

国 政, 李婉婉, 杨 晗, 等. 月季内生放线菌 GZ-57 的抑菌活性成分[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(2): 304-309.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.02.013

月季内生放线菌 GZ-57 的抑菌活性成分

国 政, 李婉婉, 杨 晗, 邓逸冰, 姬志勤

(西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 植物内生菌作为有待开发的微生物资源在农用抗生素的开发方面具有广阔的应用前景。因此, 本研究以月季作为植物材料对植物内生菌进行筛选, 得到 1 株具有抗菌活性的植物内生放线菌 GZ-57, 并通过大孔吸附树脂, 硅胶柱层析以及高效液相色谱等技术对该菌株的发酵滤液进行活性化合物的分离得到 2 种化合物 57-1 和 57-2, 通过¹H NMR, ¹³C NMR 及 ESI-MS 等波谱分析, 结果表明, 这 2 种化合物分别为水杨酰胺和 1H-吡咯-2-甲酰胺。对 2 种化合物进行抑菌试验研究结果表明, 抗真菌方面: 在 50 μg/ml 浓度下, 化合物 57-1 对小麦赤霉病菌、烟草赤星病菌和茄子黄萎病菌菌丝生长抑制率分别为 42.4%、35.5% 和 34.4%; 化合物 57-2 对茄子黄萎病菌和烟草赤星病菌菌丝生长抑制率分别为 40.0% 和 34.8%。抗细菌方面: 化合物 57-1 对 7 种病原细菌均无明显抑制作用; 化合物 57-2 对烟草青枯病菌、猕猴桃溃疡病菌和蜡状芽孢杆菌有较强的抑制作用, 其最小抑菌浓度分别为 12.50 μg/ml、6.25 μg/ml 和 12.50 μg/ml。表明菌株 GZ-57 发酵产物对多种病原真菌和病原细菌具有抑制活性, 且效果明显。

关键词: 月季; 内生放线菌; 抑菌活性

中图分类号: S476+.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)02-0304-06

Antimicrobial ingredients of GZ-57, an endophytic actinomycete from *Rosa chinensis* Jacq.

GUO Zheng, LI Wan-wan, YANG Han, DENG Yi-bing, JI Zhi-qin

(College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Endophytes as microbial resources to be developed has broad application prospects in the development of agricultural antibiotics. In this study, an antimicrobial endophytic actinomycete, named GZ-57, was isolated from the leaves of *Rosa chinensis* Jacq. Two compounds, 57-1 and 57-2, acquired through the absorption of macroporous resin, silica gel column chromatography and RP-HPLC were identified as salicylamide and 1H-pyrrole-2-carboxamide, respectively. The inhibition rates of compound 57-1 at 50 μg/ml against the mycelia growth of *Fusarium graminearum*, *Alternaria alternata* and

Verticillium dahliae were 42.4%, 35.5% and 34.4%, respectively, and the inhibition rates of compound 57-2 against *V. dahliae* and *A. alternata* were 40.0% and 34.8%. Compound 57-1 showed no antibacterial activity to seven strains, while compound 57-2 exerted strong antibacterial activities against *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* and *Bacillus cereus*, with MIC values being 12.50 μg/ml, 6.25 μg/ml and 12.50 μg/ml, respectively. Due to a variety of inhibitory activities to pathogenic fungi and bacteria, GZ-57 can be applied as a biocon-

收稿日期: 2014-10-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31371973、31301700); 陕西省自然科学基金项目(2013JQ3003); 中央高校基本科研业务费专项(QN2013009)

作者简介: 国 政(1990-), 男, 山东聊城人, 硕士研究生, 研究方向为天然产物化学。(Tel) 18292490412; (E-mail) guozheng1271@163.com

通讯作者: 姬志勤, (Tel) 15309203829; (E-mail): jizhiqin@nwsuaf.edu.cn

trol endophyte.

Key words: *Rosa chinensis* Jacq; entophytic actinomycete; antimicrobial activity

农用抗生素是现代农药的重要组成部分,从微生物中寻找新型抗生素则是新农药创制的重要途径之一^[1]。植物内生菌(Endophyte)指那些在其生活史的一定阶段或全部阶段生活于健康植物各种组织和器官内部或细胞间隙的真菌或细菌^[2-5]。植物内生菌是生物活性天然产物的丰富资源,目前已从内生菌中得到多种生物活性(如抗菌、抗癌和抗氧化等)次生代谢产物^[6]。我们从月季(*Rosa chinensis* Jacq)叶中分离得到一株内生放线菌(编号:GZ-57),其发酵液对多种病原细菌有较强的抑菌活性,同时对多种植物病原真菌菌丝生长有一定的抑制作用。为了明确放线菌 GZ-57 发酵滤液的抑菌活性成分,评价其在农林病害防治中的潜在应用价值,本研究对其发酵液的抑菌活性及活性成分进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

内生放线菌 GZ-57,从月季叶中分离得到,保存于西北农林科技大学农药研究所。

培养基:高氏一号培养基,用于 GZ-57 菌株斜面及平板培养;小米液体培养基:小米 10.0 g、葡萄糖 10.0 g、氯化钠 2.5 g、蛋白胨 3.0 g、碳酸钙 1.0 g、硫酸铵 1.0 g、纯净水 1 000 ml,用于 GZ-57 菌株摇瓶发酵;牛肉膏蛋白胨琼脂培养基:牛肉膏 0.3 g、蛋白胨 1.0 g、氯化钠 0.5 g、琼脂 2.0 g、纯净水 100 ml, pH 7.0~7.2;Muller-Hinton 肉汤培养基(杭州大和微生物试剂有限公司生产),用于病原细菌培养;PDA 培养基:马铃薯 20.0 g、葡萄糖 2.0 g、琼脂 15.0 g、纯净水 100 ml,用于病原真菌培养。所有培养基在 121 ℃、 1×10^5 Pa 高压灭菌 30 min 后备用。

菌株分离:将新采集的月季叶片用自来水冲洗干净,70%酒精消毒 5 min,无菌水冲洗 3~4 次,1%次氯酸钠溶液浸泡 20 min,10%碳酸氢钠溶液浸泡 15 min,无菌条件下将叶片剪碎,研磨至组织浸出后,加入无菌水冲洗,取 100 μ l 涂布到高氏一号培养基(含 50 mg/L 高锰酸钾和 100 mg/L 奈定酮酸)上培养,7 d 后将菌株进行分离培养纯化后放置于 4 ℃冰箱保存。

GZ-57 菌株种子液制备:将 GZ-57 菌株接种于高氏一号培养基上,25 ℃培养 7 d,接种于 100 ml 马铃薯葡萄糖液体培养基中,180 r/min、28 ℃振荡培养 16 h。

GZ-57 菌株发酵滤液制备:将 20 ml 种子液接种于 80 ml 小米发酵滤液中,180 r/min、28 ℃振荡培养 7 d。

病原真菌:番茄灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)、苹果炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、玉米弯孢病菌(*Curvularia lunata*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、茄子黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)和西瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum*)由西北农林科技大学农药研究所提供。将病原真菌接种于 PDA 培养基,于 25 ℃下培养 3~7 d。

病原细菌:烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)、猕猴桃溃疡病菌(*Pseudomonas syringae*)由西北农林科技大学农药研究所提供。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*),购自中国普通微生物菌种保藏管理中心。将病原细菌接种于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,于 37 ℃下培养 1 d。

试剂及仪器:HPD-400 大孔吸附树脂(河北宝恩树脂科技有限公司生产)、甲醇(美国 Tedia 公司生产,HPLC 级)、200~300 目硅胶(青岛海洋化工厂生产)、氨苄青霉素(USP 级)购自上海国药集团化学试剂有限公司;石油醚、乙酸乙酯均为市售分析纯。Shimadzu LC-6AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司生产),具二极管阵列检测器;Bruker RPX 500 MHz 核磁共振仪,购自德国 Bruker 公司。

1.2 放线菌 GZ-57 的菌株鉴定

基因组 DNA 利用 QIAGEN 公司的 DNeasy Blood & Tissue Kit(50) cat. no. 69504 试剂盒提取。

16S rDNA 序列分析:采用链霉菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增。上游引物 F:5'-AGAGTTT-GATCCTGGCTCAG-3';下游引物 R:5'-AAGGAGGT-

GATCCAGCCGCA-3'。将获得的 PCR 产物送华大基因测序鉴定,测序结果在 GenBank 中做 Blast 比对分析,并采用 MEGA5.1 软件构建系统发育树。

PCR 反应体系:模板 DNA (1.0 μ l), Primer F (5 μ mol/L, 0.5 μ l), Primer R (5 μ mol/L, 0.5 μ l), 10 \times Ex Taq Buffer (Mg^{2+} free) (2.5 μ l), dNTP mixture (2.5 mmol/L, 2.0 μ l), TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ l, 0.30 μ l), $MgCl_2$ (20 mmol/L, 1.5 μ l), ddH₂O (16.7 μ l)。

PCR 程序设定:94 $^{\circ}C$ 预变性 4.0 min; 94 $^{\circ}C$ 变性 1.0 min, 56 $^{\circ}C$ 退火 1.0 min, 72 $^{\circ}C$ 延伸 1.0 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}C$ 延伸 5.0 min, 4 $^{\circ}C$ 保存。

1.3 GZ-57 菌株发酵滤液抑菌活性测定

1.3.1 对病原细菌的抑菌活性 采用管碟法^[7-8]测定 GZ-57 菌株发酵滤液对病原细菌的抑菌活性。将培养好的供试细菌与融化的牛肉膏蛋白胨琼脂培养基充分混匀,倒入 9 cm 培养皿中制成带菌平板。每个平板上放 4 个牛津杯(内径 0.6 cm、外径 0.8 cm、高 1.0 cm),每杯加入 200 μ l GZ-57 菌株发酵滤液。以蒸馏水为对照,每处理 3 次重复。于 37 $^{\circ}C$ 恒温箱中培养 12 h 后,观察抑菌圈的透明程度,并用十字交叉法测量抑菌圈直径。

1.3.2 对病原真菌菌丝生长的抑制作用 采用菌丝生长速率法^[9]测定 GZ-57 菌株发酵滤液对病原真菌菌丝生长的抑制作用。将 1.0 ml GZ-57 菌株发酵滤液与 9.0 ml 融化的 PDA 培养基混匀,趁热倒入无菌培养皿中制成带药培养基平板。待培养基凝固后,在每个培养基平面接入 1 个供试真菌菌饼(直径为 4 mm),使带菌丝的一面贴在培养基表面。每处理 3 次重复。于 25 $^{\circ}C$ 恒温箱中培养 72~96 h,用十字交叉法测量菌落生长直径,计算抑制率。菌丝生长抑制率 = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径)] \times 100%。

1.4 活性成分的分离及结构鉴定

将 25 L GZ-57 菌株发酵滤液用多层纱布过滤、离心后,经大孔吸附树脂 HPD-400(1.0 kg)吸附,甲醇(2.0 L)洗脱,解析液减压浓缩至约 200 ml。浓缩液用少量硅胶拌匀晾干后进行硅胶柱层析,用石油醚/乙酸乙酯/甲醇混合溶剂梯度洗脱,每 100 ml 收集一份,硅胶薄层检测后合并相同馏分。各馏分浓缩至干后,用乙酸乙酯溶解定容,烟草青枯病菌作为指示菌,采用滤纸片法进行抑菌活性追踪测定。采

用反相高效液相色谱纯化活性馏分,获得化合物 57-1(75 mg)和 57-2(107 mg),具体色谱条件如下:色谱柱:Hypersil ODS₂, 20 mm \times 250 mm, 10 μ m;流动相:甲醇:水=1:1(体积比);流速:7.0 ml/min;检测波长 230 nm。采用质谱和核磁共振波谱等技术,结合相关文献对化合物进行结构鉴定。

1.5 活性化合物抑菌活性测定

1.5.1 对病原细菌的抑制作用 采用微量稀释法^[10]。从琼脂培养基挑取 4~5 个相同形态的供试菌菌落,接入 1.0 ml 灭菌的 Mueller-Hinton 肉汤中,35 $^{\circ}C$ 培养至轻度混浊后转入 0.9% 生理盐水中,调整到麦氏浊度为 0.5,再用 Mueller-Hinton 肉汤稀释 200 倍,其接种量相当于 7.5×10^5 CFU/ml。将稀释好的接种液转入 96 孔板中,每孔加接种液 100 μ l,再分别加入 100 μ l 不同浓度的供试化合物(57-1 和 57-2)药液,使浓度梯度分别为 100.00 μ g/ml、50.00 μ g/ml、25.00 μ g/ml、12.50 μ g/ml、6.25 μ g/ml,每板另设不加任何药剂的空白对照,氨苄青霉素(Ampicillin)阳性对照和加药不接菌阴性对照,试验中每处理 3 次重复。将处理好的 96 孔板置于培养箱中,35 $^{\circ}C$ 培养 20 h,650 nm 测定透光率,以透光率大于 85% 为抑制生长的标准,记录药剂对供试细菌的最小抑菌浓度(MIC)。

1.5.2 对病原真菌的抑制作用 方法同 1.3.2。准确称取 1.0 mg 供试化合物(57-1 和 57-2),先用 200 μ l 二甲亚砜(DMSO)溶解后,加入 0.8 ml 无菌水配制成质量浓度为 1.0 mg/ml 的母液,活性测定时用无菌水稀释至相应浓度。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

将菌株 GZ-57 的 16S rDNA 序列上传至 NCBI GenBank,获得登记号 KM979603,经 Blast 分析,选取了相似度高的 8 个序列通过 MEGA5.1 软件进行系统发育树的构建。利用 N-J 法建立系统发育树(图 1),通过系统发育树判定该菌株与 *Streptomyces parvus* (小链霉菌)和 *Prauserella marina* (巴斯德菌)位于同一分支。在合成琼脂培养基上对放线菌 GZ-57 生长形态进行观察比较,GZ-57 与 *Streptomyces parvus* 形态相似,而且遗传距离较近,因此,菌株 GZ-57 初步鉴定为 *Streptomyces parvus*。

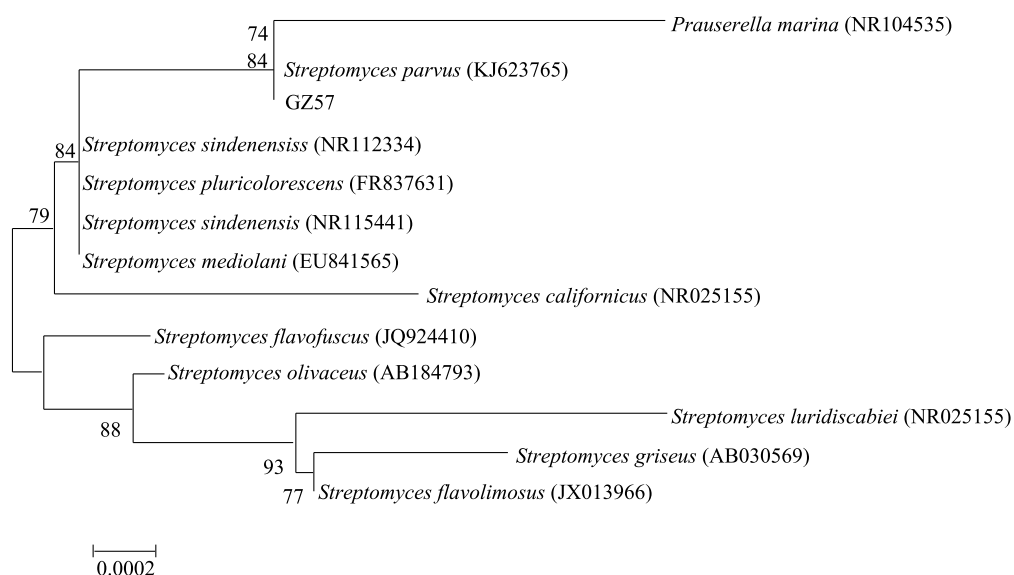


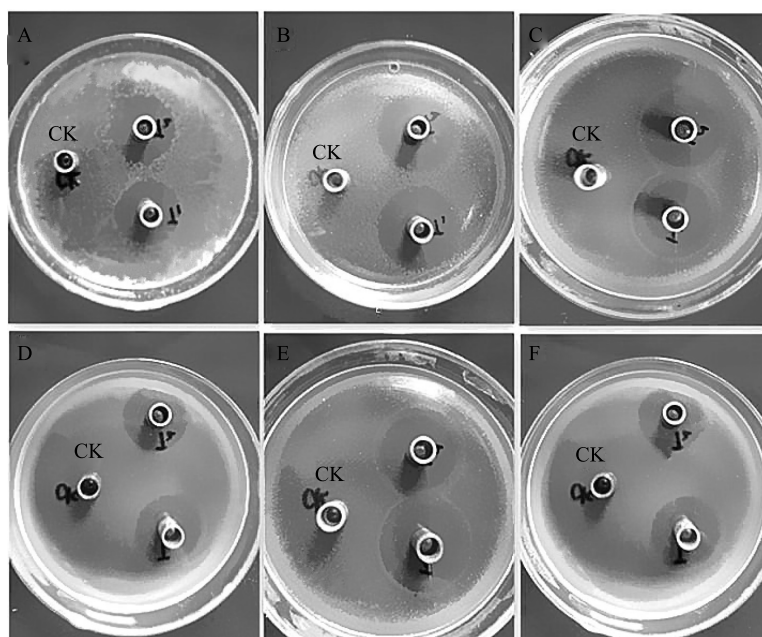
图1 菌株 GZ-57 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of strain GZ-57 based on 16S rDNA gene sequence

2.2 GZ-57 菌株发酵滤液抑菌活性

2.2.1 对病原细菌的抑制作用 GZ-57 菌株发酵滤液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽胞杆菌、蜡状芽胞杆菌、猕猴桃溃疡病菌和烟草青枯病菌有

较强的抑制作用(图2),抑菌圈清晰,直径分别为 25 mm、25 mm、20 mm、18 mm、22 mm 和 20 mm。对铜绿芽胞杆菌的抑制效果较弱,其抑菌圈模糊,直径为 15 mm。



A:大肠杆菌;B:金黄色葡萄球菌;C:枯草芽胞杆菌;D:蜡状芽胞杆菌;E:猕猴桃溃疡病菌;F:烟草青枯病菌。

图2 GZ-57 菌株发酵滤液对 6 种病原细菌的抑制作用

Fig. 2 The inhibition of GZ-57 fermented filtratin against six pathogenic bacteria

2.2.2 对病原真菌的抑制作用 由表 1 可以看出,放线菌 GZ-57 发酵滤液对供试的 7 种病原真菌菌丝生长均有一定的抑制作用,对玉米弯孢病菌和小麦赤霉病菌菌丝生长抑制作用最为明显。

表 1 GZ-57 菌株发酵滤液及化合物 57-1 和 57-2 对 7 种病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibition of fermented filtration, 57-1 and 57-2 against the mycelia growth of seven pathogenic fungi

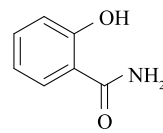
| 病原真菌 | 抑制率 (%) | | |
|--------|---------|----------|----------|
| | 发酵滤液 | 化合物 57-1 | 化合物 57-2 |
| 番茄灰霉病菌 | 20.5 | 24.1 | 20.0 |
| 小麦赤霉病菌 | 31.6 | 42.4 | — |
| 苹果炭疽病菌 | 17.0 | 20.3 | 21.1 |
| 玉米弯孢病菌 | 46.7 | 30.4 | 31.6 |
| 烟草赤星病菌 | 8.7 | 35.5 | 34.8 |
| 茄子黄萎病菌 | 21.1 | 34.4 | 40.5 |
| 西瓜枯萎病菌 | 15.8 | 25.2 | 31.6 |

—样品测定浓度为 50 $\mu\text{g/ml}$ 。

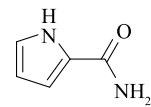
2.3 化合物的结构鉴定

化合物 57-1:白色结晶,熔点:140.2-143.7 $^{\circ}\text{C}$; $UV(\lambda_{\text{MeOH}})$:260 nm;ESI-MS: $[M+H]^+$, m/z 138。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 500 MHz): δ 6.89 (m, 2H), 7.42 (t, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.87 (d, $J=7.0$ Hz, 1H), 7.90 (br s, 1H, NH), 8.43 (br s, 1H, NH), 13.08 (br s, 1H, OH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 125 MHz): 114.9, 117.9, 118.8, 128.6, 134.5, 161.7, 172.6。结合 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱给出分子式为 $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$, 相对分子质量为 137。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与 Detlef^[9]报道的 2-Hydroxybenzamide(水杨酰胺)基本一致,故化合物 57-1 被鉴定为水杨酰胺(图 3)。

化合物 57-2:白色结晶,熔点:174.6-176.7 $^{\circ}\text{C}$; $UV(\lambda_{\text{MeOH}})$:262 nm;ESI-MS: $[M+H]^+$, m/z 111。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 500 MHz): δ 6.09 (m, 1H), 6.79 (m, 1H), 6.87 (m, 1H), 6.93 (br s, 1H, NH), 7.49 (br s, 1H, NH), 11.40 (br s, 1H, NH); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 125 MHz): 109.0, 111.1, 121.9, 126.8, 162.8。结合 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 谱给出分子式为 $\text{C}_5\text{H}_6\text{N}_2\text{O}$, 相对分子质量为 110。 $^1\text{H-NMR}$ 、 $^{13}\text{C-NMR}$ 数据与前人报道^[10]的 1H-pyrrole-2-carboxamide(1H-吡咯-2-甲酰胺)基本一致,故化合物 57-2 被鉴定为 1H-吡咯-2-甲酰胺(图 3)。



2-Hydroxybenzamide
水杨酰胺
化合物 57-1



1H-pyrrole-2-carboxamide
1H-吡咯-2-甲酰胺
化合物 57-2

图 3 化合物 57-1 和 57-2 的结构

Fig. 3 Structure of compounds 57-1 and 57-2

2.4 化合物的抑菌活性

2.4.1 对病原细菌的抑制作用 由表 2 可以看出,化合物 57-1 对供试的病原细菌无抑制作用;化合物 57-2 对烟草青枯病菌、猕猴桃溃疡病菌和蜡状芽孢杆菌有较强的抑制作用,其最小抑菌浓度值分别为 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 、6.25 $\mu\text{g/ml}$ 和 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 。

表 2 化合物 57-1 和 57-2 对 7 种病原细菌的最小抑菌浓度

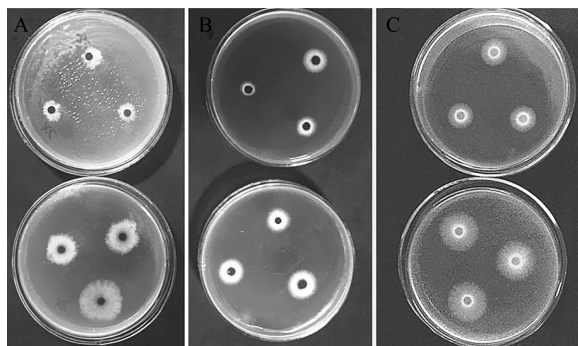
Table 2 The minimum inhibitory concentration values of 57-1 and 57-2 against seven strains of bacteria

| 病原细菌 | 最小抑菌浓度 ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|---------|-----------------------------|---------|---------|
| | 57-1 | 57-2 | 氯苯胍素钠 |
| 烟草青枯病菌 | >100.00 | 12.50 | 25.00 |
| 猕猴桃溃疡病菌 | >100.00 | 6.25 | 12.50 |
| 枯草芽孢杆菌 | >100.00 | 25.00 | 1.56 |
| 蜡状芽孢杆菌 | >100.00 | 12.50 | 6.25 |
| 铜绿色假单胞菌 | >100.00 | >100.00 | >100.00 |
| 金黄色葡萄球菌 | >100.00 | >100.00 | 6.25 |
| 大肠埃希氏菌 | >100.00 | >100.00 | 3.13 |

2.4.2 对病原真菌的菌丝抑制作用 由表 1 和图 4 可以看出,化合物 57-1 对小麦赤霉病菌、烟草赤星病菌和茄子黄萎病菌菌丝生长有一定的抑制作用,其抑制率分别为 42.4%、35.5%和 34.4%;化合物 57-2 对茄子黄萎病菌和烟草赤星病菌菌丝生长有一定的抑制作用(图 5),分别为 40.0%和 34.8%。

3 讨论

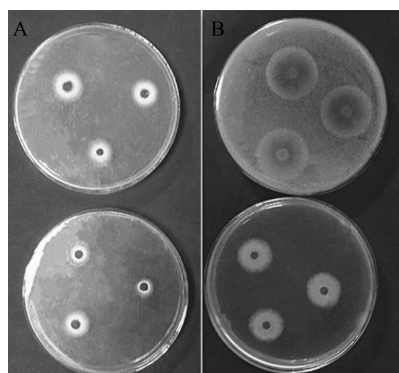
本研究从月季内生菌 GZ-57 发酵滤液中分离鉴定出水杨酰胺和 1H-吡咯-2-甲酰胺两个已知化合物,其中 1H-吡咯-2-甲酰胺为抗菌活性化合物。水杨酰胺是常用解热镇痛药,与阿司匹林(即乙酰水



A:小麦赤霉病菌;B:烟草赤星病菌;C:茄子黄萎病菌;上排为处理,下排为对照。

图4 化合物 57-1 对 3 种病原真菌的抑制作用

Fig. 4 Inhibition of compound 57-1 against three pathogenic fungi



A:烟草赤星病菌;B:茄子黄萎病菌;上排为对照,下排为处理。

图5 化合物 57-2 对 2 种病原真菌的抑制作用

Fig. 5 Inhibition of compound 57-2 against two pathogenic fungi

杨酸)具有类似的作用机理^[11]。虽然乙酰水杨酸早在 100 多年前就可以通过工业合成大量获得,但其最初是从柳树提取物中分离得到的,属于人们最早认识的天然产物之一,也是现在最为成功的医药开发实例之一。吡咯是天然产物中广泛分布的杂环骨架,其中 1H-吡咯-2-甲酰胺更是许多抗细菌活性天然产物的必要结构单元^[12-14]。1H-吡咯-2-甲酰胺是多种吡咯类杀菌剂的重要中间体,最早是通过人工合成获得的,1994 年 König 等人从热带海绵 *Agelas oroides* 中首次分离获得天然的 1H-吡咯-2-甲酰胺^[15]。本研究首次发现放线菌也可以产生 1H-吡咯-2-甲酰胺,尽管是已知化合物,但该结果说明了放线菌次生代谢物的化学多样性,证明放线菌作为

抗生素的潜在来源仍具有很大的研究价值。

参考文献:

- [1] 赵娜,王海丽,魏少鹏,等. 放线菌 C-411 发酵液抑菌活性及活性成分[J]. 植物保护学报, 2013, 40(1): 73-77.
- [2] FISHER P J, PCTRINI O, SCOTT H M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.) [J]. New Phytologist, 1992, 122(2): 299-305.
- [3] STROBEL G, DAISY B, CASTILLO U, et al. Natural products from endophytic microorganisms [J]. J Nat Prod, 2004, 67(2): 257-268.
- [4] 王志勇,刘秀娟,易曲. 植物内生菌分离时表面消毒条件的比较[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(8): 366-367.
- [5] 王娜,杨镇,龚娜,等. 植物内生菌次生代谢产物与玉米主要性状的灰色关联度分析[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 77-80.
- [6] 李海燕,刘丽. 产生物活性物质植物内生菌的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16(5): 482-485.
- [7] 张继文,杨春平,姬志勤,等. 苦皮藤内生真菌 Hd3 菌株抑菌活性成分分离及结构鉴定[J]. 农药学报, 2009, 11(2): 225-229.
- [8] SBRANA C, BAGNOLI G, BEDINI S, et al. Adhesion to hyphal matrix and antifungal activity of *Pseudomonas* strains isolated from *Tuber borchii* ascocarps [J]. Can J Microbiol, 2000, 46(3): 259-268.
- [9] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学与技术出版社, 1987.
- [10] CLSIM07A8 National committee for clinical laboratory standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria that grow aerobically; approved standard [S]. Eighth edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
- [11] DETLEF BRIEL. Synthesis and conversion of 3-(2-Hydroxythio-benzamido)benzoic acid [J]. Heterocycles, 2005, 65(6): 1295-1309.
- [12] TAKALE B S, DESAI N V, SIDDIKI A A, et al. Synthesis and biological evaluation of pyrrole-2-carboxamide derivatives; oroidin analogues [J]. Med Chem Res, 2014, 23(3): 1387-1396.
- [13] FRESNEDA P L, MOLINA P, SANZ M A. A convergent approach to midpacamide and dispacamide pyrrole-imidazole marine alkaloids [J]. Tetrahedron Lett, 2001, 42(5): 851-854.
- [14] RANE R A, TELVEKAR V N. Synthesis and evaluation of novel chloropyrrole molecules designed by molecular hybridization of common pharmacophore as potential antimicrobial agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(19): 5681-5685.
- [15] KÖNIG G M, WRIGHT A D. Two new naturally occurring pyrrole derivatives from the tropical marine sponge *Agelas oroides* [J]. Nat Prod Lett, 1994, 5(2): 141-146.

(责任编辑:陈海霞)