

• 研究论文 •

冬青卫矛内生放线菌 YDG17菌 株发酵液抑菌活性研究

杨春平, 韩小美, 韩江涛, 王群利, 吴文君*

(西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 从冬青卫矛植株中筛选得到一株内生链霉菌 YDG17, 其发酵液对多种植物病原真菌有较强的抑制作用。室内生物测定结果表明, YDG17菌株发酵液对供试的 11种植物病原真菌菌丝生长均有一定的抑制作用, 其中对小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、番茄灰霉病菌 *Fulvia fulva* 和番茄早疫病菌 *Alternaria solani* 的抑制作用最强, EC_{50} 值分别为 259.98、336.13 和 100.72 mg/L; 对供试的 3种植物病原真菌孢子萌发也均有一定的抑制作用, 其中对番茄灰霉病菌孢子萌发的抑制作用最强, EC_{50} 值为 87.84 mg/L。离体子叶法测定结果表明, 发酵液原液对番茄灰霉病的保护效果为 97.62%, 治疗效果为 79.63%。盆栽试验结果表明, 发酵液原液对番茄灰霉病的保护效果为 71.34%, 治疗效果为 64.23%。捷克八溶剂系统纸色谱测定结果表明, 该发酵液的主要活性物质为碱性水溶性抗生素。选用弱酸性离子交换树脂吸附法对 YDG17 发酵液活性成分进行了初步分离, 并对其活性馏分进行 ESI-MS/MS 分析, 表明其活性物质主要为链丝菌素类化合物, 该类化合物为首次从植物内生菌中分离得到。

关键词: 冬青卫矛; 植物内生菌; 抑菌活性; 链丝菌素

中图分类号: S482.292

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2008)01-0053-08

Antifungal Activity of the Fermentation Broth from Endophytic *Streptomyces* sp. YDG17 of *Euonymus japonicus*

YANG Chun-ping HAN Xiao-mei HAN Jiang-tao WANG Qun-li WU Wen-jun*

(Institute of Pesticide Science, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract A strain of endophytic *Streptomyces* sp. YDG17 was isolated from the root of *Euonymus japonicus*. The result of bioassay indicated that the mycelial growth of 11 species of plant-pathogenic fungus could be inhibited in vitro by the broth of YDG17, and the value of EC_{50} against *Fusarium graminearum*, *Botrytis cinerea* and *Alternaria solani* were 259.98, 336.13 and 100.72 mg/L, respectively. The spore germination of 3 species of plant-pathogenic fungus could also be inhibited by the broth of YDG17, and the value of EC_{50} in the spore germination tests against *B. cinerea* was 87.84 mg/L. The results also showed that the protective efficacy and curative efficacy of the undiluted fermentation products against *B. cinerea* were 97.62% and 79.23% on detached cucumber leaves and were 71.34% and 64.23% on potted cucumber plants, respectively. By comparing with the curves of classical antibiotics in Doskochilova system, the active ingredients in the fermentation were identified as

收稿日期: 2007-10-18 修回日期: 2008-01-14

作者简介: 杨春平 (1979-), 女, 四川南充人, 在读博士研究生, E-mail yang2185553@tom.com; * 通讯作者 (Author for correspondence): 吴文君 (1945-), 男, 四川洪雅人, 教授, 主要从事天然产物用作农药的研究, 联系电话: 029-87093987; E-mail wuwenjun@nwsuaf.edu.cn

基金项目: 国家“863”高技术项目 (2002AA245121); 国家重点基础研究发展规划 (“973”计划) 项目 (2003CB114404).

alkaline and water soluble compounds. The broth of YDG 17 was isolated by weak acid cation resin and the active fraction was identified as some streptothricins by ESI-MS/MS.

Key words *Euonymus japonicus*, plant endophyte, fungicidal activity, streptothricin

从微生物次生代谢产物中筛选农用抗生素是新农药研究与开发的一个重要途径。迄今为止,土壤微生物一直是天然抗生素最主要的来源之一。近年来为拓展产生新型抗生素的微生物资源,内生菌的研发受到广泛的关注。植物内生菌是生长在健康植物组织内的一类特殊微生物,它们不仅可以促进植物生长、增加植物抗逆性,还可以产生丰富的次生代谢产物,是天然抗菌素的又一资源库。对植物内生菌活性代谢产物的研究起步较晚,1993年 Strobel等^[1]从短叶红豆杉 *Taxus brevifolia* 中分离到能产紫杉醇的内生真菌 *Taxomyces andreanae* 后,植物内生菌才成为天然活性产物开发的热点。随后,一系列结构新颖的活性化合物不断被从内生菌中分离得到,其中包括许多新的抗菌素。如 Igarashi^[2]从杜鹃花内生链霉菌发酵液中发现了新的抗菌素 *Fistupyrene*, Pelaez等^[3]从一种刺柏 *Juniperus communis* 中分离到产生新的三萜糖苷类抗菌素的内生菌; Strobel等^[4-6]从蛇藤和 *Grevillea pteridifolia* 植物内生链霉菌代谢产物中分离到新的抗菌素 *Munumbicins* 和 *Kakadumycins* 以及 Pullen^[7]从卫矛科植物内生链霉菌中得到新的 *chloropyrro* 抗菌素等。因此,植物内生菌作为新的微生物资源,在新农药及新的农药先导物的开发中具有巨大潜力。笔者对卫矛科植物冬青卫矛 *Euonymus japonicus* 内生菌进行了研究,从中分离筛选到一株对植物病原菌有一定抑菌活性的内生链霉菌 YDG 17。为了评价该菌株在农业病害防治中的潜在应用价值,笔者对其发酵液的抑菌活性进行了系统的测定,并对其杀菌成分的分离进行了前期探索。现将主要研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

培养基: PDA 用于植物病原真菌的培养; 高氏一号培养基和小米液体培养基^[8]分别用于 YDG 17 菌株斜面及平板培养和摇瓶发酵。

YDG 17 菌株发酵液的制备: 参照文献 [8] 方法, 将 YDG 17 菌株接种于高氏一号培养基斜面上于 28℃ 下培养 4~5 d 后, 加入无菌水, 制成孢子

悬浮液。取其 10 mL 加入装有 50 mL 小米液体培养基的 250 mL 三角瓶中。180 r/min, 30℃ 下振荡培养 5 d, 过滤, 滤液于 3 000 r/min 下离心 20 min, 取上清液备用。试验时, 根据需要将此上清液稀释成不同浓度即为供试药液 (发酵液中干物质的含量为 12.69 g/L)。

供试植物病原真菌: 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*, 番茄早疫病菌 *Alternaria solani*, 小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*, 番茄叶霉病菌 *Fulvia fulva*, 苹果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*, 葡萄炭疽病菌 *Elsinoe ampelina*, 小麦纹枯病菌 *Rhizoctonia cerealis*, 棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, 西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, 玉米弯孢叶斑病菌 *Curvularia lunata*, 桃腐烂病菌 *Cytospora leucostoma*, 菌种均由西北农林科技大学农药研究所提供。

供试细菌: 枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*, 菌种来源同上。

供试植物: 黄瓜 (农城三号), 将黄瓜种子催芽后播种在花盆中, 培养至两片子叶充分展开时进行试验。

供试药剂: 50% 速克灵 (腐霉利, procymidone) 可湿性粉剂 (WP), 日本住友化学工业株式会社产品。

1.2 YDG 17 菌株的鉴定

按文献 [9, 10] 方法对 YDG 17 菌株进行初步鉴定。

1.3 杀菌活性测定

1.3.1 离体活性测定 分别采用菌丝生长速率法和孢子萌发法^[11]测定。发酵液对菌丝生长抑制活性的测定分别设 10 倍和 20 倍稀释液两个浓度处理, 并设置 50% 速克灵 WP 3 000 倍药剂对照处理。根据发酵液稀释 10、20、40、80 和 160 倍后 5 个不同浓度处理对菌丝生长的抑制率计算发酵液对病原菌菌丝生长的毒力^[12]; 根据发酵液稀释 20、40、80、160 和 320 倍后 5 个不同浓度处理对孢子萌发的抑制率, 计算发酵液对病原菌孢子萌发的毒力^[12]; 发酵液离子交换树脂粗分离馏分均以 500 mg/L 测定其对番茄灰霉病菌孢子萌发的抑制作用。以上每处理均重复 3 次, 以无菌水为对

照。

1.3.2 离体子叶法^[12]

保护作用测定:在直径 20 cm 的培养皿下垫一层湿润的薄海绵,剪取黄瓜子叶插入海绵。将不同浓度的发酵液喷于子叶上,待药液阴干后,于每张子叶中部接种一块番茄灰霉病菌菌饼(直径 3 mm)。所有处理接菌后置于 22℃、湿度 90% 以上和黑暗/光照 = 12/12 的智能人工气候箱内培养。

治疗作用测定:剪取黄瓜子叶插入湿海绵,先在子叶上接种菌饼,放入培养箱内(培养方法与保护作用相同)8 h后,把不同浓度的发酵液喷于接菌子叶上,然后将各处理放回培养箱内继续培养。

保护作用和治疗作用均设 3 个浓度处理,即发酵液原液、及其 10 倍和 20 倍稀释液,每处理设 4 次重复,每重复用黄瓜子叶 4 片,以喷施 3 000 倍 50% 速克灵 WP 为药剂对照,清水为空白对照。4 d 后根据文献[12]调查病斑直径,计算各处理对番茄灰霉病的抑制率和相对防治效果,并通过 DMRT 法对各处理数据进行统计分析。

1.3.3 盆栽试验法 以培养好的盆栽黄瓜幼苗进行试验。设发酵液原液、10 倍和 20 倍稀释液 3 个处理,每处理 4 次重复,4 盆为 1 个处理,同时以喷施 3 000 倍 50% 速克灵 WP 为药剂对照,清水为空白对照。保护作用测定方法为先喷供试药液,24 h 后接种番茄灰霉病菌孢子悬浮液(10 × 15 倍镜下每视野 100 个孢子)。治疗作用测定则先在保湿条件下接种番茄灰霉病菌孢子悬浮液,24 h 后喷施供试药液。处理后的黄瓜苗在 18℃ ± 1℃、饱和湿度和光照/黑暗 = 12 h/12 h 的条件下培养,7 d 后,根据文献[11]进行病情调查,并计算病情指数和防治效果。

1.4 YDG17 菌株发酵液中杀菌活性物质的初步定性

采用 Doskochilova 溶剂系统纸层析鉴定法^[13]:取 YDG 17 菌株发酵上清液,点于层析滤纸上,分别用 Doskochilova 溶剂系统中的 8 种溶媒体系进行展开,通过生物自显影(指示菌为枯草芽孢杆菌)检测杀菌活性成分在各种溶剂系统中的 R_f 值,并根据 R_f 值绘制展开曲线,与抗生素类化合物的经典图谱^[13]比较,进行初步定性分析。

1.5 YDG17 菌株发酵液中杀菌活性成分的初步分离

4 L 发酵液经孔径 74 μm 的筛网过滤后,用草

酸调节 pH = 3.5,静置,过滤,加 1 mol/L 的氢氧化钠调滤液至中性,用 1 kg 弱酸性离子交换树脂(经过预处理)静态吸附 1 h 后装入层析柱(150 cm × ϕ 8 cm)中,待柱中余留液通过后(通过液收集为馏分 1),先用 2 L 去离子水洗脱,再分别用质量分数为 0.5%、1%、2%、3%、4% 和 5% 的盐酸溶液各 2 L 梯度解吸。通过液、水洗脱液及各份盐酸解吸液分别收集为一份,共得到 1~8 共 8 个馏分。解吸液用 1 mol/L 的氢氧化钠调至中性,浓缩至干,甲醇脱盐。以番茄灰霉病菌为指示菌,采用抑制孢子萌发法测定各馏分的杀菌活性,得到高活性馏分 6(1.74 g)。

1.6 YDG 17 菌株抑菌活性成分分析

采用 ESI-MS/MS 方法,对 YDG 17 菌株发酵液离子交换处理后的活性馏分 6 进行成分分析。

质谱条件:离子源为 ESI 蠕动泵直接进样(5 $\mu\text{L}/\text{min}$);正离子模式检测;电离电压 4.5 kV;干燥气(N_2)流速为 25 L/min;离子传输温度 300℃。

2 结果与分析

2.1 YDG 17 菌株的鉴定

YDG 17 菌株在高氏一号培养基上生长良好,气生菌丝呈绒粉状,基内菌丝不分隔,不断裂。孢子丝着生在气生菌丝上,直链或顶端钩状至 1~3 圈长柄大螺旋形。孢子卵圆形至柱形,表面光滑。表 1 是该菌株在 5 种不同培养基上的培养特性。生理生化特性测定表明:YDG 17 菌株具有液化明胶的能力;能使牛奶凝固但不胨化;含淀粉酶;能在纤维素上少量生长但不分解滤纸;不产生硫化氢;能利用酪氨酸产生黑色素。能利用葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖、核糖、肌醇、甘露醇、麦芽糖、阿拉伯糖和鼠李糖等 10 种碳源。菌株 YDG 17 细胞壁化学成分中含 LL-二氨基庚二酸(LL-DAP)和甘氨酸,是 I 型细胞壁。

菌株 YDG 17 的这些形态特征、培养性状、大部分生理生化特征及细胞壁类型与文献[9-10]中的淡紫灰链霉菌 *Streptomyces lavendulae* 比较相似,但根据其不产生硫化氢,能利用木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、蔗糖、肌醇和甘露醇等特点,初步判定 YDG 17 菌株可能为链霉菌(*Streptomyces*)属中淡紫灰链霉菌的一个新变种。

2.2 YDG 17 发酵液对植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

YDG 17 的发酵液对供试的 11 种植物病原真

菌菌丝生长均有不同程度的抑制作用。其中, 对小麦赤霉病菌、西瓜枯萎病菌、番茄灰霉病菌、番茄早疫病菌和桃腐烂病菌的抑制作用较强, 发酵液稀释 10 倍时的抑制率分别可达 92.30%、80.00%、81.70%、90.61%和 83.61% (表 2), 均高于对照药剂 50%速克灵 WP 3 000倍稀释液。毒力测定结果表明, YDG 17的发酵液对小麦赤霉病菌、番茄灰霉病菌和番茄早疫病菌菌丝生长的 EC₅₀值 (以发酵液中的干物质计) 分别为 259.98、336.13和 100.72 mg/L (表 3)。

表 1 YDG 17菌株的培养特性
Table 1 The characteristic of strain YDG 17

培养基 Medium	气生菌丝 Aerial mycelium	基内菌丝 Substrate mycelium	可溶性色素 Soluble pigment
高氏一号 Gauss' agar	灰色, 充实 Gray, rich	浅褐色 Light brown	无 None
淀粉琼脂 Starch agar	浅灰色, 中度 Pale gray, general	灰白色 Greyish white	无 None
蔗糖察氏琼脂 Sucrose czapek' s agar	淡红灰, 充实 Reddish-gray, rich	灰白色 Greyish white	无 None
葡萄糖天门冬素琼脂 Glucose asparagine agar	荷花白, 中度 White as white but general	灰白色 Greyish white	无 None
马铃薯块 Dolb of potato agar	淡红灰, 充实 Reddish-gray, rich	深褐色 Dark brown	略变褐 A little brown

表 2 YDG 17发酵液对 11种植物病原真菌菌丝生长的抑制作用
Table 2 Inhibition of YDG 17 broth against the mycelia growth of 11 species plant pathogens

病原菌 Pathogenic fungus	平均抑制率 Inhibition rate(%)		
	稀释 10倍 10 Times diluted	稀释 20倍 20 Times diluted	50%速克灵 3 000倍 Procymidone 3 000 Times diluted
小麦赤霉病菌 F. graminearum	92.30	74.70	68.21
西瓜枯萎病菌 F. oxysporium f.sp.niveum	80.00	55.70	47.19
番茄灰霉病菌 B. cinerea	81.70	64.04	79.03
玉米弯孢叶斑病菌 C. lunata	45.80	19.66	52.33
苹果炭疽病菌 G. cingulata	76.10	27.65	65.81
葡萄炭疽病菌 E. ampelina	55.79	39.85	67.79
棉花枯萎病菌 F. oxysporum f.sp.vasinfectum	54.21	29.49	44.10
番茄叶霉病菌 F. fulvum	71.26	39.08	62.67
番茄早疫病菌 A. solani	90.61	85.92	75.54
小麦纹枯病菌 R. cerealis	58.53	17.33	58.08
桃腐烂病菌 C. leucostoma	83.61	39.58	69.74

表 3 YDG 17发酵液抑制 5种植物病原真菌菌丝生长的毒力
Table 3 Toxicity of YDG 17 broth against the mycelia growth of 5 species plant pathogens

病原菌 Pathogenic fungus	毒力回归方程 (y =) Regression equation	相关系数 r	EC ₅₀ /(mg/L)	95%置信限 (mg/L) 95% Confidence limit
小麦赤霉病菌 F. graminearum	0.264 0+ 1.961 1x	0.997 0	259.98	224.41~ 301.19
西瓜枯萎病菌 F. oxysporium	0.276 4+ 1.767 7x	0.993 1	470.11	398.03~ 555.25
番茄灰霉病菌 B. cinerea	0.920 8+ 1.614 5x	0.988 1	336.13	283.37~ 398.71
番茄早疫病菌 A. solani	2.452 6+ 1.271 7x	0.985 4	100.72	73.46~ 138.08
桃腐烂病菌 C. leucostoma	0.015 3+ 1.794 9x	0.950 4	598.58	496.45~ 721.73

注: mg/L 指每升发酵稀释液中干物质含量, 下同。
Note: The unit of mg/L was the content of dried fermentation products. The same as below.

2 3 YDG17发酵液对 3种植物病原真菌孢子萌发的抑制作用

孢子萌发法毒力测定结果(表 4)表明, YDG 17 发酵液对小麦赤霉病菌、西瓜枯萎病菌和番茄灰霉病菌孢子萌发均有抑制作用, 其中, 对番茄灰霉病菌的毒力最高, 其 EC_{50} 值为 87. 84 mg/L。

表 4 YDG17发酵液对 3种植物病原真菌孢子萌发的毒力

Table 4 Toxicity of YDG 17 broth against the spore germination of 3 species plant pathogens

病原菌 Pathogenic fungus	毒力回归方程 (y =) Regression equation	相关系数 r	EC_{50} /(mg/L)	95% 置信限 / (mg/L) 95% Confidence limit
小麦赤霉病菌 F. graminearum	$1.8488 + 1.4449x$	0.983 0	151. 67	125. 63~ 183. 12
西瓜枯萎病菌 F. oxysporium	$1.4454 + 1.5166x$	0.977 2	220. 69	183. 23~ 265. 81
番茄灰霉病菌 B. cinerea	$2.8369 + 1.1129x$	0.977 6	87. 84	66. 80~ 115. 49

2 4 离体子叶法测定 YDG17发酵液的保护和治疗作用

处理对番茄灰霉病均表现出一定的保护和治疗作用, 其中, 保护作用较治疗作用强, 且均优于对照药剂 50% 速克灵 WP 3 000倍稀释液。

表 5 YDG17发酵液对番茄灰霉病的保护和治疗作用(离体子叶法)

Table 5 The efficacy of YDG 17 broth against the Botrytis cinerea by cotyledon method in vitro

药液浓度 Concentration of sample	保护作用 Protective effect		治疗作用 Curative effect	
	病斑直径 /mm	相对防效 (%)	病斑直径 /mm	相对防效 (%)
	Diameter of spot	Relative efficacy	Diameter of spot	Relative efficacy
原液 YDG 17 broth undiluted	0.9 ± 0.25 dE	97.66 ± 0.99 aA	7.8 ± 0.38 dE	79.63 ± 1.00 aA
10倍稀释液 YDG 17 broth 10 times diluted	8.2 ± 0.66 dC	78.70 ± 2.91 dC	13.2 ± 0.52 dC	65.54 ± 1.36 cB
20倍稀释液 YDG 17 broth 20 times diluted	14.6 ± 1.50 bB	62.08 ± 3.89 dD	19.5 ± 0.76 bB	49.09 ± 1.98 dC
50% 速克灵 3 000倍稀释液 Procymidone 3 000 times diluted	5.3 ± 1.60 dD	86.23 ± 4.14 bB	10.9 ± 0.50 dD	71.54 ± 1.29 bB
CK	38.5 ± 1.24 aA	/	38.3 ± 0.38 aA	/

注: CK 为空白; 同列数据后小写字母和大写字母不同分别表示 5% 和 1% 水平时差异显著, 同栏中有相同字母表示差异不显著。下同。
Note: The CK was the blank control without the samples analyzed with Duncan's multiple range tests between treatment; significant differences of 5% and 1% were marked by the small and capital letters respectively. If any letters marked in one treatment was the same to the other one, it implies difference between them. The same as below.

2 5 盆栽试验法测定 YDG17发酵液对番茄灰霉病的防治效果

YDG 17 菌株发酵液中主要抑菌成分属于碱性水溶性抗生素类物质。

表 6 结果表明, 在活体条件下 YDG 17 发酵液对番茄灰霉病也有较好的防治效果, 其保护效果为 71. 34%, 治疗效果为 64. 23%, 均明显高于 50% 速克灵 WP 3 000倍稀释液。

2 6 YDG17菌株发酵液中杀菌活性物质的初步定性

将 YDG 17 菌株发酵液活性成分在 Doskochibva 溶剂系统中的 R_f 值绘制成曲线(图 1), 并与经典抗生素纸层析图谱^[9]进行对比, 可以推断

2 7 粗分离各馏分的抑菌活性

从表 7 可以看出, YDG 17 菌株发酵液用弱酸性阳离子交换树脂分离后得到的 8 个馏分对番茄灰霉病菌的孢子萌发抑制作用差异较大。在 500 mg/L 浓度下, 抑菌活性主要集中在 3. 0% 盐酸洗脱液馏分 6 中, 表明 3. 0% 的盐酸溶液可以有效地洗脱被树脂吸附的活性成分; 通过液对供试菌无明显抑制活性, 表明发酵液中活性物质已完全交换到树脂中。

表 6 YDG17发酵液对番茄灰霉病的保护和治疗作用(盆栽法)

Table 6 The efficacy of YDG 17 broth against the Botrytis cinerea by pot trial

药液浓度 Concentration of sample	保护作用 Protective effect		治疗作用 Curative effect	
	病情指数 Disease index	相对防效 (%) Relative efficacy	病情指数 Disease index	相对防效 (%) Relative efficacy
原液 YDG 17 broth undiluted	22.82±0.34 eE	71.34±0.42 aA	27.31±0.43 eE	64.23±0.56 aA
10倍稀释液 YDG 17 broth 10 times diluted	39.73±2.08 dC	50.11±2.61 cC	42.55±1.72 dC	44.26±2.24 cB
20倍稀释液 YDG 17 broth 20 times diluted	48.95±2.66 bB	38.53±3.34 dD	51.07±2.55 bB	33.10±3.33 dC
50%速克灵 3 000倍稀释液 Procymidone 3 000 times diluted	33.68±3.59 dD	57.70±4.51 bB	35.24±4.09 dD	53.84±5.35 bB
CK	79.63±1.88 aA	/	76.34±2.97 aA	/

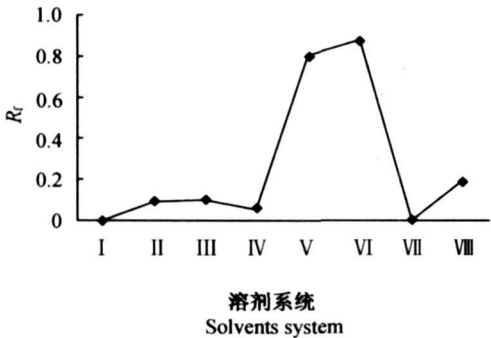


图 1 YDG17菌株发酵液活性成分在 Daskochilova溶剂系统中的 R_f 曲线

Fig 1 The curve of active ingredients of YDG 17 strain developed in Daskochilova solvent system

2.8 YDG17菌株活性成分的分析

图 2是菌株 YDG 17发酵液粗分离活性馏分 6

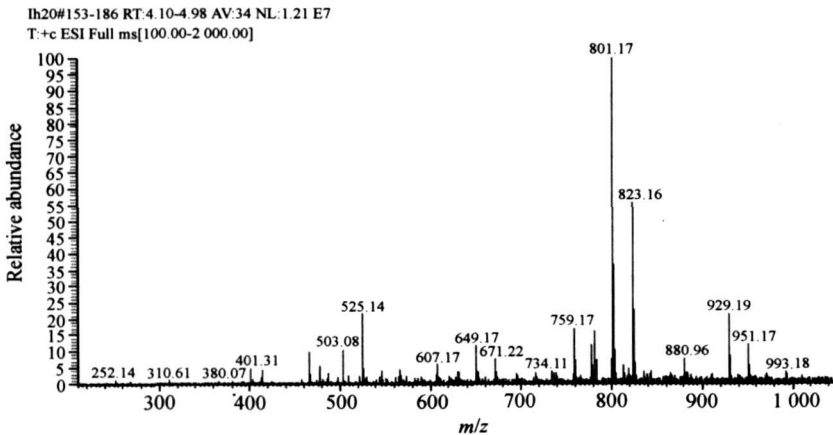


图 2 馏分 6的质谱图

Fig 2 MS spectrum of fraction 6

表 7 各馏分对番茄灰霉病菌孢子萌发的抑制作用 (500 mg/L)

Table 7 Antifungal activity of different fractions on spore gem ination of B. cinerea at the concentration of 500 mg/L

馏分 Fraction	盐酸浓度 / (%) Concentration of HCl	抑制率 (%) Inhibition rate
1	通过液 Residual liquid	0
2	0	0
3	0.5	18.37
4	1.0	40.92
5	2.0	56.01
6	3.0	100.00
7	4.0	31.35
8	10.5	19.64

注: 实验中以无菌水为对照, 对照孢子萌发率为 98%。

Note: The control was sterilized water in which the spore gem ination rate of B. cinerea was 98%.

的 ESHM S谱图, 图中丰度较高的分子离子有 m/z 801(M + H)、823(M + Na)、929(M + H)、951(M

+ Na)、759(M + H)、781(M + Na)、649(M + H)、671(M + Na)、503(M + H)、525(M + Na)。选择其中 m/z 801、929、759、649、503 为母离子进行 MS/MS 分析, 并与已知纯化合物在相同条件下的 MS/MS 图谱进行比较, 可以确定其分别是 N-乙酰

化链丝菌素 D (FW = 800)、N-乙酰化链丝菌素 C (FW = 928)、链丝菌素 D (FW = 758)、链里定酸-链丝菌素 E (FW = 648) 和链丝菌素 F (FW = 502), 均为链丝菌素类化合物 (图 3)。

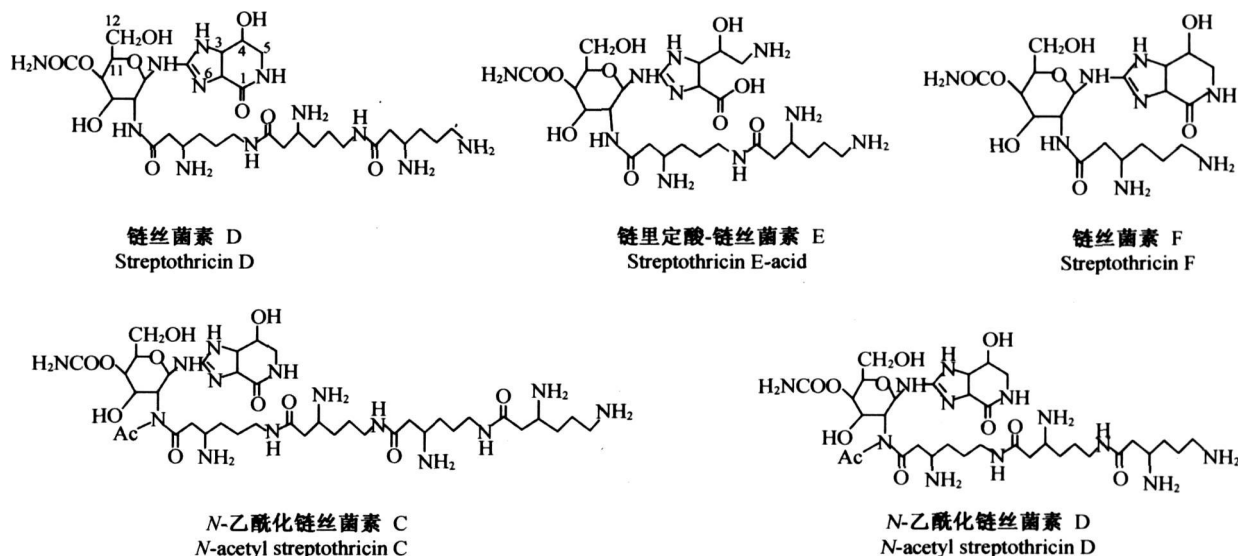


图 3 5种链丝菌素的结构

Fig 3 The structure of 5 streptothricins

3 小结与讨论

植物内生菌作为寻找新农用抗生素的一类微生物新资源, 在农药的研究与开发中越来越受到重视。YDG 17 菌株是笔者从冬青卫矛植物根中分离到的一株植物内生放线菌, 其发酵液对多种植物病原真菌具有明显的抑菌活性; 采用 ES/MS/MS 对发酵液通过离子交换后的活性馏分进行分析, 发现其主要为链丝菌素类化合物。链丝菌素是一类广谱的抗菌素, 对植物的多种病原微生物均有很强的抗病性。自 Waksman 等从 *Streptomyces lavendulae* 中分离到该类抗生素的第一个化合物——Streptothricin F 以来, 人们已从多种土壤放线菌 (主要是链霉菌) 中分离到该类化合物, 但可产生链丝菌素的植物内生菌鲜有报道。

本研究发现, YDG 17 菌株发酵液对灰霉病表现出很好的抑制作用, 盆栽试验中, 未稀释的发酵液对番茄灰霉病的保护和治疗效果均明显高于对照药剂 50% 速克灵 WP 3 000 倍稀释液。因此, 作为一种对番茄灰霉病有很好防效的抗生素

YDG 17 菌株具有一定的开发潜力。

本研究采用传统的分类方法, 通过对 YDG 17 菌株的形态特征、培养性状、生理生化特征和细胞壁成分进行研究发现, 其与已知的淡紫灰链霉菌比较接近, 但此菌株不产生硫化氢, 能利用木糖、阿拉伯糖等特点却与已知的淡紫灰链霉菌不同, 疑为一新变种。YDG 17 菌株是否为一新变种以及是否具有独特的 16S DNA 还需要结合分子生物学手段进行进一步验证。

参考文献:

- [1] STIERLE A, STROBEL G, STIERLE D. Taxol and Taxane Production by Taxomyces and reanae [J]. Science, 1993, 260: 214-216.
- [2] GARASHI Y, OGAWA M, SATO Y, et al. Fishapyrone, a Novel Inhibitor of the Infection of Chinese Cabbage by *Alternaria brassicicola*, from *Streptomyces* sp. TP-A0569 [J]. J Antibiotics, 2000, 53: 1117-1122.
- [3] PELAEZ F, CABELLO A, PLATAS G, et al. The Discovery of Enfumafungin, a Novel Antifungal Compound Produced by an Endophytic *Homomera* Species: Biological Activity and Taxonomy of the Producing Organisms [J]. Syst Appl

- Microbiol 2000 23(3): 333-343.
- [4] CASTILLO U F, STROBEL G A, FORD E J et al. Munumbicins: Wide-spectrum Antibiotics Produced by Streptomyces NRRL 30562, Endophytic on *Kennedia nigricans* [J]. Microbiology, 2002, 148: 2675-2685.
- [5] CASTILLO U F, HARPER J K, STROBEL G A, et al. Kakadumycins: Novel antibiotics from Streptomyces sp. NRRL 30566, an Endophyte of *Grevillea pteridifolia* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 224: 183-190.
- [6] CASTILLO U F, STROBEL G A, MULLENBERG K, et al. Munumbicins E-4 and E-5: Novel Broad Spectrum Antibiotics from Streptomyces NRRL 30562 [J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 255: 296-300.
- [7] FULLEN C, SCHMITZ P, MEURER K, et al. New and Bioactive Compounds from Streptomyces Strains Residing in the Wood of *Celastraceae* [J]. Planta, 2002, 216(1): 162-167.
- [8] CHEN Hua-bao (陈华保), YANG Chun-ping (杨春平), WU Wen-jun (吴文君). 放线菌 PS-54 代谢物的农用活性 [J]. Chin J Pestic (农药), 2005, (5): 231-233.
- [9] BUCHANAN R E, GIBBONS N E. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (伯杰细菌鉴定手册) [M]. Group of Bergey's Manual of Determinative Bacteriology of Microbiological Institute of Chinese Academy of Science (中国科学院微生物研究所伯杰细菌鉴定手册翻译组), 译. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1984.
- [10] Taxonomy Group of Microbiology Research Institute in Chinese Academy of Science (中国科学院微生物研究所放线菌分类组编著). Manual of Determinative Streptomyces (链霉菌鉴定手册) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1975.
- [11] 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.
- [12] MU Li-yi (慕立义), WU Wen-jun (吴文君), WANG Kai-yun (王开运). Research Methods on Plant Chemical Protection (植物化学保护研究方法) [M]. Beijing (北京): China Agriculture Press (中国农业出版社), 1997.
- [13] XU Ji-en (徐积恩), ZHU Ming-zhen (朱明珍). Antibiotic (抗生素) [M]. Beijing (北京): Science Press (科学出版社), 1982: 25-26.

(Ed. JIN SH)

收录本刊的国内外重要检索机构

国际:

美国《化学文摘》(CA)

俄罗斯《文摘杂志》(P)

美国“剑桥科学文摘社网站”:

《水资源文摘》(CSA: WR)

《环境科学与污染管理文摘》(CSA: WSPM)

《水科学与渔业文摘》(CSA: ASFA)

《生物科学文摘》(CSA: BS)

《生物技术与生物工程文摘》(CSA: BB)

汤姆森科技信息集团 (Thomson Scientific):

《动物学记录》(ZR)

《生物学文摘》(Biological Abstracts)

《生物学预览》(Biosis Previews)

国内:

“中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊)”

《中国科学引文数据库》来源期刊

《中国学术期刊综合评价数据库 (CAJCED)》统计源期刊

《中国核心期刊 (遴选) 数据库》收录期刊

“万方数据——数字化期刊群”收录期刊

《中国期刊全文数据库》(CJFD) 全文收录期刊

《中文科技期刊数据库》收录期刊

《中国学术期刊文摘》(中、英文版) 收录期刊