

北极海洋细菌 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 抑菌活性及其代谢产物研究

何培青^{1,2,3}, 李江^{1,2,3}, 刘彩云^{1,2,3}, 张停^{4,5},
王佩圣⁶, 林学政^{1,2,3}

- (1. 青岛市海洋天然产物研究开发重点实验室, 山东 青岛 266061; 2. 国家海洋局第一海洋研究所, 山东 青岛 266061;
3. 国家海洋局海洋生物活性物质重点实验室, 山东 青岛 266061; 4. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003;
5. 教育部海洋药物重点实验室 山东省海洋药物重点实验室, 山东 青岛 266003;
6. 青岛市农业科学研究院, 山东 青岛 266100)

摘要: 从 2014 年第六次中国北极科学考察采集的海洋沉积物中, 分离获得了具有抑制农作物病原真菌活性的菌株 *Pseudoalteromonas* sp. 2018。测定了该菌株对病原真菌的抑制范围和对黄瓜白粉病的大棚防治效果, 并对该菌株代谢产物通过硅胶色谱、凝胶色谱及半制备 HPLC 等进行分离纯化, 通过质谱 (MS)、氢谱 (¹H NMR) 和碳谱 (¹³C NMR) 等进行结构鉴定。研究结果表明, *Pseudoalteromonas* sp. 2018 菌株对辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*)、褐孢霉 (*Fulvia fulva*)、链格孢 (*Alternaria alternata*)、黄瓜专化型尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、番茄专化型尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 和细极链格孢 (*Alternaria tenuissima*) 等具有抑制作用, 对大棚黄瓜白粉病的防治效果达 66.7%; 研究分离获得了环(脯-酪)二肽、环(脯-异亮)二肽、环(脯-亮)二肽和环(脯-苯丙)二肽, 其中环(脯-酪)二肽和环(脯-亮)二肽对测试病原真菌的最小抑制浓度为 125~500 μg/mL。该研究为极地微生物农用资源的开发利用提供理论参考。

关键词: 北极海洋细菌; 抑制农作物病原真菌; 环二肽

中图分类号: Q935

文献标识码: A

文章编号: 1671-6647(2018)01-0098-10

doi: 10.3969/j.issn.1671-6647.2018.01.009

由真菌引起的农作物病害已成为威胁全球粮食安全的重要问题^[1]。农作物种植种类和数量的增加、农作物全球化贸易和运输、全球气候和环境的变化、以及病原真菌对新的生态系统的适应, 都导致了真菌病害日益严重^[2]。目前, 人工合成杀菌剂仍是控制农作物真菌病害主要的和最有效的手段, 但同时也对人体和环境造成危害^[3]。微生物防治农作物真菌病害具有安全、高效、对环境友好等优势, 已成为国内外广泛关注的化学杀菌剂的替代途径^[4]。为了获得新颖、高效的活性菌株及其代谢产物, 国内外学者也将菌株筛选范围从中温、低盐等常规环境扩展到极端环境^[5]。

南北极海洋环境具有特殊的地理及气候特征, 微生物为了适应低温、高盐、高辐射等条件, 形成独特的基因组成、酶学特性和代谢调控机制, 是新颖的活性菌株及其代谢产物的宝贵资源^[5]。近些年, 国内外研究者在南北极区域陆续开展了抑制农作物病原真菌的微生物及代谢产物的研究工作。Ren 等^[6]从南极企鹅岛沉积物分离获得棘孢木霉 (*Trichoderma asperellum*), 其产生的抗菌肽对茄链格孢 (*Alternaria solani*) 和稻梨孢 (*Pyricularia oryzae*) 具有抑制作用。方海霞等^[7]从南大洋海水筛选获得假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、嗜冷菌属 (*Psychrobacter*) 和假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 菌株, 对尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、

收稿日期: 2017-03-16

资助项目: 青岛市基础科学研究计划项目——具有农用活性的极端微生物及化合物资源库的构建及应用(14-2-4-14-jch); 海洋公益性行业科研专项——海藻寡糖设施蔬菜抗病诱导剂开发(201505026-04); 国家海洋经济创新发展区域示范资助的重要项目——海洋物种质资源库建设(12PYY001SF08-HYYS-1)

作者简介: 何培青(1972-), 女, 山东济南人, 博士, 副研究员, 主要从事海洋微生物方面研究。E-mail: hepeiying@fio.org.cn

(王佳实 编辑)

辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 和立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 等 7 种农作物病原真菌具有抑制作用。彭玉娇等^[8]从南极假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) C 分离获得的环(苯丙-脯)二肽对尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 具有抑制作用。王红梅等^[9]从南极假单胞菌 (*Pseudomonas* sp.) P4-11 获得了抑制尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 的壬基酚聚氧乙烯醚类化合物。Schuhmann 等^[10]从北极海冰需盐杆菌 (*Salegentibacter* sp.) 分离获得新颖的芳香族硝基化合物,对稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 具有抑制作用。赵惠娅等^[11]从北极海洋沉积物中分离获得假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 和假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*) 菌株,对尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*) 具有抑制作用。Guo 等^[12]从北极海水中获得芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) A053 对农作物病原真菌具有广泛的抑制作用,包括盘长孢状刺盘孢 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、长柄链格孢 (*Alternaria longipes*) 和核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 等。可见,南北极海洋环境蕴藏着丰富的活性菌株资源,且具有广泛的抑菌范围和产生新化合物的潜力,而北极在该领域的研究较南极的少。

本研究从 2014-07-09 中国第六次北极科学考察采集的表层沉积物样品中,分离获得一株 *Pseudoalteromonas* sp. 菌株 2018,研究了菌株对农作物病原真菌的抑制作用,及对黄瓜白粉病的大棚防治效果,并对其活性代谢产物进行了分离纯化和结构解析。研究为极地微生物农用资源的开发利用提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株和测试植物

从 2014 年中国第六次北极科学考察采集的海洋沉积物样品中分离获得了 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 菌株。16S rDNA 部分序列与埃利氏假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas elyakovii*) 的相似度为 99%,已提交 Genbank 数据库,序列号为 KY628812。

农作物病原真菌由青岛市农业科学研究院提供,包括辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*)、褐孢霉 (*Fulvia fulva*)、链格孢 (*Alternaria alternata*)、黄瓜专化型尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、番茄专化型尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)、葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*)、拟枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*) 和细极链格孢 (*Alternaria tenuissima*)。小区防效实验的供试黄瓜品种为绿地一号。

1.1.2 培养基

MY 固体培养基用于菌株的活化,包含:(1)葡萄糖 1 g,胰蛋白胨 1 g,酵母粉 1 g,酪蛋白氨基酸 1 g,海盐(Sigma,美国) 30 g, NH_4Cl 1 g, KH_2PO_4 0.35 g,2-N-吗啉乙烷磺酸(MES) 1.95 g,琼脂 15 g,去离子水 1 L;(2)连二亚硫酸钠 0.02 g;(3)微量元素 SL-10 溶液 1 mL,维生素溶液 1 mL 和促生长因子溶液 1 mL。培养基配置过程中,(1)中的组分 120 °C 灭菌 15 min,待冷却至 45 °C 时,分别添加(2)和(3)中单独配置并除菌的各组份;(2)和(3)各组分的制备和除菌方法参照文献^[13]。培养基的终 pH 约为 6.0。改良的 MY 液体培养基用于菌株的大规模发酵,包含:葡萄糖 1 g,胰蛋白胨 1 g,酵母粉 1 g,酪蛋白氨基酸 1 g,海盐(Sigma,美国) 10 g, NH_4Cl 1 g, KH_2PO_4 0.35 g,2-N-吗啉乙烷磺酸(MES) 1.95 g,去离子水 1 L。PDA 培养基(中国微生物菌种保藏管理委员会,1983)^[14]用于病原真菌的培养。麦芽汁肉汤培养基,用于化合物对病原真菌最小抑制浓度的测定,包含:胰蛋白胨 2 g,麦芽糖 17 g,去离子水 1 L。

1.2 方 法

1.2.1 菌株培养

将-80 °C 甘油管保存的 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 菌株接种到 MY 固体培养基上,12 °C 培养 7 d 进

行活化。挑取单菌落接种于 MY 液体培养基中,于 12 °C,150 r/min 转速培养 48 h,作为发酵种子液。将种子液以 5% 接种量接种于 50 L 全温发酵罐中,于 12 °C,120 r/min 转速,14 m³/h 通气量下培养 7 d。

1.2.2 抑菌活性的测定

菌株发酵液以 7 500 r/min 离心 15 min 获得上清液。参照打孔法^[14],采用打孔器在含有病原真菌孢子(1×10³个/mL)的 PDA 培养基上(链霉素 100 μg/mL)打孔,用融化的 PDA 培养基封底后,取 250 μL 发酵上清液置于孔内,20 °C 培养 48 h 后,测量抑菌圈直径大小来评价抑菌活性。参照纸碟法^[14],将分离纯化过程中所获得的不同组分溶于 200 μL 甲醇,将纸碟浸于甲醇溶液并吹干后,置于含有病原真菌孢子(1×10³个/mL)的 PDA 培养基上(链霉素 100 μg/mL),20 °C 培养 48 h 后,测量抑菌圈直径大小来评价活性。

室内活性测定在青岛市农业科学研究院进行。将菌株发酵液采用无菌水倍半稀释,取 10 mL 加入等体积冷却至 45 °C 的 PDA 培养基(含链霉素 100 μg/mL),配制成含 50%,25%,12.5% 和 6.3%(V/V)发酵液的平板。将 PDA 培养基采用无菌水稀释 1 倍后设为对照。采用 PDA 培养基,将不同病原真菌于 20 °C 培养 96 h 后,采用 5 mm 直径的打孔器在菌落外缘切取菌饼,将菌饼接种于含不同浓度发酵液的平板上,菌丝面朝上,于 20 °C 培养 72 h 后,每个菌落交叉测量 2 次直径,取平均值。菌落增长直径=菌落直径-菌饼直径;抑制生长率(%)=(对照菌落增长直径-处理菌落增长直径)/对照菌落增长直径×100%。

1.2.3 小区防效实验

本实验在青岛市即墨绿地研究所蔬菜大棚进行。将 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 菌株发酵液与清水按 1:1 和 1:2(V/V)稀释配置成两个浓度的药剂,将 30% 醚菌酯可湿性粉剂配成 1 000 倍稀释液。在田间选取发病程度基本一致的黄瓜植株,将不同药剂喷施到叶片上,同时设清水对照。实验共喷药 2 次,第 1 次喷药时间为 2016-10-18,第 2 次喷药时间为 2016-10-24。于 10-29 调查每株黄瓜的所有叶片,以每一叶片上病斑面积占整个叶面积的百分率来分级,分级方法为:0 级,无病斑;1 级,病斑面积占整个叶面积的 5% 以下;3 级,病斑面积占整个叶面积的 6%~10%;5 级,病斑面积占整个叶面积的 11%~20%;7 级,病斑面积占整个叶面积的 21%~50%;9 级,病斑面积占整个叶面积的 50% 以上。病情指数=Σ(病级叶数×该病级值)/(调查总叶数×最高病情级数值)×100;防治效果(%)=(清水对照区病情指数-药剂处理区病情指数)/清水对照区病情指数×100%。

1.2.4 代谢产物的分离纯化

将获得的 40 L 菌株发酵上清液以等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,于 25 °C 减压蒸馏获得 4.5 g 粗浸膏。将粗浸膏于甲醇和二氯甲烷混和液(V_{甲醇}:V_{二氯甲烷}=1:1)中完全溶解,采用 RP-18 反相硅胶柱,以不同体积比的甲醇和水作为流动相进行梯度洗脱,梯度设置依次为 5%(V_{甲醇}:V_水=5:95),10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90% 和 100%,最后以甲醇和二氯甲烷的混合液(V_{甲醇}:V_{二氯甲烷}=1:1)洗脱,共获得 14 个组分。结合活性测试结果,将洗脱的 14 个组分整合为 Fr1,Fr2,Fr3,Fr4 和 Fr5。其中 Fr3 依次通过 Amersham LH-20 凝胶色谱柱(V_{氯仿}:V_{甲醇}=1:1)和 Agilent 1100 系列半制备型 HPLC(色谱柱 Kromasil 100-5C8(10×250 mm,5 μm);V_{甲醇}:V_水=15:85)进行分离,获得化合物 1(RT₁=16.5 min,6.5 mg)。组分 Fr1 于硅胶层析柱(青岛海洋化工厂,200~300 目;V_{石油醚}:V_{乙酸乙酯}=3:1)去除杂质,并通过 Amersham LH-20 凝胶色谱柱(甲醇)后,于半制备型 HPLC 以 V_{甲醇}:V_水=33:67 洗脱获得化合物 2(RT₂=20 min,4.5 mg),以 V_{甲醇}:V_水=30:70 洗脱获得化合物 3(RT₃=14.6 min,3.5 mg)和化合物 4(RT₄=15.5 min,2.5 mg)。检测波长为 UV=254/201 nm,流速为 2.5 mL/min。

1.2.5 化合物结构解析及鉴定

实验在中国海洋大学医药学院完成。NMR 测定采用 Agilent 500 MHz DD2 型核磁共振仪,以 TMS 为内标;ESI-MS 采用 Q-TOF Ultima Global GAA076 LC-MS 质谱仪。旋光测试于 JASCO P-1020 旋光仪上完成。

1.2.6 化合物最小抑制浓度(MIC)的测定

化合物最小抑制浓度(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)的测定参照 Magnusson 等^[15]的方法

进行。分别称取 2 mg 测试样品,溶于 1 mL 8.0%(V/V)的甲醇溶液,配制成 2 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液,进一步倍半稀释配制成 1~1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 抑菌溶液。每个微孔中加入 50 μL 不同浓度的抑菌溶液和 50 μL 麦芽汁肉汤培养基(含有 2×10^4 个真菌孢子),以两性霉素 B 为阳性对照,20 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48 h,肉眼观察孔中真菌的生长。MIC 为真菌孢子萌发完全被抑制时的最低浓度。

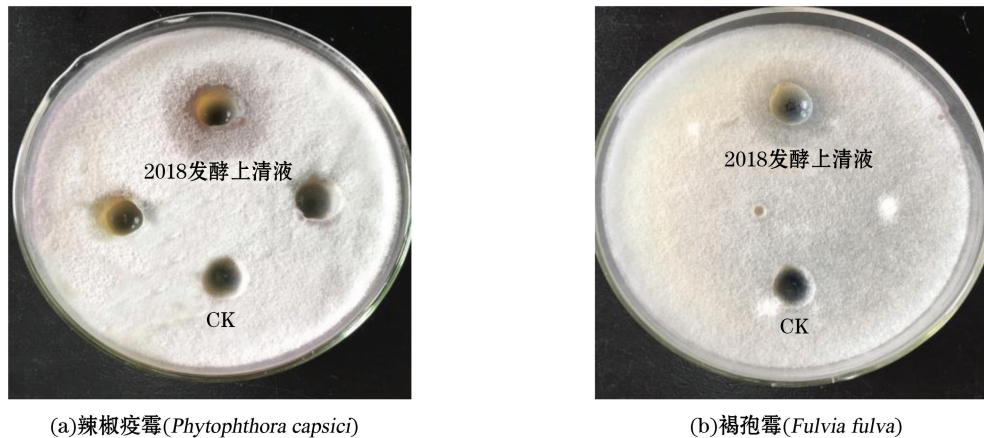
1.2.7 数据统计分析

活性测定和防效实验至少重复 3 次,数据统计分析采用 SPSS(17.0)软件进行。结果值=平均值 \pm SE,在 $p=0.05$ 水平上进行组间显著性差异的数据分析。

2 结果与分析

2.1 抑菌活性

如图 1 所示,*Pseudoalteromonas* sp. 2018 菌株发酵上清液对辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)和褐孢霉(*Fulvia fulva*)有较强的抑菌作用,抑菌圈直径均在 2 cm 以上。



(a)辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)

(b)褐孢霉(*Fulvia fulva*)

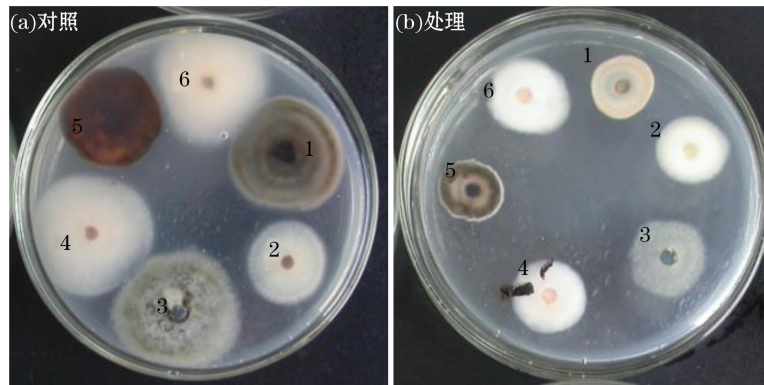
图 1 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 上清液对辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)和褐孢霉(*Fulvia fulva*)的抑制作用
Fig.1 Inhibition of *Pseudoalteromonas* sp. 2018 fermentation broth against *Phytophthora capsici* Leonian and *Fulvia fulva*

菌株发酵液对 6 种病原真菌的抑制生长率结果见表 1 和图 2。采用含 50%发酵液处理时,黄瓜专化型尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、番茄专化型尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)和细极链格孢(*Alternaria tenuissima*)的抑菌生长率均在 50%及以上。含 25%发酵液的处理仍对 4 株病原真菌有较好的抑制作用(抑制率 35%及以上)。

表 1 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 发酵上清液对 6 种农作物病原真菌的抑制生长率

Table 1 Inhibition ratios of *Pseudoalteromonas* sp. 2018 fermentation liquid on six plant pathogenic fungi

测试真菌	抑制生长率			
	50%发酵液	25%发酵液	12.5%发酵液	6.3%发酵液
链格孢(<i>Alternaria alternata</i>)	41.3 \pm 3.5	22.0 \pm 0.0	18.3 \pm 2.0	16.0 \pm 3.0
拟枝孢镰孢(<i>Fusarium sporotrichioides</i>)	27.4 \pm 3.0	34.8 \pm 1.9	16.7 \pm 3.0	9.1 \pm 0.2
葡萄座腔菌(<i>Botryosphaeria dothidea</i>)	39.9 \pm 1.8	35.8 \pm 2.0	18.9 \pm 1.4	10.5 \pm 1.8
黄瓜专化型尖孢镰孢(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>)	52.7 \pm 2.1	45.3 \pm 1.4	38.7 \pm 2.2	29.1 \pm 2.8
细极链格孢(<i>Alternaria tenuissima</i>)	57.5 \pm 1.7	40.4 \pm 2.7	42.9 \pm 3.0	31.1 \pm 2.7
番茄专化型尖孢镰孢(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>)	49.5 \pm 1.5	25.0 \pm 1.4	23.8 \pm 1.5	20.5 \pm 0.8



注: 1. 链格孢 (*Alternaria alternata*); 2. 拟枝孢镰孢 (*Fusarium sporotrichioides*); 3. 葡萄座腔菌 (*Botryosphaeria dothidea*); 4. 黄瓜专业化型尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*); 5. 细极链格孢 (*Alternaria tenuissima*); 6. 番茄专业化型尖孢镰孢 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)

图2 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 对农作物病原真菌生长的抑制作用
(平板含 25% 的 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 发酵液)

Fig. 2 Growth inhibition of *Pseudoalteromonas* sp. 2018 against plant pathogenic fungi
(plates contain 25% fermentation of *Pseudoalteromonas* sp. 2018)

2.2 菌株对黄瓜白粉病的大棚防治效果

从 10-29 调查结果(表 2)可知,采用菌株发酵液的 1:1 和 1:2 稀释液喷施黄瓜 11 d 后,黄瓜白粉病的病情指数显著低于清水对照组,其防治效果分别为 66.7% 和 62.4%。30% 醚菌酯可湿性粉剂 1 000 倍稀释液对黄瓜白粉病的防治效果为 88.4%,高于菌株发酵液。

表 2 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 对黄瓜白粉病的防治效果

Table 2 Control effect of *Pseudoalteromonas* sp. 2018 on cucumber powdery mildew

处 理	病情指数	防治效果/%
发酵液 1:1 稀释	21.8±0.7 *	66.7±0.7
发酵液 1:2 稀释	24.5±1.0 *	62.4±1.9
30% 醚菌酯可湿性粉剂 1 000 倍稀释	7.6±0.3 *	88.4±0.8
清水对照	65.2±0.6	

注:空白处为无数据; * 为 $p=0.05$ 水平上,处理组与对照组呈显著性差异

2.3 化合物的结构鉴定

分离纯化获得了 4 个化合物,其结构式如图 3 所示。

化合物 1:黄色粉末。¹³C-NMR(DEPT)数据表明,化合物 1 共获得 14 个碳信号,包括 4 个亚甲基,6 个次甲基和 4 个季碳。¹H-NMR 结果显示了苯环质子信号 δ 7.01(2H,d)和 6.62(2H,d),其偶合常数均为 8.4,表明结构中存在对位取代的苯环。根据 H-10 与 C-2,C-3,C-11,C-12,C-16 的 HMBC 远程相关关系,确定结构中含有酪氨酸片段。根据 H-7 与 C-8,C-9 和 H-6 与 C-5,C-7 的 HMBC 远程相关关系,确定结构中含有脯氨酸片段。ESI-MS 测得化合物的准分子离子峰为 m/z 260.9[M+H]⁺,确定其相对分子质量为 260,分子式为 C₁₄H₁₆N₂O₃。旋光测试结果显示 $[\alpha]_D^{20} = -33^\circ(c 1.3, MeOH)$,经上述特征分析和文献[15]比对,该

化合物的结构确定为环(脯-酪)二肽。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 4.03(1H, s, H-3), 7.83(1H, s, NH-4), 4.04(1H, t, 8.4; H-6), 1.98(1H, m, H-7a), 1.39(1H, m, H-7b), 1.69(2H, m, H-8), 3.36(1H, m, H-9a), 3.32(1H, m, H-9b), 2.89(1H, s, H-10a), 3.23(1H, s, H-10b), 7.01(1H, d, 8.4; H-12), 6.62(1H, d, 8.4; H-13), 6.62(1H, d, 8.4; H-15), 7.01(1H, d, 8.4; H-16), 9.17(1H, s, OH-14); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 165.50(s, C-2), 56.42(d, C-3), 169.29(s, C-5), 58.80(d, C-6), 28.25(t, C-7), 22.27(t, C-8), 44.96(t, C-9), 35.11(t, C-10), 127.45(s, C-11), 131.21(d, C-12, C-16), 115.17(d, C-13, C-15), 156.29(s, C-14)。

化合物 2: 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ δ 7.96(1H, br s), 4.06(1H, br t, $J = 7.6$ Hz), 4.32(1H, br t, $J = 5.5$ Hz), 以及 $^{13}\text{C-NMR}$ δ 169.46 和 165.48 表明分子可能为环二肽类化合物。根据 $^1\text{H-NMR}$ δ 7.15-7.24(5H), 4.32(1H, br t, $J = 5.5$ Hz), 2.98(1H, dd, $J = 14.8, 6.4$ Hz), 3.69(1H, dd, $J = 14.8, 6.4$ Hz) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ δ 137.3, 130.21, 128.37, 128.37, 126.75, 126.75 推测分子含有苯丙氨酸残基。由于 $^1\text{H-NMR}$ δ 7.96(1H, br s) 只显示一个酰胺质子信号, 再结合 3.00(1H, dt, $J = 12.0, 8.4, 4.0$ Hz), 3.23(1H, dt, $J = 12.0, 8.0$ Hz), 1.39(1H, m), 1.69(1H, m), 1.96(1H, m), 1.99(1H, m) 等信号可知另一部分为脯氨酸残基。经上述特征分析和文献[16]比对, 确定化合物的结构定为环(脯-苯丙)二肽。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.00(1H, dt, H-3a, $J = 12.0, 8.4, 4.0$ Hz), 3.23(1H, dt, H-3b, $J = 12.0, 8.0$ Hz), 1.39(1H, m, H-4a), 1.69(1H, m, H-4b), 1.96(1H, m, H-5a), 1.99(1H, m, H-5b), 4.06(1H, br t, H-6, $J = 7.6$ Hz), 7.96(1H, br s, NH-8), 4.32(1H, br t, H-9, $J = 5.5$ Hz), 2.98(1H, dd, H-10a, $J = 14.8, 6.4$ Hz), 3.69(1H, dd, H-10b, $J = 14.8, 4.6$ Hz), 7.24(1H, dd, H-2', $J = 8.4, 1.8$ Hz), 7.15(1H, dd, H-3', $J = 8.4, 1.8$ Hz), 7.21(1H, dd, H-4', $J = 8.4, 8.4$ Hz), 7.16(1H, dd, H-5', $J = 8.4, 1.8$ Hz), 7.22(1H, dd, H-6', $J = 8.4, 1.8$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 169.46(C-1), 45.01(C-3), 22.32(C-4), 28.20(C-5), 58.83(C-6), 165.48(C-7), 56.16(C-9), 35.75(C-10), 137.70(C-1'), 128.37(C-2'), 126.75(C-3', C-5'), 130.21(C-4'), 128.37(C-6')。

化合物 3: 白色粉末。 $^{13}\text{C-NMR}$ (DEPT) 数据表明, 化合物 3 共获得 11 个碳信号, $^1\text{H-NMR}$ δ 7.92(1H, s), 4.08(1H), 3.95(1H, s) 和 $^{13}\text{C-NMR}$ δ 170.58, 165.95 表明分子可能为环二肽类化合物。 $^1\text{H-NMR}$ 的一个酰胺质子信号 δ 7.92(1H, br s), 以及 3.30(2H, m), 2.13(1H, m), 1.78(2H, m), 1.81(1H, m) 等信号可知另一部分为脯氨酸残基。化合物阳离子 ESI-MS 在 m/z 233[M+Na] $^+$ 位置出现准分子离子峰。经上述特征分析和文献[17]比对, 将该化合物的结构定为环(脯-异亮)二肽。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.30(2H, m, H-3), 1.78(2H, m, H-4), 2.13(1H, m, H-5a), 1.81(1H, m, H-5b), 4.08(1H, H-6) 7.92(1H, br s, NH-8), 3.95(1H, s, H-9), 2.02(1H, m, H-10), 1.33(2H, m, H-11), 0.81(3H, t, H-12, $J = 7.4$ Hz), 0.96(3H, d, H-13, $J = 7.1$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.58(C-1), 45.05(C-3), 22.45(C-4), 28.35(C-5), 58.62(C-6), 165.95(C-7), 59.61(C-9), 35.30(C-10), 24.30(C-11), 12.69(C-12), 15.39(C-13)。

化合物 4: 白色粉末。 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据结果表明, 化合物 4 与化合物 3 结构相似, 仅在甲基的位置有所区别。化合物的阳离子 ESI-MS 在 m/z 233[M+Na] $^+$ 处出现准分子离子峰。经上述特征分析和文献[17]比对, 将该化合物的结构定为环(脯-亮)二肽。

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 3.34(2H, m, H-3), 1.78(2H, m, H-4), 1.84(1H, m, H-5a), 2.07(1H, m, H-5b), 4.17(1H, t, H-6, $J = 7.8$ Hz), 7.92(1H, s, NH-8), 3.98(1H, t, H-9, $J = 6.2$ Hz), 1.87(2H, m, H-10), 1.34(1H, m, H-11), 0.85(3H, d, H-12, $J = 6.5$ Hz), 0.83(3H, d, H-13, $J = 6.5$ Hz); $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO- d_6) δ : 170.76(C-1), 45.29(C-3), 22.90(C-4), 27.86(C-5), 58.89(C-6), 166.95(C-7), 53.03(C-9), 39.63(C-10), 24.50(C-11), 23.25(C-12), 21.25(C-13)。

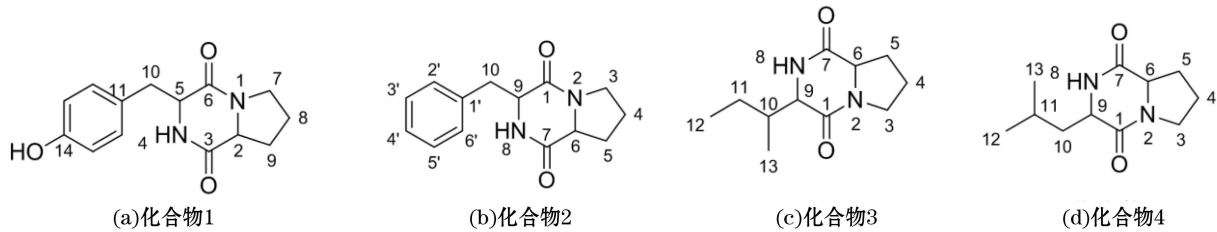


图3 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 菌株产生的化合物的结构式
Fig.3 Structure of compounds from *Pseudoalteromonas* sp. 2018

2.4 环二肽对病原真菌的最小抑制浓度

由表 3 可知,环(脯-酪)二肽和环(脯-亮)二肽对 7 种病原真菌均有抑制作用, MIC 在 125 和 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间,高于两性霉素 B 的 MIC(1~16 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

表 3 环二肽对病原真菌的最小抑制浓度

Table 3 MIC of cyclic dipeptides against plant pathogenic fungi

测试真菌	最小抑制浓度/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$		
	环(脯-酪)二肽	环(脯-亮)二肽	两性霉素 B
黄瓜专化型尖孢镰孢(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>)	250(24 h)	500(24 h)	2(24 h)
链格孢(<i>Alternaria alternata</i>)	250(48 h)	250(48 h)	2(24 h)
拟枝孢镰孢(<i>Fusarium sporotrichioides</i>)	250(24 h)	250(24 h)	2(24 h)
葡萄座腔菌(<i>Botryosphaeria dothidea</i>)	500(48 h)	500(48 h)	1(24 h)
番茄专化型尖孢镰孢(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i>)	125(36 h)	500(36 h)	2(36 h)
细极链格孢(<i>Alternaria tenuissima</i>)	500(48 h)	500(48 h)	4(48 h)
辣椒疫霉(<i>Phytophthora capsici</i>)	500(48 h)	500(48 h)	16(48 h)

3 讨 论

假交替单胞菌为专性海洋细菌,也是海洋 γ -变形菌门的主要类群。假交替单胞菌通过多种代谢途径来适应不同的栖息环境,因此可以产生抗生素、细胞毒素、溶菌物质、自毒物质和抗污物质等。根据合成途径,这些物质主要包括生物碱、聚酮和肽等^[18]。据报道,温海假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas maricaloris*)可以产生溴化环缩肽类,具有潜在的细胞毒性和抗菌活性^[19]。南极嗜冷的海游假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas haloplanktis*) TAC125 产生多种环二肽及线性四肽和六肽,其中,环-(L-脯-L-酪)二肽和 L-缬-L-亮-L-脯-L-缬-L-脯-L-谷六肽具有清除 1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基的抗氧化活性^[20]。泰国海绵 *Halisarca ectofibrosa* 附生假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)产生多种环四肽,其中,环(苯丙-脯-亮-脯)四肽对铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和产酸克雷伯氏菌(*Klebsellia oxytoca*)具有抑制作用^[21]。本研究首次从北极假交替单胞菌(*Pseudoalteromonas* sp.)2018 中获得环(脯-酪)二肽、环(脯-异亮)二肽、环(脯-亮)二肽和环(脯-苯丙)二肽。可见,假交替单胞菌属可产生多种环肽和线性肽。

环二肽是由 2 个氨基酸通过肽键缩合而成的最小环肽。环二肽骨架受到六元环和具有一定空间位置的侧链的刚性约束,骨架包含的 2 个氢键接受中心和 2 个供氢位点,往往是其与目标蛋白之间相互作用的必要结构,这使得环二肽成为药物化学中的重要药效团。与典型的线性肽类相比,环二肽对蛋白酶更为稳定。这

些结构特性决定了环二肽具有广泛的生物活性和应用价值^[22]。Kumar 等^[23]从芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)获得环(L-脯-L-亮)二肽、环(D-脯-L-亮)二肽和环(D-脯-L-酪)二肽,对尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)和扩展青霉(*Penicillium expansum*)均有抑制作用,最小抑制浓度范围为 4~64 μg/mL。据 Rhee^[24]报道,土壤链霉菌(*Streptomyces* sp.)产生的环(L-亮-L-脯)二肽可抑制多种农作物病原真菌,如毛霉(*Mucor ramannianus*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、稻梨孢(*Pyricularia oryzae*)、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)、围小丛壳(*Glomerella cingulata*)、盘长孢状刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporoides*)和稻梨孢(*Pyricularia oryzae*),其最小抑制浓度范围为 2.5~100 μg/mL。我们的研究结果也证实,环(脯-酪)和环(脯-亮)二肽对多种农作物病原真菌具有抑制作用,且首次证明其对辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)、链格孢(*Alternaria alternata*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)、拟枝孢镰孢(*Fusarium sporotrichioides*)和细极链格孢(*Alternaria tenuissima*)有抑制作用,这说明环二肽具有广泛的抑菌范围。本研究中,环(脯-酪)和环(脯-亮)二肽最小抑制浓度为 125~500 μg/mL,该浓度高于 Kumar 等^[23]和 Rhee^[24]报道的 2.5~100 μg/mL 范围。该差异可能与测试方法有关,Kumar 等^[23]和 Rhee^[24]采用纸碟扩散法分析环二肽最小抑制浓度时,干燥纸碟中含有的一定量环二肽通过扩散作用接触真菌孢子时,纸碟边缘的局部浓度可能会较高,这就导致对环二肽最小抑制浓度的估计偏低。本研究采用准确浓度的化合物和孢子相混合的微孔板法,其结果与已报道采用该方法所获得的化合物最小抑制浓度的结果相近。如 Ström 等^[16]测得环(L-丙-L-脯)二肽对拟枝孢镰孢(*Fusarium sporotrichioides*)和烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)的最小抑制浓度为 250 μg/mL。Kumar 等^[23]测得环(L-酪-L-酪)二肽和环(L-苯丙-L-甘)二肽对几种农作物病原菌的最小抑制浓度达到 500 μg/mL,而两性霉素 B 的最小抑制浓度仅为 2 μg/mL。除了研究方法,环二肽的构象,病原真菌的种类、浓度等也可能是影响其最小抑制浓度的因素。

据报道,南极适冷的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)C 产生的环(苯丙-脯)二肽可抑制尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)^[8]。伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)CF-66 产生的环(苯丙-脯)二肽对尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、盘核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)和新月弯孢霉(*Curvularia lunata*)等农作物病原真菌均具有较强的抑制作用^[25]。因此,除了环(脯-酪)和环(脯-亮)二肽,本研究获得的环(脯-苯丙)二肽可能也是 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 菌株抑制多种病原真菌的原因。这几种环二肽共同作用可能会增强菌株对病原真菌的抑制活性,这可能是该菌株防治农作物病害的主要机理。

4 结 语

研究从北极海域沉积物中获得假交替单胞菌 *Pseudoalteromonas* sp. 2018,对农作物病原真菌具有广泛的抑制作用,对黄瓜白粉病的大棚防治效果达 66.7%。从 *Pseudoalteromonas* sp. 2018 菌株中分离获得了环(脯-酪)二肽、环(脯-异亮)二肽、环(脯-亮)二肽和环(脯-苯丙)二肽,这几种环二肽的共同作用可能是菌株抑制病原真菌的主要机理。我们从北极海域获得抑制植物病原真菌的希瓦氏菌(*Shewanella* sp.)R06-1 也产生多种环二肽(未发表数据)。已报道,南极适冷的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)C 也产生环(苯丙-脯)二肽,对尖孢镰孢(*Fusarium oxysporum*)有抑制作用^[8]。因此,环二肽结构可能是极地海洋微生物普遍存在的活性组分。利用极地微生物有可能发现更多具有新结构、新生物活性的环二肽。

参考文献(References):

- [1] PENNISI E. Armed and dangerous[J]. *Science*, 2010, 327(5970): 804-805.
- [2] FISHER M C, HENK D A, BRIGGS C J, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health[J]. *Nature*, 2012, 484(7393): 186-194.

- [3] WAARD M A, GEORGOPOULOS S G. Chemical control of plant diseases: problems and prospects[J]. Annual Review of Phytopathology, 1993(31): 403-421.
- [4] JENSEN D F, KARLSSON M, SARROCCO S, et al. Biological control using microorganism as an alternative to disease resistance[M] // COLLINGE D B. Plant Pathogen Resistance Biotechnology. Hoboken: John Wiley & Sons Inc, 2016: 314-364.
- [5] ZENG Y X, CHEN B, ZOU Y, et al. Polar microorganisms, a potential source for new natural medicines[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2008, 48(5): 695-700. 曾胤新, 陈波, 邹扬, 等. 极地微生物—新天然药物的潜在来源[J]. 微生物学报, 2008, 48(5): 695-700.
- [6] REN J W, XUE C M, TIAN L, et al. Asperelines A-F, Peptaibols from the marine-derived fungus *Trichoderma asperellum*[J]. Journal of Natural Products, 2009, 72(6): 1036-1044.
- [7] FANG H X, ZHAO H Y, CHEN F R, et al. Screening and phylogenetic analysis on antifungal strains from southern ocean[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2012, 40(3): 1268-1270. 方海霞, 赵惠娅, 陈发荣, 等. 南大洋抗植物病原真菌活性菌株的筛选及系统发育分析[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(3): 1268-1270.
- [8] PENG Y J, FANG H X, LI J L, et al. Separation, purification and structure identification of antimicrobial substances from Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. C[J]. Natural Product Research and Development, 2013(B12): 14-17. 彭玉娇, 方海霞, 李敬龙, 等. 南极适冷菌 *Pseudomonas* sp. C 抑菌活性物质的分离纯化与结构鉴定[J]. 天然产物研究与开发, 2013(B12): 14-17.
- [9] WANG H M, PENG Y J, LIN X Z. Separation, purification and structure identification of the antimicrobial substances from Antarctic psychrotrophic bacterium *Pseudomonas* sp. P4-11[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2014(3): 149-152. 王红梅, 彭玉娇, 林学政. 南极适冷菌 *Pseudomonas* sp. P4-11 抑菌活性物质的分离纯化与结构鉴定[J]. 广东农业科学, 2014(3): 149-152.
- [10] SCHUHMAN I, YAO C B F, AL-ZEREINI W, et al. Nitro derivatives from the Arctic ice bacterium *Salegentibacter* sp. isolate T436 [J]. The Journal of Antibiotics, 2009, 62(8): 453-460.
- [11] ZHAO H Y, FANG H X, WANG Y, et al. Diversity of bacteria isolated from marine sediment of Arctic and screening of strains with antifungal activity against plant pathogenic fungi[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2012, 39(17): 149-153. 赵惠娅, 方海霞, 王燕, 等. 北极海洋沉积物可培养细菌多样性及抗植物病原真菌活性菌株筛选[J]. 广东农业科学, 2012, 39(17): 149-153.
- [12] GUO W, CUI P, CHEN X. Complete genome of *Bacillus* sp. Pc3 isolated from the Antarctic seawater with antimicrobial activity[J]. Marine Genomics, 2015(20): 1-2.
- [13] *Desulfurobacterium* Medium[EB/OL]. [2017-06-29]. http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/pdf/DSMZ_Medium829.pdf.
- [14] FANG Z D. Research method of plant pathology[M]. Beijing: Agriculture Press of China, 1982: 231. 方中达. 植病研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1982: 231.
- [15] RUDI A, KASHMAN Y, BENAYAHU Y, et al. Amino acid derivatives from the marine sponge *Jaspis digonoxea*[J]. Journal of Natural Products, 1994, 57(6): 829-832.
- [16] STRÖM K, SJÖGREN J, BROBERG A, et al. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipetides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(9): 4322-4327.
- [17] NISHANTH KUMAR S, MOHANDAS C, SIJI J V, et al. Identification of antimicrobial compounds, diketopiperazines, from a *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(4): 914-924.
- [18] OFFRET C, DESRIAC F, LE CHEVALIER P, et al. Spotlight on antimicrobial metabolites from the marine bacteria *Pseudoalteromonas*: chemodiversity and ecological significance[J]. Marine Drugs, 2016, 14(7): 243-248.
- [19] SPEITLING M, SMETANINA O F, KUZNETSOVA T A, et al. Bromoalterochromides A and A', unprecedented chromopeptides from a marine *Pseudoalteromonas maricaloris* strain KMM 636T[J]. Journal of Antibiotics, 2007, 60(1): 3642.
- [20] MITOVA M, TUTINO M L, INFUSINI G. Exocellular peptides from antarctic psychrophile *Pseudoalteromonas Haloplanktis*[J]. Marine Biotechnology, 2005, 7(5): 523-531.
- [21] RUNGROM W, SIWU E R O, LAMBERT L K, et al. Cyclic tetrapeptides from marine bacteria associated with the seaweed *Digenea* sp. and the sponge *Halisarca ectofibrosa*[J]. Tetrahedron, 2008, 64(14): 3147-3152.
- [22] MARTINS M B and CARVALHO I. Diketopiperazines: biological activity and synthesis[J]. Tetrahedron, 2007, 63(40): 9923-9932.
- [23] KUMAR S N, MOHANDAS C, SIJI J V, et al. Identification of antimicrobial compounds, diketopiperazines, from a *Bacillus* sp. N strain associated with a rhabditid entomopathogenic nematode against major plant pathogenic fungi[J]. Journal of Applied Microbiology, 2012, 113(4): 914-924.
- [24] RHEE K H. Purification and identification of an antifungal agent from *Streptomyces* sp. KH-614 antagonistic to rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. Journal of microbiology and biotechnology[J]. Journal of Microbiology & Biotechnology, 2003, 13(6): 984-988.
- [25] WANG A J, QUAN C S, WANG J H, et al. Purification and antifungal characterization of a Diketopiperazine from *Burkholderia cepa-*

cia CF-66[J]. *China Biotechnology*, 2009, 29(12): 43-48. 王艾晶, 权春善, 王建华, 等. 洋葱伯克霍尔德菌 CF-66 环二肽的分离纯化及抑菌活性研究[J]. *中国生物工程杂志*, 2009, 29(12): 43-48.

Inhibitory Effect of Arctic Marine Bacterium *Pseudoalteromonas* sp. 2018 Against Plant Pathogenic Fungi, and the Study on Its Metabolites

HE Pei-qing^{1,2,3}, LI Jiang^{1,2,3}, LIU Cai-yun^{1,2,3}, ZHANG Ting^{4,5},
WANG Pei-sheng⁶, LIN Xue-zheng^{1,2,3}

(1. Key Laboratory of marine natural products research and development, Qingdao 266061, China;

2. The First Institute of Oceanography, SOA, Qingdao 266061, China;

3. Key Laboratory of Marine Bioactive Substance, SOA, Qingdao 266061, China;

4. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

5. Key Laboratory of Marine Drugs of Shandong Province, Key Laboratory of Marine Drugs,
Ministry of Education, Qingdao 266003, China;

6. Academy of Agricultural Sciences of Qingdao, Qingdao 266100, China)

Abstract: Bacterium strain *Pseudoalteromonas* sp. 2018 was isolated from marine sediment collected during the sixth Chinese Arctic Research Expedition in the year of 2014, and this strain could inhibit the growth of several plant pathogenic fungi. Its antifungal spectrum and control effect on cucumber powdery mildew in a greenhouse were determined. Crude metabolites were extracted from the fermentation broth of the strain and were further separated, and purified compounds were obtained using silica gel chromatography, gel chromatography and semi-preparative HPLC chromatography. The structures of these compounds were determined via MS, ¹H NMR and ¹³C NMR. The results demonstrated that *Pseudoalteromonas* sp. 2018 could inhibit *Phytophthora capsici*, *Fulvia fulva*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Botryosphaeria dothidea*, *Fusarium sporotrichioides*, and *Alternaria tenuissima*. Its control effect on cucumber powdery mildew in greenhouse reached 66.7%. The structures of the metabolites were identified as cyclo(Pro-Tyr), cyclo(Pro-Ile), cyclo(Pro-Leu), and cyclo(Pro-Phe). The MIC values of cyclo(Pro-Tyr) and cyclo(Pro-Leu) against seven pathogenic fungi were determined as 125~500 μg/mL. Our study provides theoretical knowledge for development and utilization of agricultural resources from the polar environment.

Key words: arctic marine bacteria; inhibition against plant pathogenic fungi; cyclic dipeptides

Received: March 16, 2017