

缘座壳孢菌抑菌活性化合物的分离及鉴定

陈宇熹, 朱志强, 谭震, 赖芃宇, 邱君志*, 关雄*

福建农林大学植物保护学院, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室,
生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建 福州 350002

摘要:【目的】座壳孢菌是粉虱和蚧壳虫的一种重要昆虫病原真菌,其代谢产物具有抑菌、杀虫、抗肿瘤和抗氧化等生物活性。本研究旨在分离并鉴定缘座壳孢发酵物中的代谢物,以期为拓展该生防菌的应用提供依据。【方法】基于色谱技术从缘座壳孢菌 *A. marginata* WYTF2017-01 发酵培养物中分离化合物,借助波谱手段鉴定其化合物结构,分析化合物的抑菌活性。【结果】本研究共鉴定了 12 种化合物,包括 Methyl 24-methylene-3-oxolanost-8-en-26-oic ester (1)、Ergosta-5,7,22-trien-3-ol,4-methyl-, ($3\beta,4\alpha,22E$) (2)、杜斯塔宁(3)、 3β -acetoxo-15 α ,22-dihydroxyhopane (4)、麦角固醇(5)、4-(Hydroxymethyl)-3-furancarboxylic acid (6)、Eupenicisirenin B (7)、4,6-dihydroxy-1(3H)-isobenzofuranone (8)、 β -谷甾醇(9)、对叔丁基苯甲酸甲酯(10)、2-benzyl-4H-pyran-4-one (11)和 6-benzyl-4-oxo-4H-pyran-3-carboxamide (12),其中化合物 1、2、6~12 为首次从昆虫病原真菌中分离鉴定。化合物 1、2、3、6、7、8、11 和 12 对真菌或细菌具有不同程度的抑制活性,MIC 值为 3.13~50.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。化合物 7、8 和 12 抑菌活性较为突出,化合物 7 对大肠杆菌的 MIC 值为 3.13 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,效果与阳性对照链霉素相同,而 8 和 12 对青枯劳尔氏菌的 MIC 值分别为 6.25 和 12.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,优于或等同于链霉素(MIC 值为 12.50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。【结论】从缘座壳孢菌分离的多种代谢物具有良好的抑菌活性,显示了防治植物病害的潜力。

关键词: 子囊菌; 缘座壳孢菌; 代谢物; 结构鉴定; 抑菌活性



开放科学标识码
(OSID 码)

Isolation, identification, and antimicrobial activity of metabolites from *Aschersonia marginata* (Ascomycota, Clavicipitaceae)

CHEN Yuxi, ZHU Zhiqiang, TAN Zhen, LAI Pengyu, QIU Junzhi*, GUAN Xiong*

Key Lab of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education/State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, College of Plant Protection, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

Abstract:【Aim】*Aschersonia* is a genus of insect pathogenic fungi used for the control of whiteflies and scale insects. The metabolites of the fungi have antibacterial, insecticidal, anti-tumor, antioxidant, and other biological activities. This study aim to isolate and identify the metabolites in the fermentation of *A. marginata*, and test their antibacterial activity, so as to provide the basis for expanding the application of this biocontrol bacteria.【Method】Chromatographic techniques and spectroscopic methods were used to isolate and identify compounds from fermented cultures of *A. marginata* WYTF2017-01. The activities of identified components against fungal and bacterial pathogens were evaluated.【Result】Twelve compounds were isolated from *A. marginata* WYTF2017-01 cultures, which included methyl 24-methylene-3-oxolanost-8-en-26-oic ester (1), ergosta-5,7,22-trien-3-ol,4-methyl-, ($3\beta,4\alpha,22E$) (2), dustanin (3), 3β -acetoxo-15 α ,22-dihydroxyhopane (4), ergosterol (5), 4-(hydroxymethyl)-3-furancarboxylic acid (6), eupenicisirenin B (7), 4,6-dihydroxy-1(3H)-isobenzofuranone (8), β -sitosterol (9), methyl 4-tert-butylbenzoate (10), 2-benzyl-4H-pyran-4-one (11), and 6-benzyl-4-oxo-4H-pyran-3-carboxamide (12), in which compounds 1, 2, and 6-12 were firstly identified from entomopathogenic fungi. Compounds 1, 2, 3, 6, 7, 8, 11, and 12 displayed antifungal or antibacterial activities to varying degrees, with MIC (minimal inhibitory concentration) values of 3.13–50.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Relatively higher antibacterial activities were observed for compounds 7, 8, and 12, in which the activity of compound 7 against *Escherichia coli* was comparable with

收稿日期(Received): 2023-05-18 接受日期(Accepted): 2023-07-05

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFE0122000); 国家自然科学基金(U1803232,32270029); 福建省科技计划重点项目(2020N5005); 福建省重大科技项目(2022NZ029017); 福建省教育厅中青年教师教育科研项目(JAT210075); 福建农林大学社会服务团队支持计划项目(11899170165)

作者简介: 陈宇熹, 讲师, 博士。研究方向: 真菌代谢物及其活性。E-mail: liesleyu@163.com

* 通信作者(Author for correspondence), 邱君志, E-mail: junzhiqiu@126.com; 关雄, E-mail: guanxfafu@126.com

that of streptomycin, with an MIC value of $3.13 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. Compounds 8 and 12 displayed high antibacterial activities against *Ralstonia solanacearum*, with MIC values of 6.25 and $12.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, which were better than or comparable to positive control streptomycin (MIC = $12.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). 【Conclusion】 Some compounds isolated from *A. marginata* WYTF2017-01 showed antifungal and/or antibacterial activities, indicating their potential for biocontrol of plant diseases.

Key words: Ascomycota; *Aschersonia marginata*; metabolites; structure identification; antimicrobial activity

座壳孢菌 *Aschersonia* Montagne 是重要的昆虫病原真菌, 隶属于子囊菌门 Ascomycota 粪壳菌纲 Sordariomycetes 肉座菌目 Hypocreales 麦角菌科 Clavicipitaceae, 广泛分布于热带和亚热带地区 (Chaverri *et al.*, 2008), 多数成员专性寄生害虫粉虱和蚧壳虫, 具有重要的生防价值。座壳孢菌与其他真菌类群相似, 在长期进化过程中生物和非生物因素与菌体之间相互作用产生代谢产物, 菌体对环境的适应性得到了提高。迄今为止, 已报道座壳孢菌产生的代谢物有 100 余个 (Boonphong *et al.*, 2001; Isaka *et al.*, 2005, 2010; Kornsakulkarn *et al.*, 2013; Sadorn *et al.*, 2020, 2021), 丰富的化学成分种类包括环肽类、酮类、醌类和萜类等, 其广泛的药理作用涉及抑菌、杀虫、抗肿瘤、抗氧化、抗病毒和抗疟活性等。

在座壳孢菌抑菌活性方面, Boonphong *et al.* (2001) 从 *A. tubulata* BCC 1785 代谢物中分离得到的杜斯塔宁 dustanin 具有显著的抗分枝杆菌作用。Chutrakul *et al.* (2009) 从 *A. luteola* BCC 8774 纯化到一种杂蒽酮二聚体 ascherxanthone B, 对稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr 具有毒杀作用 ($\text{IC}_{50} = 0.58 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)。黄天培等 (2013) 发现, *A. placenta* Jos 009 代谢产物 $15\alpha, 22$ -二羟何帕烷对沙门氏杆菌 *Salmonella* 和粘质赛氏杆菌 *Serratia marcescens* 有一定抑制作用, 最小抑菌浓度 (minimal inhibitory concentration, MIC 值) 为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。由此表明, 座壳孢菌不同物种代谢物的抑菌活性存在较大差异。缘座壳孢 (*A. marginata* 有性型为赖内克耶那莫勒菌 *Moelleriella reineckiana*), 其代谢物的抑菌作用鲜有报道。本文拟在缘座壳孢发酵物中分离代谢物, 借助谱学技术鉴定其代谢物并测试其抑菌活性, 为拓展该生防菌的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基 缘座壳孢 (有性型为赖内克耶那莫勒菌 *Moelleriella reineckiana*) WYTF2017-01,

从福建省武夷山粉虱虫尸上分离、纯化和鉴定。大肠杆菌 *Escherichia coli*、青枯劳尔氏菌 *Ralstonia solanacearum*、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*、金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 和尖孢镰刀菌西瓜专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* 为本实验室保存菌株。PDB 和 LB 分别为常用真菌和细菌液体生长培养基。

1.1.2 仪器和试剂 埃朗 N-1100D-WD 型旋转蒸发仪、CA-1111 型冷却水循环装置、DTC-22 型真空泵 (上海埃朗科技国际贸易有限公司); ODS 半制备色谱柱 $10 \times 250 \text{ mm}$ (日本 YMC 公司); Alltech 液相色谱仪 (半制备) (美国 Alltech 公司); AVACE NEO 全数字化核磁共振波谱仪 (600 M) (瑞士 Bruker 公司); 甲醇、乙酸乙酯、氯仿、乙腈、氘代试剂等有机试剂 (国药集团化学试剂有限公司); 链霉素、环丙沙星和二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) (上海麦克林生化材料有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 发酵 挑取活化的 WYTF2017-01 菌块 ($1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$) 接种在 PDB 培养液中, 置于 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 、 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床培养 7 d 作为种子液。以 15% 接种量将种子液接种在大米培养基中, 置于 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$ 培养箱内培养 30 d, 获得的培养物用于提取代谢产物。

1.2.2 代谢物的分离鉴定 将 8 kg 发酵物粉碎后, 加入等体积的乙酸乙酯 (ethyl acetate, EA) 超声萃取 3 次后, 合并萃取液并旋转蒸发浓缩, 得到粗提物。借助反相硅胶 (reverse phase silica gel, RPC_{18}) 柱层析、薄层色谱法 (thin layer chromatography, TLC) 和液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 对粗提物进行分离纯化, 然后基于核磁共振仪和质谱仪数据进行结构鉴定。

1.2.3 抑菌活性评价 抑菌试验参照临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 方法 (Varma *et al.*, 2006) 进行。将测试菌株接种活化后计数, 分别稀释至试验浓度 $1 \times 10^6 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ (细菌) 和 $1 \times 10^5 \text{ 个} \cdot \text{mL}^{-1}$ (真菌孢子悬液)。在 96 孔板中分别用菌液配制 8 个浓度

(0.78、1.56、3.13、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)待测化合物,每孔待测液总体积为 200 μL ,将 96 孔板密封后置于恒温培养箱。每组浓度均设置 3 个重复,阴性对照为 DMSO,阳性对照为环丙沙星和链霉素。细菌 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h,真菌 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5~7 d,未有明显菌物生长的最小待测化合物浓度记为化合物对菌株的最小抑制浓度。

2 结果与分析

2.1 化合物的分离纯化

提取菌体粗提物约 131 g,用反相硅胶柱进行分离,用甲醇-水(30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、90%甲醇和 100%甲醇)梯度洗脱,收集洗脱液得到 5 个组分 A、B、C、D 和 E。组分 A 和 B 由于浸膏含量较少,未做进一步处理。将 C 组分进行旋转蒸发浓缩,再用葡聚糖凝胶 LH-20 分离,采用氯仿:甲醇(1:1)等度洗脱。根据薄层色谱法合并相同组分得到 C1~C5 的混合物;C4 继续采用正相硅胶柱层析分离,洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯(20:1),等度洗脱获得化合物 1(32 mg)和 2(26 mg),根据 C5 易溶于氯仿、难溶于甲醇的性质,采用重结晶的方法过滤得到化合物 3 和 4 的混合物,进一步用石油醚:丙酮(10:1)洗脱,结合 TLC 在多种展开剂中分析得到单体化合物 3(50 mg)和 4(43 mg)。

用正相硅胶柱层析分离组分 D,以氯仿:甲醇(100:0~0:100)梯度洗脱,结合 TLC 收集合并相同组分获得 D1~D5。用葡聚糖凝胶 LH-20 洗脱 D1,洗脱体系为氯仿:甲醇(1:1),通过 TLC 分析得到化合物 5(7.1 mg),通过 HPLC 分离 D2,洗脱体系为 60%甲醇/水,分离得到化合物 6(10 mg, t_R = 17.0 min)。用正相硅胶柱层析分离 D3,以石油醚:乙酸乙酯(5:1)等度洗脱得化合物 7(6.1 mg)。通过减压正相硅胶柱层析分离 D4,以氯仿:丙酮(30:1、20:1、15:1、10:1)梯度洗脱得到化合物 8(12 mg)和 9(8.9 mg)。通过半制备液相纯化组分 D5,洗脱体系 40%甲醇/水洗脱,纯化得到化合物 10(19 mg, t_R = 7.4 min)。

将组分 E 以石油醚:乙酸乙酯(100:0~0:100)梯度洗脱,合并得到组分 E1~E5, E5 以正相硅胶柱石油醚:乙酸乙酯(20:1、10:1、10:1、5:1)梯度洗脱,获得化合物 11(5.3 mg)和 12(18 mg)。

2.2 化合物结构鉴定

化合物 1:无色晶体,易溶于甲醇、氯仿等有机溶

剂,难溶于水,254 nm 紫外灯下呈现暗斑,碘熏后显色为黄棕色斑点。分子式: $\text{C}_{32}\text{H}_{50}\text{O}_3$;分子量:482.37。 ^1H NMR (600 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 4.96 (q, J = 1.1 Hz, 2H), 3.66 (s, 3H), 3.17~3.11 (m, 1H), 2.31~2.20 (m, 2H), 2.20~2.10 (m, 2H), 1.74 (s, 3H), 1.72 (d, J = 2.4 Hz, 2H), 1.51 (d, J = 6.3 Hz, 4H), 1.46~1.40 (m, 2H), 1.12 (d, J = 7.7 Hz, 3H), 1.09 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 1.04 (d, J = 1.5 Hz, 3H), 1.03 (d, J = 1.4 Hz, 3H), 0.93 (dd, J = 5.1, 1.5 Hz, 3H), 0.75 (s, 3H), 0.68 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{C} : 217.5 (C=O), 175.0 (C=O), 148.5 (C-27), 135.0 (C-10), 132.9 (C-9), 110.9 (C-29), 51.9 (C-4), 51.2 (C-OCH₃), 48.2 (C-4), 47.4 (C-17), 45.6 (C-11), 40.5 (C-12), 37.4 (C-28), 36.9 (C-3), 36.7 (C-21), 36.2 (C-5), 34.6 (C-6), 34.3 (C-1), 32.1 (C-22), 27.8 (C-21), 27.4 (C-5), 26.3 (C-26), 21.8 (C-15), 20.3 (C-13), 18.7 (C-16), 18.6 (C-8), 16.3 (C-14), 16.0 (C-7)。将核磁数据与 He *et al.* (2006) 对比,鉴定化合物 1 为 Methyl 24-methylene-3-oxolanost-8-en-26-oic ester (图 1A)。

化合物 2:白色粉末,易溶于甲醇、氯仿等有机溶剂,难溶于水,254 nm 紫外灯下呈现暗斑,碘熏后显色为黄棕色斑点。分子式: $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}$;分子量:410.68。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{H} : 5.96 (ddt, J = 7.5, 2.0, 1.1 Hz, 1H), 5.85 (dtd, J = 7.5, 1.8, 1.0 Hz, 1H), 5.24~5.17 (m, 1H), 5.16~5.10 (m, 1H), 3.85~3.77 (m, 2H), 2.53~2.42 (m, 1H), 2.17~2.09 (m, 1H), 1.11 (s, 3H), 1.05 (d, J = 6.9 Hz, 3H), 0.91 (dd, J = 3.3, 1.1 Hz, 3H), 0.91~0.89 (m, 3H), 0.83 (s, 3H), 0.82 (s, 3H), 0.78 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{C} : 148.8 (C-4), 141.3 (C-9), 134.2 (C-24), 133.8 (C-23), 120.5 (C-7), 119.6 (C-8), 52.6 (C-2), 51.4 (C-17), 44.1 (C-11), 42.9 (C-10), 42.2 (C-25), 41.3 (C-12), 40.0 (C-3), 37.9 (C-21), 36.0 (C-5), 33.6 (C-13), 33.4 (C-6), 33.1 (C-26), 31.4 (C-16), 30.5 (C-1), 28.3 (C-15), 27.0 (C-14), 21.8 (C-19), 21.2 (C-27), 21.1 (C-28), 20.4 (C-29), 19.9 (C-19), 17.8 (C-30), 17.7 (C-29)。将核磁数据与 Ryder *et al.* (1986) 对比,鉴定化合物 2 为 Ergosta-5,7,22-trien-3-ol, 4-methyl-, (3 β , 4 α , 22 E) (图 1B)。

化合物 3:白色粉末,易溶于氯仿,难溶于甲醇、水等溶剂,254 和 365 nm 紫外灯下均不显色,碘熏后显色为浅粉色后逐渐变为浅棕色至无色。分子式: $\text{C}_{30}\text{H}_{52}\text{O}_2$;分子量:444.0。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{H} :

3.34 (ddt, $J=9.5, 7.0, 2.5$ Hz, 1H), 2.54~2.46 (m, 1H), 2.25 (dt, $J=12.8, 6.5$ Hz, 1H), 2.14~2.06 (m, 1H), 1.98-1.90 (m, 1H), 1.80~1.72 (m, 1H), 1.72~1.66 (m, 1H), 1.66~1.56 (m, 3H), 1.56~1.44 (m, 4H), 1.43~1.20 (m, 9H), 1.22 (s, 3H), 1.07 (d, $J=1.5$ Hz, 3H), 1.08~0.98 (m, 6H), 0.97 (s, 3H), 0.87 (d, $J=1.5$ Hz, 3H), 0.83 (d, $J=1.5$ Hz, 3H), 0.76 (s, 3H), 0.79~0.71 (m, 1H), 0.65 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{C} : 76.1 (C-15), 73.5 (C-22), 55.4 (C-5), 54.6 (C-9), 51.4 (C-17), 48.9 (C-21), 48.6 (C-13), 46.7 (C-14), 44.0 (C-18), 43.1 (C-8), 42.2 (C-3), 41.1 (C-1), 40.5 (C-10), 39.4 (C-7), 37.1 (C-23), 33.3 (C-4), 33.0 (C-16), 29.4 (C-30), 27.3 (C-29), 26.7 (C-20), 22.4 (C-24), 21.3 (C-11), 20.9 (C-6), 19.2 (C-2), 18.0 (C-28), 16.8 (C-25), 15.9 (C-26), 11.0 (C-27)。将核磁数据与 Van Eijk *et al.* (1986) 对比, 鉴定化合物 3 为 Dustanin (图 1C)。

化合物 4: 白色粉末, 易溶于氯仿, 难溶于甲醇、水等溶剂, 在 254 和 365 nm 紫外灯下均不显色, 碘熏后显色为浅粉色后逐渐变为浅棕色至无色。分子式: $\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_4$; 分子量: 502.40。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{H} : 4.47 (tt, $J=8.9, 1.6$ Hz, 1H), 0.34 (ddt, $J=9.5, 7.0, 2.5$ Hz, 1H), 2.50 (ddd, $J=12.3, 9.4, 8.3$ Hz, 1H), 2.25 (ddd, $J=12.5, 6.8, 5.7$ Hz, 1H), 2.04 (s, 3H), 1.98~1.90 (m, 1H), 1.85~1.75 (m, 2H), 1.73~1.66 (m, 1H), 1.65~1.57 (m, 2H), 1.55~1.45 (m, 3H), 1.41~1.36 (m, 3H), 1.34~1.31 (m, 1H), 1.31~1.28 (m, 2H), 1.28~1.23 (m, 3H), 1.22 (s, 3H), 1.08~1.01 (m, 2H), 0.97 (s, 3H), 0.91 (d, $J=1.5$ Hz, 8H), 0.90 (d, $J=1.5$ Hz, 3H), 0.84 (d, $J=1.5$ Hz, 3H), 0.84 (s, 3H), 0.76 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{C} : 170.8 (C-OAc), 78.0 (C-3), 76.1 (C-15), 55.8 (C-22), 55.6 (C-5), 51.4 (C-21), 48.9 (C-17), 48.6 (C-9), 46.7 (C-13), 44.0 (C-14), 43.1 (C-18), 41.1 (C-8), 40.3 (C-19), 38.7 (C-1), 38.4 (C-10), 37.1 (C-4), 33.0 (C-7), 32.5 (C-16), 27.8 (C-30), 26.5 (C-29), 24.8 (C-23), 22.4 (C-2), 21.9 (C-OAc), 21.3 (C-6), 21.2 (C-11), 19.3 (C-26), 18.0 (C-25), 16.8 (C-24), 15.9 (C-28), 11.0 (C-27)。将核磁数据与 Boonphong *et al.* (2001) 对比, 鉴定化合物 4 为 3 β -acetoxy-15 α , 22-dihydroxyhopane (图 1D)。

化合物 5: 白色粉末, 易溶于氯仿, 难溶于甲醇、水等溶剂, 在 254 nm 紫外灯下不显色, 碘熏后显色为浅粉色后逐渐变为浅棕色至无色。分子式: $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$; 分

子量: 396.34。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{C} : 5.57 (dp, $J=7.3, 1.0$ Hz, 1H), 5.38 (dp, $J=7.3, 1.1$ Hz, 1H), 5.23 (dt, $J=3.1, 1.2$ Hz, 2H), 3.62 (tt, $J=10.2, 7.5$ Hz, 1H), 2.62~2.57 (m, 2H), 2.39~2.30 (m, 2H), 2.02~1.92 (m, 2H), 1.92~1.83 (m, 2H), 1.78~1.66 (m, 2H), 1.57~1.41 (m, 4H), 1.35~1.19 (m, 4H), 1.09~1.00 (m, 2H), 0.99 (q, $J=1.1$ Hz, 3H), 0.97 (t, $J=1.3$ Hz, 2H), 0.93 (d, $J=7.2$ Hz, 3H), 0.85 (d, $J=4.9$ Hz, 3H), 0.80 (d, $J=5.1$ Hz, 3H), 0.77 (t, $J=1.5$ Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{C} : 141.4 (C-8), 139.9 (C-5), 135.3 (C-17), 132.5 (C-23), 119.7 (C-6), 116.4 (C-7), 70.4 (C-3), 55.8 (C-17), 54.6 (C-14), 46.2 (C-9), 42.9 (C-24), 40.8 (C-13), 40.3 (C-4), 39.2 (C-20), 38.4 (C-12), 37.1 (C-1), 33.1 (C-10), 32.0 (C-25), 28.3 (C-2), 23.0 (C-15), 21.1 (C-21), 21.0 (C-26), 19.9 (C-27), 17.7 (C-28), 16.3 (C-18), 12.1 (C-19)。将核磁数据与 Kwon *et al.* (2002) 比较, 鉴定化合物 5 为 Ergosterol (图 1E)。

化合物 6: 白色粉末, 易溶于氯仿、甲醇, 难溶于水等溶剂。在 254 nm 下有暗斑, 碘熏后显色为黄棕色。分子式: $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_4$; 分子量: 142.03。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{H} : 8.89 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 7.79 (d, $J=1.8$ Hz, 1H), 5.10 (s, 2H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{C} : 162.7 (C-2), 147.5 (C-3), 137.9 (C-4), 124.5 (C-3), 116.7 (C-5), 55.9 (C-7)。将核磁数据与 Evidente *et al.* (2009) 对比, 鉴定化合物 6 为 4-(Hydroxymethyl)-3-furancarboxylic acid (图 1F)。

化合物 7: 白色粉末, 易溶于甲醇、氯仿, 难溶于水等溶剂, 在 254 nm 下有暗斑, 碘熏后显黄棕色。分子式: $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$; 分子量: 196.07。 ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{H} : 6.61 (ddt, $J=6.4, 1.9, 1.0$ Hz, 1H), 2.60 (tt, $J=6.3, 0.9$ Hz, 1H), 2.51~2.38 (m, 2H), 2.02 (tdd, $J=6.7, 4.1, 1.8$ Hz, 1H), 1.85 (dddd, $J=12.9, 7.5, 5.5, 4.0$ Hz, 1H), 1.70 (dddd, $J=12.4, 7.7, 6.8, 5.4$ Hz, 1H), 1.33 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3-d_1) δ_{C} : 180.2 (C-8), 171.8 (C-10), 137.1 (C-2), 128.9 (C-3), 31.4 (C-7), 28.5 (C-1), 28.4 (C-6), 25.5 (C-4), 23.0 (C-5), 13.8 (C-9)。将核磁数据与 Li *et al.* (2014) 对比, 鉴定化合物 7 为 Eupenicisirenin B (图 1G)。

化合物 8: 白色粉末, 易溶于氯仿、甲醇等有机溶剂, 难溶于水。在 254 nm 紫外灯下显现暗斑, 碘熏后显色为黄棕色。分子式: $\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$; 分子量:

166.03。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃-d₁) δ_H: 7.01 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.65 (d, *J* = 2.2 Hz, 1H), 5.23 (s, 2H)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃-d₁) δ_C: 171.7 (C-1), 157.6 (C-6), 154.8 (C-4), 128.2 (C-4a), 127.6 (C-7a), 108.0 (C-7), 104.9 (C-5), 67.9 (C-3)。将核磁数据与 Luo *et al.* (2007) 对比, 鉴定化合物 8 为 4,6-dihydroxy-1(3*H*)-isobenzofuranone (图 1H)。

化合物 9: 白色粉末, 易溶于氯仿等有机溶剂, 难溶于水, 在 254 nm 紫外灯下显现暗斑, 碘熏后显色为黄棕色。分子式: C₂₉H₅₀O; 分子量: 414.39。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃-d₁) δ_H: 5.37~5.32 (m, 1H), 3.52 (p, *J* = 8.5 Hz, 1H), 2.29 (ddt, *J* = 12.3, 10.8, 7.5 Hz, 1H), 2.24~2.18 (m, 1H), 2.13 (dddd, *J* = 9.8, 8.3, 7.1, 2.4 Hz, 1H), 2.08~1.99 (m, 1H), 1.99~1.95 (m, 1H), 1.95~1.88 (m, 1H), 1.88~1.79 (m, 2H), 1.76~1.64 (m, 5H), 1.62~1.52 (m, 3H), 1.51~1.42 (m, 4H), 1.41~1.34 (m, 2H), 1.35~1.27 (m, 3H), 1.19~1.11 (m, 3H), 1.00 (s, 3H), 0.92 (dd, *J* = 5.9, 1.3 Hz, 3H), 0.85 (d, *J* = 4.0 Hz, 3H), 0.85~0.83 (m, 3H), 0.80 (d, *J* = 4.2 Hz, 3H), 0.68 (s, 3H)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃-d₁) δ_C: 141.3 (C-5), 121.7 (C-6), 71.3 (C-3), 56.7 (C-14), 56.1 (C-17), 50.2 (C-9), 45.9 (C-24), 42.8 (C-4), 42.4 (C-13), 40.0 (C-12), 37.2 (C-1), 36.6 (C-10), 36.2 (C-20), 33.9 (C-22), 31.9 (C-7), 31.7 (C-8), 29.4 (C-2), 28.3 (C-25), 26.2 (C-16), 24.3 (C-23), 23.3 (C-15), 21.1 (C-28), 19.5 (C-11), 19.2 (C-26), 18.6 (C-19), 13.5 (C-27), 12.2 (C-29)。将核磁数据与刘辉鑫等(2012)对比, 鉴定化合物 9 为 β-谷甾醇(图 1I)。

化合物 10: 白色粉末, 易溶于氯仿、甲醇等有机溶剂, 难溶于水, 在 254 nm 紫外灯下显现暗斑, 365 nm 紫外灯下显蓝色荧光, 碘熏后显色为黄棕色。分子式: C₁₂H₁₆O₂; 分子量: 192.12。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃-d₁) δ_H: 7.92~7.87 (m, 2H), 7.55~7.50 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 1.31 (s, 9H)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃-d₁) δ_C: 166.7 (C=O), 155.1 (C-2), 129.7 (C-4), 127.6 (C-5), 125.4 (C-1), 52.2 (C-OCH₃), 34.8 (C-7), 31.2 (C-8)。将核磁数据与 Hu & Li (2017) 对比, 鉴定化合物 10 为对叔丁基苯甲酸甲酯(图 1J)。

化合物 11: 白色粉末, 易溶于氯仿、甲醇等有机溶剂, 难溶于水, 在 254 nm 紫外灯下显现暗斑, 碘熏后显色为黄棕色。分子式: C₁₂H₁₀O₂; 分子量:

186.07。¹H NMR (600 MHz, DMSO-d₆) δ_H: 7.71 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.32~7.26 (m, 2H), 7.26~7.21 (m, 1H), 7.20 (ddt, *J* = 7.5, 1.8, 1.0 Hz, 2H), 6.35 (dd, *J* = 8.3, 1.3 Hz, 1H), 5.75 (q, *J* = 1.1 Hz, 1H), 4.47 (q, *J* = 1.0 Hz, 2H)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃-d₁) δ_C: 183.7 (C-12), 170.0 (C-8), 154.3 (C-10), 135.0 (C-2), 129.0 (C-3), 128.8 (C-6), 127.2 (C-1), 114.7 (C-11), 112.3 (C-9), 43.1 (C-7)。将核磁数据与黄忠京等(2007)对比, 鉴定化合物 11 为 2-benzyl-4*H*-pyran-4-one (图 1K)。

化合物 12: 白色粉末, 易溶于氯仿、甲醇等有机溶剂, 难溶于水, 在 254 nm 紫外灯下显现暗斑, 碘熏后显色为黄棕色。分子式: C₁₃H₁₁NO₃; 分子量: 229.07。¹H NMR (600 MHz, CDCl₃-d₁) δ_H: 7.94 (s, 1H), 7.34~7.28 (m, 2H), 7.28~7.23 (m, 1H), 7.22~7.17 (m, 2H), 6.04 (t, *J* = 1.0 Hz, 1H), 4.47 (q, *J* = 1.0 Hz, 2H)。¹³C NMR (150 MHz, CDCl₃-d₁) δ_C: 182.0 (C-12), 170.7 (C-8), 167.8 (C=O), 158.1 (C-4), 135.2 (C-5), 129.0 (C-3), 128.8 (C-6), 127.2 (C-1), 114.9 (C-13), 114.6 (C-11), 43.2 (C-7)。将核磁数据与 Zhang *et al.* (2007) 对比, 鉴定化合物 12 为 6-benzyl-4-oxo-4*H*-pyran-3-carboxamide (图 1L)。

2.3 抑菌活性检测

分别测试 12 个化合物对 1 株真菌、2 株革兰氏阳性菌和 2 株革兰氏阴性菌的抑制活性, 结果如表 1 所示。12 个代谢物中, 化合物 1、2、3、6、7、8、11、12 共 8 个化合物表现出不同程度的抑菌活性, MIC 值为 3.13~50 μg · mL⁻¹。化合物 7 对大肠杆菌的抑制作用最强, MIC 值为 3.13 μg · mL⁻¹; 化合物 8 对 2 株病原菌(尖孢镰刀菌和青枯劳尔氏菌) MIC 值均为 6.25 μg · mL⁻¹, 有较强的抑制活性; 化合物 12 对尖孢镰刀菌、青枯劳尔氏菌也展示出较强的抑制活性, MIC 值分别为 6.25 和 12.50 μg · mL⁻¹。

3 讨论

本研究采用大米培养基对缘座壳孢菌进行固体发酵, 选用乙酸乙酯超声提取代谢产物, 借助多种色谱分离手段分离获得 12 个单体化合物, 通过波谱技术确定了它们的化学结构。这些化合物主要有三萜 4 个、酮类 2 个、呋喃衍生物 2 个、有机酸 1 个、酯类 1 个及其他甾体等, 其中化合物 1、2、6~12 均为在昆虫病原真菌中首次分离鉴定。

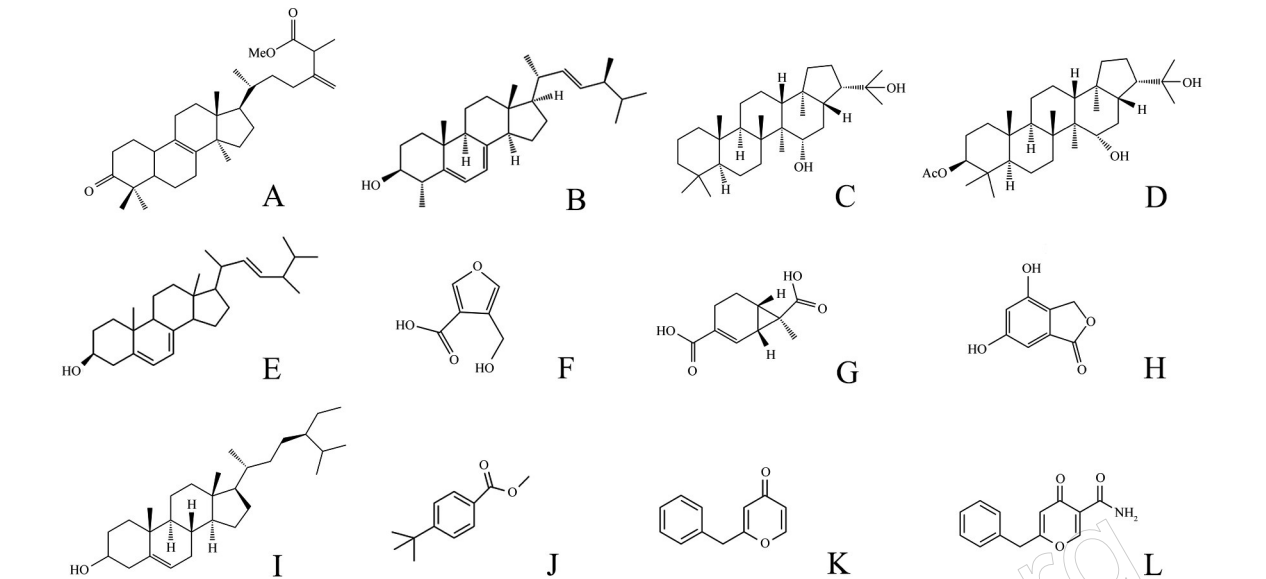


图 1 WYTF2017-01 中获得的代谢物结构
Fig.1 Chemical structure of metabolites from WYTF2017-01

表 1 化合物 1~12 的抗菌活性
Table 1 Antimicrobial activities of compounds 1–12

化合物 Compounds	最小抑制浓度 Minimum inhibitory concentration MIC/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)				
	尖孢镰刀菌西瓜专化型 <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	大肠杆菌 <i>Escherichia coli</i>	青枯劳尔氏菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>	金黄色葡萄球菌 <i>Staphylococcus aureus</i>
1	25.00	12.50	25.00	—	—
2	12.50	12.50	25.00	25.00	—
3	12.50	—	50.00	25.00	—
6	—	12.50	—	50.00	12.50
7	—	3.13	—	—	12.50
8	6.25	—	6.25	12.50	25.00
11	25.00	—	25.00	12.50	50.00
12	6.25	—	12.50	—	—
环丙沙星 Ciprofloxacin	0.78	0.78	3.13	0.78	1.56
链霉素 Streptomycin	1.56	3.13	12.50	0.78	1.56

“—”表示 MIC>50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抑菌活性较差。
“—” means value of MIC>50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, which suggests poor antimicrobial activities.

分离的化合物 7 (有机酸) 抗菌活性较为突出, 对大肠杆菌的抑菌活性与商用链霉菌相当; 化合物 8 (呋喃衍生物) 对青枯劳尔氏菌的活性优于链霉菌产品, 对尖孢镰刀菌的 MIC 达到 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 化合物 12 对青枯劳尔氏菌的抑菌活性与链霉菌效果相当。由此表明, 化合物 7 具有良好的抗菌潜力, 而化合物 8 和 12 也具有开发为植病抗菌剂的潜力。化合物 2 (三萜)、8 和 11 (吡喃酮) 对 4 株病原菌均展现出不同程度的抑制作用, 具有相对广谱的抗菌活性, 3 种萜类化合物对革兰氏阴性菌 (大肠杆菌、青枯劳尔氏菌) 的活性明显优于革兰氏阳性菌 (枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌)。据报道, 化合物结构类型差异与细菌互作的机制相关,

萜类化合物可以破坏细菌胞内微丝结构、增加菌丝细胞膜通透性、抑制菌丝生长, 这种活性作用的选择性取决于双环母核上取代基的位置。酮类化合物可与细菌 50S 蛋白亚基可逆性结合, 从而抑制细菌蛋白质合成 (Fulle & Gohlke, 2009; Nissen *et al.*, 2000)。而该菌分离得到的酮类、萜类、有机酸和呋喃衍生物都表现出不同程度和广度的抗菌活性, 可以深入挖掘其作用机理。

参考文献

黄天培, 潘洁茹, 张鸿声, 关雄, 邱君志, 2013. 扁座壳孢 Jos009 胞外代谢产物 15 α , 22-二羟何帕烷的抗菌活性. 应用与环境生物学报, 19(5): 878–880.

- 黄忠京, 邵长伦, 陈意光, 余志刚, 林永成, 2007. 南海红树林内生真菌 ZZF79 中吡喃酮类代谢产物的研究. *中山大学学报*, 46(4): 113–115.
- 刘辉鑫, 廖海兵, 袁珂, 2012. 红花芒毛苣苔化学成分研究. *中国中药杂志*, 37(13): 1963–1967.
- BOONPHONG S, KITTA KOOP P, ISAKA M, PALITTAPON-GARNPIM P, JATURAPAT A, DANWISETKANJANA K, TANTICHAROE N M, THEBTARANONTH Y, 2001. A new antimycobacterial, 3 β -acetoxo-15 α , 22-dihydroxyhopane, from the insect pathogenic fungus *Aschersonia tubulata*. *Planta Medica*, 67(3): 279–281.
- CHAVERRI P, LIU M, HODGE K T, 2008. A monograph of the entomopathogenic genera *Hypocrella*, *Moelleriella*, and *Samuelsia* gen. nov. (Ascomycota, Hypocreales, Clavicipitaceae), and their aschersonia-like anamorphs in the Neotropics. *Studies in Mycology*, 60(1): 1–66.
- CHUTRAKUL C, BOONRUANGPRAPA T, SUVANNAKAD R, ISAKA M, SIRITHUNYA P, TOOJINDA T, KIRTIKARA K, 2009. Ascherxanthone B from *Aschersonia luteola*, a new antifungal compound active against rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Journal of Applied Microbiology*, 107(5): 1624–1631.
- EVIDENTE A, CRISTINZIO G, PUNZO B, ANDOLFI A, TESTA A, MELCK D, 2009. Flufuran, an antifungal 3,5-disubstituted furan produced by *Aspergillus flavus* Link. *Chemistry & Biodiversity*, 6(3): 328–334.
- FULLE S, GOHLKE H, 2009. Statics of the ribosomal exit tunnel: implications for cotranslational peptide folding, elongation regulation, and antibiotics binding. *Journal of Molecular Biology*, 387(2): 502–517.
- HE J, FENG XZ, JI TF, LU Y, ZHAO B, 2006. Secondary metabolites from fungus *Fomes cajanderi*. *Natural Product Research*, 20(6): 598–605.
- HU Y, LI B, 2017. Efficient and selective palladium-catalyzed direct oxidative esterification of benzylic alcohols under aerobic conditions. *Tetrahedron*, 73(52): 7301–7307.
- ISAKA M, PALASARN S, KOCHARIN K, SAENBOONRUENG J, 2005. A cytotoxic xanthone dimer from the entomopathogenic fungus *Aschersonia* sp. BCC 8401. *Journal of Natural Products*, 68(6): 945–946.
- ISAKA M, YANGCHUM A, RACHTAWEE P, KOMWIJIT S, LUTTHISUNGNEON A, 2010. Hopane-type triterpenes and binaphthopyrones from the scale insect pathogenic fungus *Aschersonia paraphysata* BCC 11964. *Journal of Natural Products*, 73(4): 688–692.
- KORNSAKULKARN J, SAEPUA S, LAKSANACHAROE N P, RACHTAWEE P, THONGPANCHANG C, 2013. Xanthone and anthraquinone-type mycotoxins from the scale insect fungus *Aschersonia marginata* BCC 28721. *Tetrahedron Letters*, 54(29): 3813–3815.
- KWON H C, ZEE S D, CHO S Y, CHOI S U, LEE K R, 2002. Cytotoxic ergosterols from *Paecilomyces* sp. J300. *Archives of Pharmacal Research*, 25(6): 851–855.
- LI G, KUSARI S, LAMSHOFT M, SCHUFFLER A, LAATSCH H, SPITELLER M, 2014. Antibacterial secondary metabolites from an endophytic fungus, *Eupenicillium* sp. LG41. *Journal of Natural Products*, 77(11): 2335–2341.
- LUO H, LIU Y, FANG L, LI X, TANG N, ZHANG K, 2007. *Coprinus comatus* damages nematode cuticles mechanically with spiny balls and produces potent toxins to immobilize nematodes. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12): 3916–3923.
- NISSEN P, HANSEN J, BAN N, MOORE P B, STEITZ T A, 2000. The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, 289: 920–930.
- RYDER N S, DUPONT M C, FRANK I, 1986. Inhibition of fungal and mammalian sterol biosynthesis by 2-aza-2,3-dihydrosqualene. *FEBS Letters*, 204(2): 239–242.
- SADORN K, SAEPUA S, BOONYUEN N, CHOO WONG W, RACHTAWEE P, PITTAYAKHAJONWUT P, 2021. Bioactive dimeric tetrahydroxanthones with 2,2'- and 4,4'-axial linkages from the entomopathogenic fungus *Aschersonia confluens*. *Journal of Natural Products*, 84(4): 1149–1162.
- SADORN K, SAEPUA S, PUNYAIN W, SAORTEP W, CHOO WONG W, RACHTAWEE P, PITTAYAKHAJONWUT P, 2020. Chromanones and aryl glucoside analogs from the entomopathogenic fungus *Aschersonia confluens* BCC53152. *Fitoterapia*, 144: 104606.
- VAN EIJK G W, ROEIJMANS H J, SEYKENS D, 1986. Hopanoids from the entomogenous fungus *Aschersonia aleyrodis*. *Tetrahedron Letters*, 27(22): 2533–2534.
- VARMA G B, FATOPE M O, MARWAH R G, DEADMAN M E, ALRAWAHI F K, 2006. Production of phenylacetic acid derivatives and 4-epiradicinol in culture by *Curvularia lunata*. *Phytochemistry*, 67(17): 1925–1930.
- ZHANG Y, ZHU T, FANG Y, LIU H, GU Q, ZHU W, 2007. Carbonarones A and B, new bioactive γ -pyrone and α -pyridone derivatives from the marine-derived fungus *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Antibiotics*, 60(2): 153–157.