

# 水稻内生真菌 *Fusarium moniliforme* ZSU-1 次级代谢产物研究

王 军<sup>1a</sup>, 马文哲<sup>1a</sup>, 周世宁<sup>2a</sup>, 张庆波<sup>1a</sup>, 赖小敏<sup>1b\*</sup>, 林永成<sup>2b</sup>

(1. 中山大学, a. 药学院; b. 中山医学院, 广州 510080; 2. 中山大学, a. 生命科学学院; b. 化学与化学工程学院, 广州 510275)

**摘要:**为了探索内生镰刀菌对稻田病害生物防治的物质基础,对一株来自健康水稻茎部的串珠镰刀菌 *Fusarium moniliforme* ZSU-1 进行发酵培养,用色谱技术分别对其菌体提取物、发酵液提取物进行活性次级代谢产物分离,得到 4 个化合物,通过 1D、2D NMR、质谱等波谱分析,分别鉴定为镰刀菌酸(1)、镰刀菌酸·脱氢镰刀菌酸缩合物(1:1)(2)、白僵菌素(3)和甘露醇(4)。鉴于镰刀菌酸、镰刀菌酸·脱氢镰刀菌酸缩合物(1:1)有较强的抗菌活性,推测这两个化合物对稻田病害生物防治可能有一定的意义。

**关键词:**串珠镰刀菌; 次级代谢; 水稻内生真菌

中图分类号: Q946

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)05-0510-04

## Secondary Metabolites of the Endophytic Fungus *Fusarium moniliforme* ZSU-1 from Rice

WANG Jun<sup>1a</sup>, MA Wen-zhe<sup>1a</sup>, ZHOU Shi-ning<sup>2a</sup>, ZHANG Qing-bo<sup>1a</sup>,

LAI Xiao-min<sup>1b\*</sup>, LIN Yong-cheng<sup>2b</sup>

(1a. School of Pharmaceutical Science; 1b. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;

2a. School of Life sciences; 2b. School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** The preponderant endophytic fungi of rice in Guangdong Province were *Fusarium* spp. In order to study the function of secondary metabolites from endophytic fungi on bio-control to rice paddy disease, a strain of endophytic fungus *Fusarium moniliforme* ZSU-1 from sterily rice stem was ferment cultured, four secondary metabolites was isolated and purified by silica column and sephadex LH-20 chromatogram. On the basis of 1D、2D NMR and mass spectral data, there were fusaric acid (1), fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids (1:1) (2), beauvericin (3) and mannitol (4). The components 1 and 2 have strong antibacterial activities, they might be used for bio-control to rice paddy disease.

**Key words:** *Fusarium moniliforme*; Secondary metabolites; Endophytic fungus from rice

植物内生真菌是一种新的微生物资源, Schulz 等从植物内生真菌中获得 135 个化合物, 其中, 新化合物占 51%, 对从不同植物中分离到的 6 500 株内生真菌进行活性测定, 发现 80%~83% 的内生真菌具有抗细菌、抗真菌和除草活性, 揭示了植物内生真菌在医药研究中有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。植物内生真菌本身及其次级代谢产物还有广泛的农业

用途, 如促进农作物生长、提高农作物的抗逆性(包括抗盐碱、抗旱、抗寒等)、防治病虫害等<sup>[2]</sup>, 本课题组前期对广东省广州市五山、番禺 2 个采样点、不同品种水稻中内生真菌的类群分布及抗水稻病原菌活性进行了初步研究, 得到水稻内生真菌的优势菌群为镰刀菌; 分离到的内生真菌中有 41% 表现出不同程度的抗水稻病原菌活性, 其中内生镰刀菌

达到 55%,是具有颞抗活性的内生真菌中最大的群体,可能成为稻田病害生物防治的良好微生物资源<sup>[3]</sup>。为进一步研究内生镰刀菌颞抗活性的本质,我们挑选了抗菌活性较强的串珠镰刀菌 *Fusarium moniliforme* ZSU-1 sheld 进行次级代谢产物研究,以期探索水稻内生真菌抗菌活性的物质基础,为稻田病害生物防治提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

水稻内生真菌 ZSU-1 由中山大学生命科学学院周世宁教授研究小组从健康水稻的茎部组织中分离得到,经鉴定为串珠镰刀菌 *Fusarium moniliforme*,于 4℃ 下保存在 PDA 培养基中,置于中山大学药学院生药学和天然药物化学实验室。

柱色谱硅胶(200~300目)、硅胶 HF<sub>254</sub> 均为青岛海洋化工厂生产,凝胶 Sephadex LH-20 为瑞典 Amersham Biosciences 公司生产,葡萄糖(化学纯),乙酸乙酯(AR),石油醚(AR),氯仿(AR),甲醇(AR)。

PDA 培养基:马铃薯 20%,蔗糖 2%,琼脂 2%。PD 培养基:马铃薯 20%,蔗糖 2%。

### 1.2 仪器

<sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 由 Varian Inova 500NB 型傅里叶变换超导核磁共振仪测定(美国 Varian 公司),以四甲基硅烷(TMS)为内标。质谱用 LCQ DECA XP 型液相色谱-质谱联用仪(美国 Thermo 公司),VG-2ABB-HS 质谱仪测定,北京 X4 型显微熔点仪,分析天平、JY98-III 超声波细胞破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

### 1.3 发酵

挑取少量菌种接种到经高压灭菌的 PDA 平板培养基上,室温下静置培养 7 d 进行菌种复壮。挑取菌丝体适量接种到装有 500 mL PD 培养基的 1 000 mL 锥形烧瓶中,在 25℃ 下静置培养 15 d,总发酵体积 10 L。

### 1.4 提取分离

收集发酵液,用纱布过滤,分离菌体和培养液。培养液用等体积乙酸乙酯多次提取,至乙酸乙酯层为无色,合并萃取液,在 50℃ 下减压蒸干得到浸膏(1.7 g);将培养液乙酸乙酯提取物,加甲醇溶解,用石油醚萃取。甲醇液浓缩得发酵液甲醇部位,石油醚萃取液浓缩,得发酵液石油醚部位。

发酵液甲醇部位离心,除去固体不溶物,经凝胶 Sephadex LH-20 柱,甲醇洗脱,收集得到馏分 F1~F10。取 F4 馏分,经硅胶柱层析,以石油醚-乙酸乙酯梯度洗脱,在石油醚-乙酸乙酯 1:1 处可收集到组分 F<sub>45</sub>;重结晶,得到化合物 1 (50 mg),在石油醚-乙酸乙酯 4:6 处可收集到组分 F<sub>46</sub>,经制备硅胶薄层层析,重结晶,得到化合物 2 (80 mg)。

菌体干燥后加一定量的甲醇,超声波细胞破碎提取 3 次,合并提取液,在 50℃ 下减压浓缩至干,得到菌体甲醇提取物浸膏(1.5 g)。该浸膏经硅胶柱层析,石油醚/乙酸乙酯梯度洗脱,在石油醚/乙酸乙酯 1:1 处可收集到组分 F<sub>μ</sub>,在乙酸乙酯处得到组分 F<sub>β</sub>,组分 F<sub>μ</sub> 经硅胶柱层析,石油醚-丙酮梯度洗脱,在石油醚-丙酮 7:3 处,得到化合物 3 (10 mg);组分 F<sub>β</sub> 重结晶,得到化合物 4 (20 mg)。

### 1.5 结构鉴定

**镰刀菌酸(Fusaric acid, 1)** 白色结晶,熔点:108~109℃,易溶于氯仿、甲醇,分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>; ESIMS *m/z*: 178 [M-H]; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 8.18 (d, *J* = 8 Hz), 7.79 (dd, *J* = 8, 2 Hz), 8.66 (d, *J* = 2.5 Hz), 10.40 (s), 2.75 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.66 (2H, m, *J* = 7.5 Hz), 1.38 (2H, m, *J* = 7.5 Hz), 0.94 (3H, t, *J* = 7.5 Hz); <sup>13</sup>C MNR、DEPT (CDCl<sub>3</sub>): δ 144.4 (C), 124.1 (CH), 138.6 (CH), 143.3 (C), 147.7 (CH), 164.6 (C), 32.9 (CH<sub>2</sub>), 32.7 (CH<sub>2</sub>), 22.2 (CH<sub>2</sub>), 13.7 (CH<sub>3</sub>)。HMBC 数据见结构图。

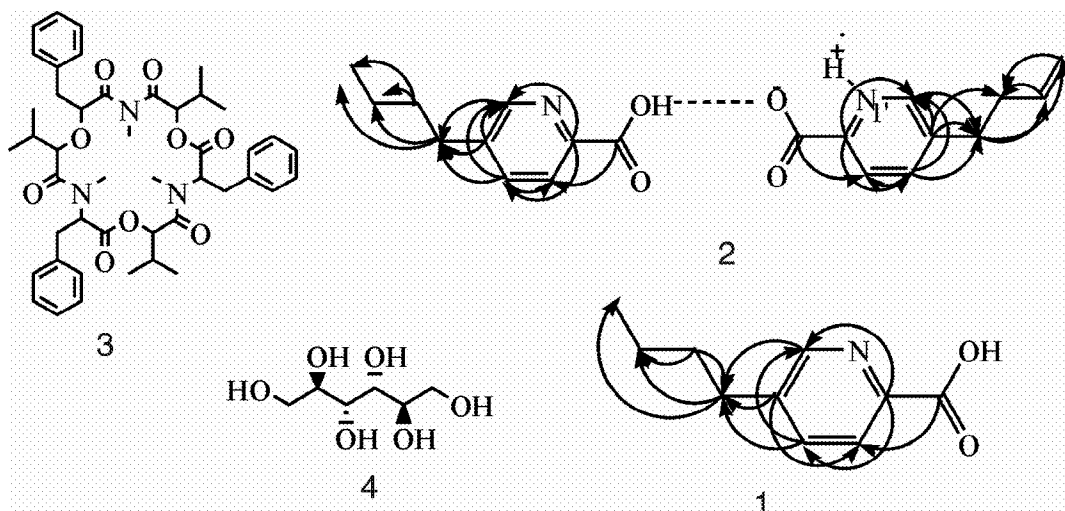
**镰刀菌酸·脱氢镰刀菌酸(1:1)缩合物(Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids (1:1), 2)** 白色结晶,易溶于氯仿、甲醇,分子式为 C<sub>10</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>·C<sub>10</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>, Mr = 356.41; FAB mass *m/z*: 178 [M+1], 180[M+1], ESIMS *m/z*: 178[M+1], 180[M+1]; <sup>1</sup>H NMR(500 MHz DMSO): δ 7.97 (2H, d, *J* = 8 Hz), 7.81 (2H, dd, *J* = 8, 1.5 Hz), 8.55 (2H, d, *J* = 1.5 Hz), 11.40 (2H, s), 2.65 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.58 (2H, q, *J* = 7.5 Hz), 1.31 (2H, m, *J* = 7.5 Hz), 0.90 (3H, t, *J* = 7.5 Hz), 2.80 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 2.39 (2H, q, *J* = 6.6 Hz), 5.80 (1H, ddt, *J* = 17.0, 13.5, 6.6 Hz), 5.01 (1H, d, *J* = 17.0 Hz), 4.99 (1H, d, *J* = 13.5 Hz); <sup>13</sup>C MNR、DEPT (DMSO): δ 146.0 (C), 145.9 (C), 124.2 (CH), 124.1 (CH), 136.8 (CH), 136.7 (CH), 141.4 (C) 140.6 (C), 149.4 (CH), 149.3 (CH), 166.0 (C), 32.33 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 21.5 (CH<sub>2</sub>), 13.5

(CH<sub>3</sub>), 33.9 (CH<sub>2</sub>), 31.1 (CH<sub>2</sub>), 137.2 (CH), 115.6 (CH<sub>2</sub>)。HMBC 数据见结构图, 晶体结构数据表见参考文献[4]。

**白僵菌素 (Beauvericin, 3)** 白色固体, mp. 80℃; 易溶于石油醚、氯仿、乙酸乙酯、丙酮、甲醇; 分子式为 C<sub>45</sub>H<sub>57</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>。ESIMS *m/z*: 806.4 [M + Na]<sup>+</sup>, 801.3 [M + NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup>, 784.3 [M + H]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ 7.24 (5H, ar CH, Phe), 5.63 (1H, dd, *J* = 4.8, 12.4 Hz), 4.78 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 3.44 (1H, dd, *J* = 4.4, 14.4 Hz), 3.06 (3H, *s*, N-CH<sub>3</sub>), 2.93 (1H, dd, *J* = 12.4, 14.4 Hz), 1.90 (1H, *m*), 0.81 (3H, d, *J* = 6.6 Hz), 0.34 (3H, d, *J* = 6.6 Hz); <sup>13</sup>C MNR DEPT (125 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ<sub>c</sub> 171.1 (C), 169.9

(C), 135.9 (C), 128.7 (2CH), 128.6 (2CH), 127.1 (CH), 75.9 (CH), 57.0 (CH), 34.7 (CH<sub>2</sub>), 32.0 (CH<sub>3</sub>), 29.9 (CH), 18.4 (CH<sub>3</sub>), 17.0 (CH<sub>3</sub>)。结构确定参考文献[5]。

**甘露醇 (Mannitol, 4)** 白色针状结晶 (MeOH), 易溶于水, 微溶于甲醇, mp. 166 ~ 168℃, ESIMS *m/z*: 240.9 [M + CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H]<sup>-</sup>, 181.2 [M - H]<sup>-</sup>; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz D<sub>2</sub>O): δ 83.86 (2H, dd, *J* = 11.7, 1.6 Hz), 3.74 (4H, *m*), 3.63 (2H, dd, *J* = 11.5, 8 Hz); <sup>13</sup>C NMR DEPT (125 MHz D<sub>2</sub>O): δ 63.6 (2CH<sub>2</sub>), 69.7 (2CH), 71.3 (2CH)。结构确定参考文献[6]。



## 2 结果和讨论

水稻内生真菌 ZSU-1 在 25℃ 下发酵 2 周, 培养液经乙酸乙酯等体积萃取和菌体经甲醇超声破碎提取, 从培养液中分离得到了 2 个生物碱, 从菌体中分离到了 1 个缩酚胺类化合物和 1 个六碳糖醇, 通过对其 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、2-D NMR、ESIMS、FABMS 等波谱数据的分析及与文献数据对比, 鉴定了这些化合物分别为镰刀菌酸 (Fusaric acid, 1), 镰刀菌酸·脱氢镰刀菌酸 (1:1) 缩合物 (Fusaric and 9,10-dehydrofusaric acids (1:1), 2), 白僵菌素 (Beauvericin, 3) 及甘露醇 (Mannitol, 4)。

从培养液提取物中分离得到的化合物 2 的 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 吸收信号较复杂, 但通过 FABmass 及 ESIMS 技术检出的分子离子峰不能与其复杂的核磁共振信号相匹配, 两种质谱技术均给出 *m/z*: 178[M+1]、180[M+1] 1:1 的质谱吸收信号, 我们

通过 X-射线单晶衍射实验证明, 化合物 2 为镰刀菌酸·脱氢镰刀菌酸 (1:1) 缩合物, 在结晶状态中两种分子通过羧基进行分子间缩合<sup>[4]</sup>, 但其液态是否也成缩合状态还有待进一步证实。

镰刀菌酸有广泛的生理活性, 是一种多巴胺 β-羟化酶抑制剂, 能抑制去甲肾上腺素合成, 对老年性高血压病人有降血压作用。根据镰刀菌酸、镰刀菌酸·脱氢镰刀菌酸 (1:1) 缩合物、白僵菌素这 3 个化合物有很强的抗菌活性, 推测在水稻病害生物防御中起一定作用的物质可能是镰刀菌酸。Son 等从有广泛拮抗植物病原细菌、真菌活性的镰刀菌 *Fusarium oxysporum* Aims EF119 代谢产物中找到比卡菌素 (bikaverin) 和镰刀菌酸, 实验证明实际抗菌有效的成分是镰刀菌酸。从本研究 and Son 等的结果可初步推断镰刀菌酸在镰刀菌的生物防治中可能起着重要作用, 还有待进一步证实。

## 参考文献

- [1] Schulz B, Boyle C, Draeger S, et al. Endophytic fungi: A source of biologically active secondary metabolites [J]. *Mycol Res*, 2002, 106: 996–1004.
- [2] Gimenez C, Cabrera R, Reina M, et al. Fungal endophytes and their role in plant protection [J]. *Curr Org Chem*, 2007, 11: 707–720.
- [3] Tian X L(田新莉), Cai A Q(蔡爱群), Zhou S N(周世宁), et al. Studies on communities of endophytic fungi from rice and their antipathogenic activities *in vitro* [J]. *Acta Sci Nat Univ Sunyatseni* (中山大学学报:自然科学版), 2005, 144(12): 69–73.(in Chinese)
- [4] Wang J, Li G W, Lin Y C, et al. 5-(But-3-enyl) pyridinium-2-carboxylate-5-butylpyridine-2-carboxylic acid (1:1), a co-crystal from *Fusarium moniliforme* [J]. *Acta Crystallogra Sec E*, 2005, 61(5): o1515.
- [5] Kuo Y C, Lin L C, Don M J, et al. Cyclodesipeptide and dioxomorpholine derivatives isolated from the insectbody portion of the fungus *Cordyceps cicadae* [J]. *J Chin Med*, 2002, 13(4):209–219.
- [6] Guo S X(郭顺星), Chen X M(陈晓梅), Yang J S(杨峻山), et al. Studies on the chemical constituents of *Mycena dendrobii* [J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2000, 35(6): 372–374.(in Chinese)
- [7] Son S W, Kim H Y, Choi G J. Bikaverin and fusaric acid from *Fusarium oxysporum* show antioomycete activity against *Phytophthora infestans* [J]. *J Appl Microbiol*, 2008, 104: 692–698.