

植物内生放线菌 Lj20 的鉴定及其抗真菌物质的合成

马林, 陈红兵, 韩巨才*, 刘慧平

(山西农业大学农学院, 太谷 030801)

摘要:【目的】菌株 Lj20 是从辣椒植株根部分离得到的一株有抗真菌活性的植物内生放线菌。为了进一步开发利用这一放线菌, 对其进行了鉴定及抗菌活性物质的研究。【方法】根据 Lj20 的形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞壁组分和 16S rDNA 序列对其进行鉴定。结合 GC-MS 分析, 合成了代谢产物中所含的抗真菌活性物质, 并用菌丝生长抑制法测定其生物活性。【结果】Lj20 菌株属于链霉菌属, 与娄彻氏链霉菌 (*Streptomyces rochei*) 极为相似。代谢产物中含有 2, 6-二叔丁基对甲酚和 3, 5-二叔丁基-4-羟基-苯甲醚。两种化合物对番茄灰霉病菌的 EC₅₀ 值分别为 237.04 mg/L 和 186.48 mg/L。【结论】菌株 Lj20 鉴定为娄彻氏链霉菌 (*Streptomyces rochei*)。2, 6-二叔丁基对甲酚和 3, 5-二叔丁基-4-羟基-苯甲醚对番茄灰霉病菌都有较强的抑制作用。

关键词: 内生放线菌 Lj20; 鉴定; 抗真菌物质; 合成

中图分类号: Q935 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 07-0900-05

农用抗生素是微生物产生的次级代谢产物, 可用于防治农业有害生物, 是一类用途很广泛、产业化程度很高的生物农药^[1]。放线菌是产生抗生素的重要微生物资源, 在植物中也广泛存在, 并且内生放线菌很可能产生从土壤放线菌中难以发现的新型天然产物^[2-4]。我们从山西省临汾地区采集的辣椒根部分离得到植物内生放线菌 Lj20 对多种病原菌都有抑制作用^[5, 6]。因此, 本文进一步通过形态特征、培养特征、生理生化特征、细胞壁组分及 16S rDNA 序列的分析对 Lj20 菌株进行了鉴定, 由于经过层析得到的抗真菌活性物质仍为混合物, 所以根据 GC-MS 推测的结构式对其进行化学合成和抗菌活性测定, 为该放线菌的开发利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 植物内生放线菌 Lj20, 从山西省临汾地区采集的辣椒根部分离并纯化所得。

1.1.2 主要试剂和仪器: 甲醛、甲醇 (西安化学试剂厂, 分析纯); 2,6-二叔丁基苯酚 (山东科威化工有限公司); 2,6-二叔丁基对甲酚 (上海诚心化工有限公司); X-4/X-5 显微熔点测定仪 (上海广英仪器有限公司); HP6890N/5973N 色谱质谱联用仪 (美国 Agilent 公司); IR200 傅立叶变换红外光谱仪 (Thermo Nicolet 公司); AC-P200 型核磁共振仪 (德国 Bruker 公司)。

1.2 Lj20 菌株的鉴定

1.2.1 形态特征: 于高氏合成 1 号琼脂、燕麦培养基、GYM、Bennett's 琼脂和酵母淀粉琼脂上, 28 °C 培养 7~10 d, 取片, 显微镜下观察菌体的形态特征^[7]。

1.2.2 培养特征: 在上述 5 种培养基上, 28 °C 培养 7~10 d 后观察菌丝体的颜色及可溶性色素^[7]。

1.2.3 细胞壁化学组分分析: 采用 Hasegawa 薄板层析法^[8]对菌株进行全细胞水解液的氨基酸和糖型分析。

1.2.4 生理生化特征: 参照《放线菌的分类和鉴定》^[9]和《伯杰细菌鉴定手册(第八版)》^[10]的相关内容进行生理生化的鉴定。

基金项目: 山西省留学基金(200441); 山西省科技攻关项目(051045, 2007031039)

*通讯作者。Tel: +86-354-6288351; E-mail: sxndhjc@yahoo.com.cn

作者简介: 马林(1982-), 女, 山西平定人, 博士研究生, 主要从事生物农药方面的研究。E-mail: malin1590@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-01-16; 修回日期: 2008-04-17

1.2.5 16S rDNA 序列分析:用溶菌酶法从新鲜菌体提取基因组 DNA, 采用通用引物^[11]进行 16S rDNA 扩增, PCR 产物经检测、纯化后直接用 Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit 测序, 电泳及数据收集用 Applied Biosystems DNA Sequencer (model 3730) 自动进行。所测的 16S rDNA 序列经校对、拼接后与 GenBank 数据库中相关种属的序列进行 BLAST 比较, 以确定该菌株分类地位。

1.3 Lj20 代谢产物中抗真菌物质的合成

1.3.1 抗真菌物质结构测定:Lj20 菌株的发酵液经萃取、硅胶柱层析、硅胶薄层层析之后的抗真菌活性成分用气相色谱-质谱(GC-MS)联用检测所含物质的化学结构, 并用化学合成的方法合成其类似物。

GC-MS 联用条件: 柱为 Dexsil-300GC 熔融弹性石英毛细管柱 (30 m×0.25 mm×0.25 μm); 柱温: 初温 50 (2 min), 汽化室以 3 /min 称序升温至 250 (10 min); 载气: 高纯氮气; 进样方式: 分流 30 1; 进样口温度 250 ; 尾吹 0.4 kg/cm², 进样量 0.15 μL; 灵敏度 10⁻¹⁰, 配用 CDMC-IB 色谱数据处理系统进行数据处理; 离子源: EI 源 (70 eV); 倍增器电压 1900 V; GC-MS 接口温度 280 ; 扫描质量范围为 45~380 m/z, 扫描速度 1 S/DEC。用上述条件得到各化合物质谱碎片, 获得质谱数据直接由联机的 NIST98 数据系统进行检索, 然后对照 EPA/NIH/MSDS 谱库进行物质鉴定。其中化合物相对含量由峰面积归一法计算。

1.3.2 抗真菌物质的化学合成:活性成分经过 GC-MS 测定分析, 将保留时间为 8.45 min 和 10.63 min 的两种可能抗菌化合物 2,6-二叔丁基对甲酚和 3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲醚作为进一步的研究对象, 3,5-二叔丁基-4-羟基苯甲醚用以下的方法合成。

将 5.2 g 2,6-二叔丁基苯酚、37%~40%的甲醛 5 mL 和 60 mL 甲醇加到 100 mL 三口瓶中, 用氮气吹赶空气后, 缓慢滴加入 0.04 g/mL 的催化剂。通电加热反应, 66 加热搅拌回流 2.5 h, 反应结束后, 放置自然冷却, 打开三口瓶, 将反应产物进行抽滤, 得到产品, 对实验所得的产物用甲醇进行重结晶, 用显微熔点测定仪测熔

点, 用 GC-MS 分析含量, 并对合成物经核磁共振氢谱 (¹H-NMR)、红外光谱(IR)等光谱数据分析, 确定其结构。

1.3.3 生物活性测定:两种化合物、多抗霉素 (Polyoxin)、腐霉利 (Procymidone) 分别用少量甲醇溶解, 用无菌水以等比数列稀释为 5 个浓度, 将稀释液与 PDA 培养基^[12]按 1:9 混匀, 接种番茄灰霉病菌块为指示菌, 对照加入等体积的无菌水(含少量甲醇)。以多抗霉素和腐霉利为农用抗生素和化学杀菌剂对照。在 25 条件下恒温培养, 当对照快要长满全皿时, 测量菌落直径, 3 次重复, 计算毒力回归方程式、抑制中浓度 (EC₅₀) 和 95% 置信限。

2 结果

2.1 Lj20 的分类鉴定

2.1.1 形态特征:菌株 Lj20 革兰氏染色阳性; 在高氏合成 1 号和燕麦等培养基上生长 7 d, 孢子丝长, 直或柔曲; 孢子卵圆形至椭圆形, 表面光滑 (图 1)。



图 1 菌株 Lj20 的孢子丝特征(10000×)

Fig. 1 Scan electron micrograph of Lj20 showing the spore chains (10000×).

2.1.2 培养特征:菌株 Lj20 在 5 种鉴定培养基上培养, 一定时间后观察其气生菌丝、基内菌丝的生长情况以及色素的有无和颜色等内容。其中, 在除 Bennett's 琼脂的其他培养基上气生菌丝生长丰茂, 在燕麦培养基和 Bennett's 琼脂上产生可溶色素。(表 1)。

表 1 菌株 Lj20 的培养特征

Table 1 The culture characteristics of Fq24

Medium	Aerial hyphae	Substrate mycelium	Soluble pigment
Gause's No.1 agar	Gray to grayish-white, abundant	Offwhite yellow to puce	None
Oat power agar	Gray, abundant	Puce	Grayish-pink
GYM agar	Gray, grayish-white to grayish-pink, abundant	Brown	None
Bennett's agar	White, thin	Tawny	Light yellow
Yeast starch agar	Gray, abundant	Puce	None

2.1.3 生理生化特征：菌株 Lj20 能利用葡萄糖、阿拉伯糖、木糖、果糖、鼠李糖、肌醇、甘露糖和蔗糖等，但不能在菊糖和棉子糖等上生长；对明胶液化、牛奶酪化和淀粉酶等反应呈阳性；不产生类黑色素和 H₂S 等（表 2）。

表 2 菌株 Lj20 的生理生化特征
Table 2 The physiological characteristics of Lj20

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Sugar utilization		Gelatin liquefaction	+
Glucose	+	Milk solidification	-
Arabinose	+	Milk peptonization	+
Xylose	+	Starch hydrolysis	+
Fructose	+	Melanin-like substance production	-
Rhamnose	+	Tyrosinase	-
Inositol	+	H ₂ S production	-
Mannitose	+		
Sucrose	+		
Dahlin	-		
Gossypose	-		

2.1.4 细胞壁类型分析：菌株 Lj20 的全细胞水解液含有 L,L-DAP (L,L-二氨基庚二酸 Diaminopimelic acid), 且含有甘氨酸。无特征性糖；细胞壁属于 型，糖型 C。

2.1.5 16S rDNA 序列测定：菌株 Lj20 的 16S rDNA 序列与 GenBank 中相关序列 Blast 比较的结果表明，该菌株属于链霉菌属；与目前发表的相关菌株相比，菌株 Lj20 的 16S rDNA 序列(1386 bp)与娄彻氏链霉菌 (*Streptomyce rochei*) 的序列相似性很高，只有 1 个碱基差异，相似性达到 99.9% 以上。

2.2 Lj20 代谢产物中抗真菌物质的合成

2.2.1 GC-MS 分析结果：Lj20 所产活性成分经过气相色谱的结果如图 2 所示。此成分仍为混合物，含有 2 种以上物质，但是在 8.45 min 和 10.63 min 处有两个较明显的峰，其结构式经 GC-MS 分析为图 3 所示的两个酚类物质。

2.2.2 化学合成物的波谱分析：化合物为浅黄色结晶，熔点 99.5。GC-MS：(M+1)⁺=251.09，指示分子量为 250.09，分子式为 C₁₆H₂₆O₂。¹H-NMR：含有 5 种不同位移的 H，1.43926 (18 H，叔丁基上 H)，

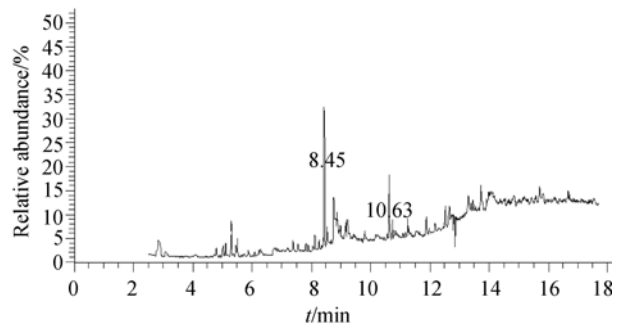


图 2 Lj20 代谢产物气相色谱图
Fig. 2 Gas chromatogram of metabolites of Lj20.

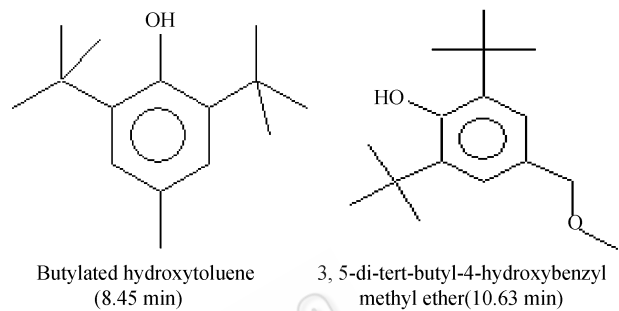


图 3 GC-MS 推测结构式
Fig. 3 Conjectured structural formulae by GC-MS.

3.40048 (3 H，醚键甲基上 H)，4.34320 (2 H，亚甲基上的 H)，5.19473 (1 H，羟基上的 H)，7.13984 (2 H，苯环上的 H)。5 种 H 面积比值为 18 2.9 1.96 0.94 2.02，其比值接近 18 3 2 1 2，¹H-NMR 谱图与 3,5-二叔丁基-4-羟基苄基甲醚结构相符。IR：3543.5 cm⁻¹、2955.4 cm⁻¹、1235.5 cm⁻¹ 是分别来源于 O-H、C-H 和酚中 C-O 伸缩振动的吸收峰，872.5 cm⁻¹、772.8 cm⁻¹ 来源于芳环中 C-H 的面外弯曲振动；1095.7 cm⁻¹ 是来源于醚键 C-O-C 的不对称伸缩振动的吸收峰，强度大。

2.2.3 生物活性测定：结果由表 3 可知：2,6-二叔丁基对甲酚和 3,5-二叔丁基-4-羟基苄基甲醚对番茄灰霉病都有一定的抑制作用，EC₅₀ 分别为 237.04 mg/L 和 186.48 mg/L。两种化合物的抗菌能力要大于农用抗生素多抗霉素，却低于化学杀菌剂腐霉利。

表 3 合成物、多抗霉素和腐霉利对番茄灰霉病菌的抑制作用
Table 3 Inhibition effects of compounds, polyoxin and procymidone against *Botrytis cinerea* Pers

Fungicides	Regression equation	EC ₅₀ /(mg/L)	95% FL/(mg/L)
Butylated hydroxytoluene	Y=2.6189+1.0026x	237.04	159.65~351.934
3,5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl methyl ether	Y=2.5200+1.0922x	186.48	123.65~281.225
Polyoxin	Y=2.4380+0.8280x	1242.22	888.58~1736.59
Procymidone	Y=3.5017+0.7142x	125.31	82.87~169.93

3 讨论

根据形态特征和细胞壁组分分析,菌株 Lj20 属于链霉菌属。其培养特征、生理生化特征和 16S rDNA 序列均与娄彻氏链霉菌 (*Streptomyces rochei*) 极为相似。故将菌株 Lj20 定名为娄彻氏链霉菌 (*Streptomyces rochei*)。

一般认为酚类物质同植物抗病性有关,对病原真菌具有抑制作用^[13],所以选择 Lj20 的代谢产物中的酚类和醚类物质为抗真菌的活性物质进行合成,试验结果也证明此类物质有抗菌活性。通过本文所述方法合成得到的 3,5-二叔丁基-4-羟基-苄基甲醚的产率可达 90%,产品用甲醇重结晶。经过 GC-MS 分析含量为 99.5%,杂质主要是未反应的原料 2,6-二叔丁基苯酚和少量溶剂,同时 GC-MS 分析结果显示,2,6-二叔丁基对甲酚和 3,5-二叔丁基-4-羟基-苄基甲醚的保留时间分别为 8.45 min 和 10.63 min,这与 Lj20 所产活性成分中的两种物质保留时间是一致的,由此可以证实所合成的物质为 Lj20 所产活性成分中所含的物质。

代谢产物有效成分的分离及结构的鉴定有助于新型农药的开发,娄彻氏链霉菌仅在医药^[14]方面的应用有所报道,代谢产物中所包含的 2,6-二叔丁基对甲酚是一种抗氧化剂,广泛用于石油化工及食品工业中^[15],在抗真菌活性方面还未查到有文献报道。3,5-二叔丁基-羟基苄基甲醚的合成未见有详细的报道^[16-18],它的抗真菌活性方面还未查到有文献报道。但是,对于 Lj20 所产抗真菌活性物质的分离提纯和结构鉴定尚待进一步研究。

致谢 本文对放线菌的分类鉴定得到中国科学院微生物研究所放线菌系统学与资源研究组黄英老师的指导,在此表示感谢!

参 考 文 献

- [1] 朱昌雄, 蒋细良, 姬军红, 等. 我国生物农药的研究进展及对未来发展建议. *现代化工(Modern Chemical Industry)*, 2003, 23(7): 1-4.
- [2] Cao L, Qiu Z, You J, *et al.* Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* strains from surface-sterilized tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots. *Letters in Applied Microbiology*, 2004, 39: 425-430.
- [3] Conn VM, Franco CMM. Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70: 1787-1794.
- [4] Igarashi Y, Miura SS, Fujita T, *et al.* Pterocidin, a cytotoxic compound from the endophytic *Streptomyces hygrosopicus*. *Journal of Antibiotics*, 2006, 59: 193-195.
- [5] 邢鲲, 韩巨才, 刘慧平, 等. 辣椒内生放线菌的分离、鉴定和拮抗作用. *安徽农业科学(Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 2005, 33(5): 777-778.
- [6] 马林, 韩巨才, 刘慧平. 植物内生放线菌 Fq24 和 Lj20 对番茄早疫病菌的抑制作用. *农药科学与管理(Pesticide Science and Administration)*, 2006, 27(5): 29-31, 35.
- [7] 中国科学院微生物研究所放线菌分类组. 链霉菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1975. 13-15.
- [8] Hasegawa T, Takizawa M, Tanida S. A rapid analysis for chemical grouping of aerobic actinomycetes. *Journal of General Applied Microbiology*, 1983, 29: 319-322.
- [9] 阎逊初. 放线菌的分类和鉴定. 北京: 科学出版社, 1992. 296-1048.
- [10] Buchanan RE, Gibbons NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 第八版. 中国科学院微生物研究所《伯杰氏细菌鉴定手册》翻译组译. 北京: 科学出版社, 1984, pp910-1227.
- [11] Dong XZ, Xin YH, Jian WY, *et al.* *Bifidobacterium Thermacidophilum* sp. Nov., isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50(1): 119-125.
- [12] 钱存柔, 黄仪秀. 微生物学实验教程. 北京: 北京大学出版社, 2000: 24-25.
- [13] Backman CH, Elgerma DM, Machardy WE. The localization of fusarial infection in vascular tissue of single-dominant-gene resistant tomatoes. *Phytopathology*, 1972, 62: 1256-1260.
- [14] 刘玉娥, 刘继兰, 曹中兴. 大环内酯类抗生菌的研究进展. *中华医院感染学杂志(Chinese Journal of Nosocomiology)*, 2003, 13(4): 395-397.
- [15] 刘杰, 刘岗. 抗氧化剂 BHT 结晶工艺研究. *中国食品添加剂(China Food Additives)*, 2005, (4): 47-48.
- [16] George NZ, Eleni AR, Antonios MG, *et al.* New analogues of butylated hydroxytoluene as anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2006, 14(16): 5616-5624.
- [17] Yoshihiro U, Akihiko H, Masaki I, *et al.* Design and synthesis of 2, 6-diprenyl-4-iodophenol TX-1952 with a novel and potent anti-peroxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2002, 132: 41-45.
- [18] 姜爱莉, 孙丽芹, 翁新楚. 特丁基对苯二酚衍生物的抗氧化性能的研究. *中国粮油学报(Journal of the Chinese Cereals and Oils Association)*, 2002, 17(4): 52-54.

Identification of endophytic actinomycete Lj20 from plant and its antifungal substances

Lin Ma, Hongbing Chen, Jucai Han^{*}, Huiping Liu

(College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: [Objective] Endophytic actinomycete Lj20 with antifungal activity was isolated from the roots of capsicum plants. We identified Lj20 and synthesized its antifungal substances. [Methods] Morphological, biological and biochemical characteristics, chemotaxonomy analysis and 16S rDNA sequences were used to identify Lj20. According to GC-MS extrapolation result, one of antifungal substances in the metabolites of Lj20 was chemically synthesized. The bioactivities were determined by mycelium growth inhibition method. [Results] Lj20 belonged to *Streptomyces* sp. and was similar to *Streptomyces rochei*. The metabolites contained butylated hydroxytoluene and 3, 5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl methyl ether. The median effective concentration (EC₅₀) of these two compounds to *Botrytis cinerea* Pers. were 237.04 mg/L of the water and 186.48 mg/L of the water, respectively. [Conclusion] Lj20 was classified as *Streptomyces rochei*. Butylated hydroxytoluene and 3, 5-di-tert-butyl-4-hydroxybenzyl methyl ether had significant inhibition to the pathogen.

Keywords: endophytic actinomycete Lj20; identification; antifungal substance; synthesis

Supported by the Shanxi Studying Abroad Foundation(200441) and the Shanxi National Programs for Science and Technology Development (051045, 2007031039)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-354-6288351; E-mail: sxndhjc@yahoo.com.cn

Received: 16 January 2008/ Revised: 13 April 2008

答 作 者 问

问：在学术会议上发表过的论文能否在《微生物学报》上发表？

答：这要分两种情况。(1)如果论文集属于正式出版物，有正式书号或刊号，则不能再在本刊发表；(2)如果不是正式出版物，属于交流材料，则论文可以投稿本刊。

问：投稿时都需要哪些材料，是否还需要纸稿？

答：从2006年起，本刊开始采用“稿件远程处理系统”。投稿时需要提供：(1)论文研究内容所属单位的介绍信(通常是第一单位)，介绍信模板可从本刊主页“下载专区”或“远程投稿时”下载。(2)在接到本刊E-mail发出的“收稿通知”后，需要及时补寄纸样的1份稿件和介绍信，并缴纳100元稿件受理费(请通过邮局汇款，切忌夹在信中邮寄)。