

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(8):1036–1043; 4 August 2010  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 一株多花黄精内生真菌的鉴别及其抗菌代谢产物

汪滢<sup>1#</sup>, 王国平<sup>2#</sup>, 王丽薇<sup>3</sup>, 徐旭辉<sup>4</sup>, 夏静<sup>2</sup>, 黄雪芳<sup>2</sup>, 吴友贵<sup>5</sup>, 章初龙<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029)

(<sup>2</sup> 浙江大化浙大生物药物研发中心, 杭州 311616)

(<sup>3</sup> 杭州师范大学医药卫生管理学院, 杭州 310036)

(<sup>4</sup> 浙江大学农药与环境毒理研究所, 杭州 310029)

(<sup>5</sup> 浙江庆元百山祖国家级自然保护区, 庆元 323800)

**摘要:**【目的】药用植物内生真菌是一类重要的微生物资源,能代谢产生多种生物活性物质。本研究从浙江庆元百山祖自然保护区多花黄精(*Polygonatum cyrtonea*)分离获得1株具有抗菌活性的菌株zjqy610。【方法】通过形态和ITS rDNA序列分析,鉴定为变灰青霉(*Penicillium canescens*)。采用正相硅胶柱层析和凝胶(Sephadex LH-20)柱层析,以紫外光或碘蒸汽显迹,配合活性追踪等,从zjqy610发酵液中分离获得3个具抗菌活性的化合物。【结果】通过质谱和核磁共振波谱技术分别将其结构鉴定为:乙基氧苯氨基乙酸(*o*-acetylbenzeneamidinocarboxylic acid)、灰黄霉素(*griseofulvin*)和[1,2-*b*]呋喃2-甲基3-羧甲基4-羟基-5-甲氧基萘(*naphtho*[1,2-*b*]furan-3-carboxylic acid, 4-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-)。抑菌活性测试表明,3个化合物对多种植物病原真菌具有抑制活性,其中化合物zjqy610D-4对番茄灰葡萄孢、圆形炭疽菌、泻根亚隔孢壳和核盘菌4种病原真菌的活性最强,半抑制浓度EC<sub>50</sub>分别为0.68、0.38、0.91和0.61 mg/L。【结论】该化合物具有开发成农用抗生素的价值。

**关键词:** 多花黄精;植物内生菌;变灰青霉;抗真菌活性;结构鉴定

**中图分类号:** S482.292, O658.1, O657.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 08-08-1036

植物内生菌(endophytes)是指在整个生活史或是生活史的某一阶段能够定殖在宿主植物健康细胞之间或者细胞内,却不对其宿主产生明显病害症状的微生物。内生菌靠入侵植物组织获取营养和得到宿主的保护,但其也会产生具有生物活性的次生代谢产物来提高宿主的抗逆性能。人们对植物内生菌的研究主要涉及内生菌的生物学作用,如促进农作物的生长、提高农作物的抗逆性,以及病害防治、虫害防治、线虫防治和作物抗非生物胁迫等方面<sup>[1-3]</sup>。植物内生菌的多样性及其所处的特殊生境带来了其

多种多样的生态学功能<sup>[4]</sup>。生物多样性也意味着其化学多样性, Schulz等从内生真菌中获得的135个化合物中,新化合物占51%<sup>[5]</sup>。目前内生菌中得到次生代谢产物包括抗生素、抗肿瘤化合物、抗氧化化合物等,如抗肿瘤活性物质紫杉醇<sup>[6]</sup>、抗菌活性物质炭疽菌酸(*colletotric acid*)<sup>[7]</sup>和蛋白合成抑制剂木霉菌素(*trichodermin*)<sup>[8]</sup>等。

长期以来不合理用药甚至盲目用药促使病菌抗药性的迅速产生,导致许多老品种药物现在已没有多少应用价值,寻找开发新型活性化合物愈加显得重

**基金项目:**浙江省重大科技攻关项目(2006C12008)

\* 通信作者。Tel: +86-571-86971185; E-mail: fungi@zju.edu.cn

**作者简介:** #对本文有同等贡献。汪滢(1981-),女,博士研究生,研究方向为作物分子生物学研究;王国平(1974-),男,本科,工程师,研究方向为应用微生物方面, Tel: +86-571-86971185, E-mail: yuiop380@sina.com

**收稿日期:** 2010-01-24; **修回日期:** 2010-03-27

要。植物源药物来源范围较窄,加上近年药物需求逐年增多,许多珍贵的药用植物无序开发,导致野生植物资源溃泛,甚至于多种药用植物面临着绝种的风险。植物资源的短缺和不可再生性,导致许多药物更加难以满足市场需求。内生菌的生物多样性和化学多样性,成为发现新的活性化合物和先导化合物的重要来源。越来越多的学者开始注重对其的开发利用,从中寻找有价值的次生代谢产物,并应用于医药、环境和农业等领域。笔者多年来从事植物内生真菌及其活性化合物的研究,从浙江庆元百山祖自然保护区多花黄精(*Polygonatum cyrtoneura* Hua)内分离获得1株具有抗菌活性的菌株,从形态学及分子生物学方面对其进行分类鉴定,并对其活性次生代谢产物进行研究,以期为开发利用提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:**柱层析硅胶(200-300目)购自青岛海洋化工厂;柱层析凝胶(Sephadex LH-20)购自 Amersham Pharmacia 公司;色谱纯乙腈,美国 Honeywell Burdick & Jackson;其它所用试剂均为国产分析纯。高效液相色谱仪(Waters 1525 二元高压梯度泵、Waters 2487 检测器、Breeze 工作站),美国 waters; 3K-30 高速台式离心机,德国 Sigma; RE-6000A 旋转蒸发器,上海亚荣; $\infty$  4cm、长 50cm 的玻璃层析柱;SPECORD 200 紫外分光光度计,德国耶拿(蔡司);X-4 型显微熔点测定仪,北京泰克;Frs-135 型红外光谱仪,美国 Bio-Rad;LCQ-Advantage 型质谱仪,美国 Finnigan; DRX-500 型核磁共振仪,德国 Bruker。

**1.1.2 供试病原菌:**链格孢(*Alternaria alternata*)、灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、圆形炭疽菌(*Colletotrichum orbiculare*)、泻根亚隔孢壳(*Didymella bryoniae*)、尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、尖孢镰刀菌甜瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*)、果生丛梗孢(*Monilinia fructicola*)、指状青霉(*Penicillium digitatum*)、柿盘多毛孢(*Pestalotia diospyri*)、终极腐霉 *Pythium ultimum*、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani*、齐整小菌核 *Sclerotium rolfsii*、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)。

### 1.2 植物内生真菌的分离纯化

参照 Schulz 等<sup>[9]</sup>方法进行内生真菌的分离,无

菌处理后的组织块移接在含 100 mg/L 氨苄青霉素和链霉素的 PDA 平板上,25℃ 培养 3-10 d,待菌丝长出后将菌丝顶端移接到 PDA 培养基上,连续重复纯化 3 次后用石蜡油或冷冻法进行保存。将表面消毒处理过的材料不做剪切、植于 PDA 平板上作为对照检查表面消毒是否彻底,确保分离得到的真菌是植株的内生真菌而非表面附生菌<sup>[10]</sup>。

### 1.3 内生真菌的分类鉴定

参照文献[11-12],采用 PDA 培养基和促孢培养基进行插片培养,对分离到的内生真菌进行菌落形态、颜色、生长速率及显微形态特征进行观察,根据其产孢结构、分生孢子梗着生情况、孢子形态与颜色等,并结合 ITS1/ITS2 的 DNA 序列进行分类鉴定。ITS1/ITS2 的 DNA 序列 PCR 扩增引物 ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' 和 ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' 由上海生工合成, DNA 模板的提取参照文献[13]进行, PCR 体系: DNA 模板 1.0  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR 缓冲液(含 25 mmol/L  $MgCl_2$ ) 5.0  $\mu$ L, dNTP(5 mmol/L) 1.0  $\mu$ L, 引物(100  $\mu$ g/mL) 各 0.4  $\mu$ L, *Taq* DNA 聚合酶(2 U/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 加水补足 50  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94℃ 3 min; 94℃ 40 s, 55℃ 50 s, 72℃ 60 s, 30 个循环; 72℃ 10 min。PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,用 Axyprep DNA 纯化试剂盒纯化后测序,测序由上海泽衡公司完成。

### 1.4 抗菌活性菌株的筛选

采用两点对峙培养法进行活性菌株的筛选:用直径为 5 mm 的不锈钢打孔器切取纯化后的内生真菌菌饼,接入直径为 90mm 的 PDA 平板一侧(距中心 30 mm),25℃ 培养 2 d 后在 PDA 平板另一侧(距中心 30 mm)接入病原指示菌,同时以只接病原指示菌为对照,2-5 d 后观察菌落的生长及抑菌情况,用卡尺测量内生真菌与病原菌菌落生长的相向半径: $r_{内}$ 、 $r_{病}$ ,以及对照半径  $r_0$ ,病原菌与内生菌菌落相交后,观察记录内生真菌对病原菌的包围、抑制及覆盖病原菌菌落占领其营养空间的过程,筛选出对病原菌具有抑制作用的内生菌。

病菌的生长抑制率可采用下列公式计算:病菌的生长抑制率 = 对照病原菌直径  $r_0$  - 病原菌菌落直径  $r_{病}$  / 对照病原菌直径  $r_0 \times 100\%$

### 1.5 发酵液的制备及抗菌活性物质的分离纯化

将活性菌株 zjqy610 在 PDA 培养基上活化后,用无菌水将孢子洗下,接入 MID 液体培养基,避光静止培养 21 d 后过滤发酵产物。发酵液用等体积

的乙酸乙酯萃取3次,有机相用无水硫酸钠干燥后真空浓缩,得棕褐色粗提物浸膏。将乙酸乙酯粗提物用甲醇、丙酮和乙酸乙酯混合溶剂溶解,拌入100℃-105℃干燥后的层析硅胶,挥干溶剂后装柱,以不同梯度的石油醚/乙酸乙酯流动相进行洗脱。将收集的各单位洗脱液分别浓缩,并配制成甲醇溶液,采用高效薄层层析色谱(TLC)追踪斑点,用石油醚/乙酸乙酯最优系统展开,以紫外光照射或碘蒸汽显迹,配合滤纸片扩散法进行抑菌活性追踪测定,将斑点位置相同并有抑菌活性的样品进行合并,分离纯化得到活性代谢产物。

## 1.6 抑菌活性测定

**1.6.1 菌丝生长速率法:**用无菌水将供试样品稀释成8个梯度后加入到PDA中,混匀后倒入∞60 mm的培养皿中制成有毒平板。每个梯度3个重复,并以无菌水为空白(CK)对照。将活化的供试病原菌菌饼(∞5 mm)接种至有毒平板中央,25℃培养至对照皿菌落即将长满平皿时,用十字交叉法测量各处理皿的菌落∞。用下式计算抑制率:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{(\text{对照皿平均}\infty - \text{处理皿平均}\infty)}{(\text{对照皿平均}\infty - 5)} \times 100$$

利用DPS统计软件,采用剂量对数-抑菌率机值法计算求得半抑制浓度(EC<sub>50</sub>)及毒力回归方程。

**1.6.2 滤纸片扩散法:**将活化后的指示菌菌饼(直径5 mm)接种至PDA平板上进行初步培养,待菌落生长至∞20 mm时备用。取10 μL各组样品的甲醇溶液置于滤纸圆片(Φ5 mm)上,略微风干后,置于上述供试PDA平板菌落边缘。以甲醇溶液作空白对照,各处理3个重复,25℃培养2-3 d后测量抑菌圈∞。

## 2 结果和分析

### 2.1 活性菌株 zjqy610 的分类鉴定

从浙江庆元百山祖自然保护区药用植物多花黄精体内分离获得25株内生真菌,通过两点对峙培养法,筛选出zjqy610菌株对灰葡萄孢、终极腐霉、圆形炭疽菌、尖孢镰刀菌黄瓜专化型等病原菌具有很强的拮抗活性,zjqy610在多花黄精块根多个组织块都能分离到,15个组织块中分离到形态相似的有5株。该菌株在PDA培养基中生长较快,3-5 d菌落直径为4-6 cm,菌落边缘呈灰白色、向内为灰绿色,呈轮生状,背面有皱折,分泌色素,菌落表面有浅黄色水珠渗出(图1-A);分生孢子梗从气生菌丝生

出,分生孢子梗顶端有2-3层帚状枝,分生孢子呈规则圆球形(图1-B)。

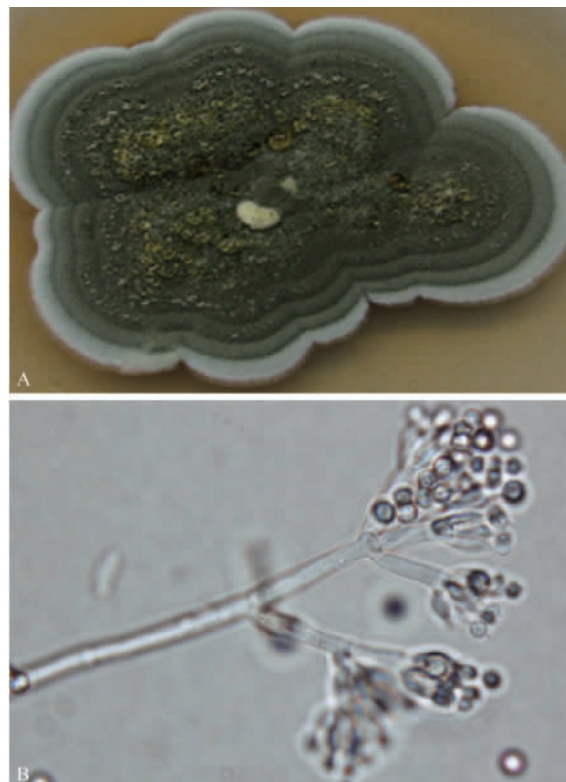


图1 zjqy610 菌落形态及产孢结构

Fig. 1 Colony Morphology and conidiogenous structure of zjqy610. A: Colony morphology of zjqy610 on PDA (1×); B: conidiophore and conidia morphology of zjqy610(1000×).

将序列登录GenBank(登录号GU556971),利用BLAST软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)与GenBank数据库中的序列进行比对分析,获得最相近菌株的ITS rDNA序列,用Clustal x1.8按照最大同源性的原则进行排序,采用Kimura 2计算核苷酸差异值,并用Neighbor-joining构建系统进化树,自展数为1000。ITS rDNA序列比对分析,zjqy610与变灰青霉*Penicillium canescens* AY373901、AJ608947、DQ658168、AF033493、FJ439586、AY484896等6个菌株的相似度达到100(图2),结合形态学特征,鉴定该菌株为变灰青霉。

### 2.2 zjqy610 活性代谢化合物纯化鉴定

20L发酵液经乙酸乙酯粗提,浓缩后得3.5 g棕褐色浸膏。200-300目层析硅胶干法上样,按极性从小到大顺序,用不同梯度的石油醚/乙酸乙酯为洗脱剂进行梯度洗脱,以50 mL为单位收得40份洗脱液。高效薄层层析色谱追踪斑点,配合滤纸片扩散

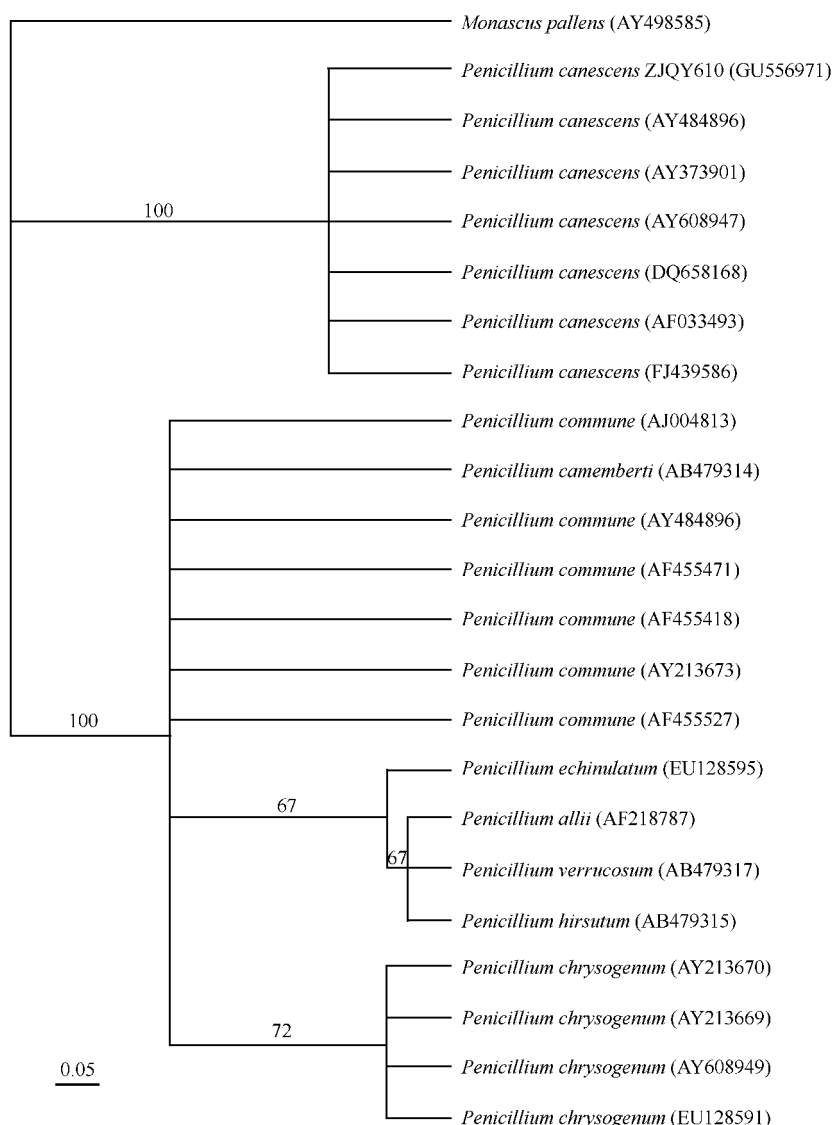


图2 zjqy610 与参考菌株 ITS rDNA 序列构建的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on the ITS rDNA sequences of zjqy610 and its GenBank allies. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap, 5% sequence divergence.

法进行抑菌活性追踪,将收集产物划分为6个部分,其中第2、4和6部分均显示有抑菌活性。125 mg第2部分反复通过正相硅胶柱和柱层析凝胶(Sephadex LH-20)纯化,从中得到化合物zjqy610B-g-3为44 mg;220 mg第4部分通过正相硅胶柱反复纯化,从中得到化合物zjqy610D-4为175 mg;109 mg第6部分通过正相硅胶柱分离纯化,得到化合物zjqy610F-2为21 mg。

化合物zjqy610B-g-3为白色针状晶体,以石油醚/乙酸乙酯=1:1溶剂展开Rf值为0.34,熔点174.6-175.3℃(未校正)。根据ESI-MS中准分子离子峰m/s:207[M+H]<sup>+</sup>、224[M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>及<sup>13</sup>C NMR和<sup>1</sup>H NMR可以推断其分子式为C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>

N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>。<sup>1</sup>H-NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δppm): 12.67(1H, brs, -OH), 8.60(1H, d, 6-H), 8.32(1H, brs, 1'-H), 7.86(1H, d, 3-H), 7.79(1H, brs, 2'-H), 7.57(1H, m, 5-H), 7.21(1H, m, 4-H), 2.43(3H, s, 10-H); <sup>13</sup>C-NMR(500MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, δppm): 138.1(C-1), 120.7(C-2), 128.8(C-3), 123.4(C-4), 132.3(C-5), 119.8(C-6), 158.7(C-7), 170.3(C-8), 196.4(C-9), 24.2(C-10)。数据与文献[14]报道相一致,结合理化性质,推断其为乙基氧苯氨基亚胺乙酸(o-acetylbenzeneamidinocarboxylic acid)(图3)。

化合物zjqy610D-4为白色菱形晶体,石油醚/乙酸乙酯=1:1的溶剂展开Rf值为0.21,熔点

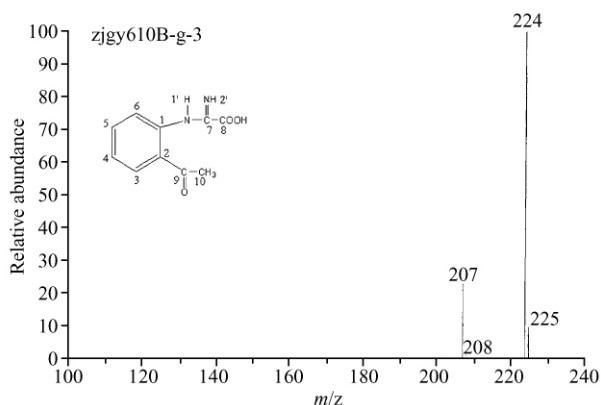


图3 化合物 zjqy610B-g-3 化学结构图和 MS 图谱

Fig. 3 Chemical structure and MS spectrogram of zjqy610B-g-3.

221.8 – 222.3°C (未校正)。根据 ESI-MS 中准分子离子峰  $m/s$ : 353  $[M + H]^+$  以及  $^{13}C$  NMR 和  $^1H$  NMR 可以推断其分子式为  $C_{17}H_{17}ClO_6$ 。  $^1H$  NMR (500MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ppm): 6.14 (1H, s, H-11), 5.54 (1H, s, H-8), 4.04 (3H, s, H-12), 3.98 (3H, s, H-14), 3.62 (3H, s, H-13), 3.00 (1H, d, H-15), 2.84 (1H, d,  $J = 16.6 Hz$ , H-16), 2.44 (1H, d,  $J = 13.4 Hz$ , H-15), 0.970 (3H, d,  $J = 4.6 Hz$ , H-17);  $^{13}C$  NMR (500MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$ ppm): 197.00 (C-1), 192.45 (C-2), 170.79 (C-3), 169.55 (C-4), 164.62 (C-5), 157.76 (C-6), 105.15 (C-7), 104.86 (C-8), 97.21 (C-9), 90.76 (C-10), 89.52 (C-11), 57.00 (C-12), 56.66 (C-13), 56.38 (C-14), 40.06 (C-15), 36.46 (C-16), 14.23 (C-17)。根据文献[15]的 NMR 数据以及化合物 zjqy610D-4 的相关理化性质,可以判定该化合物为灰黄霉素 (griseofulvin) (图4)。

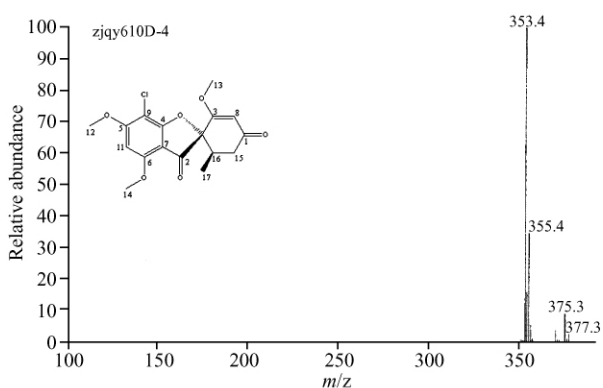


图4 化合物 zjqy610D-4 化学结构图和 MS 图谱

Fig. 4 Chemical structure and MS spectrogram of zjqy610D-4.

化合物 zjqy610F-2 为淡黄色无定型粉末,石油

醚/乙酸乙酯 = 1:1 溶剂展开 Rf 值为 0.18, 熔点 239.1-240.3°C (未校正)。根据 ESI-MS 中准分子离子峰  $m/s$ : 273  $[M + H]^+$  以及  $^{13}C$  NMR 和  $^1H$  NMR 可以推断其分子式为  $C_{15}H_{12}O_5$ 。  $^1H$  NMR (500MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 13.39 (1H, s, -COOH), 10.94 (1H, brs, -OH), 6.29-6.60 (4H, m, H-5 ~ 8), 3.85 (3H, s, -OCH<sub>3</sub>), 2.72 (3H, s, -CH<sub>3</sub>);  $^{13}C$  NMR (500MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 181.58 (s, C-1), 165.59 (s, C-4), 162.79 (d, C-13), 162.99 (d, C-14), 158.88 (s, C-6), 156.41 (s, C-2), 142.94 (s, C-3), 116.29 (s, C-8), 110.88 (s, C-11), 103.01 (s, C-9), 100.47 (s, C-10), 96.76 (s, C-7), 91.94 (s, C-7), 55.94 (s, C-5), 22.97 (s, C-15)。根据文献[16]的 NMR 数据以及相关理化性质,可以判定该化合物为[1,2-b]呋喃-2-甲基-3-羧甲基-4-羟基-5-甲氧基萘 Naphtho [1, 2-b] furan-3-carboxylic acid, 4-hydroxy-5-methoxy-2-methyl- (图5)。

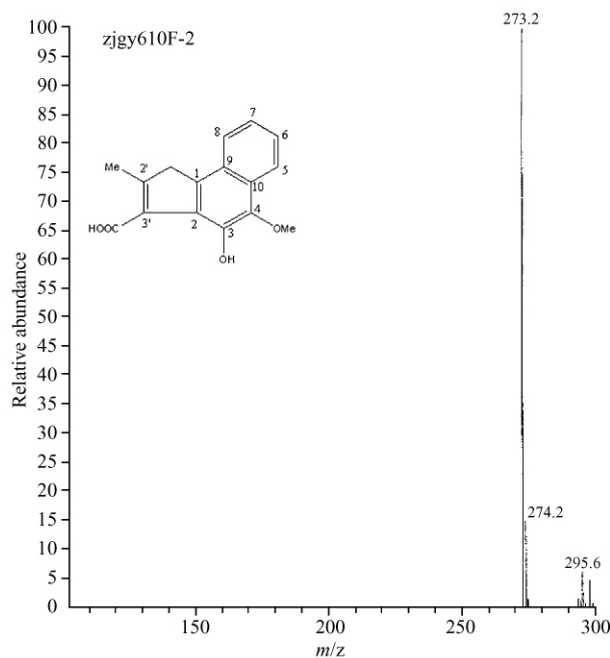


图5 化合物 zjqy610F-2 化学结构图和 MS 图谱

Fig. 5 Chemical structure and MS spectrogram of zjqy610F-2.

### 2.3 活性代谢化合物的抗菌活性

从菌株 zjqy610 的发酵液乙酸乙酯粗提取物中分离纯化得到 3 个具有抗菌活性的物质,其中化合物 zjqy610D-4 是其主要活性成份,抑菌活性谱广,对供试的 15 种植物病原真菌都具有很强的抑制作用。对灰葡萄孢、圆形炭疽菌、泻根亚隔孢壳和核盘菌 4 种病原真菌的活性最强,半抑制浓度  $EC_{50}$  分别为 0.68、0.38、0.91 和 0.61 g/mL (表 1)。

表 1 次生代谢产物 zjqy610D-4 对不同病原真菌的抑菌活性

Table 1 Inhibitory activity of metabolite zjqy610D-4 against different pathogenic fungi

Phytopathogens	Regression equation	r	IC <sub>50</sub> /(mg/L)	95% Fiducial limit/(mg/L)
<i>Alternaria alternata</i>	$y = 3.62496 + 0.90067x$	0.98318	33.63	16.78 - 93.66
<i>Botrytis cinerea</i>	$y = 5.0953 + 0.57803x$	0.9877	0.68	0.50 - 0.92
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	$y = 5.3432 + 0.82487x$	0.99724	0.38	0.34 - 0.43
<i>Didymella bryoniae</i>	$y = 5.10207 + 0.47636x$	0.97122	0.61	0.35 - 0.98
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	$y = 4.49731 + 0.62547x$	0.98574	6.36	3.95 - 12.39
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	$y = 4.24081 + 0.56561x$	0.97829	21.99	10.06 - 79.28
<i>Monilinia fracticola</i>	$y = 4.58092 + 0.84705x$	0.98832	3.12	2.22 - 4.76
<i>Penicillium digitatum</i>	$y = 4.40699 + 0.68759x$	0.98944	7.29	4.74 - 12.96
<i>Pestalotia diospyri</i>	$y = 3.77859 + 0.74889x$	0.97348	42.75	17.21 - 196.45
<i>Pythium ultimum</i>	$y = 4.55963 + 0.56183x$	0.98042	6.08	3.51 - 13.72
<i>Rhizoctonia solani</i>	$y = 3.90876 + 0.8829x$	0.98778	17.22	10.05 - 36.37
<i>Sclerotium rolfsii</i>	$y = 3.38739 + 1.71129x$	0.99499	8.76	6.84 - 11.68
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	$y = 5.02112 + 0.51823x$	0.91137	0.91	0.28 - 2.65
<i>Trichoderma harzianum</i>	$y = 4.55997 + 0.45681x$	0.96684	9.19	4.22 - 37.38
<i>Verticillium dahliae</i>	$y = 4.04117 + 0.68475x$	0.97446	25.13	10.84 - 104.54

### 3 讨论

Stierle 等<sup>[6]</sup>分离到产生抗肿瘤活性的紫杉醇菌株, Wang 等<sup>[17]</sup>分离到产细胞毒素 Brefeldin A 的内生真菌, LU 等<sup>[18]</sup>筛选到一株能产生 3 种新抗菌活性物质的炭疽菌, 植物内生真菌资源非常丰富, 内生真菌生物多样性带来代谢产物的多样性, 同样内生真菌代谢产物的应用也呈现多样性。内生真菌代谢化合物应用涉及多方面, 如促进作物生长和提高作物抗逆性、病虫害防治以及临床医疗用药, 内生真菌是人类的天然资源宝库。

目前很多学者认为内生真菌能合成与其宿主相类似的代谢产物, 其中“基因水平传递”理论认为基因的直接传递, 使得宿主与内生真菌具有了相同的次级代谢产物的合成途径, “内共生理论”认为是生物相互作用及协同进化导致内生菌具有与宿主相同代谢途径。还有学者认为是内生菌的侵入, 寄主在胁迫下产生小分子抗菌物质-植物保卫素, 许多事实也证明内生菌能够促进宿主植物活性成分的合成, 或者对植物次级代谢产物进行转化。正由于植物内生真菌具有与宿主相类似的代谢途径, 现在许多药用植物内生真菌及其代谢产物的开发利用成为热点。随着研究开发的进展, 内生真菌逐渐成为药用植物的替代资源, 为植物资源的保护提供了基础。

多花黄精为百合科黄精属中国特有植物, 具有抗肿瘤活性和降糖降脂的作用, 目前还没有多花黄精内生真菌及其代谢化合物的研究报道, 本课题组分离获得的活性菌株 zjqy610 为青霉属变种变灰青霉。β-半乳糖苷酶<sup>[19]</sup>、β-1,4-木聚糖酶<sup>[20]</sup>、植酸酶<sup>[21]</sup>是变灰青霉主要代谢产物。我们从 zjqy610 菌株发酵液中分离获得的 3 个代谢产物具有不同程度的生物活性, 其中化合物 *o*-Acetylbenzeneamidinocarboxylic Acid (zjqy610B-g-3) 是在 1982 年首次从赤霉病菌 *Gibberella saubinetii* (IAM8049)<sup>[14]</sup> 中分离得到, 具有抗肿瘤活性, 到目前为止青霉属真菌能代谢产生该化合物为首次报道。Naphtho [ 1, 2-b ] furan-3-carboxylic acid, 4-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-(zjqy610F-2) 是 1960 年通过化学合成方法得到的<sup>[16]</sup>, 该化合物为首次从微生物代谢产物中发现。化合物灰黄霉素 (zjqy610D-4) 是内生真菌 zjqy610 主要活性代谢产物, 对多种植物病原真菌均具有抑制作用, 尤其是对灰葡萄孢、圆形炭疽菌、泻根亚隔孢壳和核盘菌的抑菌活性最强, 半抑制浓度 EC<sub>50</sub> 分别为 0.68、0.38、0.91 和 0.61 mg/L。灰黄霉素为灰黄青霉 *Penicillium griseofulvum* 的代谢产物, 文献报道变灰青霉可以产生灰黄霉素<sup>[22]</sup>, 我们的研究也证明了变灰青霉 zjqy610 能代谢产生该化合物(数据未显示)。

## 参考文献

- [ 1 ] Zhang HW, Song YC, Tan RX. Biology and chemistry of endophytes. *Natural Product Reports*, 2006, 23: 753-771.
- [ 2 ] Stroble G, Daisy B, Castillo U, Harper J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 2004, 67: 257-268.
- [ 3 ] Piel J, Hui D, Wen GP, Butzke D, Platzer M, Fusetani N, Matsunaga S. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *PNAS*, 2004, 21: 519-538.
- [ 4 ] Purvis A, Hector A. Getting the measure of biodiversity. *Nature*, 2000, 405: 212-219.
- [ 5 ] Schulz B, Boyle C, Draeger S, Rommert AK, Krohn K. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. *Mycological Research*, 2002, 106: 996-1004.
- [ 6 ] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanea*, an endophytic fungus of Pacific yew. *Science*, 1993, 260: 214-216.
- [ 7 ] Zou WX, Meng JC, Lu H, Chen GX, Shi GX, Zhang TY, Tan RX. Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*. *Journal of Natural Products*, 2000, 63: 1529-1530.
- [ 8 ] Eric C, Julian ED. Inhibition of Initiation, Elongation, and Termination of Eukaryotic Protein Synthesis by Trichothecene Fungal Toxins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1977, 11: 491-499.
- [ 9 ] Schulz B, Wanke U, Draeger S. Endophytes from herbaceous plants and shrubs: effectiveness of surface sterilization methods. *Mycological Research*, 1993, 97: 1447-1450.
- [ 10 ] Cho LX, You JL, Zhou SN. Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 8: 169-171.
- [ 11 ] BameR HL, Hunter BB. 半知菌属图解. 沈崇尧编译. 第三版. 北京: 科学出版社, 1977.
- [ 12 ] 魏景超. 真菌鉴定手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1979.
- [ 13 ] Guo LD, Hyde KD, Liew ECY. Detection and Taxonomic Placement of Endophytic Fungi within Frond Tissues of *Livistona chinensis* Based on rDNA Sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 20: 1-13.
- [ 14 ] MuneKata M, Seto H, Tamura G. Isolation of *o*-Acetylbenzeneamidinocarboxylic Acid, a New Metabolite of *Gibberella saubinetii*. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46(6): 1711-1713.
- [ 15 ] [http://www. labseeker. com/ChemicalBiotech/chem-moreinfo. asp? catalog\\_no =26529.](http://www.labseeker.com/ChemicalBiotech/chem-moreinfo.asp?catalog_no=26529)
- [ 16 ] Grinev AN, Hun ST, Terentev AP. Synthesis of furan, pyrrole, naphthofuran, and benzindole derivatives. *Zhurnal Obshchei Khimii*, 1960: 3668-3672.
- [ 17 ] Wang JF, Huang YJ, Fang MJ, Zhang YJ, Zheng ZH, Zhao YF, Su WJ. Brefeldin A, a cytotoxin produced by *Paecilomyces* sp. and *Aspergillus clavatus* isolated from *Taxus mairei* and *Torreya grandis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2002, 34: 51-57.
- [ 18 ] Lu H, Zou WX, Meng JC, Hu J, Tan RX. New bioactive metabolites produced by *Colletotrichum* sp. an endophytic fungus in *Artemisia annua*. *Plant Science*, 2000, 151: 167-173.
- [ 19 ] Budriene S, Gorochovceva N, Romaskevicius T, Yugova LV, Miezeliene A, Dienys G, Zubriene A.  $\beta$ -Galactosidase from *Penicillium canescens*. Properties and immobilization. *Central European Journal of Chemistry*, 2005, 3: 95-105.
- [ 20 ] Sinitsyna OA, Gusakov AV, Okunev ON, Serebryany VA, Vavilova EA, Vinetsky YP, Sinitsyn AP. Recombinant endo- $\beta$ -1, 4-xylanase from *Penicillium canescens*. *Biochemistry (Moscow)*, 2003, 68: 1313-1319.
- [ 21 ] 褚西宁, 王朝健, 袁静明. 变灰青霉固态发酵降解植酸的初步研究. *微生物学通报 (Microbiology)*, 1996, 23(4): 217-220.
- [ 22 ] Nicoletti R, Lopez-Gresa MP, Manzo E, Carella ACIavatta ML. Production and fungi toxic activity of Sch 642305, a secondary metabolite of *Penicillium canescens*. *Mycopathologia*, 2007, 163: 295-301.

# Isolation and identification of an endophytic fungus of *Polygonatum cyrtonema* and its antifungal metabolites

Ying Wang<sup>1#</sup>, Guoping Wang<sup>2#</sup>, Liwei Wang<sup>3</sup>, Xuhui Xu<sup>4</sup>, Jing Xia<sup>2</sup>, Xuefang Huang<sup>2</sup>, Yougui Wu<sup>5</sup>, Chulong Zhang<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(<sup>2</sup> Zhejiang Dahua Zhejiang University Biomedicament R&D Center, Hangzhou 311616, China)

(<sup>3</sup> College of Medicine and Public Health Management, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

(<sup>4</sup> Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(<sup>5</sup> Zhejiang Qingyuan Baishanzu Mountain Nature Reserve, Qingyuan 323800, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] Endophytic fungi in medicinal plants produce a variety of bioactivity compounds. In this study, an endophytic fungus zjqy610 with antifungal activity was isolated from *Polygonatum cyrtonema* in Zhejiang Qingyuan Baishanzu Mountain nature reserve. [ **Methods** ] Strain zjqy610 was identified as *Penicillium canescens* based on the morphology and its rDNA sequence analysis. Three antifungal compounds were isolated from the fermentation broth of zjqy610 through normal-phase silica gel column chromatography and gel (Sephadex LH-20) column chromatography, traced by ultraviolet light or iodine vapor with bioassay-guided fractionation. [ **Results** ] These three compounds were elucidated as o-acetylbenzeneamidinocarboxylic acid (zjqy610B-g-3), griseofulvin (zjqy610D-4) and naphtho [1,2-b] furan-3-carboxylic acid, 4-hydroxy-5-methoxy-2-methyl-(zjqy610F-2) based on mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. The antifungal activity assays showed that the three compounds had inhibitory to variety of plant pathogenic fungi. Compound zjqy610D-4 had strong antifungal activity against *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum orbiculare*, *Didymella bryoniae* and *Sclerotinia sclerotiorum*. EC<sub>50</sub> was 0.68, 0.38, 0.91 and 0.61 mg/L, respectively. [ **Conclusion** ] Zjqy610D-4 is deserved to develop an agricultural antibiotics.

**Keywords:** *Polygonatum cyrtonema*; Endophytes; *Penicillium canescens*; antifungal activity; structure elucidation

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Scientific and Technological Project of Zhejiang Province(2006C12008)

\* Corresponding author. Tel: +86-571-86971185; E-mail: fungi@zju.edu.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 24 January 2010/ Revised: 27 March 2010

## 《微生物学报》综述文章投稿要求

为了避免篇幅庞大、罗列文献、内容空泛、缺乏观点,力求内容更加新颖、并更具可读性,本刊提出以下几点要求,大家根据要求踊跃投稿。

1. 本刊主要刊登微型综述(mini review),来稿字数最好控制在5000字以内(不包括参考文献)。
2. 综述的选题要有新意,对读者及同行确有一定的启发作用和参考价值。
3. 参考文献应控制在40篇以内,近3年发表的文献不少于10篇。
4. 应结合文献扼要评述国内外学者在本领域的研究进展,不要泛泛罗列文献,只述不评。
5. 应结合自己的研究工作,就该研究领域存在的问题和解决的途径提出自己的观点。
6. 投送"能够反映国际研究热点、对学科发展有指导意义"的述评类文章。