

# 土壤来源链霉菌 KIB-717 抗植物病原真菌活性成分研究

尚宁宁<sup>1,2</sup>, 张周鑫<sup>2</sup>, 喻明明<sup>2</sup>, 马亚团<sup>2</sup>, 黄胜雄<sup>2</sup>, 彭 腾<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>成都中医药大学药学院教育部中药材标准化重点实验室 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137; <sup>2</sup>中国科学院昆明植物研究所植物化学与西部植物资源持续利用国家重点实验室, 昆明 650201

**摘要:** 运用中压 MCI 柱色谱和半制备 HPLC 等分离手段对云南省腾冲高黎贡山土壤来源链霉菌 KIB-717 次级代谢产物进行分离纯化, 得到 3 个单体化合物。运用 NMR 和 MS 等波谱方法, 并参考相关文献, 对所得化合物进行结构分析, 分别鉴定为  $\beta$ -rubromycin (**1**)、 $\gamma$ -rubromycin (**2**)、griseorhodin F (**3**)。运用滤纸片法测定这三个化合物对植物病原真菌的抑菌活性。抑菌实验首次证明化合物 **1** 和 **2** 对番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、稻瘟病菌 [*Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.] 等所测植物病原真菌表现出一定的抑制作用。

**关键词:** 链霉菌; 次级代谢产物; 分离鉴定; 植物病原真菌; 抑菌活性

中图分类号: R914.4; R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.1.011

## Secondary Metabolites from a Soil-derived *Streptomyces* sp. KIB-717 and Their Inhibitory Activity on Plant Pathogenic fungi

SHANG Ning-ning<sup>1,2</sup>, ZHANG Zhou-xin<sup>2</sup>, YU Ming-ming<sup>2</sup>, MA Ya-tuan<sup>2</sup>, HUANG Sheng-xiong<sup>2</sup>, PENG Teng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Standardization of Chinese Herbal Medicine, State Key Laboratory Breeding Base of Systematic Research, Development and Utilization of Chinese Medicine Resources, Ministry of Education, College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Phytochemistry and Plant Resources in West China, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China

**Abstract:** Three compounds,  $\beta$ -rubromycin (**1**),  $\gamma$ -rubromycin (**2**) and griseorhodin F (**3**), were separated and purified by medium-pressure MCI column and semi-preparative HPLC from the fermentation broth of *Streptomyces* sp. KIB-717, which was isolated from soil samples collected in Gaoligongshan in Tengchong from Yunnan Province, China. The structures of three isolates were characterized through extensive analysis of NMR and mass spectrometry data and by comparison the NMR data with that reported in literatures. The antifungal experiments demonstrated that compounds **1** and **2** possessed significant antifungal activity against most of the tested plant pathogenic fungi, such as *Botrytis cinerea* and *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr.

**Key words:** *Streptomyces*; secondary metabolites; isolation and identification; plant pathogenic fungi; antifungal activity

链霉菌次级代谢产物结构多样, 生物活性显著, 是开发新天然活性物质的重要源泉。目前, 来源于链霉菌次级代谢产物已广泛应用于基础医疗、农业等领域。如作为抗生素应用于医疗领域的链霉素<sup>[1]</sup>, 以及已广泛应用于烟草病害、辣椒病毒病等病害防治的杀毒菌素<sup>[2]</sup>。为了寻找新的抗植物病原菌的天然活性物质, 本课题组对多株链霉菌的发酵产物进行了活性筛选, 发现从云南腾冲高黎贡山

采集的土壤样本中分离的链霉菌 KIB-717 菌株发酵液乙酸乙酯提取物具有较好的抑制植物病原真菌的活性。本实验对该菌株进行大规模发酵, 对其主要次级代谢产物进行分离纯化及活性追踪, 得到 3 个化合物。抑菌实验首次证明化合物 **1** 和 **2** 对大多数植物病原菌表现出较强的抑制作用, 具有作为抗植物病原真菌药的研究价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与材料

Bruker Avance III-600 核磁共振仪 (TMS 作为内标,  $\delta$  为 ppm), Waters Xevo TQ-S 型超高压液相三重

收稿日期: 2016-09-01

接受日期: 2016-10-25

基金项目: 国家科技支撑计划 (2015BAC05B02); 云南省应用基础研究面上项目 (2016FB021)

\* 通讯作者 Tel: 86-28-61800231; E-mail: Pengteng1973@sina.com

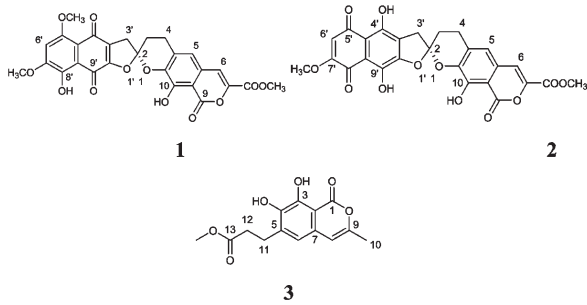


图1 化合物1~3的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of compounds 1-3

四极杆联用质谱仪, YXQ-LS-18SI 高压蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司医疗设备厂), ZQZY-HC 恒温摇床(上海知楚仪器), Hitachi Chromaster 5430 高效液相色谱仪(日立), YMC-Triat C<sub>18</sub>型液相色谱柱(250 × 10 mm I. D.), YMC-Triat C<sub>18</sub>型液相色谱柱(250 × 4.6 mm I. D.), LC3000 型高效液相色谱仪, 中压 MCI 色谱柱(26 mm I. D. × 310 mm), Sephadex LH-20(瑞典 AIRTECH 生物化学试剂公司生产), 薄层色谱硅胶板(青岛海洋化工厂)。其他试剂为国产分析纯试剂(天津市大茂化学试剂厂, 广东环凯微生物科技有限公司)。

## 1.2 发酵菌株

发酵菌株 KIB-717 分离自云南省腾冲高黎贡山采集的土壤样本, 由云南大学云南省微生物研究所西南微生物多样性教育部重点实验室提供。通过对该菌株进行 16S RNA 测序分析, 将测序结果通过 BLAST 与 GenBank 数据库中相关菌株进行同源性比较, 发现菌株 KIB-717 与 *Streptomyces* sp. strain HS-NF-1046 和 *Streptomyces* sp. VTTE-062980 的序列相似度为 100%。结合其形态学特征和培养特性, 确定其为链霉菌属, 命名为 *Streptomyces* sp. KIB-717。植物病原真菌由西北农林科技大学鉴定并提供。发酵菌株与植物病原真菌均保存在昆明植物研究所植物化学与西部植物资源可持续利用国家重点实验室。

## 1.3 培养基及培养条件

固体培养基: 为 MS 培养基, 配方为大豆粉 20.0 g/L(煮沸过滤取滤液), 甘露醇 20.0 g/L, 技术琼脂粉 20.0 g/L, pH = 7.0。

种子培养基: 为 TSB 培养基, 配方为胰蛋白胨 17.0 g/L, 大豆蛋白胨 3.0 g/L, 氯化钠 5.0 g/L, 磷酸氢二钾 2.5 g/L, 右旋葡萄糖 2.5 g/L, pH = 7.3 ±

0.2。

PDA 培养基: 200.0 g 去皮土豆切碎, 加入 1.0 L 水, 煮沸 30 min, 用四层纱布过滤, 滤液定容到 1.0 L, 加入 20.0 g 琼脂粉, 加热搅拌使其溶解, 再加 20.0 g 葡萄糖。

LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g/L, 酵母提取物 5.0 g/L, NaCl 10.0 g/L, 技术琼脂粉 20.0 g/L, pH = 7.4。

将在 MS 平板上活化好的菌株接种到 10 只装有 50 mL 种子液的 250 mL 三角瓶中, 置于摇床中, 在 28 °C、200 rpm 条件下培养 2 d。将种子液按 5% 接种量转接到 40 只盛有 250 mL 发酵培养基的 1 L 三角瓶中, 置于摇床中, 在 28 °C、200 rpm 条件下培养 5 d。

## 1.4 提取与分离

将发酵液以 3500 rpm 的转速离心 20 min。上清液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次, 乙酸乙酯相减压浓缩, 得发酵液粗提物。菌丝体用丙酮浸泡过夜后过滤, 减压浓缩, 乙酸乙酯萃取 3 次, 乙酸乙酯相减压浓缩, 得菌体粗提物。经 HPLC 分析, 合并发酵液、菌体粗提物, 减压浓缩, 得总粗提物 2.6 g。中压 MCI 柱层析分离, 依次用甲醇-水(10:90-100:0)、氯仿-甲醇(1:1)梯度洗脱, 经 TLC 分析, 合并洗脱液得到四个组分。氯仿-甲醇(1:1)组分经半制备 HPLC 分离, 0.1% 醋酸乙腈(B)和 0.1% 醋酸水(A)为流动相, 以 3 mL/min 的流速梯度洗脱(0~9 min, 60% B; 9~15 min, 80% B; 15-18 min, 100% B), 得到化合物 1(12.6 mg)和化合物 2(2.0 mg)。甲醇-水(70:30)组分经 Sephadex LH-20(甲醇洗脱)分离, TLC 分析, 合并洗脱液得到 4 个组分(Fr 1-4)。Fr3 组分用半制备 HPLC 分离, 甲醇(B)和水(A)为流动相, 以 3 mL/min 的流速梯度洗脱(0~14 min, 55% B; 14~25 min, 65% B; 25-29 min, 100% B), 得化合物 3(2.0 mg)。

## 1.5 活性测试(滤纸片法)

将保存于石蜡油中指示菌株腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)、尖孢镰刀菌 1(*Fusarium oxysporum* Schl.)、尖孢镰刀菌 2(*Fusarium oxysporum*)、番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、棉花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. Sp. *Vasinfectum*)、马铃薯干腐病菌(*Fusarium solani*)、稻瘟病菌[*Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr.]、小麦赤霉病菌(*Gibberella saubineti*)、灰黄青霉(*Penicillium griseofulvum* HL)及苹果炭疽

病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 分别接种至 PDA 培养基上活化培养, 28 °C 避光培养 4 d, 待其菌落基本长满培养皿待用。将待测化合物和多菌灵均配制成浓度为 2.0 mg/mL 的丙酮溶液备用。将活化好的植物病原真菌分别加入温度适宜 (约 40 °C) 的 PDA 培养基中 (300 mL PDA 培养基中加入两个培养皿中的菌体)。然后, 将已接菌的 PDA 培养基分别倒入培养皿中 (每个培养皿倒入 25 mL 培养基), 放凉后, 十字线标记。在无菌滤纸片 (用打孔器将滤纸片加工成直径为 5 mm) 中心滴加 10  $\mu$ L 待测化合物, 待溶剂挥干后用灭菌过的镊子将其放置已接菌的平板上。每块平板均以丙酮作阴性对照, 以多菌灵作阳性对照。30 °C 培养箱中培养 24 h 后观察抑菌圈大小, 用十字交叉法测量抑菌圈直径。

## 2 结果与分析

### 2.1 化合物结构鉴定

**化合物 1** 红色粉末; 分子式为  $C_{27}H_{20}O_{12}$ ; ESI-MS  $m/z$  537  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 12.81 (1H, s, H-8'), 11.03 (1H, s, H-10), 7.43 (1H, s, H-6), 6.91 (1H, s, H-5), 6.74 (1H, s, H-6'), 4.00 (6H, s, 5'-OCH<sub>3</sub>, 7'-OCH<sub>3</sub>), 3.95 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.64 (1H, d,  $J = 18.3$  Hz, H-3'), 3.42 (1H, m, H-4), 3.31 (1H, d,  $J = 18.3$  Hz, H-3'), 2.97 (1H, m, H-4), 2.47 (1H, m, H-3), 2.30 (1H, m, H-3);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 181.9 (C-9'), 179.3 (C-4'), 164.9 (C-9), 160.5 (7-COOCH<sub>3</sub>), 158.8 (C-5'), 155.4 (C-7'), 154.9 (C-9'a), 150.6 (C-10), 149.6 (C-8'), 141.3 (C-7), 141.2 (C-10a), 131.6 (C-4a), 127.5 (C-5a), 127.4 (C-3'a), 118.2 (C-5), 113.6 (C-6), 111.1 (C-2), 114.8 (C-8'a), 110.5 (C-4'a), 106.6 (C-9a), 103.6 (C-6'), 57.1 (7'-OCH<sub>3</sub>), 56.4 (5'-OCH<sub>3</sub>), 53.0 (7-COOCH<sub>3</sub>), 40.1 (C-3'), 29.6 (C-3), 22.1 (C-4)。以上数据与文献报道的波谱数据一致<sup>[3]</sup>, 故鉴定为  $\beta$ -rubromycin。

**化合物 2** 红色粉末; 分子式为  $C_{26}H_{18}O_{12}$ ; ESI-MS  $m/z$  513  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 13.03 (1H, s, 9'-OH), 12.27 (1H, s, 4'-OH), 11.02 (1H, s, 10-OH), 7.44 (1H, s, H-6), 6.93 (1H, s, H-5), 6.18 (1H, s, H-6'), 3.96 (3H, s, 7'-OCH<sub>3</sub>), 3.92 (3H, s, 7-OCH<sub>3</sub>), 3.77 (1H, d,  $J = 17.9$  Hz, H-3'), 3.47 (1H, m, H-4), 3.43 (1H, d,  $J = 17.9$  Hz, H-3'), 2.99 (1H, m, H-4), 2.51 (1H, m, H-3), 2.35 (1H, m, H-3);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 183.7 (C-5'), 179.2 (C-8'), 164.9 (C-9), 160.5 (7-COOCH<sub>3</sub>), 160.0 (C-7'), 158.8 (C-4'), 153.5 (C-9'a), 150.6 (C-10), 150.0 (C-9'), 141.3 (C-10a), 141.2 (C-7), 131.5 (C-4a), 127.4 (C-5a), 122.9 (C-3'a), 118.2 (C-5), 113.6 (C-6), 113.0 (C-8'a), 111.6 (C-2), 110.1 (C-6'), 106.6 (C-9a), 106.5 (C-4'a), 56.8 (7'-OCH<sub>3</sub>), 53.0 (7-COOCH<sub>3</sub>), 39.5 (C-3'), 29.6 (C-3), 22.3 (C-4)。以上数据与文献报道的波谱数据一致<sup>[3]</sup>, 故鉴定为  $\gamma$ -rubromycin。

**化合物 3** 黄色粉末; 分子式为  $C_{14}H_{14}O_6$ ; ESI-MS  $m/z$  279  $[M+H]^+$ ;  $^1H$  NMR (600 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 6.68 (1H, s, H-6), 6.18 (1H, s, H-8), 3.67 (3H, s, 13-OMe), 3.04 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-11), 2.7 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-12), 2.25 (3H, s, H-10);  $^{13}C$  NMR (150 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$ : 173.3 (C-13), 166.8 (C-1), 151.7 (C-9), 146.8 (C-3), 141.1 (C-4), 136.2 (C-5), 129.2 (C-7), 116.0 (C-6), 104.5 (C-8), 104.4 (C-2), 51.7 (13-OCH<sub>3</sub>), 33.1 (C-12), 26.2 (C-11), 19.2 (C-10)。以上数据与文献报道的波谱数据一致<sup>[4]</sup>, 故鉴定为 griseorhodin F。

### 2.2 化合物抑菌活性结果

以 10 株病原真菌菌株为指示菌检测三个化合物的抑菌活性。结果显示化合物 1 和 2 对大多数所测植物病原真菌具有一定的抑制活性。化合物 3 对所测植物病原真菌均没有活性 (见表 1)。

表 1 化合物 1~3 抑菌圈直径 (mm)

Table 1 The diameter of inhibition zone of compounds 1-3 (mm)

植物病原真菌 Plant pathogenic fungi	丙酮 Acetone	多菌灵 Carbendazim	1	2	3
腐皮镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	0	47.00	15.00	10.00	0
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i> Schl.	0	34.00	10.00	11.00	0

植物病原真菌 Plant pathogenic fungi	丙酮 Acetone	多菌灵 Carbendazim	1	2	3
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	0	45.00	10.00	8.00	0
番茄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	0	0	17.00	15.00	0
棉花枯萎病菌 <i>Fusarium oxysporum f. sp. Vasinfectum</i>	0	36.00	12.00	10.00	0
马铃薯干腐病菌 <i>Fusarium solani</i>	0	24.00	15.00	12.00	0
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i> (Hebert) Barr.	0	0	18.00	0	0
小麦赤霉病菌 <i>Gibberella saubinetii</i>	0	47.00	0	0	0
灰黄青霉 <i>Penicillium griseofulvum</i> HL	0	43.00	0	0	0
苹果炭疽病菌 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	0	50	0	0	0

注:表中数据均为3次重复平均值。

Note: Data given were from 3 duplicates.

### 3 讨论

本研究从链霉菌 KIB-717 菌株发酵液中分离得到 3 个化合物。其中  $\beta$ -rubromycin(1)、 $\gamma$ -rubromycin(2) 由 Brockmann H 等人<sup>[6]</sup>报道分离自链霉菌属菌株次级代谢产物。它们是一类具有很好生物活性和独特分子骨架的天然产物<sup>[12,13]</sup>。目前,已有很多文献报道<sup>[5-11]</sup> $\beta$ -rubromycin(1) 和  $\gamma$ -rubromycin(2) 具有显著的抑制枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌等革兰氏阳性细菌生长的活性,以及抑制 HIV-1 逆转录酶活性和较弱的抑制肿瘤细胞生长的活性。但是此类化合物在抑制植物病原真菌方面的活性目前尚未见报道。本实验首次发现化合物 1 和 2 对大多植物病原真菌具有一定的抑制作用,为进一步研究开发抑制植物病害的生物农药奠定基础。

#### 参考文献

- Li SF (李书芬). New benzoquinone ansamycins from *Streptomyces hygroscopicus* and the exploration of secondary metabolites from *Streptomyces* by LC-DAD-MS. Beijing: Peking Union Medical College (北京协和医学院), PhD. 2014.
- Wang XX (王雪啸). Isolation, purification and Identification of agro active compounds from secondary metabolites produced by soil actinomycete SPRIC-1. Shanghai: East China University of Science and Technology (华东理工大学), MSc. 2015.
- Puder C, Loya S, Hizi A, et al. Structural and biosynthetic investigations of the Rubromycins. *Eur J Org Chem*, 2000, 2000:729-735.
- Lin Z, Zachariah MM, Marett L, et al. Griseorhodins D-F,

Neuroactive intermediates and end products of Post-PKS Tailoring modification in Griseorhodin biosynthesis. *J Nat Prod*, 2014, 77:1224-1230.

- Brasholz M, Sörgel S, Azap C, et al. Rubromycins: Structurally intriguing, biologically valuable, synthetically challenging antitumour antibiotics. *Eur J Org Chem*, 2007, 2007:3801-3814.
- Brockmann H, Zecek A. Rubromycine, III. Die Konstitution von  $\alpha$ -Rubromycin,  $\beta$ -Rubromycin,  $\gamma$ -Rubromycin and  $\gamma$ -iso-Rubromycin. *Chem Ber*, 1970, 103:1709-1726.
- Atkinson DJ, Brimble MA. Isolation, biological activity, biosynthesis and synthetic studies towards the rubromycin family of natural products. *Nat Prod Rep*, 2015, 32:811-840.
- Bernardo CEP, Silva PJ. Computational development of rubromycin-based lead compounds for HIV-1 reverse transcriptase inhibition. *Peer J*, 2014, 2:e470.
- Sperry J, Wilson ZE, Rathwell DCK, et al. Isolation, biological activity and synthesis of benzannulated spiroketal natural products. *Nat Prod Rep*, 2010, 27:1117-1137.
- Kiran KG, Palaniswamy M, Angayarkanni J. Human telomerase inhibitors from microbial source. *World J Microbiol Biotechnol*, 2015, 31:1329-1341.
- Yuen TY, Ng YP, Ip FCF, et al. Telomerase inhibition studies of novel spiroketal-containing rubromycin derivatives. *Aust J Chem*, 2013, 66:530-533.
- Wei LP (魏立平). Total synthesis of (±)- $\gamma$ -rubromycin. Lanzhou University (兰州大学), PhD. 2012.
- Wang WJ (王文晶). The first total synthesis of (±)- $\delta$ -rubromycin, (+)-Coriandrone A and B & Studies on the total synthesis of vigatalide B. Lanzhou: Lanzhou University (兰州大学), PhD. 2014.