察、拍照。在 48 h 时，将一次性平板放置于冰上，使凝胶溶解，取出化学分配器，用移液枪小心吸取实验组与对照组化学分配器粗端直径 1 cm 范围内的凝胶线虫混合液，分别放置于 24 孔中，加入 400 μL 清水，轻轻吹吸，混合均匀，防止其凝固；清水冲洗取出的枪头，清洗出的线虫凝胶混合液同样放置于 24 孔板中；在倒置显微镜下计数线虫总数及死亡数^[13]。

计算线虫的趋化指数(chemotaxis index, C.I.)与校正死亡率(correct mortality)。

计算公式：

$$\text{C.I.} = \frac{\text{实验区J2数量} - \text{对照区J2数量}}{\text{实验区J2数量} + \text{对照区J2数量}}$$

0 < C.I. < 1 时，说明对线虫具有一定程度的吸引作用；

-1 < C.I. < 0 时，说明对线虫具有一定程度的趋避作用；

C.I. = 0 时，说明对线虫的运动轨迹没有特异性的作用。

1.8 统计分析

数据分析采用 SPSS17.0，趋化指数采用独立样本 t 检验进行差异显著性分析。死亡率、趋化指数和孵化抑制值用平均值 \pm 标准差表示 ($n \geq 3$)。

2 结果与分析

2.1 杀线虫活性物质的分离纯化

秀丽隐杆线虫在正相硅胶柱层析乙酸乙酯：甲醇(1:1)回收组分 6-8 处理 24 h 后，即出现了大量死亡，组分 6-8 即使稀释 10 倍(取 30 μL 加 270 μL 水稀释 10 倍)分别也有高达 93.44%、88.69%、83.25%的校正死亡率，结果显示组分 6-8 具有显著的杀虫活性，可进行下一步的分离纯化。

将反相硅胶柱层析回收的 50 管 10% 乙腈水

洗脱液 1-14、15-33、34-50 分为 3 组进行旋蒸和冷冻干燥, 再进行杀虫生测实验。生测结果显示, 秀丽隐杆线虫在反相硅胶柱层析回收组分 1 和组分 2 处理 48 h 后, 出现了大量死亡, 线虫校正死亡率达到了 98.76% 和 75.78%, 而组分 3 虽然回收溶液体积最大, 但是几乎没有杀虫活性(6.21%)。混合组分 1 和组分 2, 进行下

一步的分离纯化。

对反相回收杀线虫活性组分进行半制备氨基色谱柱层析(图 1A), 按照出峰时间和峰型回收液相洗脱液, 杀线虫生测结果显示, 保留时间 3.69、4.32、4.50 min 的线虫死亡率分别为 100%、10.95% 和 4.94%, 杀线虫活性物质在半制备氨基色谱柱层析上保留时间为 3.69 min。

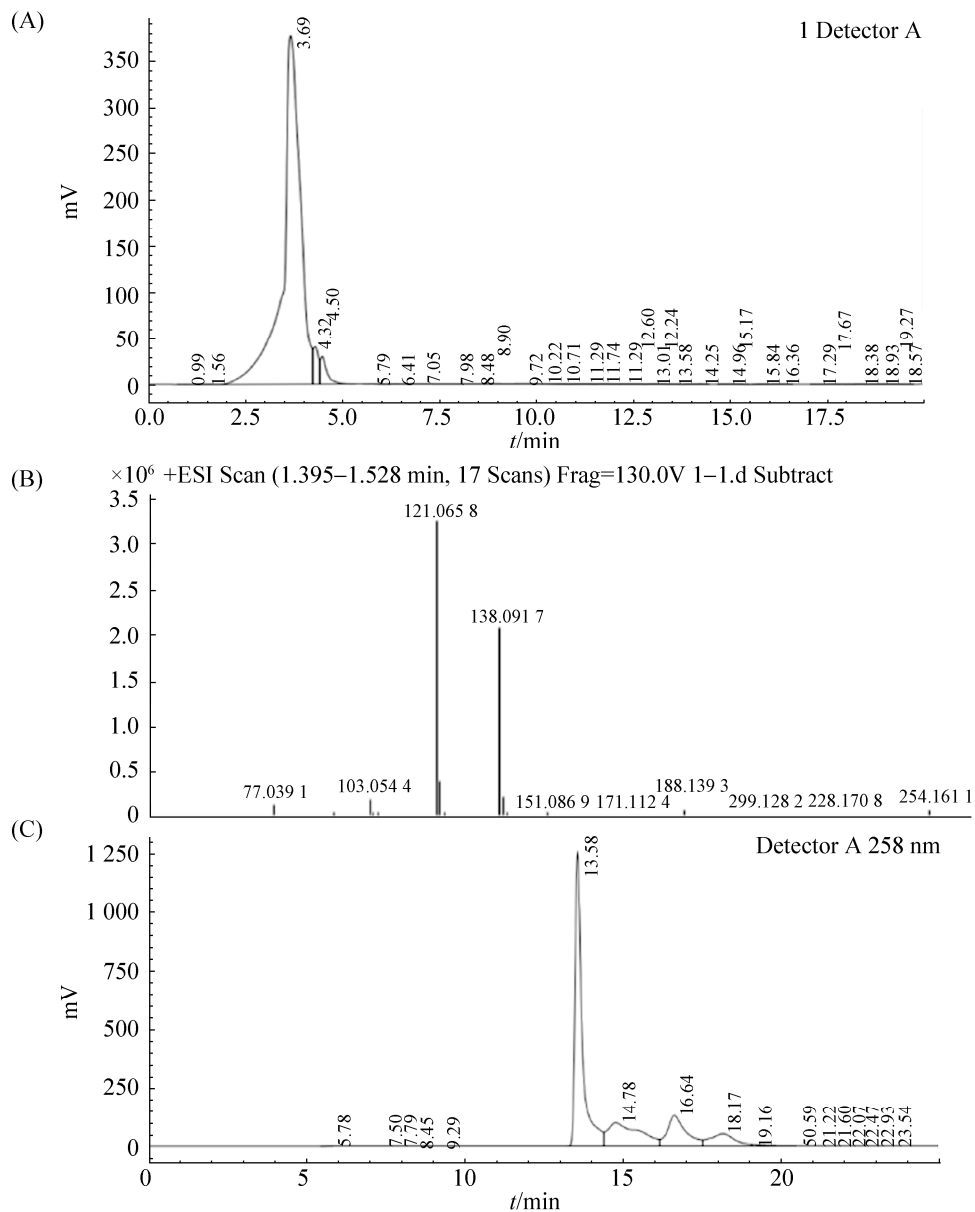


图 1 高效液相色谱图和质谱图

Figure 1 High-performance liquid chromatography and mass chromatogram. High-performance liquid chromatography of nematicidal fraction by Phenomenex Luna NH₂ column (A) and Agilent C₁₈ column (C); Mass chromatogram (B) of nematicidal fraction.

2.2 杀线虫活性物质的结构鉴定

液相-质谱联用(图 1B)分析显示杀线虫活性物质分子量可能为 121.065 8 或 138.091 7 ($[M+H]^+$)。

通过半制备 Agilent C₁₈ 柱进一步获得纯物质 15.8 mg (保留时间为 13.58 min)(图 1C), 纯化合物得率 1.13 mg/L 发酵液。通过 ¹H 和 ¹³C NMR 分析进一步阐明了 4-乙烯基苯酚的结构, ¹H 和 ¹³C NMR 谱图见图 2, 数据见表 1。4-乙烯基苯酚的化学结构如图 3 所示。

表 1 杀线虫活性物质 4-乙烯基苯酚核磁共振数据

Table 1 ¹H NMR (600 MHz) and ¹³C NMR (151 MHz) NMR data of 4-vinylphenol (CD₃OD)

Position	δ_C	δ_H (J in Hz)
1	157.02 (C)	
2	114.83 (2CH)	6.74–6.71 (m, 2H)
3	127.02 (2CH)	7.26–7.23 (m, 2H)
4	129.34 (C)	
5	136.42 (CH)	6.62 (dd, $J=17.6, 10.9$ Hz, 1H)
6	109.34 (CH ₂)	5.55 (dd, $J=17.6, 1.1$ Hz, 1H) 5.02 (dd, $J=10.9, 1.1$ Hz, 1H)

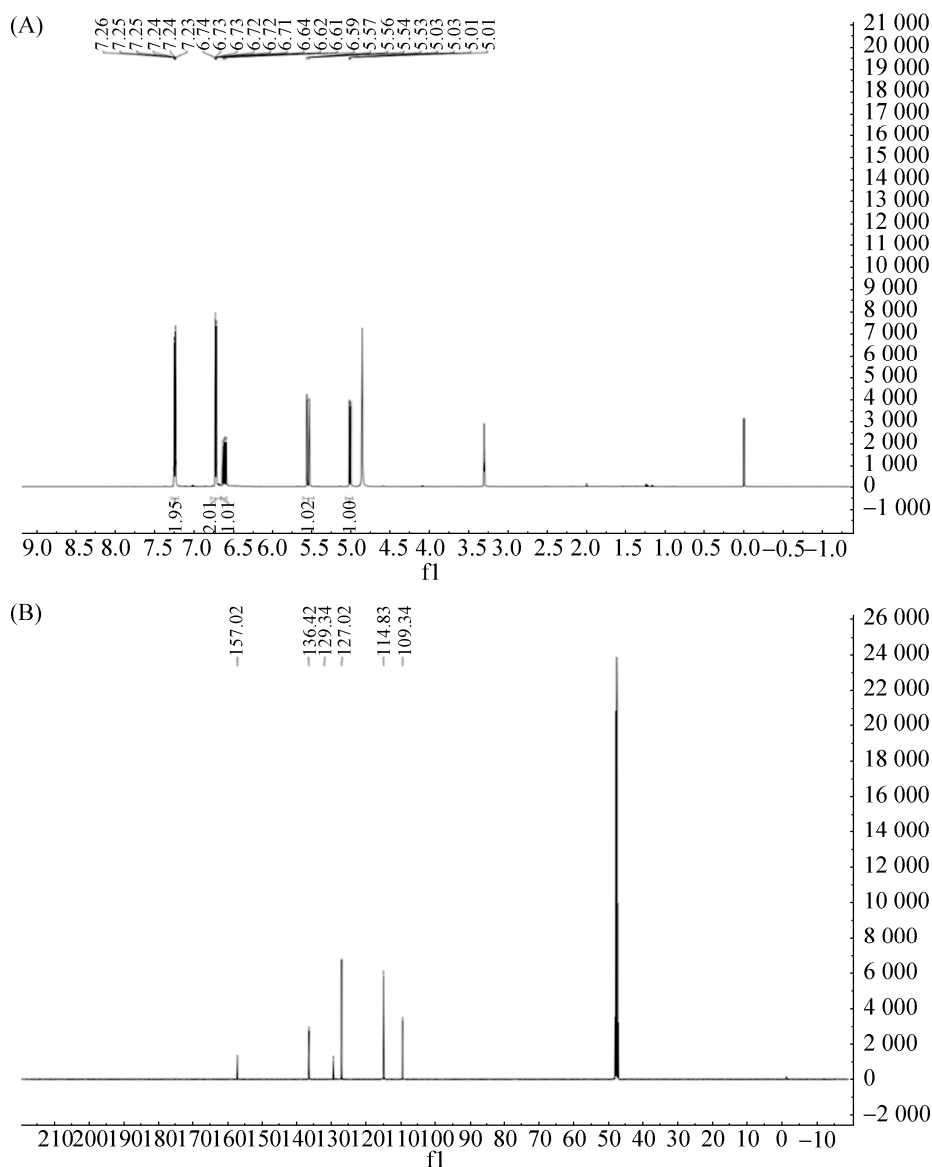


图 2 核磁共振谱图

Figure 2 NMR spectrum. 1D ¹H spectrum (A) and 1D ¹³C spectrum (B) of 4-vinylphenol.

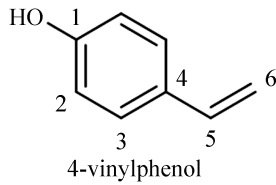


图3 4-乙烯基苯酚结构图

Figure 3 The structure of 4-vinylphenol.

2.3 4-乙烯基苯酚触杀和熏杀线虫活性

5 $\mu\text{g/mL}$ 的阿维菌素处理线虫 48 h 后, 线虫校正死亡率即达到 $96.40\% \pm 2.55\%$, 15 $\mu\text{g/mL}$ 4-乙烯基苯酚处理南方根结线虫 48 h 和 72 h, 线虫校正死亡率分别为 $48.50\% \pm 11.75\%$ 和 $71.23\% \pm 9.06\%$, 触杀活性显著低于阿维菌素。在熏蒸试验中, 10 mg/mL 及更高浓度的 4-乙烯基苯酚在 24 h 后导致 J2 几乎 100% 的死亡率(表 2)。

表 2 不同浓度 4-乙烯基苯酚熏杀根结线虫活性 (24 h)

Table 2 Fumigant activity of different concentration of compound 4-vinylphenol against *Meloidogyne incognita* at 24 h

Concentration/(mg/mL)	Mortality/%
0	0.54 ± 0.71
1	0.40 ± 0.46
5	3.21 ± 1.13
10	99.57 ± 0.86
20	100 ± 0

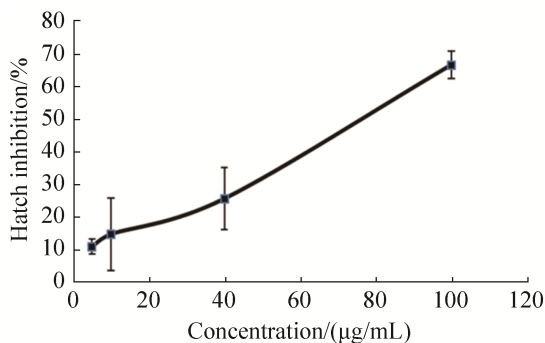


图 4 4-乙烯基苯酚对根结线虫卵孵化作用图 (10 d)

Figure 4 The inhibition effect of 4-vinylphenol on *Meloidogyne incognita* egg hatching (10 days).

2.4 4-乙烯基苯酚对根结线虫卵孵化抑制活性

根结线虫卵孵化率随着 4-乙烯基苯酚浓度的增加而显著降低。4-乙烯基苯酚浓度为 5–100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对卵孵化的抑制率为 10.7%–66.2%, 浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 的 4-乙烯基苯酚对孵化出来的幼虫致死率高达 80%–100% (图 4)。

2.5 根结线虫对 4-乙烯基苯酚趋化活性

在 2D 琼脂平板上, 4-乙烯基苯酚浓度为 0、0.1、1、10 mg/mL 时的趋化指数(CI)分别为 0.016、0.027、0.247 和 -0.257。在 4-乙烯基苯酚的最低浓度下, 处理区线虫的积累量与对照区无明显差异。然而, 在 1 mg/mL 浓度下, 处理区的线虫数量($P=0.039$)多于对照区, 在 10 mg/mL 浓度下, 对照区的线虫数量($P=0.023$)多于处理区。

在 3D PF-127 凝胶中, 线虫聚集在含有 4-乙烯基苯酚的分配器附近(图 5)。到 8 h, 线虫

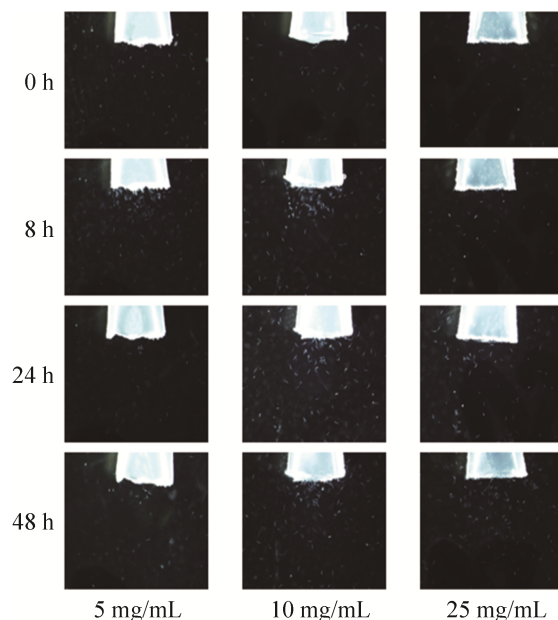


图 5 不同时间段南方根结线虫对不同浓度 4-乙烯基苯酚的趋化实验

Figure 5 Chemotaxis experiments of *Meloidogyne incognita* at different concentrations of 4-vinylphenol in different time periods.

在 5 mg/mL 和 10 mg/mL 分配器附近聚集,但在 25 mg/mL 分配器附近未观察到明显聚集;到 24 h 和 48 h,线虫在 10 mg/mL 分配器附近聚集较多,只有少量线虫在 25 mg/mL 分配器附近聚集。48 h 时,5、10、25 mg/mL 4-乙炔基苯酚的 CI 值分别为 0.35、0.48、0.45。48 h 时,5、10、25 mg/mL 分配器附近的死亡率分别为 13.7%、37.8%和 53.1%。

3 讨论

秀丽隐杆线虫是一种研究天然化合物对植物寄生线虫生物活性的模式线虫,易于在实验室培养和繁殖^[14]。因此,秀丽隐杆线虫是检验杀线虫剂对植物寄生线虫抑制作用的良好模型。本文报道了深海细菌 *Virgibacillus dokdonensis* 杀线虫活性物质的分离纯化,利用 LC-MS 和 NMR 分析鉴定培养滤液中的杀线虫成分为 4-乙炔基苯酚。4-乙炔基苯酚的化学结构与文献报道的数据一致^[15]。我们评估了 4-乙炔基苯酚对南方根结线虫的多种作用模式。在低浓度下,4-乙炔基苯酚表现出引诱和杀灭活性,在高浓度下表现出驱避活性。该化合物还具有挥发性杀线虫活性(熏蒸)和抑制卵孵化活性。在其他细菌中也发现了具有多种作用方式的培养滤液。在对多粘类芽胞杆菌的研究中,从菌株 KM2501-1 中鉴定出 11 种挥发性有机化合物^[16];其中 8 种具有接触杀线虫活性,6 种具有熏蒸活性,5 种具有趋化作用。这些挥发性有机化合物提供了一个全面的策略,包括吸引和杀死线虫(“美人计”),熏蒸和驱避模式。同样,恶臭假单胞菌培养滤液中的各种成分也显示出对 J2 和卵的杀线虫活性和熏蒸活性^[17]。然而,在这两项研究中,没有一种化合物具有 4-乙炔基苯酚那么多的作用方式。

琼脂被用作各种化合物趋化性实验的基

质,包括根系分泌物^[18]和微生物代谢物^[16-17]。3D PF-127 凝胶系统也被用于研究线虫行为和趋化性^[19-20]。PF-127 凝胶是透明的,因此便于观察线虫的运动和聚集。它还可以从凝胶中提取线虫,用于后续研究。研究结果表明,在不同的体系(2D 和 3D)中,相同的挥发性化合物在不同浓度下具有相似的趋化作用。例如,在这两种体系中,4-乙炔基苯酚在低浓度时作为引诱剂,在高浓度时作为驱避剂,但是 10 mg/mL 4-乙炔基苯酚在 2D 琼脂体系中它是驱避剂,在 3D 凝胶体系中它是引诱剂。化合物在不同基质中的不同扩散速率可能是造成这种差异的原因。挥发性物质在 2D 琼脂体系中的扩散可能是通过空气和琼脂进行的,因此 4-乙炔基苯酚在该体系中的扩散可能比通过 Pluronic 凝胶的扩散更快。趋化性实验表明 J2 在高浓度 4-乙炔基苯酚下会逃离。当施用于根系时,4-乙炔基苯酚可通过距离它们来减少 J2 对根系的渗透。即使根周围 4-乙炔基苯酚的浓度随着时间的推移而降低,低浓度的化合物对 J2 也是有吸引力和致命的。

4-乙炔基苯酚是一种常见的水果、花卉和细菌代谢物,它自然存在于咖啡、花生和野生稻等植物中。4-乙炔基苯酚作为植物的代谢物,可以直接用滴灌的方式施用。如果高浓度的 4-乙炔基苯酚对植物幼苗具有烧苗等影响,也可以根据 4-乙炔基苯酚具有挥发性的特点,在种植之前以覆膜熏蒸的方式处理田间土壤达到控制线虫的目的,同时避免对植物的不良影响。

控制卵的孵化可以有效地控制线虫的种群。例如糠醛丙酮对盆栽和田间线虫有抑制卵孵化等多种作用^[21]。本研究的缺点是,我们不能从 4-乙炔基苯酚溶液中去掉 J2 或虫卵,并将它们置于水中以确定它们是否恢复。如果在种植或移栽时将 4-乙炔基苯酚应用于根区,我们

还需要进一步研究 4-乙炔基苯酚在产卵时是否会以有效浓度存在。

总之, 我们从深海独岛枝芽胞杆菌 MCCC 1A00493 分离鉴定到杀线虫化合物 4-乙炔基苯酚。其对南方根结线虫具有多种作用模式, 包括低浓度下对 J2 的吸引和致死、高浓度下的驱避活性、熏蒸活性和卵孵化抑制。4-乙炔基苯酚在土壤中的有效性及其在不同土壤类型中的扩散和持久性有待进一步研究。

参考文献

- [1] Liu T, Meyer SLF, Chitwood DJ, Chauhan KR, Dong D, Zhang TT, Li J, Liu WC. New nematotoxic indoloditerpenoid produced by *Gymnoascus reessii* za-130. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(15): 3127–3132.
- [2] Jang JY, Dang QL, Choi YH, Choi GJ, Jang KS, Cha B, Luu NH, Kim JC. Nematicidal activities of 4-quinolone alkaloids isolated from the aerial part of *Triumfetta grandidens* against *Meloidogyne incognita*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2015, 63(1): 68–74.
- [3] Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ, Gaur HS, Helder J, Jones MGK, Kikuchi T, Manzanilla-López R, Palomares-Rius JE, Wesemael WML, Perry RN. Top 10 plant-parasitic *Nematodes* in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2013, 14(9): 946–961.
- [4] Kayani MZ, Mukhtar T, Hussain MA. Evaluation of nematicidal effects of *Cannabis sativa* L. and *Zanthoxylum alatum* Roxb. against root-knot nematodes, *Meloidogyne incognita*. *Crop Protection*, 2012, 39: 52–56.
- [5] Ma YY, Li YL, Lai HX, Guo Q, Xue QH. Effects of two strains of *Streptomyces* on root-zone microbes and nematodes for biocontrol of root-knot nematode disease in tomato. *Applied Soil Ecology*, 2017, 112: 34–41.
- [6] Jouzani GS, Valijanlian E, Sharafi R. *Bacillus thuringiensis*: a successful insecticide with new environmental features and tidings. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(7): 2691–2711.
- [7] Meyer SLF, Everts KL, Gardener BM, Masler EP, Abdelnabby HME, Skantar AM. Assessment of DAPG-producing *Pseudomonas fluorescens* for management of *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum* on watermelon. *Journal of Nematology*, 2016, 48(1): 43–53.
- [8] Heyndrickx M, Lebbe L, Kersters K, De Vos P, Forsyth G, Logan NA. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenicus* (Proom and Knight 1950). Emended description of *Virgibacillus pantothenicus*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48(1): 99–106.
- [9] Essghaier B, Fardeau ML, Cayol JL, Hajlaoui MR, Boudabous A, Jijakli H, Sadfi-Zouaoui N. Biological control of grey mould in strawberry fruits by halophilic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 2009, 106(3): 833–846.
- [10] Kobayashi T, Agustini TW, Ibrahim R, Kamei K, Kondo A, Kajiwara M, Ooka Y, Nakamura H, Terahara T, Imada C. Production of bacteriocin by *Virgibacillus salexigens* isolated from “terasi”: a traditionally fermented shrimp paste in Indonesia. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2016, 32(3): 1–9.
- [11] Huang D, Shao ZZ, Yu Y, Cai MM, Zheng LY, Li GY, Yu ZN, Yi XF, Zhang JB, Hao FH. Identification, characteristics and mechanism of 1-deoxy-*N*-acetylglucosamine from deep-sea *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493. *Marine Drugs*, 2018, 16(2): 52.
- [12] Huang D, Yu C, Shao ZZ, Cai MM, Li GY, Zheng LY, Yu ZN, Zhang JB. Identification and characterization of nematicidal volatile organic compounds from deep-sea *Virgibacillus dokdonensis* MCCC 1A00493. *Molecules*, 2020, 25(3): 744.
- [13] Cheng WL, Chen Z, Zeng L, Yang X, Huang D, Zhai YL, Cai MM, Zheng LY, Thomashow LS, Weller DM, Yu ZN, Zhang JB. Control of *Meloidogyne incognita* in three-dimensional model systems and pot experiments by the attract-and-kill effect of furfural acetone. *Plant Disease*, 2021: PDIS-07-20-1501.
- [14] Urwin P, Lilley C, Costa J. *Caenorhabditis elegans* as a model for plant-parasitic *Nematodes*. *Nematology*, 2007, 9(1): 3–16.
- [15] Yue GGL, Lee JKM, Kwok HF, Cheng L, Wong ECW,

- Jiang L, Yu H, Leung HW, Wong YL, Leung PC, Fung KP, Lau CBS. Novel PI3K/AKT targeting anti-angiogenic activities of 4-vinylphenol, a new therapeutic potential of a well-known styrene metabolite. *Scientific Reports*, 2015, 5: 11149.
- [16] Cheng WL, Yang JY, Nie QY, Huang D, Yu C, Zheng LY, Cai MM, Thomashow LS, Weller DM, Yu ZN, Zhang JB. Volatile organic compounds from *Paenibacillus polymyxa* KM2501-1 control *Meloidogyne incognita* by multiple strategies. *Scientific Reports*, 2017, 7: 16213.
- [17] Zhai YL, Shao ZZ, Cai MM, Zheng LY, Li GY, Huang D, Cheng WL, Thomashow LS, Weller DM, Yu ZN, Zhang JB. Multiple modes of nematode control by volatiles of *Pseudomonas putida* 1A00316 from Antarctic soil against *Meloidogyne incognita*. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 253.
- [18] Fleming TR, Maule AG, Fleming CC. Chemosensory responses of plant parasitic nematodes to selected phytochemicals reveal long-term habituation traits. *Journal of Nematology*, 2017, 49(4): 462–471.
- [19] Wang CL, Lower S, Williamson VM. Application of Pluronic gel to the study of root-knot nematode behaviour. *Nematology*, 2009, 11(3): 453–464.
- [20] Li CJ, Zhou XH, Lewis EE, Yu Y, Wang CL. Study on host-seeking behavior and chemotaxis of entomopathogenic nematodes using Pluronic F-127 gel. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2019, 161: 54–60.
- [21] Cheng WL, Yang X, Zeng L, Huang D, Cai MM, Zheng LY, Yu ZN, Zhang JB. Evaluation of multiple impacts of furfural acetone on nematodes *in vitro* and control efficiency against root-knot nematodes in pots and fields. *Antibiotics: Basel, Switzerland*, 2020, 9(9): E605.

(本文责编 李磊)