

·研究简报·

昆虫病原线虫共生菌 YL001 细胞内代谢产物 抑菌作用研究初报

刘霞^{1,3}, 李骞¹, 许贤¹, 王永宏^{1,2*}, 张兴^{1,2}

(1. 西北农林科技大学 无公害农药研究服务中心, 陕西 杨凌 712100;

2. 陕西省生物农药工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100;

3. 延安大学 生命科学学院, 陕西 延安 716000)

摘要:以生物活性跟踪法测定了菌株代号为 YL001 的昆虫病原线虫共生菌 *Xenorhabdus nematophilus* 细胞内代谢产物的不同溶剂提取物及其不同馏分的抑菌活性。结果表明, YL001 细胞内代谢产物的乙醇提取物和甲醇提取物的抑菌活性均高于石油醚提取物、乙酸乙酯提取物和正丁醇提取物, 前两种提取物对番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和辣椒疫霉病菌 *Phytophthora capsici* 的 72 h 菌丝生长抑制作用最强, 在 0.4 mol/mL 浓度时抑制率均达 100%。乙醇提取物经硅胶柱层析分离, 洗出液合并后收集得到 8 个馏分。测定了各馏分对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用, 结果表明: 馏分 F₆ 的抑菌活性最高, 在 0.5 mol/mL 浓度时, 96 h 的菌丝生长抑制率可达 96.09%; 提取物的活性段主要集中在馏分 F₆、F₇ 和 F₈。活体组织法测定结果表明, 其乙醇提取物在 10 mg/mL 的剂量下对番茄灰霉病的保护效果为 64.81%, 治疗效果为 62.03%。

关键词:昆虫病原线虫; 共生菌; 细胞内代谢产物; 抑菌活性

中图分类号: S482.292

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2006)01-0095-04

Study on the Antifungal Activity of Intracellular Secondary Metabolic Products from *Xenorhabdus nematophilus*

LIU Xia^{1,3}, LI Qian¹, XU Xian¹, WANG Yong-hong^{1,2*}, ZHANG Xing^{1,2}

(1. Research and Development Center of Bio-rational Pesticide, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 2. Shaanxi Research Center of Bio-pesticide Engineering and Technology, Yangling 712100, China;

3. College of Life Science, Yan'an University, Yan'an 716000, China)

Abstract: The fungicidal activities of extracts and fractions from *Xenorhabdus nematophilus*, code named YL001 cells were tested in vitro and in vivo. The bioassay results indicated that fungicidal activity of ethanol extract and methanol extract was higher than that of other extracts. The ethanol extract was subjected to chromatography silica gel (200 ~ 300 mesh) using CHCl₃-methanol with increasing amounts of methanol. The resulting 8 fractions with different hydrophobicities were analyzed by in vitro antibacterial activity assay to *Botrytis cinerea*. The result showed that fraction 6 was more active than others and the

收稿日期: 2005-09-21; 修回日期: 2005-12-29.

作者简介: 刘霞 (1970-), 女, 陕西绥德人, 博士研究生, 副教授, 主要从事天然产物研究与开发; *通讯作者: 王永宏 (1968-), 男, 陕西凤翔人, 博士, 副教授, 主要从事微生物农药的研究与开发. 联系电话: 029-87092122; E-mail: wyh34@yahoo.com.cn; liuxiayidan@126.com

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2003AA241140); 国家“十五”科技攻关重大专项 (2002BA516A04); 西北农林科技大学人才计划支持项目 (01140501).

inhibition rate against the mycelial growth of *Botrytis cinerea* was 96.09% after 96 hours. The result also indicated that fungicidal components were mainly in fraction 6, fraction 7 and fraction 8. In addition, protective effect and therapeutic effect of the cells products at 10 mg/mL against the *Botrytis cinerea* were 64.81% and 62.03% on tomato, respectively.

Key words: entomopathogenic nematodes; symbiotic bacteria; intracellular products; fungicidal activity

微生物产生的次生代谢产物有的分泌于细胞外,形成细胞外次生代谢产物,有的则留在细胞内,形成细胞内次生代谢产物。昆虫病原线虫共生菌 *Xenorhabdus nematophilus* 是寄生于昆虫病原线虫 (entomopathogenic nematode) 肠道内的一种革兰氏阴性细菌^[1], 研究已证明其次生代谢产物具有杀虫^[2]、抑菌^[3-7]和抗肿瘤^[8-10]等多种生物活性,在农业和医药卫生领域具有较好的应用前景,因而成为科研工作者们研究的热点之一。据文献报道^[11],昆虫病原线虫共生菌中具有生物活性的次生代谢产物在胞内和胞外均有分布,目前对胞外代谢产物的研究较多,而对胞内代谢产物的研究甚少。*Xenorhabdus nematophilus* YL001是从陕西杨凌筛选得到的一株新菌株,国内外均未见相关研究报道,因此作者对其细胞内代谢产物的农用抑菌作用进行了初步研究,现将结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 供试材料

培养基: PDA 培养基用于植物病原真菌的培养,牛肉膏蛋白胨固体培养基 (NA)、牛肉膏蛋白胨液体培养基 (NB) 和酵母提取物培养基 (YS) 分别用于 YL001 菌株斜面及平板培养、菌种活化和摇瓶发酵。培养基配制按传统方法进行^[12]。

YL001 细胞: 将种管保存的共生菌划线移于 NA 培养基平板上,于 28℃ 下活化 24~48 h。从生长良好的活化平板上挑取单菌落,接种于 NB 培养基中,28℃ 摇床培养 24 h,之后按体积分数 8% 的接种量转接于发酵培养基中,于 28℃、180 r/min 条件下摇床培养 72 h。最后在 4℃、10 000 r/min 下离心 20 min,收集离心管底部的细胞团置于 4℃ 冰箱中备用。

供试植物病原真菌: 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、小麦赤霉病菌 *Gibberella zeae*、辣椒疫霉病菌 *Phytophthora capsici*、玉米大斑病菌 *Exserohilum turcicum*、苹果炭疽病菌 *Clomereia cinyulatae*、白菜

黑斑病菌 *Alternaria brassicae*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*,以上菌种由西北农林科技大学无公害农药研究服务中心提供。

供试植物: 番茄果实。

1.2 细胞破碎及不同溶剂提取物的制备

将离心所得的细胞团与 3 倍体积的有机溶剂混匀,于 560 W 和工作时间间隔时间为 4 s 5 s 的条件下在超声波破碎仪中冰浴破碎 18 min,之后以 10 000 r/min 离心 20 min,收集有机相。剩余细胞团中再加入 3 倍体积新的有机溶剂,混合后置于摇床上进一步萃取、离心,收集有机相。如此重复 2 次。合并 3 次萃取后的有机相,然后通过无水 N_2SO_4 柱干燥,在旋转薄膜蒸发器中减压浓缩至干。提取物为棕褐色粘稠物,将其配制成浓度为 0.4 mg/mL 的水溶液,测定其对菌丝生长的抑制率。萃取所用有机溶剂分别为石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇和甲醇,均为分析纯。

1.3 乙醇提取物硅胶柱层析分离馏分的制备

使用湿法装柱在玻璃层析柱 (50 mm × 500 mm) 中装入 200~300 目的硅胶,柱高 38 cm,柱顶端安装加压球。将 20 g 乙醇提取物完全溶于甲醇后,用 80~100 目的硅胶拌样、吹干、研磨,将其加在已装好的层析柱顶端,依次用氯仿、氯仿-甲醇不同体积比混合液 (10:1~1:10) 和甲醇梯度洗脱,根据收集到的洗脱液的颜色和薄层层析点板情况,将洗脱液合并。各馏分在 42℃ 的旋转薄膜蒸发器上浓缩,并将浓缩液在通风橱中自然挥干。取适量上述各馏分,用蒸馏水溶解并稀释成浓度为 0.5 mg/mL 的水溶液,跟踪测试它们对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用。

1.4 杀菌活性测定方法

1.4.1 离体活性测定 参照方中达^[13]的抑制菌丝生长速率法进行。每培养皿放置 3 个菌饼,每处理重复 3 次,以空白培养基处理为对照。

1.4.2 活体组织测定法

保护作用测定: 采摘健康新鲜、形状和大小均一的番茄果实 (带蒂),表面用 75% 的酒精擦拭消毒,晾干。将乙醇提取物稀释成不同浓度水溶液,

用小型喷雾器喷于番茄表面。底部铺上滤纸并加无菌水保湿, 24 h后接种番茄灰霉病菌菌饼。

治疗作用测定, 番茄处理和乙醇提取物的稀释方法同保护作用测定, 区别是先在保湿条件下接种番茄灰霉病菌菌饼, 24 h后再喷施供试药液。以上每浓度处理均设 3次重复, 每重复用番茄果实 1个, 以空白培养基处理为对照。4 d后测量各处理果实的病斑直径, 计算相对防效, 并以 DMRT (Duncan s Multiple Range Test)法对结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同溶剂提取物的抑菌活性

用石油醚、乙酸乙酯、正丁醇、乙醇和甲醇等极性不同的溶剂, 分别对 YL001 细胞破碎液进行萃取, 得不同溶剂的提取物。生测结果 (见表 1) 表明, 处理 72 h后, 在 0.4 mg/mL 的供试浓度下, YL001 细胞甲醇提取物和乙醇提取物的抑菌活性最强, 对番茄灰霉病菌和辣椒疫霉病菌菌丝生长的抑制率均为 100%; 其次为正丁醇提取物, 对辣

椒疫霉病菌菌丝生长的抑制率为 93.34%; 石油醚提取物的抑菌活性最差, 对所有供试菌菌丝生长的抑制率均接近于 0。综合考虑溶剂的毒性和提取物的抑菌活性等因素, 认为乙醇是提取 YL001 细胞内代谢产物的合适溶剂。

2.2 硅胶柱层析馏分的抑菌活性

通过硅胶柱层析对乙醇提取物进行分离, 得 $F_1 \sim F_8$ 共 8个馏分, 以番茄灰霉病菌分别对其进行生物活性跟踪测定。结果 (见表 2) 表明, 不同馏分对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制活性存在较大差异, 在 0.5 mg/mL 的供试浓度下, 馏分 $F_6 \sim F_8$ 对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用最强, 处理后 96 h的抑制率分别为 96.09%、91.16% 和 89.13%; 而馏分 $F_1 \sim F_3$ 的抑菌作用最弱, 96 h的抑制率均低于 50%, 显著低于 $F_6 \sim F_8$ 。由测定结果可看出, YL001 细胞的抑菌活性成分主要集中在馏分 F_6 、 F_7 和 F_8 , 这一区段的洗脱液比例为氯仿: 甲醇为 8:1~1:1 段。

Table 1 Antifungal activity of YL001 cells extracted by various solvent after 72 h

Extract solvent	Inhibition rate (%)						
	B. cinerea	G. zeae	P. capsici	E. turcicum	C. cinnylat	A. brassicae	A. alternata
Petroleum ether	4.65 d	1.53 e	1.33 d	7.52 c	4.96 c	3.52 d	2.73 d
Ethyl acetate	46.28 c	40.59 d	41.34 c	33.80 b	34.46 b	65.72 c	56.33 b
n-Butyl alcohol	89.31 b	65.20 c	93.34 b	59.70 a	52.98 ab	70.42 c	42.04 c
Methanol	100.00 a	89.21 a	100.00 a	70.33 a	57.13 a	80.53 b	68.63 a
Ethanol	100.00 a	78.47 b	100.00 a	63.82 a	61.57 a	86.44 a	67.83 a

Note: The concentration of each extraction was 0.4 mg/mL. The same column followed by different letters were significantly different at the 5% level by Duncan's Multiple Range Test (The same as in the following tables).

Table 2 Antifungal activity of different fractions after silica-gel column chromatography against Botrytis cinerea

Fractions	Treated time/h					
	48		72		96	
	Inhibition zone/mm	Inhibition rate (%)	Inhibition zone/mm	Inhibition rate (%)	Inhibition zone/mm	Inhibition rate (%)
F_1	14.22 ±0.19 b	26.18 e	20.78 ±1.07 a	10.14 d	43.22 ±1.93 a	5.51 e
F_2	8.72 ±0.25 cd	82.31 c	10.61 ±1.77 bc	76.45 bc	26.22 ±0.54 bc	49.86 d
F_3	9.72 ±0.25 c	72.19 d	12.33 ±1.64 b	65.22 c	27.78 ±1.13 b	45.80 d
F_4	7.56 ±0.10 def	97.44 b	8.61 ±0.96 cd	89.49 ab	17.83 ±8.96 cde	71.74 bc
F_5	8.44 ±0.25 de	85.28 c	10.06 ±1.95 bc	80.07 bc	20.33 ±1.32 bcd	65.22 cd
F_6	7.00 ±0.00 f	100.00 a	7.44 ±0.25 d	97.10 a	8.50 ±0.76 e	96.09 a
F_7	7.44 ±0.10 ef	95.50 b	8.28 ±0.92 cd	91.67 ab	10.39 ±0.19 e	91.16 ab
F_8	7.50 ±0.29 ef	95.19 b	8.39 ±0.59 cd	90.94 ab	11.17 ±0.17 de	89.13 ab
CK	16.78 ±1.07 a	—	22.33 ±1.53 a	—	45.33 ±3.51 a	—

Note: The concentration of each fraction was 0.5 mg/mL; CK was the blank control without the samples (The same as in table 3).

2.3 乙醇提取物对番茄灰霉病的保护和治疗效果

由表 3 可知, YL001 细胞乙醇提取物不同浓度处理对番茄灰霉病均表现出一定的保护和治

作用, 供试浓度为 10.0、5.0 和 2.5 mg/mL 时对番茄灰霉病的保护效果分别为 64.81%、46.66% 和 41.78%, 治疗效果分别为 62.03%、45.43% 和 38.30%。

Table 3 The efficacy of ethanol extracts of YL001 against the *Botrytis cinerea* after 4 d

Concentration of samples / mg · mL ⁻¹	Protective effect		Therapeutic effect	
	Inhibition zone/mm	Relative efficacy (%)	Inhibition zone/mm	Relative efficacy (%)
10.0	15.54 ± 1.02 c	64.81 a	16.44 ± 0.69 c	62.03 a
5.0	21.48 ± 1.13 b	46.66 b	21.89 ± 1.39 b	45.43 b
2.5	23.08 ± 1.03 b	41.78 b	24.22 ± 1.17 b	38.30 b
CK	36.78 ± 2.01 a	—	36.78 ± 1.00 a	—

3 讨论

据文献报道^[11], 昆虫病原线虫共生菌的细胞经破碎后用乙酸乙酯萃取, 真空浓缩后过 Sephadex LH-20 色谱柱, 最后用反相 HPLC 制备得到了有抑菌和杀虫活性的 4 种单体化合物。本试验所用昆虫病原线虫共生菌为 YL001 菌株, 对其细胞破碎液进行跟踪生物测定, 从不同溶剂提取物的生物活性来看, 乙醇是提取 YL001 菌株胞内代谢产物的最佳溶剂。由此推测二者的抑菌活性成分可能有所不同。用硅胶柱层析法对乙醇提取物进行分离时, 洗脱液从低极性溶剂逐渐向高极性溶剂过渡, 抑菌活性高的馏分主要集中在极性较强的馏分段中, 说明 YL001 菌株胞内抑菌成分可能是极性较强的物质, 笔者后续分离的初步结果也证实了这一点。有关其中抗菌有效成分的继续分离和鉴定还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Thomas GM, Poinar GO. *Xenorhabdus* gen. nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family Enterobacteriaceae [J]. *Int J Syst Bacteriol*, 1979, 29: 352-360.
- [2] McInemey B V, Gregson R P, Lacey M, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. I Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity [J]. *J Nat Prod*, 1991, 54: 774-784.
- [3] Akhurst R J. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. bacteria biologically associated with insect pathogenic nematodes of the families Herorhabditidae and Steinernemadidae [J]. *J Gen Microbiol*, 1982, 128: 3061-3067.
- [4] Chen C, Dunphy G B, Webster J M. Antifungal activity of two *Xenorhabdus* species and *Photobacterium luminescens*, bacteria associated with the nematodes *Steinernema* species and *Hetero-*

habditis megidis [J]. *Biological Control*, 1994, (4): 157-162.

- [5] YANG Huai-wen (杨怀文), ZHANG Zhim-ing (张志铭), YANG Xiu-fen (杨秀芬), et al. 嗜线虫致病杆菌代谢物对马铃薯晚疫病菌的抑制作用 [J]. *Chin J Biological Control (中国生物防治)*, 2000, 16(3): 111-113.
- [6] Dongjin Ji, Youngkeun Yi, Ga-Hwa Kang, et al. Identification of an antibacterial compound, benzylideneacetone, from *Xenorhabdus nematophila* against major plant pathogenic bacteria [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2004, 239: 241-248.
- [7] Li J, Chen G, Webster J M. Nematophin, a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* [J]. *Can J Microbiol*, 1997, 43: 770-773.
- [8] Webster J M, Li J, Chen G. Xenomins: novel heterocyclic compounds with antimicrobial and antineoplastic [P]. *US Patent 582787211*, 1998-10-27.
- [9] Webster J M, Li J, Chen G. Anticancer property of dithiopyrrolones [P]. *US Patent 6020360*, 2000-02-01.
- [10] Lü Jun-jun (吕秋军), JIAN Heng (简恒), LIU Wei-jing (刘卫京), et al. 从嗜线虫杆菌中分离的吡啶衍生物抗肿瘤活性的研究 [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2002, 11(11): 850-852.
- [11] McInemey B V, Richard P G, Lacey M J, et al. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp., part I. Dithiopyrrolone derivatives with antibiotic activity [J]. *J Natural Products*, 1991, 54(3): 774-784.
- [12] CHENG Li-juan (程丽娟), XUE Quan-hong (薛泉宏). *Experiment Technology of Microbiology (微生物学实验技术)* [M]. Xi'an (西安): World Books Publishing Company (世界图书出版公司), 2000.
- [13] FANG Zhong-da (方中达). *Research Method of Plant Pathology (植病研究方法)* [M]. Beijing (北京): Chinese Agriculture Press (中国农业出版社), 1998.

(Ed. TANG J)