

丁唯嘉, 李明哲, 陈泽林, 等. 小菜蛾共生真菌棒曲霉 XCE02 的代谢产物及抗菌活性 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(2): 76-81.
DING Weijia, LI Mingzhe, CHEN Zelin, et al. Metabolites of a symbiotic fungus *Aspergillus clavatus* XCE02 from *Plutella xylostella* and their antifungal activities[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(2): 76-81.

小菜蛾共生真菌棒曲霉 XCE02 的 代谢产物及抗菌活性

丁唯嘉[†], 李明哲[†], 陈泽林, 蔡佳纯, 张梓娜, 李月婷, 孙晨昊, 李春远
(华南农业大学 材料与能源学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】研究小菜蛾共生真菌棒曲霉 *Aspergillus clavatus* XCE02 代谢产物及其抗植物病原真菌的活性。【方法】柱层析技术分离纯化 XCE02 代谢产物, 并运用波谱技术鉴定结构; 滤纸片扩散法测试代谢产物对香蕉炭疽菌和小麦赤霉菌的抑菌活性。【结果】分离鉴定出 gliomasolide A、Sch725674、gliomasolide C、clavatustide A、clavatustide B、20-羟基麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮、黄嘌呤、麦角甾醇、过氧化麦角甾醇和丁二酸 10 个化合物。在 250 μg/mL 时, gliomasolide A、Sch725674 和 gliomasolide C 对香蕉炭疽菌和小麦赤霉菌显示了高度抗菌活性, clavatustide A 和 clavatustide B 对香蕉炭疽菌和小麦赤霉菌显示了中度抗菌活性, 20-羟基麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮对小麦赤霉菌显示了中度抗菌活性。【结论】从曲霉属分离到了 gliomasolide A、gliomasolide C 和 20-羟基麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮, gliomasolide A、Sch725674 和 gliomasolide C 可作为相应抗菌农药先导化合物开展深入研究。

关键词: 昆虫共生真菌; 棒曲霉; 代谢产物; 抗菌活性; 柱层析技术; 波谱技术; 滤纸片扩散法
中图分类号: O629 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)02-0076-06

Metabolites of a symbiotic fungus *Aspergillus clavatus* XCE02 from *Plutella xylostella* and their antifungal activities

DING Weijia[†], LI Mingzhe[†], CHEN Zelin, CAI Jiachun, ZHANG Zina, LI Yueting, SUN Chenhao, LI Chunyuan
(College of Materials and Energy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To study the metabolites of a symbiotic fungus *Aspergillus clavatus* XCE02 from *Plutella xylostella* and their antifungal activities against plant pathogens. 【Method】The metabolites were isolated and purified by column chromatography. Their structures were elucidated by spectral analysis. The antifungal activities of the metabolites against *Colletotrichum musae* and *Fusarium graminearum* were investigated using paper disc-agar diffusion method. 【Result】Ten compounds were isolated and identified as gliomasolide A, Sch725674, gliomasolide C, clavatustide A, clavatustide B, 20-hydroxyergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one, xanthine, ergosterol, ergosterol peroxide and butanedioic acid. At the concentration of 250 μg/mL, gliomasolide A, Sch725674 and gliomasolide C exhibited high inhibitory activities against *C. musae* and *F. graminearum*,

收稿日期: 2019-04-28 网络首发时间: 2020-01-07 11:38:26
网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20200106.0923.004.html>
作者简介: 丁唯嘉 (1979—), 女, 讲师, 博士, E-mail: dwjzsu@163.com; 李明哲 (1998—), 男, E-mail: 2069409284@qq.com; [†]对本文贡献相同; 通信作者: 李春远 (1978—), 男, 教授, 博士, E-mail: chunyuanyuanli@scau.edu.cn
基金项目: 国家自然科学基金 (21102049); 广东省自然科学基金 (2018A030313582, 2015A030313405); 广东省科技计划公益研究与能力建设专项 (2016A020222019); 教育部留学回国人员科研启动基金 ([2015]311); 广州市科技计划项目 (201707010342); 华南农业大学材料与能源学院大学生科技创新训练项目

clavatustide A and clavatustide B showed moderate inhibitory activities against *C.musae* and *F.graminearum* and 20-hydroxyergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one showed moderate inhibitory activity against *F.graminearum*.
【Conclusion】 Gliomasolide A, gliomasolide C and 20-hydroxyergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one have been obtained from the genus *Aspergillus* in this study. Gliomasolide A, Sch725674 and gliomasolide C can be used as leading compounds for developing antifungal pesticide.

Key words: insect symbiotic fungus; *Aspergillus clavatus*; metabolite; antifungal activity; column chromatography; spectral analysis; paper disc-agar diffusion method

真菌引起的植物病害对农业生产和食品保藏造成了严重的危害,如香蕉炭疽病使香蕉果实变黑、腐烂^[1],小麦赤霉病引起小麦植株出现苗枯、茎腐、秆腐和穗腐等症状^[2]。化学农药是目前防治植物真菌病害的主要手段,但也造成病原菌抗药性增强、农药残留等问题^[3]。微生物天然产物因具有易降解、毒性低等特点,是化学农药替代品的重点研究对象。已知的昆虫种类达 90 万种,预测可能有 200~3 000 万种^[4],而几乎所有昆虫都有共生菌。昆虫共生菌分布于昆虫体内,大部分是酵母类、真菌类和细菌类共生菌^[5]。相对于植物共生菌,目前对昆虫共生菌代谢产物的研究远远不足^[6]。小菜蛾 *Plutella xylostella* 属鳞翅目菜蛾科,1 年可传 17 代,在我国南方尤为泛滥,主要危害甘蓝、青花菜、白菜、油菜、萝卜等十字花科植物^[7]。小菜蛾以蔬菜为食,因此会接触到植物病原菌,其共生菌对植物病原菌可能有选择性抑制作用。在前期对小菜蛾共生真菌的研究中,发现分离自肠道的棒曲霉 *Aspergillus clavatus* XCE02 菌株在大米固体培养基上培养时,其代谢产物乙醇提取物为 1 mg/mL 时对植物病原菌小麦赤霉菌 *Fusarium graminearum* 和香蕉炭疽菌 *Colletotrichum musae* 显示了较好的抗菌活性,抑菌圈直径分别约为 15.61 和 14.35 mm。本文研究棒曲霉菌株 XCE02 代谢产物的分离、鉴定及抗菌活性,以期寻找到相应的抗菌先导化合物。

1 材料与方法

1.1 材料

AV 600 核磁共振波谱仪 (瑞士 BrukerBiospin AG); MDS SCIEX APCI 2000 液质联用仪; Orbitrap 高分辨质谱仪 (德国 Thermo Fisher Scientific Inc.); SEPA-300 旋光仪; GF254 和柱层析硅胶为青岛海洋化工厂生产; φ 为 99% 的多菌灵购于上海迈瑞尔化学技术有限公司; 试验所用其他试剂均为分析纯。

棒曲霉 XCE02 分离自小菜蛾肠道^[8]。植物病原菌小麦赤霉菌和香蕉炭疽菌引种自华南农业大学

农学院,以上菌株均保藏于华南农业大学材料与能源学院。

1.2 菌种鉴定及发酵

将 XCE02 菌株划线接种于马铃薯蔗糖琼脂 (PSA) 培养基, 26 ℃ 恒温黑暗条件下培养 10 d 后,观察其生长情况和菌落形态,并进行初步鉴定。

参考文献 [9] 的方法 PCR 扩增真菌核糖体 ITS 基因区段鉴定真菌。用 CTAB 法提取菌株总 DNA^[10],用 rDNA-ITS 序列通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 与 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')^[11] 进行 PCR 反应。反应体系与文献 [12] 相同,具体为: Taq Plus PCR MasterMix [天根生化 (北京) 科技有限公司] 25 μ L, 上游和下游引物各 2 μ L, 模板 DNA(10 ng) 1 μ L, dd H₂O 20 μ L, 总体积 50 μ L。反应程序为: 95 ℃ 预变性 5 min; 95 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 35 s, 共 30 个循环; 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物送至广州天一辉远基因科技有限公司进行测序,已测序的核苷酸序列在 NCBI 网站进行 BLAST 相似性比对。

发酵培养: 在 1 000 mL 锥形瓶中装入 100 g 粳米、100 mL H₂O, 于 121 ℃ 高温高压灭菌 30 min 后接种菌株 XCE02, 28 ℃ 条件下静置培养 30 d, 共培养 100 瓶。

1.3 发酵产物的提取与分离

发酵产物用 95%(φ) 乙醇溶液浸泡 3 次,减压浓缩除去水后用乙酸乙酯萃取 3 次,减压浓缩,经硅胶柱层析,以石油醚-乙酸乙酯 (体积比为 100:0~0:100) 溶液、乙酸乙酯-甲醇 (体积比为 100:0~80:20) 溶液系统梯度洗脱,得到 10 种化合物。

1.4 结构鉴定

通过分析化合物的氢谱 (¹H NMR)、碳谱 (¹³C NMR)、电喷雾质谱 (ESIMS)、电喷雾高分辨质谱 (HRESIMS) 等试验数据与文献或与标准品对照等方法,鉴定 10 种化合物的结构。

1.5 抗菌活性试验及数据处理

采用滤纸片扩散法^[12-13] 测试结构较为新颖的化

合物对香蕉炭疽菌、小麦赤霉菌的抗菌活性, 28 ℃条件下香蕉炭疽菌和小麦赤霉菌分别培养 48 和 24 h, 以多菌灵和溶解样品的溶剂(φ 为 5% 的二甲基亚砜, DMSO) 分别作为阳性对照和空白对照。鉴于所得样品数量较少, 配制的溶液浓度较低, 多菌灵和待测样品均为 250 $\mu\text{g/mL}$, 用十字交叉法量取抑菌圈直径, 每种样品, 同一植物病原菌在每个培养皿上测试 2 组抑菌圈直径, 重复 3 次, 共得到 6 组抑菌圈数据, 最终结果以 6 组抑菌圈数据的平均值 $\pm$ 标准误表示。用 SPSS 17.0 统计软件进行单因素方差 (One-way ANOVA) 和相关性分析。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

菌株在 PSA 培养基上培养 10 d 后菌落表面呈蓝灰绿色, 基层有较多分生孢子。菌落边缘有一薄层白色菌丝紧贴基质生长, 背面暗黄色。孢子穗圆筒形, 小梗单层, 孢子梗宽为 7.5~15.0 μm ; 顶囊棍棒形; 分生孢子椭圆形, (2.5~3.5) $\mu\text{m} \times$ (2.8~3.9) μm , 表面光滑, 壁稍厚序列, 符合曲霉属棒曲霉特征^[14]。进一步用 PCR 扩增真菌核糖体 ITS 序列的方法验证菌株的种属, DNA 测序结果与 NCBI BLAST 数据库中编号为 KY765893.1 的棒曲霉序列相似性为 100%, 与编号为 AY373847.1、NR121482.1、KF669481.1 的棒曲霉序列相似性均为 99%。此结果与形态学鉴定结果吻合, 表明该菌株属于棒曲霉, 该菌株的 GenBank 登录号为 MK828108.1。

2.2 化合物的鉴定及波谱数据

分离鉴定了 10 种化合物, 在 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=85:15$ 时得到化合物 1 (5 mg); 在 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=70:30$ 时得到化合物 2 (2 mg), 在 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=60:40$ 时得到化合物 3 (3 mg), 在 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=30:70$ 得到化合物 4 (3.5 mg) 和 5 (2.5 mg); 在 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=75:25$ 时得到化合物 6 (10 mg); 在 $V(\text{乙酸乙酯}):V(\text{甲醇})=90:10$ 时分离得到化合物 7 (18 mg); 在 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=65:35$ 时得到化合物 8 和 9 的粗品, 再经重结晶得到化合物 8 (12 mg) 和 9 (4 mg); 在 $V(\text{石油醚}):V(\text{乙酸乙酯})=45:55$ 时得到化合物 10 (7 mg)。

鉴定化合物 1~10 分别为 gliomasolide A、Sch725674、gliomasolide C、clavatustide A、clavatustide B、20-羟基麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮、黄嘌呤、麦角甾醇、过氧化麦角甾醇和丁二酸。其中化合物 1~7 的波谱数据如下。

化合物 1: 无色晶体 [$V(\text{甲醇}):V(\text{三氯甲烷})=1:1$], 熔点 89~91 ℃; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=+30.5$ (c 0.15, MeOH),

HRESIMS(m/z): 313.238 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 6.82 (dd, 15.8, 7.8 Hz, 1H), 5.97 (dd, 15.8, 1.0 Hz, 1H), 4.99 (m, 1H), 4.32 (ddd, 12.0, 7.8, 5.0 Hz, 1H), 3.65 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.75 (m, 2H), 1.63 (m, 1H), 1.57 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.32~1.43 (m, 13H), 1.23 (m, 2H), 1.14 (m, 1H), 0.90 (t, 7.2 Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3COCD_3) δ 168.0, 151.2, 123.3, 77.3, 72.7, 70.9, 36.1, 36.0, 34.3, 32.8, 32.4, 31.3, 29.7, 26.4, 25.9, 24.9, 23.6, 14.3。

化合物 2: 无色晶体。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=+25.7$ (c 0.5, MeOH), HRESIMS(m/z): 329. 233 0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 6.87 (dd, 15.8, 6.0, 1H), 6.08 (dd, 15.8, 1.6, 1H), 4.95 (dddd, 9.8, 7.5, 5.0, 2.2, 1H), 4.49 (ddd, 6.0, 3.0, 1.6, 1H), 3.99 (q, 6.5, 1H), 3.85 (ddd, 6.0, 4.7, 3.0, 1H), 1.83 (ddd, 14.7, 6.5, 6.0, 1H), 1.71 (m, 1H), 1.65 (m, 1H), 1.61(m, 1H), 1.58 (m, 1H), 1.54 (m, 1H), 1.30~1.45(m, 11H), 1.19 (m, 2H), 1.16 (m, 1H), 0.90 (t, 6.8, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ 168.6, 149.5, 123.3, 77.8, 76.1, 72.9, 69.6, 38.4, 36.9, 36.6, 34.2, 32.9, 29.7, 27.1, 26.5, 25.9, 23.9, 14.6。

化合物 3: 黄色固体。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=-38.0$ (c 0.15, MeOH), HRESIMS(m/z): 343.212 4 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CD_3OD) δ 6.95 (dd, 15.8, 4.8, 1H), 6.18 (dd, 16.0, 1.5, 1H), 5.02 (m, 1H), 4.60 (br. s, 1H), 4.10 (ddd, 7.6, 5.4, 1.5, 1H), 4.00 (dd, 3.5, 3.0, 1H), 3.37 (br s, 1H), 1.77 (m, 1H), 1.68 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.55 (m, 1H), 1.33~1.49 (m, 11H), 1.13 (m, 2H), 1.10 (m, 1H), 0.92 (t, 7.2, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CD_3OD) δ 168.5, 147.6, 123.3, 77.9, 77.4, 73.7, 71.2, 71.3, 36.3, 34.7, 32.9, 32.8, 30.4, 27.8, 26.5, 26.4, 23.7, 14.6。

化合物 4: 黄色固体。 $[\alpha]_{\text{D}}^{25}=+22.6$ (c 0.10, MeOH), ESIMS(m/z): 472.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$, HRESIMS 472.187 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 10.22 (s, 1H), 8.55 (d, 8.4 Hz, 1H), 8.05 (s, 1H), 7.64 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.58 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.52 (t, 7.8 Hz, 1H), 7.45 (t, 7.8 Hz, 1H), 7.35~7.38(m, 5H), 7.30(m, 1H), 7.21 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.09 (t, 7.8 Hz, 1H), 5.51 (dd, 8.4, 6.6 Hz, 1H), 5.26 (d, 15.0 Hz, 1H), 3.94(m, 1H), 3.43 (dd, 13.8, 8.4 Hz, 1H), 3.29 (d, 1H, 15.0 Hz), 3.27 (m, 1H), 3.25 (m, 1H), 1.02 (t, 7.2 Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 169.6, 167.9, 167.4, 167.4, 138.1, 135.7, 134.5, 132.6, 132.3, 129.7, 129.8, 128.8, 127.8, 127.4, 126.7, 126.3, 125.9, 123.2, 123.1, 122.0, 71.7, 51.4, 43.4, 37.7, 13.9。

化合物 5: 黄色无定形固体。HRESIMS(m/z): 458.172 8 $[M+H]^+$ 。 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 10.15 (s, 1H), 8.56(s, 1H), 8.50 (d, 8.4 Hz, 1H), 7.64 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.56 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.44 (t, 7.8 Hz, 1H), 7.41 (t, 7.8 Hz, 1H), 7.32~7.35(m, 5H), 7.31(m, 1H), 7.20 (d, 7.8 Hz, 1H), 7.05 (s, 1H), 5.53 (t, 7.6 Hz, 1H), 5.27 (d, 14.8 Hz, 1H), 3.42 (dd, 13.6, 7.6 Hz, 1H), 3.27 (dd, 13.6, 7.6 Hz, 1H), 3.12 (d, 14.8 Hz, 1H), 3.03 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 169.9, 167.6, 167.5, 167.4, 138.2, 135.6, 135.0, 132.8, 132.4, 129.9, 129.8, 128.9, 127.5, 127.4, 126.7, 126.6, 126.3, 123.4, 123.3, 122.1, 71.7, 54.4, 37.4, 35.9。

化合物 6: 黄色油状物。HRESIMS(m/z): 409.309 7 $[M+H]^+$ 。 $[\alpha]_D^{25}=+115.6(c\ 0.15, MeOH)$, 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) 6.63 (d, 9.5 Hz, 1H), 6.05 (d, 9.5 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.58 (m, 1H), 5.57 (m, 1H), 2.58 (m, 1H), 2.54 (m, 1H), 2.52 (m, 1H), 2.47 (m, 1H), 2.23 (m, 1H), 2.02 (m, 1H), 1.96 (m, 1H), 1.89 (m, 1H), 1.87 (m, 1H), 1.77 (m, 1H), 1.73 (m, 1H), 1.64 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.53 (m, 1H), 1.49 (m, 1H), 1.38 (m, 1H), 1.29 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.98 (s, 3H), 0.96 (d, 6.8 Hz, 3H), 0.88 (d, 6.8 Hz, 3H), 0.86 (d, 6.8 Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 199.7, 164.5, 155.6, 136.7, 133.9, 130.6, 124.8, 124.4, 123.1, 74.8, 59.1, 44.4, 44.3, 42.7, 36.8, 36.1, 34.3,

34.2, 33.2, 30.7, 18.9, 24.9, 22.5, 20.6, 20.2, 19.9, 16.8, 17.3。
化合物 7: 白色粉末。HRESIMS(m/z): 153.041 6 $[M+H]^+$ 。 1H NMR (600 MHz, $DMSO-d_6$) δ 13.32 (s, 1H), 11.53 (s, 1H), 10.84 (s, 1H), 7.92 (s, 1H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, $DMSO-d_6$) δ 155.5, 151.4, 149.1, 140.6, 106.6。

麦角甾醇 (化合物 8)、过氧化麦角甾醇 (化合物 9) 和丁二酸 (化合物 10) 为真菌中常见化合物, 数据略。

2.3 化合物的结构鉴定

化合物 1 ^{13}C NMR δ 168.0 表明存在 1 个酯羰基, δ 151.2, 123.3 结合 1H NMR δ 6.82 (dd, 15.8, 7.8 Hz, 1H), 5.97 (dd, 15.8, 1.0 Hz, 1H) 的低场化学位移提示有 1 个和羰基共轭的双键, ^{13}C NMR δ 77.3, 72.7, 70.9 结合 1H NMR δ 4.99, 4.32, 3.65 的信号表明存在 3 个连氧的—CH 基团, 提示除了酯羰基外, 可能有 2 个连—CH 的羟基。 1H NMR δ 0.90 (t, 7.0, 3H) 和中高场区重叠的质子信号及碳谱 (δ 36.3, 32.9, 26.4, 23.7, 14.6) 表明化合物的分子中存在链状结构单元。根据高分辨质谱 313.238 4 $[M+H]^+$ 的分子离子峰, 结合碳谱、氢谱及以上分析推导出化合物的分子式为 $C_{18}H_{32}O_4$, 除去羰基和双键的不饱和度, 表明分子存在 1 个单环, 说明化合物属于大环内酯结构类型。查阅文献 [15] 对照波谱数据、比旋光度等, 化合物 1 鉴定为 gliomasolide A, 结构见图 1。

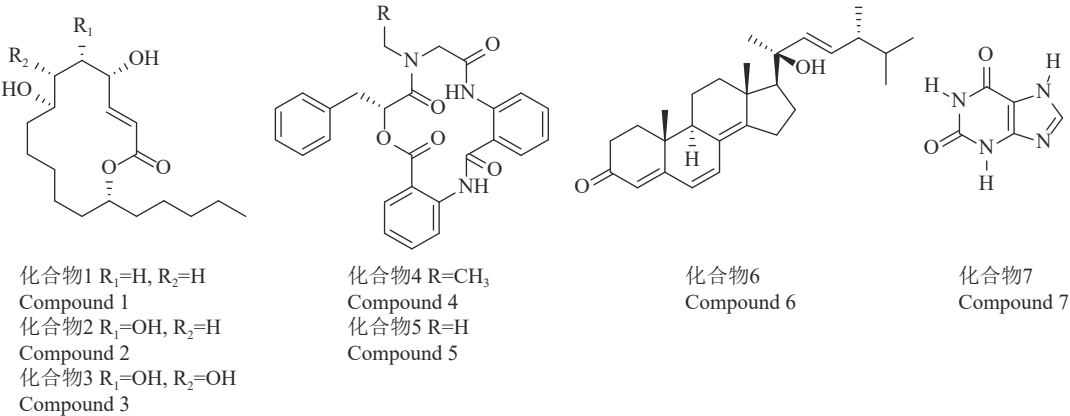


图 1 化合物 1~7 的分子结构
Fig. 1 Structures of compounds 1~7

化合物 2 的 ^{13}C NMR 和 1H NMR 和化合物 1 非常相似, 表明其具有与化合物 1 相同的碳骨架。化合物 2 的 ^{13}C NMR δ 77.8, 76.1, 72.9, 69.6 结合 1H NMR δ 4.95, 4.49, 3.99, 3.85 表明其有 4 个连氧的—CH, 比化合物 1 多了 1 个。而且化合物 2 的质谱显示其相对分子质量比化合物 1 多 16, 由此推测化合物 2 是化合物 1 取代了 1 个羟基的衍生物。查阅文献 [16] 对照波谱数据、比旋光度等, 化合物 2 鉴

定为 Sch725674, 结构见图 1。

化合物 3 1H NMR 和 ^{13}C NMR 和化合物 2 相似, 表明其也具有和化合物 2 类似的大环内酯骨架, 两者区别在于化合物 3 有 δ 77.9, 77.4, 73.7, 71.2, 71.3 5 个连氧的—CH, 比化合物 2 多 1 个, 同时化合物 3 的质谱显示其相对分子质量比化合物 2 多 16, 由此推测化合物 3 在化合物 2 基础上多取代了 1 个羟基。查阅文献 [15] 对照波谱数据、比旋光度

等数据, 化合物 3 鉴定为 gliomasolide C, 结构见图 1。

化合物 4 HRESIMS 分子离子信号 472.187 2 [M + H]⁺可知其分子式 C₂₇H₂₅N₃O₅, 不饱和度为 17。¹³C NMR δ 169.6, 167.9, 167.4, 167.4 显示 4 个碳基碳, 16 个苯环区碳 (δ 122.0~138.1) 信号, 同时 ¹H NMR 显示 13 个苯环区氢信号, 结合耦合常数, 表明其分子中存在 1 个单取代苯环和 2 个二取代苯环。扣除这些单元后剩余的不饱和度表明化合物 4 存在环状结构。进一步观察 ¹H NMR 发现 δ 10.22 (s, 1H), 8.05 (s, 1H) 有 2 个 NH 信号, ¹³C NMR δ 43.4, 13.9 是典型的连接在酰胺氮上的乙基结构单元信号, 结合 δ 71.7 的 1 个连氧碳信号, 推测化合物 4 为 2 个邻氨基苯甲酸、1 个 2-羟基苯丙酸以及 1 个 N-乙基甘氨酸组成的环内酰胺类物质。在此基础上查阅文献 [17] 对照波谱数据、比旋光度等, 化合物 4 鉴定为 clavastide A, 分子结构见图 1。

化合物 5 ¹³C NMR 数据和化合物 4 十分类似, 表明具有相同的环状碳架结构。化合物 5 的 ¹H NMR 和化合物 4 相比少了 δ 1.02 (t, 7.2 Hz, 3H) 的三重峰甲基信号, 多了 δ 3.03 (s, 3H) 的氮甲基碳信号, 同时化合物 5 的 ¹³C NMR 比化合物 4 少了 1 个高场区的 δ 43 附近的碳, 质谱少了 14, 相当于 CH₂ 的质量单元。这些结果表明二者不同仅在于化合物 4 连接在酰胺氮上的乙基单元在化合物 5 中变成了甲基结构。查阅文献 [17] 对照波谱数据、比旋光度等, 化合物 5 鉴定为 clavastide B, 分子结构见图 1。

化合物 6 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 提示其属于甾醇

类, ¹H NMR δ 0.96 (d, 6.8 Hz, 3H), 0.88 (d, 6.8 Hz, 3H), 0.86 (d, 6.8 Hz, 3H) 是连在—CH 上的甲基, 1.29 (s, 3H), 1.06 (s, 3H), 0.98 (s, 3H) 是连在季碳上的甲基, ¹H NMR δ 6.63 (d, 9.5 Hz, 1H), 6.05 (d, 9.5 Hz, 1H), 5.75 (s, 1H), 5.58 (m, 1H), 5.57 (m, 1H) 及 ¹³C NMR δ 164.5, 155.6, 136.7, 133.9, 130.6, 124.8, 124.4, 123.1 说明有 4 个双键, ¹³C NMR δ 199.7 的信号表明化合物 6 存在 1 个 α, β 不饱和羰基, δ 74.8 的连氧碳信号 (无对应的 ¹H NMR 信号) 表明化合物 6 有 1 个连季碳的羟基。在此基础上查阅文献, 波谱数据和比旋光度与文献 [18] 中的基本一致, 化合物 6 鉴定为 20-羟基麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮, 结构见图 1。

化合物 7 ¹H NMR 显示 δ 13.32 (s, 1H), 11.53 (s, 1H), 10.84 (s, 1H) 3 个 NH 信号以及 7.92 (s, 1H) 的双键 CH 信号, 结合 ¹³C NMR δ 155.5, 151.4, 149.1, 140.6, 106.6 的信号表明化合物 7 可能是嘌呤类化合物, 查阅文献 [19] 并对照波谱数据等, 化合物 7 鉴定为黄嘌呤。

麦角甾醇 (化合物 8)、过氧化麦角甾醇 (化合物 9) 和丁二酸 (化合物 10) 的结构通过与实验室标准品进行核磁共振波谱、薄层层析对照确定。

2.4 化合物对植物病原菌的抗菌活性

采用滤纸片扩散法测试了部分化合物对香蕉炭疽菌和小麦赤霉菌的活性。根据文献 [12], 抑菌圈直径为 [6, 11)、[11, 15) 和 [15, 20) mm 分别表示对该菌株有轻度、中度和高度抗菌作用。由表 1 可知,

表 1 化合物的抗植物病原菌活性¹⁾
Table 1 Antifungal activities of compounds against plant pathogens

测试化合物 Tested compound	d(抑菌圈 Inhibition zone)/mm	
	香蕉炭疽菌 <i>Colletotrichum musae</i>	小麦赤霉菌 <i>Fusarium graminearum</i>
gliomasolide A	18.19±0.43eE	15.45±0.41eE
Sch725674	17.18±0.36dD	17.02±0.35gG
gliomasolide C	18.18±0.46eE	16.22±0.54fF
clavastide A	13.75±0.42cC	13.46±0.36cC
clavastide B	13.66±0.24cC	14.47±0.27dD
20-羟基麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮	10.54±0.43bB	12.37±0.53bB
20-hydroxyergosta-4, 6, 8(14), 22-tetraen-3-one		
多菌灵 Positive control	26.53±0.20fF	18.57±0.18hH
空白对照 Negative control	0aA	0aA

1)表中数据为平均值±标准误, 同列数据后不同小写字母表示组间0.05水平差异显著, 不同大写字母表示组间0.01水平差异显著(Duncan's法)

1)The data in the table are average values ± standard errors, and different lowercase letters in the same column indicate significant differences among groups at 0.05 level, different capital letters in the same column indicate significant differences among groups at 0.01 level (Duncan's method)

在浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 时, gliomasolide A、Sch725674 和 gliomasolide C 对香蕉炭疽菌和小麦赤霉菌均显示了高度抗菌活性, 且 Sch725674、gliomasolide C 对小麦赤霉菌的抗菌活性与多菌灵接近; clavatustide A, clavatustide B 对香蕉炭疽菌和小麦赤霉菌显示中度抗菌作用, 20-羟基麦角甾-4, 6, 8(14), 22-四烯-3-酮对小麦赤霉菌中度抗菌, 对香蕉炭疽轻度抗菌。但化合物对 2 种植物病原真菌抗菌活性均弱于阳性对照多菌灵。

3 结论与讨论

从棒曲霉菌株 XCE02 的发酵液中共分离鉴定出 gliomasolide A、gliomasolide C、20-羟基麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮等 10 种化合物, 结构类型包括有大环内酯、环脂肽、生物碱、甾醇等。滤纸片扩散法抗菌活性测试结果表明, 在浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 时, 化合物 gliomasolide A、Sch725674 和 gliomasolide C 对香蕉炭疽菌和小麦赤霉菌显示了高度抗菌活性, 推测它们是菌株提取物显示对植物病原菌抗性的重要原因之一, 可作为抗菌农药先导化合物开展深入研究。此外 clavatustide A、clavatustide B 和 20-羟基麦角甾-4,6,8(14),22-四烯-3-酮也对香蕉炭疽菌和小麦赤霉菌显示了中度或轻度抗菌活性。据文献报道, gliomasolide A 可以抑制人宫颈癌细胞的增殖^[15], Sch725674 对酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 和白色念珠菌 *Candida albicans* 具有强抑制活性^[16], clavatustide A 和 clavatustide B 具有抑制 3 种人肝癌细胞 HepG2、SMMC-7721 和 Bel-7402 增殖的活性^[17]。但鲜见这些化合物对植物病原菌抗菌活性的研究报道, 本研究结果丰富了昆虫天然共生真菌源抗菌农药先导化合物库。

参考文献:

[1] INTAN SAKINAH M A, SUZianti I V, LATIFFAH Z. Phenotypic and molecular characterization of *Colletotrichum* species associated with anthracnose of banana (*Musa* spp.) in Malaysia[J]. *Genet Mol Res*, 2014, 13(2): 3627-3637.

[2] AVOZANI A, REIS E M, TONIN R B. *In vitro* sensitivity reduction of *Fusarium graminearum* to DMI and QoI-fungicides[J]. *Summa Phytopathol*, 2014, 40(4): 358-364.

[3] MAHLO S M, MCGAW L J, ELOFF J N. Antifungal

activity of leaf extracts from South African trees against plant pathogens[J]. *Crop Prot*, 2010, 29(12): 1529-1533.

[4] 刘高强, 魏美才. 昆虫资源开发与利用的新进展[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(6): 142-146.

[5] 谭周进, 肖启明, 谢丙炎, 等. 昆虫内共生菌研究概况[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(4): 140-143.

[6] 戈惠明, 谭仁祥. 共生菌: 新活性天然产物的重要来源[J]. 化学进展, 2009, 21(1): 30-46.

[7] 马春森, 马罡, 杨和平. 小菜蛾在温带地区越冬研究进展[J]. 生态学报, 2010, 30(13): 3628-3636.

[8] 周丹丽, 徐嘉欣, 朱新伟, 等. 小菜蛾内生菌 *Bacillus* sp.-B03 产生的 Iturin 类代谢产物的研究[C]//中国化学会. 第十一届全国天然有机化学学术会议. 上海: 中国化学会, 2016: 344.

[9] 孙静, 谢淑娜, 刘佳中, 等. 河南省玉米茎基部镰刀菌的形态和分子鉴定[J]. 植物病理学报, 2014, 44(1): 8-16.

[10] 王娜, 钱冠兰, 李晓捷, 等. 海带配子体克隆中一株镰刀菌的分离鉴定[J]. 微生物学通报, 2010, 37(10): 1491-1494.

[11] 郭鹏豪, 刘秀丽, 崔颖鹏, 等. 真菌通用引物 ITS1 和 ITS4 在丝状真菌鉴定中的价值评价[J]. 中国微生态学杂志, 2013, 25(8): 922-924.

[12] 李文生, 周丹丽, 陆盈池, 等. 1 株红树内生真菌 *Fusarium* sp. 代谢产物的研究[J]. *华南农业大学学报*, 2017, 38(3): 64-69.

[13] CHEN M, ZHOU J R, LI C Y, et al. Isolation, identification and bioactivity of allelic chemicals of *Streptomyces* sp. strain 6803[J]. *Allelopathy J*, 2009, 23(2): 411-424.

[14] 章婷, BEDELKHAN A, 郑婕施, 等. 高产洛伐他汀棒曲霉菌株的筛选、鉴定及发酵条件优化[J]. *工业微生物*, 2016, 46(6): 24-33.

[15] ZHANG J, LIN X P, LI L C, et al. Gliomasolides A-E, unusual macrolides from a sponge-derived fungus *Gliomastix* sp. ZSDS1-F7-2[J]. *RSC Adv*, 2015, 5(67): 54645-54648.

[16] YANG S W, CHAN T M, TERRACCIANO J, et al. Structure elucidation of Sch725674 from *Aspergillus* sp.[J]. *J Antibiot*, 2005, 58(8): 535-538.

[17] JIANG W, YE P, CHEN C, et al. Two novel hepatocellular carcinoma cycle inhibitory cyclodepsipeptides from a hydrothermal vent crab-associated fungus *Aspergillus clavatus* C2WU[J]. *Mar Drugs*, 2013, 11(12): 4761-4772.

[18] AI H L, ZHANG L M, CHEN Y P, et al. Two new compounds from an endophytic fungus *Alternaria solani*[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14(12): 1144-1148.

[19] 晏小云, 殷晓静, 王国凯, 等. 南苜蓿的化学成分研究[J]. 中国药学杂志, 2012, 47(6): 415-417.

【责任编辑 霍 欢】