

马铃薯内生拮抗真菌 E-19 的分离、 鉴定及其次生代谢产物研究

杨曼思, 王文祥, 李龙根, 艾洪莲*, 郭华春*

云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201

摘要: 采用组织分离法, 从马铃薯健康植株中分离得到一株内生真菌(E-19), 根据形态学特征和 18S rDNA 序列分析, 将其鉴定为 *Bipolaris eleusines*。平板对峙培养结果显示, 该菌对马铃薯晚疫病菌有较强的抑制作用; 采用硅胶柱色谱、Sephadex LH-20 凝胶柱色谱、半制备 HPLC 等方法从 *Bipolaris eleusines* 发酵液中分离纯化获得 6 个化合物; 通过波谱学数据及理化性质确定它们的结构分别为: Isosativenediol (1)、Dihydrorehelminthosporo (2)、Helminthosporol (3)、Drechslerines C (4)、Drechslerines A (5)、Secolongifolene diol (6)。以上化合物均为首次从该菌中分离得到。

关键词: 马铃薯; 内生真菌; *Bipolaris eleusines*; 化学成分; 结构鉴定

中图分类号: R284.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.10.008

Isolation and Identification of Secondary Metabolites of Endophytic Fungi from *Solanum tuberosum*

YANG Man-si, WANG Wen-xiang, LI Long-gen, AI Hong-lian*, GUO Hua-chun*

School of Agriculture and Biological Technic, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

Abstract: This paper reported the isolation and identification of chemical components of the fermentation products of endophytic fungi E-19, isolated from *Solanum tuberosum*. This fungus was identified as *Bipolaris eleusines* on the basis of phylogenetic tree analysis of its 18S rDNA sequence. The secondary metabolites were isolated and purified using gel column chromatography, semi-preparative HPLC and Sephadex LH-20. Their structures were determined to be isosativenediol (1), dihydrorehelminthosporo (2), helminthosporol (3), drechslerines C (4), drechslerines A (5), secolongifolene diol (6) on basis of spectroscopic analysis and comparison with literatures.

Key words: *Solanum tuberosum*; endophytic fungus; *Bipolaris eleusines*; chemical constituent; structural identification

2015年1月6日,农业部副部长余欣荣在“马铃薯主粮化战略研讨会”上表示,今后要推进马铃薯主粮化,力争通过几年的不懈努力,使马铃薯的种植面积、单产水平、总产量和主粮化产品在马铃薯总消费量中的比重均有显著提升,让马铃薯逐渐成为水稻、小麦、玉米之后的我国第四大主粮作物。随着马铃薯主粮化战略的推出,马铃薯种植过程中所面临的各种病害成为制约马铃薯单产水平和总产量的主要障碍之一。目前,马铃薯最严重的病害为马铃薯晚疫病(*Phytophthora infestans*),广泛分布于马铃薯各产区,其危害性、防治难度及对社会造成的巨大

影响,已超过稻瘟病和小麦锈病,被视为全球第一大作物病害。在全国范围内,特别是降水充沛的西南山区和北方部分潮湿产区,晚疫病几乎每年都有发生,由此造成马铃薯产量损失高达20%~80%。

植物内生菌由于其物种丰富,数量庞大,而且与其它生物之间具有紧密的生态关系,使其成为天然活性物质的丰富来源。Schulz等报道^[1],从内生真菌次生代谢产物中获得了135个化合物,其中新化合物占51%,而土壤微生物产生的新化合物只占38%。从植物内生菌中寻找新型先导化合物,创制高效、环保的新型农药,已经成为目前国内外研究的热点问题之一。本文报道了从马铃薯健康植株分离、纯化内生真菌,并通过形态学和18S rDNA序列分析,构建系统发育树,以及对该菌次生代谢产物的分离、纯化、鉴定结果,为开发无污染、低残留并且可

收稿日期: 2015-04-27 接受日期: 2015-08-26

基金项目: 国家马铃薯产业技术体系(CARS-10); 云南省自然科学基金(2013ZA007)

*通讯作者 Tel: 86-871-65227732; E-mail: aihonglian05@163.com; ynghe@126.com

以使农业生产种植进入可持续的良性发展的微生物源农药奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料

2014年3~4月份分别在大理、德宏、临沧三地采集的马铃薯健康植株,用于内生真菌的分离,均由云南农业大学薯类研究所提供。

1.1.2 试剂

青霉素链霉素混合抗生素、75%无水乙醇、2%次氯酸钠、葡萄糖、猪肉蛋白胨、琼脂、酵母粉、 KH_2PO_4 、 MgSO_4 (西陇化工股份有限公司)、柱层析用硅胶80~100目、200~300目和预制 GF_{254} TLC板(青岛海洋化工),Sephadex LH-20(瑞典 Amersham Biosciences 公司),Chromatorex C-18(日本 Fuji Sily-sia 化学公司)。

1.2 仪器

普通药物天平(上海医疗器械厂),立式压力蒸汽灭菌锅(上海博讯实业有限公司),超净工作台(苏州净化设备有限公司),Bruker AVANCE III-600、DRX-500 或 AV-400 核磁共振仪,分析型 HPLC(Agilent 1100 系列液相色谱仪),半制备 HPLC(Agilent Technologies 1200 系列液相色谱仪),Horbia SE-PA-300 旋光仪,UV-210A 型分光光度计, Bruker Tensor27 型红外光谱仪, Waters AutoSpec Premier P776 质谱仪。

1.3 内生真菌的分离、纯化

将采集的健康马铃薯植株的根、茎、叶在自来水下冲洗干净,擦干,根茎剪成3 cm的小段,叶剪成3 cm×3 cm的小片,按下列程序进行表面消毒:无菌条件下,75%乙醇漂洗1 min,无菌水冲洗3次;2%次氯酸钠消毒(消毒时间:根3 min;茎2.5 min;叶2 min)、无菌水冲洗3次;然后置于无菌滤纸上将水分吸干。将表面消毒后的根、茎剪去两端切口,剩余段从中间剖开,剪成(0.3~0.5) cm^3 的小块,叶剪去四周后将剩余部分剪成0.3 cm×0.3 cm小块。

消毒有效性评价采取3种方法:一是取少量第3次无菌水冲洗液涂抹新的培养基平板;二是用组织印迹法,将消毒好待处理的材料在未使用的培养基平板上轻轻滚动或紧贴培养基放置5 min后移走;三是在分离操作的同时将未使用的培养基平板打开并暴露在无菌操作台上。将上述3种处理的培

养皿置于22~25℃培养箱中培养。

采用顶端菌丝纯化法,每日定期观察内生真菌长出情况,将切口处新长出的菌丝挑取尖端部分转接至PDA培养基上,纯化培养直至获得纯菌株,放置于4℃冰箱保存。

1.4 拮抗菌株的筛选

采用平板对峙拮抗实验法测定上述分离得到的内生真菌的抑菌作用^[2,3]。具体操作如下:在9 cm的PDA平板上,分别接种待测菌株和靶标病原菌,并使间距为5 cm,置于22~25℃培养箱中培养3~5 d,观察并记录菌株生长情况和菌株间的拮抗现象。

1.5 拮抗菌株的发酵

培养基:葡萄糖5%,猪肉蛋白胨0.15%,酵母粉0.5%, KH_2PO_4 和 MgSO_4 各0.05%;培养条件:温度24℃;摇床转速150 rpm;暗培养25 d。

1.6 拮抗菌株的鉴定

将内生真菌接种于培养皿中,在靠近培养皿边缘1/3处45°斜插一个经过灭菌的盖玻片,置于22~25℃培养箱中培养3~5 d,待菌丝长至盖玻片上时,取出至显微镜上观察菌丝形态。将内生真菌接种于产孢培养基,诱导产生孢子后,置显微镜观察并照相。

用真菌18S通用引物,ITS1:(5'-TCCGTAGGT-GAACCTGCGG-3')和ITS4:(5'-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3'),进行PCR扩增。PCR反应体系(20 μL):DNA模板1 μL ,10×Buffer 2 μL ,dNTPs(2.5 mmol/L)1.6 μL ,ITS1 primer(10 $\mu\text{mol/L}$)0.4 μL ,ITS4 primer(10 $\mu\text{mol/L}$)0.4 μL ,HiFi(5 U/ μL)0.2 μL ,ddH₂O 14.4 μL 。PCR反应条件为:94℃预变性4 min;94℃变性1 min,58℃退火45 s,72℃延伸40 s,30个循环;72℃延伸10 min;4℃保温。用凝胶回收试剂盒纯化PCR产物,克隆至PCR2.1载体上,18S rDNA序列由生物技术有限公司测定。将测得的18S rDNA序列进行BLAST分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>),并构建系统进化树^[4,5]。

1.7 拮抗菌株次生代谢产物的分离、纯化、鉴定

内生真菌E-19发酵液20 L减压浓缩至2 L,用乙酸乙酯进行多次萃取,萃取液减压浓缩得到浸膏约26 g。用硅胶(80~100目)拌样,上正相硅胶柱(200~300目, $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$,100:0~0:100,V/V)粗分,得到5个组份。组分1经反相中压以甲醇-水(85:15→0:100)梯度洗脱,得到大量的化合物1(约

2 g)。组分 2 以石油醚-丙酮(5:1→1:1)梯度洗脱得化合物 **2**(10 mg)。组分 3 以石油醚-丙酮(5:1→1:1)梯度洗脱得亚组分,对亚组分经反相-高效液相色谱法(RP-HPLC)制备柱色谱以(10%~30%,乙腈/水)得化合物 **4**(2.1 mg)、**5**(12 mg)和**6**(6 mg)。化合物 **3**(3 mg)来自于组分 4,经中压反相柱层析(85%~100%甲醇)和半制备 HPLC(70%~100%乙腈,20 min)分离得到。

2 实验结果

2.1 内生真菌 E-19 的鉴定

从马铃薯健康植株中分离得到一株对马铃薯晚疫病具有强烈拮抗作用的真菌 E-19,经 3 种消毒有效性方法检验,在其对照培养皿上未出现菌落,证明其为马铃薯内生真菌。

内生真菌 E-19 在 PDA 培养基上生长较快,培养 4 d 呈现黑褐色的菌落,直径 4.2 cm,背面黑褐色

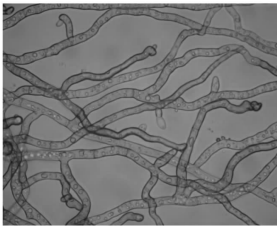


图 1 E-19 菌丝在显微镜下的形态图

Fig. 1 Morphology of endophytic fungi E-19 under microscope

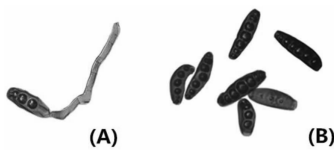


图 2 内生真菌 E-19 的孢子在显微镜下的形态图

Fig. 2 Fungal spores of endophytic fungi E-19 under microscope

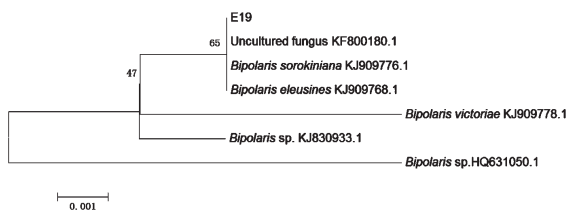
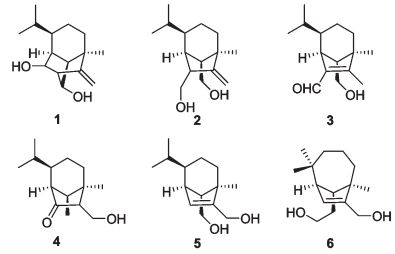


图 3 基于 18S rDNA 序列构建的 E-19 与其他真菌菌种的分子系统进化树

Fig. 3 Neighbour-joining tree based on 18S rDNA sequences showing relationships between strain E-19 and closely related members of fungi

至黑色。气生菌丝较发达,其菌丝和孢子在显微镜下的照片如图 1、图 2 所示。18S rDNA 序列分析表明内生真菌 E-19 与 *Bipolaris sorokiniana* (最大相似度:100%;覆盖度:95%;登录号:KJ909776.1)和 *Bipolaris eleusines* (最大相似度:99%;覆盖度:98%;登录号:KY909768.1)非常接近,其系统发育树见图 3。结合其菌丝形态特征和孢子特征,将其确定为 *Bipolaris eleusines*。

2.2 内生真菌 E-19 次生代谢产物的结构鉴定



化合物 1 分子式 $C_{15}H_{24}O_2$, 白色无定型粉末。 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 4.99 (1H, s, H-12), 4.70 (1H, s, H-12), 4.41 (1H, br s, H-14), 3.66 (1H, br s, H-15), 2.72 (1H, br s, H-1), 2.57 (1H, br s, H-7), 1.76 (1H, br s, H-13), 1.55 (1H, m, H-9), 1.05 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-10), 0.99 (3H, s, H-8), 0.93 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 154.4 (C-2), 105.5 (C-12), 79.1 (C-14), 75.3 (C-15), 58.1 (C-1), 53.9 (C-13), 46.0 (C-7), 43.0 (C-6), 40.3 (C-3), 37.2 (C-4), 31.1 (C-9), 28.4 (C-8), 22.7 (C-5), 21.4 (C-10), 21.0 (C-11)。以上数据与文献^[6]报道一致,故化合物 **1** 鉴定为 Isosativenediol。

化合物 2 分子式 $C_{15}H_{26}O_2$, 白色无定型粉末。 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 4.90 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-12), 4.79 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, H-12), 3.68 (1H, dd, $J = 11.0, 6.0$ Hz, H-15), 3.66 (1H, dd, $J = 11.0, 6.5$ Hz, H-14), 3.46 (1H, dd, $J = 11.0, 9.0$ Hz, H-15), 3.25 (1H, dd, $J = 11.0, 9.0$ Hz, H-14), 2.52 (1H, br t, $J = 8.0$ Hz, H-1), 2.37 (1H, s, H-7), 1.57 (1H, br t, $J = 8.0$ Hz, H-13), 0.99 (3H, s, H-8), 0.96 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-10), 0.84 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, H-11); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 158.9 (C-2), 104.9 (C-12), 66.8 (C-14), 63.5 (C-15), 57.6 (C-7), 49.4 (C-1), 47.5 (C-3), 45.8 (C-13), 42.9 (C-4), 38.1

(C-6), 30.9 (C-9), 25.2 (C-5), 21.6 (C-10), 20.9 (C-11), 20.3 (C-8)。以上数据与文献^[6]报道一致,故化合物 2 鉴定为 Dihydroprehelminthosporol。

化合物 3 分子式 $C_{15}H_{24}O_2$, 白色无定型粉末。¹H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 10.03 (1H, s, H-15), 3.65 (1H, dd, $J = 10.8, 5.4$, H-14), 3.32 (1H, dd, $J = 10.8, 8.7$ Hz, H-14), 3.19 (1H, br s, H-7), 2.00 (3H, s, H-12), 1.66 (1H, dd, $J = 8.0, 5.0$ Hz, H-13), 1.08 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, H-10), 1.02 (3H, s, H-8), 0.75 (3H, d, $J = 5.4$ Hz, H-11); ¹³C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 188.7 (C-15), 167.0 (C-2), 137.3 (C-1), 62.1 (C-14), 61.1 (C-13), 50.8 (C-3), 44.8 (C-6), 41.1 (C-7), 34.2 (C-4), 31.9 (C-9), 25.3 (C-5), 21.8 (C-10), 20.8 (C-11), 18.4 (C-8), 10.8 (C-12)。以上数据与文献^[6,7]报道一致,故化合物 3 鉴定为 Helminthosporol。

化合物 4 分子式 $C_{14}H_{24}O_2$, 白色无定型粉末。¹H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 3.84 (1H, dd, $J = 10.7, 5.1$ Hz, H-12), 3.49 (1H, dd, $J = 10.7, 7.1$ Hz, H-12), 2.09 (1H, br q, $J = 7.1$ Hz, H-14), 1.08 (3H, s, H-8), 1.01 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-10), 0.95 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, H-14), 0.81 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-11); ¹³C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 221.0 (C-1), 62.0 (C-12), 54.9 (C-2), 51.3 (C-7), 50.6 (C-13), 50.1 (C-6), 41.9 (C-3), 36.1 (C-4), 29.9 (C-9), 26.0 (C-5), 22.0 (C-8), 21.4 (C-10), 20.3 (C-11), 6.3 (C-14)。以上数据与文献^[7]报道一致,故化合物 4 鉴定为 Drechslerines C。

化合物 5 分子式 $C_{14}H_{24}O_2$, 白色结晶。¹H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ : 5.56 (1H, br d, $J = 1.5$ Hz, H-1), 4.08 (1H, dd, $J = 14.3, 1.1$ Hz, H-12), 4.02 (1H, dd, $J = 14.3, 1.5$ Hz, H-12), 3.64 (1H, dd, $J = 10.6, 5.3$ Hz, H-14), 3.36 (1H, dd, $J = 10.6, 9.4$ Hz, H-14), 2.76 (1H, br s, H-7), 1.00 (3H, s, H-8), 0.99 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-10), 0.89 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-11); ¹³C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ : 147.2 (C-2), 124.2 (C-1), 63.9 (C-13), 62.7 (C-14), 60.0 (C-12), 47.7 (C-3), 45.5 (C-6), 43.9 (C-7), 35.8 (C-4), 33.9 (C-9), 26.5 (C-5), 21.7 (C-10), 21.4 (C-11), 19.1 (C-8)。以上数据与文献^[7]报道一致,故化合物 5 鉴定为 Drechslerine A。

化合物 6 分子式 $C_{15}H_{26}O_2$, 白色无定型粉末。¹H NMR (CD_3OD , 600 MHz) δ : 5.75 (1H, br s, H-1), 4.07 (1H, dd, $J = 14.9, 1.7$ Hz, H-12), 4.00 (1H, dd, $J = 14.9, 1.7$ Hz, H-12), 3.65 (1H, m, H-15), 3.56 (1H, m, H-15), 2.02 (1H, m, H-13), 1.06 (3H, s, H-8), 0.97 (3H, s, H-10), 0.98 (3H, s, H-11); ¹³C NMR (CD_3OD , 150 MHz) δ : 147.9 (C-2), 128.3 (C-1), 62.1 (C-15), 59.8 (C-12), 58.9 (C-9), 51.4 (C-3), 47.1 (C-13), 45.8 (C-4), 42.8 (C-6), 36.7 (C-7), 35.2 (C-14), 32.7 (C-10), 28.0 (C-11), 22.3 (C-8), 21.9 (C-5)。以上数据与文献^[7]报道一致,故化合物 6 鉴定为 Secolongifolene diol。

3 结论

随着人们对环境污染、食品安全和人类自身健康的重视,以及抗药菌株的出现,寻找新的具有抑菌活性的天然产物已成为农药及抗生素领域的重要课题。植物内生真菌在与宿主植物协同进化过程中,能够合成活性物质协助宿主抵御外来病原菌的侵袭。本课题以采自大理、德宏、临沧三地的马铃薯健康植株为材料,分离内生真菌。结合形态学特征和 18S rDNA 序列分析结果,将菌株 E-19 鉴定为 *B. eleusines*。为了进一步探索其化学物质基础,我们从 *B. eleusines* 的发酵液中分离出 6 个 Sativene 骨架类型的倍半萜类化合物,均是首次从该菌中分离得到。本研究将为马铃薯内生真菌活性物质的开发奠定化学物质基础。

参考文献

- Schulz B, Boyle C. The endophytic continuum. *Mycol Res*, 2005, 109: 661-686.
- Lu SY (鲁素云). Biological Control of Plant Diseases (植物病害生物防治学). Beijing: Beijing Agricultural University Press, 1993, 243-254.
- Wang JH (王家和). Isolation and screening of antagonistic fungi against tobacco root diseases. *Chin J Biol Control* (中国生物防治), 1998, 14: 28-31.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR protocols: a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990, 315-322.