

· 研究简报 ·

一株虫生真菌杀线虫活性代谢产物的 分离与结构鉴定

张永刚, 袁文鹏, 夏雪奎, 刘新, 孟秀梅,
王小军, 张绵松, 刘昌衡*

(山东省科学院 中日友好生物技术研究中心, 山东省应用微生物重点实验室, 济南 250014)

摘要:以生物活性为导向,利用硅胶、凝胶柱层析法以及高效液相色谱等技术对一株虫生真菌拟青霉菌 *Paecilomyces* sp. 的活性次生代谢产物进行了研究。从其活性组份中共分离得到 2 个杀线虫活性次生代谢产物,经质谱和核磁共振等波谱分析方法鉴定其结构分别为脑苷酯类化合物 Cerebroside A(1)和 Cerebroside B(2)。活性测定结果显示,这 2 个化合物均具有杀松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 活性,其中化合物 1 在质量浓度分别为 1 000,100 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下对松材线虫的致死率分别为 100%,100% 和 11.1%。

关键词:虫生真菌;拟青霉菌;杀线虫活性;结构鉴定

DOI:10.3969/j.issn.1008-7303.2010.02.19

中图分类号:S482.39

文献标志码:A

文章编号:1008-7303(2010)02-0225-04

Isolation and identification of the nematicidal secondary metabolites from one strain of entomogenous fungi

ZHANG Yong-gang, YUAN Wen-peng, XIA Xue-kui, LIU Xin,
MENG Xiu-mei, WANG Xiao-jun, ZHANG Mian-song, LIU Chang-heng*

(Biotechnology Center of Shandong Academy of Sciences,

Key Laboratory for Applied Microbiology of Shandong Province, Ji'nan 250014, China)

Abstract: By application of different separation techniques, such as silica gel, Sephadex LH-20 column chromatography, and reversed-phase high performance liquid chromatography, two nematicidal secondary metabolites were isolated from the fermentation broth of one strain of entomogenous fungi *Paecilomyces* sp. The structures of these compounds were elucidated as Cerebroside A (1) and Cerebroside B (2) primarily by analysis of their NMR spectroscopic data. Bioassay tests showed that the two compounds had moderate nematicidal activities against *Bursaphelenchus xylophilus*, the average mortality of *B. xylophilus* caused by compound 1 at the mass concentrations of 1 000, 100 and 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ were 100%, 100% and 11.1%, respectively.

Key words: entomogenous fungi; *Paecilomyces* sp.; nematicidal activity; structure elucidation

收稿日期:2010-02-03;修回日期:2010-03-31.

作者简介:张永刚(1982-),男,山东临沂人,助理研究员,主要从事天然产物化学研究, E-mail: zhangygcq@yahoo.cn; * 通讯作者(Author for correspondence):刘昌衡(1962-),男,山东威海人,副研究员,研究方向为天然产物化学,电话:0531-82605355, E-mail: liuchh@keylab.net
基金项目:国家重点基础研究发展规划(“973”计划)资助项目(2004CB719601);山东省科学院博士基金项目(ZBS2010Y).

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 原产北美,目前是我国重要的外来入侵种 (alien invasive species),由它引起的松材线虫病又称松树萎蔫病,对我国森林已构成严重威胁。松材线虫病被称为松树的癌症,是松树的一种毁灭性病虫害,通常感病后 40 d 左右即可造成松树枯死,3~5 a 可摧毁成片松林,被列为重要的危害性森林病害^[1]。

目前国内外对松材线虫尚无很好的防治药剂,一些对植物寄生根结线虫和胞囊线虫有效的生物制剂,对松材线虫则无活性。因此寻找对松材线虫有效的药剂已迫在眉睫。通过对微生物次生代谢产物的高通量筛选,笔者发现了一些具有生物活性的新化合物^[2-4],其中一株拟青霉菌 *Paecilomyces* sp. 的固体发酵粗提物具有明显的杀松材线虫活性,通过活性跟踪,进一步分离纯化,得到了具有杀松材线虫活性的 2 个化合物 Cerebroside A 和 Cerebroside B。现将研究结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器及试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪;RP-C₁₈ 色谱柱:半制备柱,4.6 mm × 150 mm (Agilent);柱层析硅胶 [300 目 (48 μm)] (青岛海洋化工有限公司);Sephadex LH-20 (美国 Fluka 公司);乙酸乙酯等试剂均为国产分析纯。

1.2 菌种

真菌 *Paecilomyces* sp. 采自西藏林芝 (FS2-2C2B) 由中国科学院微生物研究所中国普通微生物保藏中心鉴定并保藏 (AS6.34)。

1.3 实验方法

1.3.1 菌株发酵及粗提物制备 取在 PDA 平板上生长 5 d 的真菌拟青霉菌 *Paecilomyces* sp. 的菌丝,用无菌水配制成每 1 mL 含 1×10^4 个孢子的菌悬液。取 500 mL 三角瓶 12 个,分别放入 80 g 大米及 120 mL 蒸馏水,封口并浸泡过夜,121 °C 下灭菌 30 min。冷却后向每瓶中加入 10 mL 上述菌悬液 (共 12 瓶),并在 25 °C 下发酵培养 40 d。发酵结束后,将大米和菌体进行机械粉碎,并向每个三角瓶中加入 300 mL 乙酸乙酯,浸泡 24 h 后提取,重复提取 3 次,合并提取液减压脱溶,得到褐色油状粗提物 3.5 g。

1.3.2 次生代谢产物的分离 将粗提物用硅胶拌样后上柱,以石油醚-乙酸乙酯-甲醇体系为洗脱剂进行梯度减压洗脱,洗脱液经过薄层层析 (TLC) 和

高效液相色谱 (HPLC) 分析,合并相同组份,共得到 10 个组份。对松材线虫的杀虫活性测试结果显示,由乙酸乙酯-甲醇 = 100:5 (体积比) 洗脱出的馏分 (100 mg) 具有较好的活性,故对该馏分进行了深入的分离纯化。首先用 Sephadex LH-20 进行柱层析分离 (甲醇洗脱),得到一个活性组份 (42 mg),继续用半制备液相色谱 (Kramosil C₁₈ 柱, 10 μm, 10 mm × 250 mm; 90% 甲醇洗脱 5 min, 90%~100% 甲醇梯度洗脱 5 min, 100% 甲醇洗脱 40 min; 流速 2 mL/min) 对其进行分离纯化,得到两个脑苷酯类化合物 Cerebrosides A (1, 4.5 mg, t_R 25.5 min) 和 Cerebrosides B (2, 5.0 mg, t_R 27.8 min)。

1.3.3 杀线虫活性测试 采用液体浸泡法^[5]。将 2 mg 待测化合物溶于 100 μL 丙酮中,用纯水将其稀释成质量浓度分别为 2 000, 200 和 20 μg/mL 的药液,供试。

在 PDA 平皿培养基上接种灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea*,并在 25 °C 下培养 4~5 d,待菌落基本长满平皿时,接种松材线虫 *B. xylophilus*,于 25 °C 下培养 7 d;待线虫将菌落吃完后用贝曼浅盘法收集线虫 (即将培养好线虫的 PDA 培养基用解剖刀切成块,放入 8 层纱布中,将纱布包好,放入带胶管的直径为 20 cm 的漏斗中,加入无菌水,静置后收集);将收集到的线虫液离心去除上清液,在显微镜下用无菌纯水将线虫液调整到合适的浓度,立即使用。

取 100 μL 待测化合物溶液 (质量浓度分别为 2 000, 200 和 20 μg/mL) 加入到 24 孔板中,加入 100 μL 松材线虫 (30~50 条) 悬液,使供试化合物的最终质量浓度分别为 1 000, 100 和 10 μg/mL。待混和均匀后,于 25 °C 黑暗条件下培养 24 h,在倒置显微镜下计数活、死线虫数目,按 (1) 和 (2) 式计算死亡率。以质量分数为 5% 的丙酮水溶液作对照。实验重复 3 次,取平均值得到平均死亡率。

$$\text{线虫死亡率}/\% = (\text{死线虫数}/\text{总线虫数}) \times 100 \quad (1)$$

$$\text{校正死亡率}/\% = [(\text{处理死亡率} - \text{对照死亡率}) / (1 - \text{对照死亡率})] \times 100 \quad (2)$$

2 结果与分析

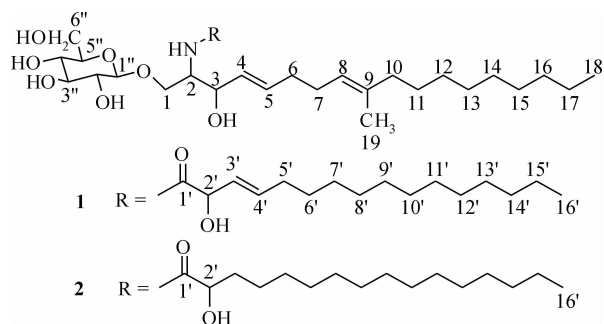
2.1 化合物的结构鉴定

化合物 1: 白色蜡状固体。ESI-MS (pos.), m/z : 748.4 [M + Na]⁺, ESI-MS (neg.), m/z : 724.4 [M - H]⁻, 表明其相对分子质量为 725。NMR 数据见表 1。¹³C NMR: δ 175.5 (CONH) 和 δ 54.6

(CHNH)显示有一个酰胺键;¹H NMR 和 ¹³C NMR 信号提示有一个 β -D-葡萄糖。¹H NMR 信号 δ 0.90 (t,6H, J =6.4 Hz, $2 \times \text{CH}_3$) 显示有长脂肪链存在,推测该化合物为脑苷酯类化合物。¹H NMR 信号 δ 5.46 (dd 15,7.3),5.73 (dt 15,6.1),5.50 (dd 14,6.1),5.84 (dt 14,7.2),5.14 (m) 和 ¹³C NMR 信号 δ 131.0,134.6,124.9,136.8,129.0,134.8 显示有 3 个双键。其 NMR 数据与文献报道的 Cerebroside A 完全一致,并且通过二维核磁数据 HMBC 和 ¹H-¹H COSY 进一步确证了该化合物的结构,由此推断化合物 **1** 为脑苷酯类化合物 Cerebroside A^[6]。IR (Neat), $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3 279 (br),2 955,2 921,2 851,1 640,1 534,1 467,1 084。结构式见 Scheme 1。

化合物 **2**: 白色蜡状固体。ESI-MS (pos.), m/z :750.4 [M + Na]⁺, ESI-MS (neg.), m/z :726.4 [M - H]⁻, 表明其相对分子质量为 727。NMR 数据见表 1。¹³C NMR 中 δ 177.2 (CONH) 和 δ 54.6 (CHNH) 显示有一个酰胺键;¹H NMR 和 ¹³C NMR 信号提示有一个 β -D-葡萄糖。¹H NMR 信号 δ 0.90

(t,6H, J =6.4 Hz, $2 \times \text{CH}_3$) 显示有长脂肪链存在。综合以上分析,并且与化合物 **1** 的核磁数据对照,推断该化合物也为脑苷酯类化合物。¹H NMR 信号 δ 5.49 (dd 15,7.4),5.74 (dt 15,6.1),5.15 (m) 和 ¹³C NMR 信号 δ 131.1,134.7,124.8,136.8 显示化合物 **2** 有两个双键。化合物 **2** 的 NMR 数据与文献报道的 Cerebroside B 完全一致,由此推断化合物 **2** 为 Cerebroside B^[6]。IR (Neat), $\nu_{\text{max}}/\text{cm}^{-1}$: 3 285 (br),2 955,2 920,2 851,1 650,1 542,1 467,1 079。结构式见 Scheme 1。



Scheme 1

表 1 化合物 **1** 和 **2** 的核磁共振氢谱和碳谱数据Table 1 ¹H NMR 和 ¹³C NMR data of compound **1** and **2**

位置 Position	1		2	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., J_{HH}) (500 MHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (150 MHz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., J_{HH}) (500 MHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (150 MHz)
1 α	4.15, dd (10,5.2)	69.7, CH ₂	4.14, dd (10,5.2)	69.7, CH ₂
1 β	3.71, dd (10,3.4)		3.72, dd (10,3.4)	
2	3.96 ~ 3.99, m	54.6, CH	3.99, m	54.6, CH
3	4.11, dd (11,7.6)	72.9, CH	4.12, dd (11,7.6)	72.9, CH
4	5.46, dd (15,7.3)	131.0, CH	5.49, dd (15,7.4)	131.1, CH
5	5.73, dt (15,6.1)	134.6, CH	5.74, dt (15,6.1)	134.7, CH
6	2.02 ~ 2.06, m	33.0, CH ₂	2.05 ~ 2.09, m	33.1, CH ₂
7	2.02 ~ 2.06, m	29.1, CH ₂	2.05 ~ 2.09, m	29.1, CH ₂
8	5.13 ~ 5.15, m	124.9, CH	5.13 ~ 5.15, m	124.8, CH
9		136.8, qC		136.8, qC
10	1.98, t (7.5)	40.8, CH ₂	1.98, t (7.3)	40.8, CH ₂
11	2.02 ~ 2.06, m	33.8, CH ₂	2.05 ~ 2.09, m	33.8, CH ₂
12 ~ 16	1.29, br s	30.2 ~ 30.8, CH ₂	1.29, br s	30.4 ~ 30.8, CH ₂
17	1.27 ~ 1.31, m	23.7, CH ₂	1.27 ~ 1.31, m	23.8, CH ₂
18	0.90, t (6.4)	14.3, CH ₃	0.90, t (6.4)	14.5, CH ₃
19	1.60, s	16.2, CH ₃	1.60, s	16.2, CH ₃
1'		175.5, qC		177.2, qC
2'	4.44, d (6.0)	74.1, CH ₂	3.98 ~ 4.00, m	73.1, CH ₂
3'	5.50, dd (14,6.1)	129.0, CH	1.68 ~ 1.73, m	35.9, CH ₂
4'	5.84, dt (14,7.2)	134.8, CH	1.55 ~ 1.59, m	29.1, CH ₂
5'	2.02 ~ 2.06, m	33.1, CH ₂	1.38 ~ 1.41, m	30.4, CH ₂
6' ~ 14'	1.29, br s	30.2 ~ 30.8, CH ₂	1.29, br s	30.2 ~ 30.8, CH ₂
15'	1.27 ~ 1.31, m	23.7, CH ₂	1.27 ~ 1.31, m	23.7, CH ₂
16'	0.90, t (6.4)	14.5, CH ₃	0.90, t (6.4)	14.5, CH ₃
1''	4.27, d (7.8)	104.7, CH	4.27, d (7.8)	104.7, CH
2''	3.20, t (8.0)	75.0, CH	3.20, t (8.0)	75.0, CH

续表(Continued)

位置 Position	1		2	
	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., J_{HH}) (500 MHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (150 MHz)	$\delta_{\text{H}}^{\text{a}}$ (mult., J_{HH}) (500 MHz)	$\delta_{\text{C}}^{\text{b}}$ (150 MHz)
3"	3.34 ~ 3.36, m	77.9, CH	3.34 ~ 3.36, m	77.9, CH
4"	3.27 ~ 3.31, m	71.7, CH	3.27 ~ 3.31, m	71.6, CH
5"	3.27 ~ 3.31, m	78.0, CH	3.27 ~ 3.31, m	78.0, CH
6"	3.87, d (12)	62.7, CH ₂	3.87, d (12)	62.7, CH ₂
	3.67, dd (12, 4.4)		3.67, dd (12, 4.0)	

2.2 杀线虫活性

测试结果见表 2。在 1 000, 100 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下, 化合物 1 对松材线虫的致死率分别为 100%, 100% 和 11.1%, 化合物 2 的致死率分别为 90.48%, 11.48% 和 1.66%。可以看出, 由菌株发酵液乙酸乙酯粗提物中分离得到的两个活性化合物, 其中化合物 1 为主要杀虫活性成分。

表 2 化合物 1 和 2 的杀线虫活性

Table 2 Nematicidal activity of compound 1 and 2 against *Bursaphelenchus xylophilus*

化合物 Compd.	质量浓度	平均死亡率
	Mass concentration/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Average mortality rate/%
1	1 000	100
	100	100
	10	11.1
2	1 000	90.5
	100	11.5
	10	1.66

3 讨论

脑苷酯类化合物是常见的具有多种活性的天然产物, 包括 Sphingolipid^[7]、Catacerebroside^[8]、Pinelloside^[9]、Ceremide^[10]、Lonijaposide^[11]、Thraustochytrioside^[12]、Polygalacerebroside^[13] 和 Monoglycosylceramide^[14] 等, 但对具有毒杀松材线虫活性的该类化合物的报道相对较少。

寻找对松材线虫有效的防治方法和药剂, 对保护松林具有十分重要的意义。本文首次报道了从真菌 *Paecilomyces* sp. 中可以分离得到化合物 1 和 2, 尽管它们为已知结构, 但其对松材线虫的杀虫活性则是首次报道。与文献报道的其他具有毒杀松材线虫活性的化合物相比^[5], 化合物 1 具有更好的活性。

参考文献:

[1] DONG Jin-yan (董谨燕), LI Ru (李钊), ZHANG Ke-qin (张

克勤). 松材线虫生物防治研究进展[J]. *Plant Protection* (植物保护), 2005, 31(5): 9-15.

- [2] ZHANG Y G, LIU S C, CHE Y S, *et al.* Epicoccins A-D, epipolythiodioxopiperazines from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Epicoccum nigrum*[J]. *J Nat Prod*, 2007, 70: 1522-1525.
- [3] ZHANG Y G, TIAN R R, LIU S C, *et al.* Alachalasin A-G, new cytochalasins from the fungus *Stachybotrys charatum*[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16: 2627-2634.
- [4] ZHANG Y, LIU S C, LIU H W, *et al.* Cycloaspeptides F and G, cyclic pentapeptides from a *Cordyceps*-colonizing isolate of *Isaria farinosa*[J]. *J Nat Prod*, 2009, 72: 1364-1367.
- [5] HUANG Z, DAN Y, HUANG Y, *et al.* Sesquiterpenes from the mycelial cultures of *Dichomitus squalens*[J]. *J Nat Prod*, 2004, 67: 2121-2123.
- [6] SITRIN R D, CHAN G, DINGERDISSEN J, *et al.* Isolation and structure determination of *Pachybasium* cerebrosides which potentiate the antifungal activity of aculeacin [J]. *J Antibiot*, 1988, 41: 469-480.
- [7] GAO J, ZHU W, ZHANG S, *et al.* Sphingolipids from the edible fungus *Tuber indicum*[J]. *Eur J Lipid Sci Tech*, 2004, 106: 815-821.
- [8] ZHAN Z, YUE J. New glycosphingolipids from the fungus *Catathelasma ventricosa*[J]. *J Nat Prod*, 2003, 66: 1013-1016.
- [9] CHEN J H, CUI G Y, LIU J Y, *et al.* Pinelloside, an antimicrobial cerebroside from *Pinellia ternata*[J]. *Phytochemistry*, 2003, 64: 903-906.
- [10] YAOITA Y, KOHATA R, KAKUDA R, *et al.* Ceramide constituents from five mushrooms[J]. *Chem Pharm Bull*, 2002, 50: 681-684.
- [11] KUMAR N, SINGH B, GUPTA A P, *et al.* Lonijaposides, novel cerebrosides from *Lonicera japonica*[J]. *Tetrahedron*, 2006, 62: 4317-4322.
- [12] JENKINS K M, JENSEN P R, FENICAL W. Thraustochytriosides A-C; new glycosphingolipids from a unique marine protist, *Thraustochytrium globosum* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1999, 40: 7367-7640.
- [13] ZHANG W, LI T, LIU R, *et al.* A new cerebroside from *Polygala japonica*[J]. *Fitoterapia*, 2006, 77: 336-337.
- [14] KARLSSON K A, LEFFLER H, SAMUELSSON B E. Characterization of cerebroside (monoglycosylceramide) from the sea anemone, *Metridium senile*. Identification of the major long-chain base as an unusual dienic base with a methyl branch at a double bond [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1979, 574: 79-93.

(责任编辑: 金淑惠)