

地衣内生菌 *Elaphocordyceps* sp.的代谢产物

元超¹ 郭玉华¹ 李刚² 吴长生² 李铭³ 王海英^{3*} 赵遵田^{3*}

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所云南分所 西双版纳州傣药南药重点实验室
云南 景洪 666100)

(2. 山东大学 药学院 山东 济南 250012)

(3. 山东师范大学 生命科学学院 山东 济南 250014)

摘要:【目的】通过对猫耳衣内生菌 *Elaphocordyceps* sp.代谢产物的研究,以期获得结构新颖、抗菌活性强的化合物。【方法】采用 PCR 扩增和测定 nrDNA 的 ITS (Internal transcribed spacer) 序列,在 GenBank 数据库中比对,并采用构建系统发育树的方法,确定该菌株的分类地位。采用硅胶柱色谱、凝胶柱色谱和高效液相色谱方法进行成分分离。根据理化性质和波谱数据进行结构鉴定。采用倍比稀释法进行抑菌活性测定。【结果】鉴定出供试菌株为地衣内生菌 *Elaphocordyceps* sp.。从 *Elaphocordyceps* sp.的发酵液中分离得到 3 个化合物,结构鉴定为麦角甾醇、4,8-Dihydroxy-1-tetralone 和 De-O-methyldiaporthin。化合物 1-3 表现弱的抑制白色念珠菌活性。化合物 3 具有非常强的植物毒活性(叶片敏感度: 4 nmol)。化合物 3 在地衣内生菌 *Elaphocordyceps* sp.发酵液中的得率为 0.75 mg/L (3.2×10^3 nmol),远远高于其对叶片敏感度 4 nmol。【结论】由猫耳衣内生菌 *Elaphocordyceps* sp.产生的 De-O-methyldiaporthin 可作为一种微生物源除草剂。

关键词:地衣内生菌, *Elaphocordyceps* sp., 植物毒, De-O-methyldiaporthin

Metabolites of endolichenic fungus *Elaphocordyceps* sp.

YUAN Chao¹ GUO Yu-Hua¹ LI Gang² WU Chang-Sheng² LI Ming³ WANG Hai-Ying^{3*}
ZHAO Zun-Tian^{3*}

(1. Key Laboratory of Dai and Southern Medicine of Xishuangbanna Dai Autonomous Prefecture, Institute of Medicinal Plant Development Yunnan Branch, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Jinghong, Yunnan 666100, China)

(2. School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

(3. College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan, Shandong 250014, China)

Abstract: [Objective] To acquire compounds with novel structures or potent antimicrobial activities through research on metabolites of endolichenic fungus *Elaphocordyceps* sp. isolated from *Leptogium* sp.. [Methods] We confirmed taxonomy status of the endolichenic fungus by PCR amplification,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31170187, 31270059); 济南市高校自主创新项目(No. 201202024)

*通讯作者: Fax: 86-691-2122161

✉: 王海英: endolichen@gmail.com; 赵遵田: yuanchao79@126.com

收稿日期: 2013-10-29; 接受日期: 2014-01-14; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-16

evaluation of the ITS (internal transcribed spacer) sequence of nrDNA, sequence comparison in GenBank Database and construction of the phylogenetic tree. Constitutes were isolated by the gel column chromatography, sephadex LH-20 and HPLC methods. Structures were elucidated by physicochemical properties and spectral data analysis. Double dilution method was adopted to evaluate antifungal activity. **[Results]** The testing strain was identified as *Elaphocordyceps* sp.. Three compounds were isolated and purified from the fermentation of the endolichenic fungus. Their structures were elucidated to be ergosterol, 4,8-dihydroxy-1-tetralone and De-O-methyladiaporthin. The three compounds show weak inhibition on *Candida albicans* sc5314. De-O-methyladiaporthin exhibits very strong phytotoxic activity, with leaf sensitivity concentration of 4 nmol. The concentration of De-O-methyladiaporthin in fermentation broth of *Elaphocordyceps* sp. reached 0.75 mg/L (3.2×10^3 nmol), much higher than the leaf sensitivity concentration of 4 nmol. **[Conclusion]** De-O-methyladiaporthin produced by the fungus of *Elaphocordyceps* sp. can be a microbial herbicide.

Keywords: Endolichenic fungus, *Elaphocordyceps* sp., Phytotoxicity, De-O-methyladiaporthin

地衣是自然界中藻类与真菌的特殊共生体,地衣中除了共生菌外还有大量内生菌^[1],由于其独特的生境,地衣已逐步成为天然药物和天然产物化学研究的新热点。自2007年Paranagama等^[2]首次报道地衣内生菌化学成分至今,关于地衣内生菌的次生代谢产物的研究主要是车永胜^[3-7]、刘宏伟^[8]、Gunatilaka^[9-10]、娄红祥^[11]等对其报道较多,且结构新颖、活性较好。我们拟从地衣内生菌中发现结构新颖的化合物,为生物活性筛选和新型药物的研发提供备选化合物。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂

仪器:NMR测定为Bruker Avance 600型核磁共振波谱仪;质谱测定为LTQ-Orbitrap XL型质谱仪(配有ESI源;鞘气:50 arb;毛细管温度:275 °C;辅助气:10 arb;毛细管电压:25 V;喷雾电压:4.5 kV)。半制备液相使用Agilent 1200高效液相仪,半制备柱为Ecclipse XDB-C18,4.6 mm×250 cm,粒径5 μm,PDA检测器。

试剂:石油醚、丙酮、二氯甲烷和甲醇等均为分析纯,高效液相用甲醇为色谱纯,薄层层析用硅胶(GF₂₅₄)、柱层析用硅胶(200-300目)均为青岛海洋化工厂生产,显色剂为10% H₂SO₄-EtOH溶液。

1.2 菌种鉴定和发酵液制备

菌种由本实验室李铭从采自云南丽江老君山

的一种猫耳衣中分离出来,通过提取其DNA,进行PCR扩增其nrDNA的ITS序列,测定该菌株nrDNA的ITS序列,然后在GenBank数据库中对该株内生菌nrDNA-ITS序列进行相似性搜索,共检索到同源性较高的ITS序列2条,用ClustalX 1.83将检索到的2株已知同源性序列与该内生真菌nrDNA-ITS序列进行多重序列比对,使用MEGA 4.0的最小进化法(ME)构建系统发育树。

该菌种接种于PDA斜面培养基上,25 °C培养14 d,然后用接种棒将其接种于2个500 mL三角瓶中(每瓶装有200 mL PDB培养基,pH调至6.5,1×10⁵ Pa灭菌15 min),在25 °C摇床上振荡培养7 d,转速170 r/min,制备种子液。然后,用无菌水将种子液调节成10⁶ CFU/mL的菌悬液;同时,制备20瓶PDB培养基,用菌悬液进行接种,10 mL/瓶,25 °C摇床上振荡培养21 d,转速170 r/min,获得4 L发酵液。

1.3 提取及分离化合物

菌株*Elaphocordyceps* sp.发酵液用纱布过滤出菌丝体,用95%乙醇回流提取4次,提取物过滤并真空浓缩得乙醇浸膏,加入一定体积水悬浮,乙酸乙酯萃取,减压浓缩至干。发酵水液用旋转蒸发器45 °C减压浓缩至膏状物,加入一定体积水悬浮,然后用乙酸乙酯萃取,减压浓缩至干。两部分乙酸乙酯萃取物进行TLC检测,展开剂为Petroleum

ether : Acetone (3:1, 体积比), 发现菌丝体和发酵液的乙酸乙酯萃取物化学成分基本一致, 因此决定将两部分合并进行分离, 得乙酸乙酯浸膏(2.3 g)。

该乙酸乙酯浸膏经硅胶柱色谱, 以石油醚-丙酮系统梯度洗脱(100:1 至 0:100, 体积比), 由 100:1 (体积比)部分得到化合物 1 (5 mg), 将 50:1 (体积比)洗脱部分, 经 Sephadex LH-20 柱层析(MeOH), 再经半制备 HPLC (色谱条件: 20 min 内 60%–90% MeOH 梯度洗脱, 流速=1.6 mL/min, $t_R=16$ min)得化合物 2 (2 mg) 20:1 (体积比)洗脱部分经 Sephadex LH-20 柱层析(MeOH), 再经半制备 HPLC (色谱条件: 20 min 内 60%–90% MeOH 梯度洗脱, 流速=1.6 mL/min, $t_R=12$ min)得化合物 3 (3 mg)。

1.4 化合物 1–3 对白色念珠菌的生长抑制活性测定

–80 °C 保存的的白色念珠菌 sc5314 菌株解冻后, 接种到 YEPD 培养基上, 30 °C 培养 24 h。将菌悬液在振荡器上振荡 15 s, 用血细胞计数板计数菌数, 调整菌悬液浓度为 $(1-5)\times 10^6$ CFU/mL。将其用 RPMI-1640 培养液稀释菌液 1 000 倍, 作为接种的菌悬液。采用微量稀释法测定化合物 1–3 对白色念珠菌的抑制活性, 测定时每孔中含菌量约为 $(0.5-2.5)\times 10^3$ CFU/mL, 化合物 1–3 的浓度范围为 256–32 mg/L, 培养板置 30 °C 培养 24 h 后观察结果, 氟康唑为阳性对照, 所有实验重复 3 次, 计算最低抑菌浓度(MIC)。

2 结果

2.1 菌种鉴定结果

通过对菌株 nrDNA 的 ITS 序列分析, 其与 *Elaphocordyceps inegoensis* 和 *Elaphocordyceps subsessilis* 以 100%的自展支聚类为一支, 命名为 *Elaphocordyceps* sp. (图 1)。

2.2 结构鉴定

由图 2 可知, 化合物 1: 白色针晶, mp: 153–155 °C, 分子式: $C_{28}H_{44}O$, ESI-MS m/z : 397 $[M+H]^+$; 1H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz) δ_H : 3.67 (1H, *m*, H-3), 5.59 (1H, *dd*, $J=6.0$, 6.0 Hz, H-6), 5.41 (1H, *m*, H-7), 0.66 (3H, *s*, H-18), 0.97 (3H, *s*, H-19), 1.05 (3H, *d*, $J=6.6$ Hz, H-21), 5.20 (1H, *m*, H-22), 5.24 (1H, *m*, H-23), 1.99 (1H, *m*, H-24), 1.41 (1H, *m*, H-25), 0.86 (3H, *d*, $J=6.0$ Hz, H-26), 0.85 (3H, *d*, $J=6.0$ Hz, H-27), 0.95 (3H, *d*, $J=6.0$ Hz, H-28)。 ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz) δ_C : 39.07 (C-1), 32.00 (C-2), 70.48 (C-3), 40.80 (C-4), 139.80 (C-5), 119.59 (C-6), 116.28 (C-7), 141.42 (C-8), 46.23 (C-9), 37.03 (C-10), 21.31 (C-11), 38.37 (C-12), 42.83 (C-13), 54.56 (C-14), 23.01 (C-15), 28.33 (C-16), 55.70 (C-17), 12.07 (C-18), 16.30 (C-19), 40.48 (C-20), 21.12 (C-21), 131.96 (C-22), 135.58 (C-23), 42.81 (C-24), 33.09 (C-25), 19.67 (C-26), 19.98 (C-27), 17.63 (C-28)。将其 1H 和 ^{13}C NMR 数据与文献[12]对照, 基本一致, 确定化合物 1 为麦角甾醇。

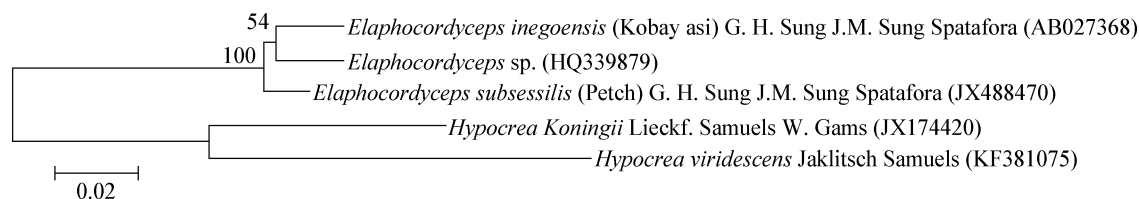


图 1 地衣内生菌 *Elaphocordyceps* sp.的系统发育树

Figure 1 The phylogenetic tree of the endolichenic fungus *Elaphocordyceps* sp.

注: 括号里的数字为 GenBank 登录号; 分支点上的数字为 Bootstrap 值, 代表分类单位被聚在一起的几率; 比例尺显示水平线的长度, 代表碱基替换数。

Note: The numbers in the brackets are gene sequence accession numbers in GenBank; The numbers of nodes indicate bootstrap values, and represent the percentages of 1 000 bootstrap replications in which the taxa to the right are placed together; The scale bar represents the horizontal branch lengths and the number of substitutions per nucleotide position.

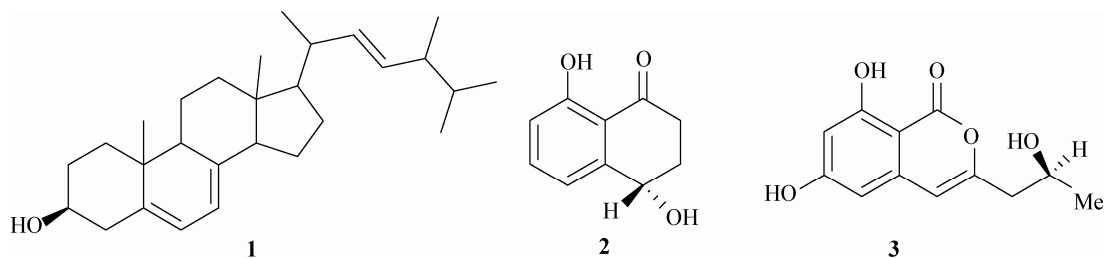


图2 化合物1-3的结构
Figure 2 Structures of compounds 1-3

化合物2:白色粉末, mp: 72-73 °C, 分子式: $C_{10}H_{10}O_3$, ESI-MS m/z : 179 $[M+H]^+$; 以 Petroleum ether: Acetone (3:1, 体积比) 薄层展开, R_f 为 0.32, 喷 10% H_2SO_4 -EtOH 加热后显单一的红色斑点。 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_H : 12.40 (1H, s, 8-OH), 7.56 (1H, m, H-6), 7.08 (1H, d, $J=12.0$ Hz, H-5), 6.85 (1H, d, $J=6.0$ Hz, H-7), 5.65 (1H, s, 4-OH), 4.75 (1H, m, H-4), 2.76 (2H, m, H-2), 2.20 (1H, m, H-3a), 2.19 (1H, m, H-3b)。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_C : 205.18 (C-1), 35.16 (C-2), 31.39 (C-3), 65.86 (C-4), 117.30 (C-5), 136.70 (C-6), 115.74 (C-7), 161.34 (C-8), 148.57 (C-4a), 114.90 (C-8a)。将 1H 和 ^{13}C NMR 数据与文献[13]对照, 完全一致, 确定化合物2为 4,8-Dihydroxy-1-tetralone。

化合物3:白色粉末, 分子式: $C_{12}H_{12}O_5$, ESI-MS m/z : 237 $[M+H]^+$; 以 Petroleum ether: Acetone (3:1, 体积比) 薄层展开, R_f 为 0.2, 喷 10% H_2SO_4 -EtOH 加热后显单一的红色斑点。 1H NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ_H : 10.97 (1H, s, 8-OH), 6.47 (1H, s, H-4), 6.30 (1H, s, H-5), 6.17 (1H, s, H-7), 3.97 (1H, m, H-2'), 2.49 (2H, d, $J=6.0$ Hz, H-1'), 1.12 (3H, d, $J=6.0$ Hz, H-3')。 ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ_C : 166.88 (C-1), 155.70 (C-3), 105.83 (C-4), 103.08 (C-5), 166.08 (C-6), 101.89 (C-7), 163.07 (C-8), 98.43 (C-9), 140.06 (C-10), 43.07 (C-1'), 64.40 (C-2'), 23.79 (C-3')。将 1H 和 ^{13}C NMR 数据与文献[14]对照, 完全一致,

确定化合物3为 De-O-methyldiaporthin。

2.3 生物活性测定结果

活性测定结果表明(表1), 化合物1-3均表现弱的白色念珠菌 sc5314 抑制活性, MIC 均为 128 mg/L。

表1 化合物1-3抑制白色念珠菌 sc5314 活性结果
Table 1 The MIC results of compounds 1-3 on *Candida albicans* sc5314

化合物 Compounds	最低抑菌浓度 MIC (mg/L)
1	128
2	128
3	128
Fluconazole	2

3 讨论

据文献[14-15]报道, 化合物3, De-O-methyldiaporthin 最早分离自植物病原菌 *Drechslera siccas*, 分离率 3 mg/L, 生物合成途径研究表明 De-O-methyldiaporthin 是 Diaporthin 的去甲基化产物, 且该两种化合物同时从真菌 *Aspergillus ochraceus* D2306 中分离得到过。De-O-methyldiaporthin 具有非常强的植物毒活性, 其对小麦、马唐、大豆等的敏感浓度为 1 μ g/L (4 nmol), 对刺苋和庭院杂草的敏感浓度为 8 nmol 左右, 表明化合物 De-O-methyldiaporthin 是一种非常具有开发潜力的微生物源农药药源分子。本研究显示: 化合物 De-O-methyldiaporthin 从地衣内生菌

Elaphocordyceps sp.发酵21 d的PDB培养基发酵液中的得率为0.75 mg/L (3.2×10^3 nmol),说明化合物De-O-methyldiaporthin在地衣内生菌*Elaphocordyceps* sp.发酵液中的真实含量要高于0.75 mg/L (3.2×10^3 nmol),尽管该得率(0.75 mg/L)低于植物病原菌*Drechslera siccans*中De-O-methyldiaporthin的得率(3 mg/L),但这仍远远高于De-O-methyldiaporthin对小麦、马唐、大豆等的敏感浓度1 μ g/L (4 nmol),如果将地衣内生菌*Elaphocordyceps* sp.的PDB发酵液直接开发成微生物源除草剂替代传统化学除草剂,将大大降低农业生产成本,有利于绿色生态环境保护。同时,该研究也进一步丰富了产强植物毒素De-O-methyldiaporthin菌株的种类。

另外,从植物内生菌中发现潜在的药源分子,能够为新药研发提供重要备选化合物。地衣作为自然界一种特殊的有机体,含有大量未被认知的、亟待开发的内生菌资源,这些内生真菌的代谢产物结构新颖、复杂多样,具有广泛而良好的生物活性。另外,微生物中多数代谢途径在普通培养条件下不能表达,因此采取不同策略,如改变培养基配方或培养条件,可以促进某些潜在基因进行表达,获得广泛的结构新颖、活性强的化合物,为新药的研发提供大量备选先导化合物。

参 考 文 献

- [1] Elizabeth AA, Lutzoni F. Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots?[J]. *Ecology*, 2007, 88: 541-549.
- [2] Paranagama PA, Wijeratne EM, Burns AM, et al. Heptaketides from *Corynespora* sp. inhabiting the cavern beard lichen, usnea cavernosa: first report of metabolites of an endolichenic fungus[J]. *Journal of Natural Products*, 2007, 70: 1700-1705.
- [3] Zhang F, Li L, Niu SB, et al. A thiopyranochromenone and

other chromone derivatives from an endolichenic fungus *Preussia africana*[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(2): 230-237.

- [4] Wang YC, Zheng ZH, Liu SC, et al. Oxepinochromenones, furochromenone, and their putative precursors from the endolichenic fungus *Coniochaeta* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2010, 73: 920-924.
- [5] Ding G, Li Y, Fu SB, et al. Ambuic acid and torreyanic acid derivatives from the endolichenic fungus *Pestalotiopsis* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72: 182-186.
- [6] Zhang F, Liu SC, Lu XH, et al. Allenyl and alkynyl phenyl ethers from the endolichenic fungus *Neurospora terricola*[J]. *Journal of Natural Products*, 2009, 72: 1782-1785.
- [7] Wang YC, Niu SB, Liu SC, et al. The first naturally occurring thiopinols and thienol from an endolichenic fungus *Coniochaeta* sp.[J]. *Organic Letters*, 2010, 12(21): 5081-5083.
- [8] Wu W, Dai HQ, Bao L, et al. Isolation and structural elucidation of proline-containing cyclopentapeptides from an endolichenic *Xylaria* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74: 1303-1308.
- [9] Kithsiri WEM, Bharat PB, Liu MX, et al. Geopyxins A-E, ent-kaurane diterpenoids from endolichenic fungal strains *Geopyxis aff. majalis* and *Geopyxis* sp. AZ0066: Structure-activity relationships of geopyxins and their analogues[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(3): 361-369.
- [10] Kithsiri WEM, Bharat PB, Malkanthi KG, et al. Maximizing chemical diversity of fungal metabolites: Biogenetically related heptaketides of the endolichenic fungus *Corynespora* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2010, 73: 1156-1159.
- [11] Li G, Wang HY, Zhu RX, et al. Phaeosphaerins A-F, cytotoxic perylenequinones from an endolichenic fungus, *Phaeosphaeria* sp.[J]. *Journal of Natural Products*, 2012, 75(2): 142-147.
- [12] 张鹏, 包海鹰, 图力古尔. 珊瑚状猴头菌子实体化学成分研究() [J]. *中草药*, 2012, 12: 385-390.
- [13] Talapatra SK, Karmacharya B, Shambhu CD, et al. (-)-Regiolone, an α -tetralone from *Juglans regia*: structure, stereochemistry and conformation[J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(12): 3929-3932.
- [14] Hallock YF, Clardy J, Kenfielda DS, et al. De-O-methyldiaporthin, a phytotoxin from *Drechslera siccans*[J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(10): 3123-3125.
- [15] Jonathan PH, Peter GM. Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*[J]. *Phytochemistry*, 2001, 57: 165-169.