

内生真菌稻帚枝霉 *Sarocladium oryzae* L99 次级代谢产物分离及抑菌活性

梁伟中¹, 肖依文^{1,2}, 张文慧¹, 汪 涯¹, 高波良¹, 朱 笃^{1,2*}

¹江西科技师范大学生命科学学院 江西省生物加工过程重点实验室, 南昌 330013;

²江西师范大学生命科学学院 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 南昌 330022

摘要: 东乡野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 内生真菌 L99 显示出较强的病原细菌和真菌抑制活性。结合形态学与 ITS-rDNA 序列分析, 将 L99 进行鉴定为稻帚枝霉 (*Sarocladium oryzae*)。对菌株 L99 发酵产物进行分离, 共得到 10 个化合物, 利用核磁共振和质谱技术将其鉴定为脱氧胸腺嘧啶核苷(1)、2'-O-甲基腺苷(2)、2'-脱氧尿苷(3)、腺嘧啶核苷(4)、腺嘌呤核苷(5)、(E)-9-methyloctadec-9-enoic acid(6)、麦角甾醇过氧化物(7)、烟曲霉酸(8)、(9Z)-glycerin-1-monooleate(9)、酞酸二丁酯(10)。除化合物 8 外, 其他化合物均首次从稻帚枝霉中分离得到。抑菌活性结果表明, 化合物 6、8 和 10 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和水稻细菌性条斑病菌有较强的抑制活性, 而化合物 6 和 9 具有水稻纹枯病菌抑制活性。

关键词: 东乡野生稻; 内生真菌; 稻帚枝霉; 次级代谢产物; 抑菌活性

中图分类号: O629.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021) Suppl-0035-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.S.005

Isolation of secondary metabolites and antimicrobial activity of endophytic fungus *Sarocladium oryzae* L99

LIANG Wei-zhong¹, XIAO Yi-wen^{1,2}, ZHANG Wen-hui¹, WANG Ya¹, GAO Bo-liang¹, ZHU Du^{1,2*}

¹Key Laboratory of Bioprocess Engineering of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China; ²Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China

Abstract: An endophytic fungus strain L99 from Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) showed strong inhibitory activity against pathogenic bacteria and fungus. By using morphological characteristics and internal transcribed spacer (ITS) sequence analysis, strain L99 was identified as *Sarocladium oryzae*. Ten kinds of secondary compounds were separated and purified from fermentation broth of strain L99. According to mass spectrometry, ¹H NMR and ¹³C NMR analyses, they were identified as deoxythymidine (1), 2'-O-methyladenosine (2), 2'-deoxyuridine (3), uridine (4), adenosine (5), (E)-9-methyloctadec-9-enoic acid (6), ergosterol peroxide (7), fumonic acid (8), (9Z)-glycerin-1-monooleate (9), and dibutyl phthalate (10). Except for compound 8, the other 9 compounds were isolated from *S. oryzae* for the first time. The antimicrobial activities were screened, compounds 6, 8 and 10 showed certain inhibitory activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, while compound 6 and 9 showed inhibitory activity against *Rhizoctonia solani*.

Key words: *Oryza rufipogon*; endophytic fungus; *Sarocladium oryzae*; secondary metabolites; antimicrobial activity

植物内生菌 (endophytes) 是一类定殖于健康植物组织内部, 正常情况下不引发 (至少是暂时不引

发) 植物产生明显病症的微生物^[1], 具有提升宿主植物的耐盐、耐旱和抵抗病虫害等抗逆能力^[2]。由于植物内生菌所处生境独特, 且次级代谢产物丰富, 已成为天然药物及农药等的重要来源^[3]。

东乡野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 是我国乃至世界上迄今为止发现的纬度最高、分布最北的普通野生稻, 现仅残存于江西省东乡县岗上积镇庵家山

收稿日期: 2021-01-04 接受日期: 2021-03-25

基金项目: 国家自然科学基金 (81760649); 江西省自然科学基金 (20181BAB215044); 江西省教育厅科技计划研究项目 (GJJ190593); 江西科技师范大学研究生创新基金 (YC2019-X03)

* 通信作者 E-mail: zhudu12@163.com

地区。东乡野生稻具有光合作用强、抗逆性和抗病虫害等能力突出的特点^[4,5]。迄今,东乡野生稻的研究主要集中于种质资源保护与利用、优良基因的挖掘等方面,而对其根际和内生微生物的研究较少,仅见本实验室报道^[6,7]。我们前期开展了东乡野生稻可培养内生真菌多样性研究,发现其内生真菌多样性十分丰富。通过抑菌活性检测,筛选到数量众多、具抑菌活性的内生真菌;同时通过聚酮合成酶(PKS)分析,发现东乡野生稻内生真菌蕴含丰富的次级代谢产物基因族,因此可作为生物农药挖掘的潜在资源^[8]。本研究以本课题组前期从东乡野生稻中筛选到的内生真菌菌株 L99 为对象,开展其次生代谢产物分离和抑菌活性研究,以期发现潜在的抑菌活性化合物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

1.1.1 实验材料

内生真菌 L99 分离自江西省东乡县(28°14' N, 116°36' E)野外健康的东乡野生稻健康叶片,现保藏于江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室。供试病原细菌:大肠杆菌(*Escherichia coli* CCTCC AB93154)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus* CCTCC AB91093)购于中国典型培养物保藏中心,水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)为江西农业大学农学院植物保护研究室赠予。供试病原真菌:油菜菌核菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、芝麻枯萎菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *sesami*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)和水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)均由江西农业大学农学院植物保护研究室赠予。

1.1.2 培养基

内生真菌 L99 鉴定培养基为马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA:200 g 马铃薯煮出液稀释至 1 000 mL,加入葡萄糖 20 g、琼脂 20 g)和麦芽汁琼脂培养基(MEA:麦芽抽提粉 20 g,蛋白胨 1 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL);菌株活化采用 PDA 培养基;种子培养采用马铃薯葡萄糖液体培养基(PDB:200 g 马铃薯煮出液稀释至 1 000 mL,加入葡萄糖 20 g);固体发酵采用大米培养基(大米 80 g,去离子水 120 mL)。以上培养基均在 121 °C 下高压灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂

甲醇、氯仿、乙腈、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、无水乙醇、95%乙醇均为分析纯(西陇化工);色谱级纯甲醇、乙腈(德国 Merck 公司);GF₂₅₄ 高效薄层硅胶板(青岛海洋化工厂);反相 C₁₈ 薄层层析板(德国 Merck 公司);柱色谱硅胶(100 ~ 200 目,200 ~ 300 目,青岛海洋化工厂);Sephadex LH-20 葡聚糖凝胶(美国 Amersham 公司)。

1.1.4 主要仪器

S1000 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);电泳仪及电泳槽(北京六一厂);凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);N-1100S 旋转蒸发仪(日本东京理化);Bruker AV400、Bruker AVANCE III 600 MHz 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司);AB5600 + QTOF 高分辨液质联用仪(美国 SCIEX 公司);WD-9403F 紫外检测分析仪(北京六一厂);SZ-97A 三重纯水蒸馏器(上海亚荣生化仪器厂);SG2200H 超声波清洗仪(上海冠特超声仪器有限公司);ZHWHY211B 型摇床(上海智城分析仪器制造有限公司);ODS-C₁₈ 分析色谱柱(日本 YMC 公司);Waters1525 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);PURIFLASH450 中压层析系统(法国 Interchim 公司);多功能酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 菌株鉴定

1.2.1 菌株形态观察

菌株 L99 活化后,分别接种至 PDA 和 MEA 培养基中,于 28 °C 条件下培养 14 天,观察其菌落形态变化;并用光学显微镜观察其菌丝及孢子形态。

1.2.2 菌株分子生物学鉴定

分子生物学鉴定采用 CTAB 法提取内生真菌总 DNA,使用通用 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCT-GCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 扩增真菌 ITS-rDNA 序列^[8]。扩增后引物序列送往上海生工测序,将测序得到的 ITS-rDNA 序列在 NCBI 的 GenBank 序列库进行比对下载相关序列的 ITS-rDNA 序列,利用 MEGA 6.0 软件中的 Clustal X 方法进行建树。

1.3 菌株培养和发酵

将内生真菌 L99 接种到 PDA 平板培养基上活化培养 4 天(28 °C)。挑取小块长满菌丝的培养基接种入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 锥形瓶中扩大培养 5 天(28 °C、120 rpm)。配置 20 瓶发酵培养基,每瓶接入 2 mL 种子液,室温静置培养 40 天。

1.4 发酵液的提取和分离

菌株 L99 发酵结束后,将培养基和菌体进行机械粉碎,加入 80% 乙醇,使用超声波辅助重复萃取 4 次。减压过滤乙醇提取液,旋蒸浓缩获得提取液 2 L。先将浸提液放入 4 °C 冰箱静置 24 h 时析出沉淀,过滤得到析出的沉淀粗提物 8.2 g,提取液再用乙酸乙酯萃取 4 次,减压浓缩得到乙酸乙酯粗浸膏 4.6 g。

4.6 g 乙酸乙酯粗浸膏与 200 ~ 300 目正相硅胶拌样后上柱,流动相采用二氯甲烷: 甲醇(50: 1→1: 1)进行梯度洗脱,用薄层色谱 TLC 检测合并为 6 个组分(Fr. 1 ~ 6)。Fr. 3 使用凝胶色谱(二氯甲烷: 甲醇 15: 1)洗脱得到化合物 **1**(3 mg), **2**(5 mg) 和 **3**(8 mg)。Fr. 4 使用凝胶色谱(二氯甲烷: 甲醇 10: 1)洗脱得到化合物 **4**(12 mg)。Fr. 5 使用凝胶色谱(二氯甲烷: 甲醇 5: 1)洗脱得到化合物 **5**(5 mg)。

8.2 g 析出沉淀粗提物与 200 ~ 300 目正向硅胶拌样后上柱,流动相采用石油醚: 乙酸乙酯(50: 1→0: 100)梯度洗脱,用薄层色谱 TLC 检测合并为 5 个组分(Fr. A ~ E)。Fr. A 用正相硅胶柱层析(石油醚: 乙酸乙酯 1: 1)梯度洗脱得到 1 个组分,经制备

HPLC(乙腈: 水 90: 10)纯化得到化合物 **6**(2 mg, $t_R = 12$ min)。Fr. C 使用 Sephadex LH-20(甲醇)洗脱得到 1 个组分,经制备 HPLC(乙腈: 水 90: 10)纯化得到化合物 **7**(1.8 mg, $t_R = 19$ min)。Fr. D 经 Sephadex LH-20(甲醇)洗脱得到 2 个组分 Fr. D1 和 Fr. D2, Fr. D1 组分重结晶得到化合物 **8**(12 mg), Fr. D2 组分用 HPLC(乙腈: 水 80: 20)纯化得到化合物 **9**(2 mg, $t_R = 16$ min)。组分 Fr. E 经 Sephadex LH-20(甲醇)洗脱得到 1 个组分,通过 HPLC(乙腈: 水 80: 20)纯化得到化合物 **10**(1.5 mg, $t_R = 8$ min)。

1.5 抑菌活性测定

使用平板扩散方法测定发酵液及单体化合物对 3 种指示细菌的抑制活性^[9],同时以链霉素和培养液分别作为阳性和阴性对照,实验重复 3 次。采用菌丝生长抑制法^[10]测定抑制病原真菌的活性,对照培养基添加等量 PDB 培养基,每菌株抑菌实验重复 3 次。观察病原真菌菌饼在不同培养基上的生长情况,并测量菌落直径。抑菌效果用抑制率表示,抑制率 = $(R_c - R_t) / (R_c - R_0) \times 100\%$ 。其中 R_c 表示对照菌落生长直径, R_t 表示处理菌落生长直径, R_0 表示菌饼直径。

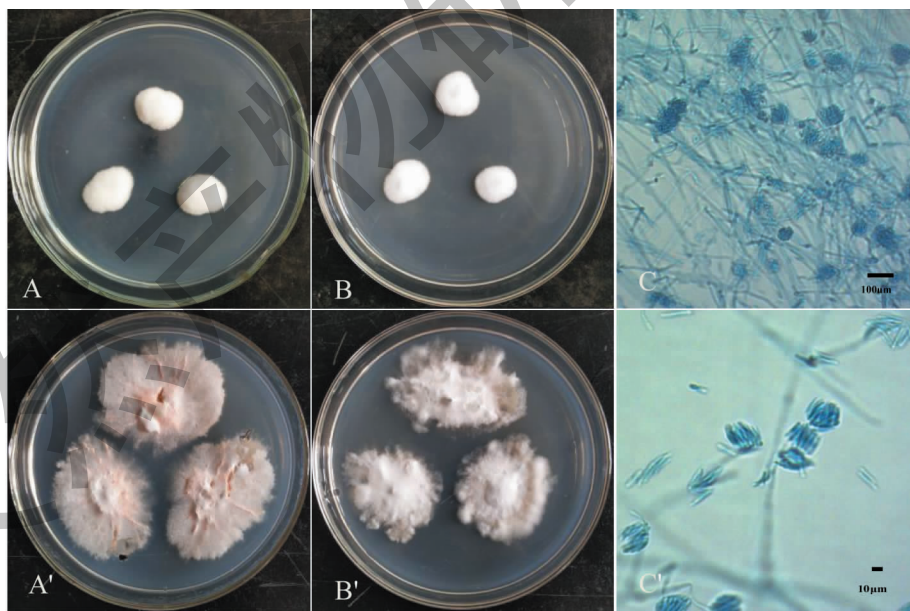


图 1 内生真菌 L99 的菌落形态及孢子形态

Fig. 1 Colony morphology and spores morphology of endophytic fungi L99

注:在 PDA 培养 7 天(A)、14 天(A')时的菌落形态;在 MEA 培养 7 天(B)、14 天(B')时的菌落形态;在 PDA 培养 14 天时 100 倍(C)、400 倍(C')显微镜下的孢子形态。Note: Colony characteristics of strain L99 cultured on PDA for 7 days (A) and 14 days (A'); Colony characteristics of strain L99 cultured on MEA culture for 7 days (B) and 14 days (B'); Spore morphology under 100 times (C) and 400 times (C') microscope of strain L99 cultured on PDA for 14 days.

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

内生真菌 L99 在 PDA 和 MEA 培养基培养 7 天,菌落形态为白色绒毛状(图 1A 和 B)。继续培养至 14 天,菌株在 PDA 培养基上菌落为粉红色,背面有粉红色色素渗出(图 1A');在 MEA 培养基上菌株呈白色蓬松状,背部有黄色色素渗出(图 1B')。菌株在 PDA 培养基培养 14 天,通过显微镜观察其孢子形态,发现孢子呈长杆状,且多个孢子团簇在一起(图 1C 和 C')。

PCR 扩增、测序获得菌株 L99 ITS-rDNA 序列的长度分别为 584 bp,提交至 GenBank (Accession number:KF558875)。通过与 NCBI 的 GenBank 序列库中已有的核酸序列进行 Blast 比对,结果表明,菌株 L99 与 *Sarocladium oryzae* (HG965026) 相似度最高,达 99%。在 GenBank 中选取与比对菌株序列最相近的菌株序列,进一步构建系统发育树(图 2)。结合形态学和分子生物学鉴定结果,将菌株 L99 确定稻帚枝霉(*Sarocladium oryzae*)。

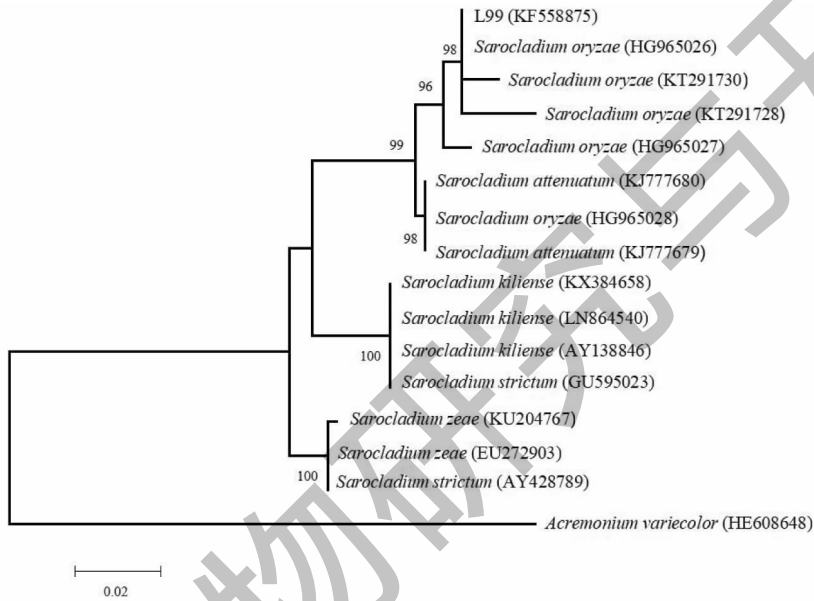


图 2 内生真菌 L99 基于 ITS-rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of endophytic fungi L99 based on ITS-rDNA

2.2 发酵液抑菌活性检测

菌株 L99 的发酵液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、水稻细菌性条斑病菌都有一定的抑制作用,对金黄色葡萄球菌和水稻细菌性条斑病菌的抑制作用相当,抑菌圈在 14.5 mm 左右(表 1);菌丝抑制率结果表明,菌株 L99 的发酵液对水稻纹枯病菌的抑制率达到 80% 对其他病原真菌的抑制率均低于 15% (表 1)。

2.3 结构鉴定

化合物 1 白色晶体,溶于甲醇;分子式为 $C_{10}H_{14}O_5N_2$ 。HR-ESI-MS: m/z 243.0976 [M + H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 7.84 (1H, d, J = 1.1 Hz, H-1), 6.30 (1H, t, J = 6.8 Hz, H-7), 4.49 ~ 4.40 (1H, m, H-5), 3.98 ~ 3.87 (1H, m, H-8), 3.78 (2H, ddd, J = 28.2, 12.0, 3.4 Hz, H-9),

2.34 ~ 2.16 (2H, m, H-6), 1.90 (3H, d, J = 1.1 Hz, H-10); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 170.0 (C-4), 155.0 (C-3), 140.7 (C-1), 114.1 (C-2), 91.3 (C-5), 88.8 (C-7), 74.7 (C-8), 65.4 (C-9), 43.7 (C-6), 15.0 (C-10)。以上数据与文献^[11]报道数据基本一致,鉴定该化合物为 deoxythymidine (见图 3)。

化合物 2 白色固体,溶于甲醇;分子式为 $C_{11}H_{15}O_4N_5$ 。HR-ESI-MS: m/z 282.1195 [M + H]⁺; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ : 8.24 (1H, s, H-2), 8.09 (1H, s, H-5), 5.96 (1H, d, J = 6.0 Hz, H-6), 4.39 (1H, dd, J = 4.9, 3.0 Hz, H-7), 4.36 ~ 4.31 (1H, m, H-9), 4.06 (1H, q, J = 2.7 Hz, H-8), 3.79 (1H, dd, J = 12.6, 2.5 Hz, H-10), 3.65 (1H, dd, J = 12.6, 2.7 Hz, H-10), 3.32 (3H, s, H-11); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD) δ : 156.2 (C-1), 152.2

表 1 菌株 L99 发酵液的抑菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of fermentation broth of strains L99

指示菌 Tested microorganism	抑菌效果 Inhibition effect
细菌 Bacterium	
大肠杆菌 <i>E. coli</i>	++
金黄色葡萄球菌 <i>S. aureus</i>	++
水稻细菌性条斑病菌 <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	++
真菌 Fungi	
油菜菌核菌 <i>S. sclerotiorum</i>	5%
芝麻枯萎菌 <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>sesami</i>	8%
小麦赤霉 <i>G. zeae</i>	6%
水稻稻瘟病菌 <i>M. grisea</i>	12%
水稻纹枯病菌 <i>R. solani</i>	80%

注: -: 无明显活性; +: 抑菌圈直径在 10~12 mm; ++: 抑菌圈直径在 12~15 mm; +++: 抑菌圈直径大于 15 mm。

Note: -: No obvious activity; +: Inhibition diameters 10-12 mm; ++: Inhibition diameters 12-15 mm; +++: Inhibition diameters greater than 15 mm.

(C-2), 148.6(C-3), 140.4(C-5), 119.6(C-4), 87.8(C-6), 87.0(C-7), 83.2(C-9), 69.4(C-8), 61.8(C-11), 57.4(C-10)。以上数据与文献^[12]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 2'-*O*-methyladenosine。

化合物 3 白色固体, 溶于甲醇; 分子式为 $C_9H_{12}O_5N_2$ 。HR-ESI-MS: m/z 227.067 4 [M-H]⁻; ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ : 8.00(1H, d, J = 8.1 Hz, H-3), 6.41~6.19(1H, m, H-5), 5.71(1H, d, J = 8.1 Hz, H-4), 4.40(1H, dt, J = 6.4, 3.3 Hz, H-7), 3.94(1H, dd, J = 6.8, 3.4 Hz, H-8), 3.80(1H, dd, J = 12.0, 3.3 Hz, H-9), 3.73(1H, dd, J = 12.0, 3.7 Hz, H-9), 2.31(1H, ddd, J = 13.6, 6.2, 3.4 Hz, H-6); ¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD) δ : 164.8(C-2), 150.8(C-1), 141.1(C-3), 101.2(C-4), 87.6(C-5), 85.2(C-7), 70.8(C-8), 61.4(C-9), 40.0(C-6)。以上数据与文献^[13]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 2'-deoxyuridine。

化合物 4 无色簇晶, 溶于甲醇; 分子式为 $C_9H_{12}O_6N_2$ 。HR-ESI-MS: m/z 243.062 8 m/z [M-H]⁻; ¹H NMR(400 MHz, CD₃OD) δ : 8.03(1H, d, J = 8.1 Hz, H-4), 5.92(1H, d, J = 4.6 Hz, H-3), 5.72(1H, d, J = 8.1 Hz, H-5), 4.18(2H, dt, J = 9.8, 5.1 Hz, H-9), 4.03(1H, dt, J = 4.4, 2.9 Hz, H-8),

3.86(1H, dd, J = 12.2, 2.7 Hz, H-6), 3.75(1H, dd, J = 12.2, 3.1 Hz, H-7); ¹³C NMR(100 MHz, CD₃OD) δ : 164.8(C-1), 151.1(C-2), 141.3(C-4), 101.2(C-3), 89.3(C-5), 85.0(C-8), 74.3(C-6), 69.9(C-7), 60.9(C-9)。以上数据与文献^[14]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 uridine。

化合物 5 白色粉末, 溶于甲醇; 分子式为 $C_{10}H_{13}O_4N_5$ 。HR-ESI-MS: m/z 268.103 7 [M-H]⁻; ¹H NMR(400 MHz, DMSO-d₆) δ : 8.35(1H, s, H7-OH), 8.14(1H, s, H8-OH), 7.38(2H, s, H1-NH₂), 5.87(1H, d, J = 6.2 Hz, H10-OH), 5.58~5.39(2H, m, H-10), 5.21(1H, d, J = 4.6 Hz, H-5), 4.61(1H, dd, J = 11.3, 6.1 Hz, H-2), 4.14(1H, dd, J = 7.6, 4.6 Hz, H-6), 3.96(1H, q, J = 3.2 Hz, H-9), 3.67(1H, dt, J = 12.0, 4.0 Hz, H-7), 3.6~3.5(1H, m, H-8); ¹³C NMR(100 MHz, DMSO-d₆) δ : 156.6(C-1), 152.8(C-2), 149.5(C-3), 140.4(C-5), 119.8(C-4), 88.4(C-6), 86.4(C-7), 73.9(C-8), 71.1(C-9), 62.1(C-10)。以上数据与文献^[15]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 adenosine。

化合物 6 淡黄油状, 溶于氯仿; 分子式为 $C_{19}H_{36}O_2$ 。HR-ESI-MS: m/z 295.247 7 [M-H]⁻; ¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) δ : 5.40~5.33(1H, m, H-10), 2.03(2H, dd, J = 11.6, 6.2 Hz, H-2), 1.64(3H, dd, J = 14.4, 7.1 Hz, H-19), 1.36~1.22(28H, m, H-3~8, H-11~17), 0.90(3H, t, J = 7.0 Hz, H-18); ¹³C NMR(150 MHz, CDCl₃) δ : 179.7(C-1), 130.0(C-9), 129.7(C-10), 34.0(C-2), 31.9(C-8), 29.8(C-11), 29.7(C-3), 29.7~29.4(C-4~C-7), 29.7~28.9(C-12~C-15), 27.2(C-16), 24.7(C-17), 22.7(C-19), 14.1(C-18)。以上数据与文献^[16]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 (*E*)-9-methyloctadec-9-enoic acid。

化合物 7 白色固体, 溶于氯仿; 分子式为 $C_{28}H_{44}O_3$ 。HR-ESI-MS: m/z 429.263 6 [M+H]⁺, 451.304 0 [M+Na]⁺; ¹H NMR(600 MHz, CDCl₃) δ : 6.52(1H, d, J = 8.5 Hz, H-7), 6.26(1H, d, J = 8.5 Hz, H-6), 5.24(1H, dd, J = 15.2, 7.7 Hz, H-22), 5.16(1H, dd, J = 15.3, 8.4 Hz, H-23), 4.02~3.94(1H, m, H-3), 2.12(1H, ddd, J = 13.8, 5.0, 1.8 Hz, H-20), 2.06~2.01(1H, m, H-24), 1.98(2H, dd, J = 10.3, 6.7 Hz, H-2), 1.95~1.92(1H, m, H-25), 1.87(2H, dd, J = 13.2, 7.0 Hz, H-4),

1.79 ~ 1.74 (1H, m, H-17), 1.71 (1H, dt, $J = 13.4$, 3.4 Hz, H-9), 1.64 ~ 1.55 (3H, m, H-14, H-15), 1.55 ~ 1.45 (4H, m, H-12, H-16), 1.45 ~ 1.33 (3H, m, H-18), 1.32 ~ 1.20 (3H, m, H-11, H-1), 1.01 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, H-28), 0.92 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, H-21), 0.86 ~ 0.89 (9H, m, H-26, H-27, H-19); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3), δ : 135.4 (C-6), 135.2 (C-7), 132.3 (C-22), 130.7 (C-23), 82.2 (C-8), 79.4 (C-5), 66.4 (C-3), 56.2 (C-14), 51.7 (C-10), 51.1 (C-13), 44.6 (C-9), 42.8 (C-17), 39.8 (C-22), 39.3 (C-20), 36.9 (C-24), 34.7 (C-25), 33.1 (C-1), 30.1 (C-4), 28.7 (C-15), 23.4 (C-16), 20.9 (C-11), 20.6 (C-18), 20.0 (C-19), 19.7 (C-21), 18.2 (C-26), 17.6 (C-27), 12.9 (C-28)。以上数据与文献^[17]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 ergosterol peroxide。

化合物 8 白色晶体, 溶于氯仿; 化学式为 $\text{C}_{33}\text{H}_{44}\text{O}_8$ 。HR-ESI-MS: m/z 567.301 1 [M-H]⁻; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 7.31 (1H, m, H-1), 5.90 (2H, m, H-2, H-16), 5.23 (1H, s, H-6), 5.11 (1H, s, H-24), 2.74 (1H, dq, $J = 9.2$ Hz, 6.8 Hz, H-4), 2.61 (1H, d, $J = 13.2$ Hz, H-9), 2.57 (1H, s, H-13), 2.45 (2H, d, $J = 7.1$ Hz, H-22), 2.47 (1H, d, $J = 12.7$ Hz, H-12a), 1.84 (1H, m, H-12b), 2.26 (1H, d, $J = 11.6$ Hz, H-5), 2.27 (1H, s, H-15a), 1.90 (1H, s, H-15b), 2.10 (2H, d, $J = 11.4$ Hz, H-23), 2.11 (3H, d, $J = 11.4$ Hz, C6-OCOCH₃), 1.99 (1H, m, H-11a), 1.57 (1H, m, H-11b), 1.96 (3H, m, C16-OCOCH₃), 1.69 (3H, s, H-27), 1.61 (3H, s, H-

26), 1.47 (3H, s, H-19), 1.27 (3H, m, H-28), 1.18 (3H, s, H-29), 0.93 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 157.3 (C-1), 127.8 (C-2), 201.4 (C-3), 40.4 (C-4), 47.2 (C-5), 73.8 (C-6), 208.8 (C-7), 52.7 (C-8), 41.7 (C-9), 38.2 (C-10), 23.9 (C-11), 25.9 (C-12), 49.4 (C-13), 46.6 (C-14), 40.6 (C-15), 73.5 (C-16), 147.7 (C-17), 17.9 (C-18), 27.5 (C-19), 130.4 (C-20), 174.1 (C-21), 28.6 (C-22), 28.3 (C-23), 122.8 (C-24), 132.9 (C-25), 17.8 (C-26), 25.8 (C-27), 13.1 (C-28), 18.4 (C-29), 168.9 (C6-OCOCH₃), 20.8 (C6-OCOCH₃), 170.2 (C16-OCOCH₃), 20.5 (C16-OCOCH₃)。以上数据与文献^[18]报道数据基本一致, 鉴定该化合物为 helvol-ic acid。

化合物 9 无色油状, 溶于氯仿; 分子式为 $\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4$ 。HR-ESI-MS: m/z 355.213 1 [M-H]⁻; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 5.33 (1H, s, H-1'), 4.13 (2H, m, H-9, H-10), 3.92 (1H, s, H-1'), 3.72 (2H, m, H-3'), 3.58 (1H, m, H-2'), 2.33 (2H, m, H-2), 2.00 (1H, m, H-8), 1.61 (2H, m, H-11), 1.27 (2H, m, H-3 ~ 7, H12 ~ 17), 0.87 (3H, s, H-18); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 74.4 (C-1), 130.0 (C-10), 129.7 (C-9), 70.2 (C-1'), 65.0 (C-2'), 63.4 (C-3), 34.1 (C-2), 31.9 (C-11), 29.7 (C-8), 29.6 ~ 28.9 (C-3 ~ 7, C-16, C-17), 28.7 (C-12), 27.2 (C-13), 24.9 (C-14), 22.7 (C-15), 14.1 (C-18)。以上数据与文献^[19]报道数据基本一致, 鉴定化合物为 (9Z)-glycerin-1-monooleate。

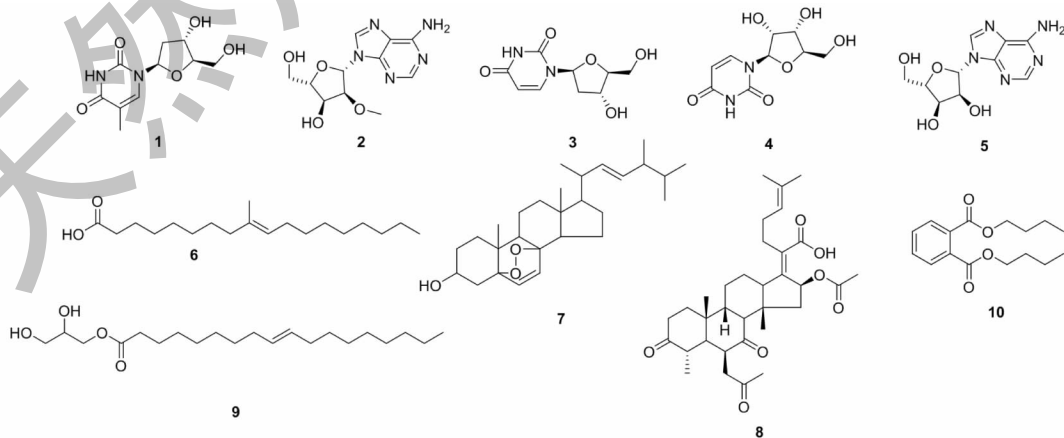


图3 化合物 1~10 的结构

Fig. 3 Chemical structures of compounds 1-10

化合物 10 无色油状,溶于氯仿;分子式为 $C_{16}H_{22}O_4$ 。HR-ESI-MS: m/z 279.232 9 $[M + H]^+$, 301.179 6 $[M + Na]^+$; 1H NMR(600 MHz, $CDCl_3$) δ : 7.73(1H, d, $J = 3.4$ Hz, H-3), 7.55(1H, d, $J = 3.9$ Hz, H-4), 4.32(2H, t, $J = 6.2$ Hz, H-8), 1.77 ~ 1.70(2H, m, H-9), 1.46(2H, dd, $J = 14.5, 7.1$ Hz, H-10), 1.00 ~ 0.95(3H, m, H-11); ^{13}C NMR(150 MHz, $CDCl_3$) δ : 167.8(C-1, C-1'), 132.3(C-2, C-7), 130.9(C-3, C-6), 128.9(C-4, C-5), 65.6(C-2, C-8'), 30.6(C-3', C-9), 19.2(C-4', C-10), 13.8(C-5', C-11)。以上数据与文献^[20]报道数据基本一致,鉴定化合物为 dibutyl phthalate。

2.4 抑菌活性测定结果

对化合物 **1** ~ **10** 进行了活性测定,其中化合物 **7** 对 *E. coli* 有较好抑制作用,化合物 **6**、**8** 和 **10** 分别对 *E. coli*、*S. aureus* 和 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 有一定的抑制活性,而其他化合物并未展现出明显的抑制活性(见表 2)。另外,化合物 **6** 和 **9** 具有较好的抑制水稻纹枯病菌的作用(见表 3)。

表 2 单体化合物抑制病原细菌的最小抑菌浓度(MIC)

Table 2 Minimum inhibitory concentrations (MIC) of the compounds against pathogenetic bacteria

化合物 Compound	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>
6	10 ± 0.5	46.3 ± 2.3	18.5 ± 1.7
7	20.7 ± 1.2	-	-
8	3.10 ± 0.3	12.5 ± 0.8	17.9 ± 2.1
10	45.6 ± 2.6	38.4 ± 1.5	16.8 ± 0.7
链霉素 Streptomycin	1.0 ± 0.03	5.0 ± 0.05	5.0 ± 0.13

注:所有值均以 $\mu g/mL$ 为单位,每个实验重复 3 次; -: 无明显活性。
Note: All values are in $\mu g/mL$, each experiment was repeated three times; -: No obvious activity.

表 3 单体化合物抑制水稻纹枯病菌的抑制率

Table 3 Inhibitory ratio of the compounds against pathogenetic *R. solani*

化合物 Compound	抑制率 Inhibition ratio(%)
6	42.0 ± 0.8
8	5.0 ± 0.5
9	71.0 ± 1.2

注:每个实验重复 3 次。

Note: Each experiment was repeated three times.

3 结论

迄今,有关东乡野生稻内生菌多样性及其天然

产物的研究较少,仅见本课题组的报道。前期,我们从一株东乡野生稻内生放线菌 *Streptomyces* sp. S123 中分离到 nigericin 和 17-O-demethylgeldanamycin,其中 nigericin 对 *S. aureus*、*B. subtilis* 及 *R. solani* 显示出较强的抑制活性^[6];从 *Streptomyces* sp. PRh5 中分离到邻苯二甲酸二丁酯、尼日利亚菌素、13-docosenamide、诺卡胺素,其中尼日利亚菌素、13-docosenamide 对水稻纹枯病菌具有一定抑制活性^[7]。由于东乡野生稻内生菌多样真菌多样性丰富,可能蕴含多样的天然活性化合物^[8],因此非常有必要进行深入挖掘。

本文报道了一株东乡野生稻内生真菌 L99,其具有明显的抑制病原细菌和病原真菌的生物活性。结合分子生物学和形态学手段,将 L99 鉴定为稻帚枝霉(*Sarocladium oryzae*)。稻帚枝霉属于囊菌门,是水稻叶鞘腐败病的病原真菌。迄今,有关稻帚枝霉的研究主要集中在其引起水稻稻叶鞘腐败病的病原机制及其生物防治等方面^[21,22],有关其次级代谢产物的研究很少报道,而有关植物内生的稻帚枝霉研究则更未见报道。Tschen^[23]从水稻病原真菌 *S. oryzae* 中分离出一种引起禾本科幼苗的生长迟缓和萎黄病的抗生素代谢产物烟曲霉酸(helvolinic acid); Sakhivel 等^[24]在 *S. oryzae* 液体培养基中检测到次级代谢产物烟曲霉酸和浅蓝菌素(cerulenin),并探讨了其在引起水稻鞘腐病中可能发挥的作用。此后,Cortes *et al.*^[25]对含有浅蓝菌素的 *S. oryzae* 粗提物开展生防实验,发现在温室条件下,*S. oryzae* 粗提物对稻瘟病的抑制率达 63%,显示较好的应用潜力。

本文从东乡野生稻内生真菌 *S. oryzae* L99 中分离到 10 个单体化合物,除化合物 **8** 外,其余 9 个化合物均为首次从 *S. oryzae* 中分离得到。其中,化合物 **1** ~ **5** 属于核苷类化合物,核苷类化合物具有重要的生理功能,参与人体内多种生理活动的调节,具有抗病毒、抗氧化和抗肿瘤活性。有研究发现化合物 **1**、**3** 和 **4** 具有一定的抑制神经氨酸酶的活性,神经氨酸酶促使成熟流感病毒脱离宿主细胞感染新的细胞,在流感病毒的生活周期中扮演了重要的角色,说明此类化合物可能具有潜在的抗病毒活性^[26]。化合物 **7** 通过诱导细胞周期停滞和凋亡,来抑制胃肠道肿瘤细胞的增殖^[27]。化合物 **8** 显示对革兰氏阳性菌和阴性菌均有良好的抑制活性,此外,Zhao 等^[28]发现其能高效抑制稻瘟病菌孢子的萌发,IC₅₀ 值为 7.20 $\mu g/mL$ 。我们对化合物 **1** ~ **10** 进行了活

性测定,发现化合物 **7** 对 *E. coli* 有较好抑制作用,化合物 **6**、**8** 和 **10** 展现出对 *E. coli*、*S. aureus* 和 *X. oryzae* pv. *oryzicola* 均有一定的抑制活性,而化合物 **6** 和 **9** 对水稻纹枯病菌有抑制活性,其他化合物并未展现出明显的抑菌活性。本研究为东乡野生稻内生真菌次生代谢产物的开发和生防应用提供了基础。

参考文献

- Stone JK. An overview of endophytic microbes: endophytism defined, 3 [M]. New York: Marcel Dekker, 2000: 3-29.
- Pavlova AS, Leontieva MR, Smirnova TA, et al. Colonization strategy of the endophytic plant growth-promoting strains of *Pseudomonas fluorescens* and *Klebsiella oxytoca* on the seeds, seedlings and roots of the epiphytic orchid, *Dendrobium nobile* Lindl [J]. J Appl Microbiol, 2017, 123: 217-232.
- Cragg GM, Newman DJ. Natural products: a continuing source of novel drug leads [J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj, 2013, 1830: 3670-3695.
- Luo F, Wang Y, Zeng QG, et al. Diversity and plant growth promoting activities of the cultivable rhizobacteria of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) [J]. Biodivers Sci (生物多样性), 2011, 19: 476-484.
- Xu L, Meng W, Cao C. Antibacterial and antifungal compounds from marine fungi [J]. Mar Drugs, 2015, 13: 3479-3513.
- Zhang ZB, Deng YM, Xiong YY, et al. Isolation of endophytic actinomycetes from Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) and analysis of secondary metabolite of active strain S123 [J]. Microbiol China (微生物学通报), 2015, 42: 1662-1670.
- Bao JY, Zhang ZB, Xiao YW, et al. Antibacterial and antifungal secondary metabolites produced by endophytic actinomycete *Streptomyces* [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2018, 30: 1933-1938.
- Wang Y, Gao BL, Li XX, et al. Phylogenetic diversity of culturable endophytic fungi in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff), detection of polyketide synthase gene and their antagonistic activity analysis [J]. Fungal Biol, 2015, 119: 1032-1045.
- Li G, Kusari S, Lamshöft M, et al. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Eupenicillium* sp. LG41 [J]. J Nat Prod, 2014, 77: 2335-2341.
- Yang YY, Wang C, Xian HH, et al. Antimicrobial activity and fermentation technology of marine actinomycete strain H74-18 [J]. Chin J Mar Drug (中国海洋药物), 2020, 39 (5): 52-58.
- Zhang AL, Yu M, Xu HH, et al. Constituents of *Dendrobium devonianum* and their antioxidant activity [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 844-847.
- Martínez-Montero S, Fernández S, Rodríguez-Pérez T, et al. Improved synthesis and isolation of 2'-*O*-methyladenosine: effective and scalable enzymatic separation of 2'/3'-*O*-methyladenosine regioisomers [J]. Eur J Org Chem, 2009, 19: 3265-3271.
- Shi XF, Tang XL, Li GQ, et al. Studies on chemical constituents of the south China sea gorgonian *Muriceides collaris* [J]. Chin J Mar Drug (中国海洋药物), 2009, 28 (2): 18-21.
- Rosemeyer H, Toth G, Golankiewicz B, et al. Syn-anti conformational analysis of regular and modified nucleosides by 1D ¹H NOE difference spectroscopy: a simple graphical method based on conformationally rigid molecules [J]. J Org Chem, 1990, 55: 463-464.
- Kianfé BY, Kühlbörn J, Tchuenguem RT, et al. Antimicrobial secondary metabolites from the medicinal plant *Crinum glaucum* A. Chev. (Amaryllidaceae) [J]. S Afr J Bot, 2020, 133: 161-166.
- Ames DE, Bowman RE. Synthetic long-chain aliphatic compounds. IV. Some methyl-substituted oleic acids [J]. J Chem Soc, 1951: 1087-1092.
- Kim DS, Baek N-I, Oh SR, et al. Anticomplementary activity of ergosterol peroxide from *Naematoloma fasciculare* and reassignment of NMR data [J]. Arch Pharm Res, 1997, 20: 201-205.
- Luo XW, Zhou XF, Lin XP, et al. Antituberculosis compounds from a deep-sea-derived fungus *Aspergillus* sp SCSIO Ind09F01 [J]. Nat Prod Res, 2017, 31 (16): 1-5.
- Fu Y, Weng Y, Hong WX, et al. Efficient synthesis of unsaturated 1-monoacyl glycerols for in meso crystallization of membrane proteins [J]. Synlett, 2011 (6): 809-812.
- Wang XQ, Feng JJ, Tian Y, et al. Melamine-formaldehyde aerogel functionalized with polydopamine as in-tube solid-phase microextraction coating for the determination of phthalate esters [J]. Talanta, 2019, 199: 317-323.
- Lyu X, Yang X, Jiang R, et al. Indoor biological activity and field control effect of different fungicides against *Sarocladium oryzae* (Sawada) W. Gams. et Webster [J]. Agrochemicals (农药), 2020, 59: 450-454.
- Peeters KJ, Haeck A, et al. Morphological, pathogenic and toxigenic variability in the rice sheath rot pathogen *Sarocladium oryzae* [J]. Toxins, 2020, 12 (2): 109.
- Tschen JSM, Chen LL, Hsieh ST, et al. Isolation and phytotoxic effects of helvolic acid from plant pathogenic fungus *Sarocladium oryzae* [J]. Bot Bull Acad Sin, 1997, 38: 251-256.