

# 黄芪内生真菌 AR15 中吲哚二酮哌嗪及其对黄芪白粉病原菌的抑制作用

张弘驰<sup>1,2</sup>, 刘瑞<sup>1,2\*</sup>, 李慧<sup>1,2</sup>, 安志鹏<sup>1,2</sup>, 周凤<sup>1,2</sup>

(1. 山西大同大学 生命科学学院,山西 大同 037009;2. 山西大同大学 应用生物技术研究所,山西 大同 037009)

**摘要:**为了研究黄芪内生真菌 AR15 的次级代谢产物的结构及其对黄芪白粉病原菌的抑制作用。采用形态学方法和 ITS 序列鉴定该 AR15, 使用反复硅胶柱色谱法、Sephadex LH-20 凝胶色谱法, 结合 HPLC 对 AR15 的发酵产物进行分离纯化, 通过波谱分析鉴定其发酵液中分离得到 8 个化合物的结构。结果表明: 黄芪内生真菌 AR15 为 *Penicillium* sp., 分离到的 8 个吲哚二酮哌嗪类生物碱分别鉴定为 fumitremorgin B(1)、cyclotryprostatins B(2)、verruculogen(3)、tryprostatin B(4)、tryprostatin A(5)、cyclotryprostatin A(6)、cyclotryprostatins C(7)、cyclotryprostatins D(8), 所有吲哚二酮哌嗪对黄芪白粉病原菌都显示出一定的抑制作用, 其中化合物 1,3 和 6 的 MIC 值达到 3.13、1.56 和 6.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**关键词:**内生真菌; 黄芪; 吲哚二酮哌嗪; 分离; 黄芪白粉病

**中图分类号:**S567.2      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2017)01-0197-06

Indole Diketopiperazines from Endophytic Fungus AR15 of *Astragalus membranaceus* and Antimicrobial Activity for *Erysiphe pisi*

ZHANG Hong-chi<sup>1,2</sup>, LIU Rui<sup>1,2\*</sup>, LI Hui<sup>1,2</sup>, AN Zhi-peng<sup>1,2</sup>, ZHOU Feng<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, Shanxi Datong University, Datong, Shanxi 037009, China;

2. Applied Biotechnology Institute, Shanxi Datong University, Datong, Shanxi 037009, China)

**Abstract:** The chemical constituents from endophytic fungus AR15 of *Astragalus membranaceus* and antimicrobial activity to *Erysiphe pisi* were investigated. According to the morphological features, cultural characteristics and ITS sequences, the strains AR15 were identified as *Penicillium* sp. The compounds were isolated by column chromatography, Sephadex LH-20, and HPLC. Eight indole diketopiperazines were obtained and elucidated as fumitremorgin B (1), cyclotryprostatins B (2), verruculogen (3), tryprostatin B (4), tryprostatin A (5), cyclotryprostatin A (6), cyclotryprostatins C (7), and cyclotryprostatins D (8). All indole diketopiperazines showed inhibitory activity to *E. pisi*, and compound 1,3 and 6 showed strong inhibitory activity with MIC values of 3.13, 1.56 and 6.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , respectively.

**Key words:** endophytic fungus; *Astragalus membranaceus*; indole diketopiperazine; isolation; *Erysiphe pisi*

吲哚二酮哌嗪是一类重要的哌嗪类稠合杂环天然产物, 它是以色氨酸和其他氨基酸缩合而形成的环二肽为基本骨架, 组成吲哚二酮哌嗪类化合物的吲哚单元和二酮哌嗪单元均具有生物活性, 研究发

现此类化合物具有抗癌、抗菌、止痛、镇咳、抗炎等多种生物活性, 所以近年对源自天然和人工合成的吲哚二酮哌嗪类以及生物活性筛选已经成为新药研究领域的热点之一<sup>[1-2]</sup>。

收稿日期:2016-05-14 修回日期:2016-06-23

基金项目:山西省科技攻关项目(20130311011-6);大同市科技攻关项目(201468-1)。

作者简介:张弘驰,男,博士,研究方向:微生物次生代谢产物。E-mail:zhanghclw@163.com

\* 通信作者:刘瑞,女,博士,研究方向:天然产物。E-mail:zhanghclw@163.com

海洋微生物一直是吲哚二酮哌嗪的重要来源,但近年研究发现药用植物中蕴含着的内生真菌成为吲哚二酮哌嗪的一个新的来源<sup>[3-5]</sup>,在系统研究黄芪内生真菌的过程中,发现了1株可以产生吲哚二酮哌嗪类生物碱的内生真菌AR15,本研究从AR15中分离到的8个吲哚二酮哌嗪,并发现其对黄芪白粉病原菌有很好的抑制作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

菌种:黄芪全株植物于2013年9月采自山西省恒山阳坡,经山西大同大学周凤教授鉴定,内生真菌AR15分离自该植物的根部,现保存于山西大同大学应用生物技术研究所。活性测试菌黄芪白粉病原菌*Erysiphe pisi* DC,由山西大同大学应用生物技术研究所提供。

培养基:内生真菌和测试菌培养采用的PDA固体培养基,内生真菌发酵培养采用的是察氏液体培养基和大米固体培养基。

仪器:高效液相色谱Agilent 1200(美国惠普公司),Welch material XB-C<sub>18</sub>柱(4.6 mm×250 mm,5 μm),ODS反相柱(日本YMC公司,50 μm),ESI-MS质谱仪JEOL SX102A(日本电子株式会社),超导核磁波谱仪Bruker ADVANCE 400 MHz(瑞士布鲁克公司),熔点仪Fisher-Johns(北京市科仪电光仪器厂)。柱层析用硅胶和硅胶预制板(青岛海洋化工厂),Sephadex LH-20(上海安玛西亚公司股份有限公司),HPLC用色谱纯试剂(上海星可生化有限公司),其余化学纯试剂(天津博迪试剂厂)。

### 1.2 方法

1.2.1 内生真菌的鉴定 将菌株AR15接种于PDA平板上,27℃暗箱培养,观察记录菌丝生长形态以及外观培养性状;采用玻片培养法,棉兰染色后,显微观察孢子梗的分枝状况和孢子形态等情况。另外,AR15转接到PDA平板培养10~15 d后,干燥的菌丝块在液氮中研磨成粉状,采用CTAB法提取其内生真菌DNA,1%琼脂糖凝胶电泳检测其纯度和浓度。以提取到的基因组DNA为模板,通过引物TS1(TCCGTAGGTGAAACCTGCGG)和ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)扩增18S rDNA的ITS序列。扩增后的PCR产物由三联兄弟生物医药研究(北京)有限公司测序,将测序获得的ITS序列通过Blast比对,结合形态学和分子生物学鉴定菌种的归属<sup>[6]</sup>。

1.2.2 内生真菌的固体发酵及代谢产物提取和分离 挑取活化的AR15,接种于含100 mL察氏液体

培养基的250 mL三角瓶中,28℃、150 r·min<sup>-1</sup>振荡培养7 d,得种子液。规模发酵采用固体发酵<sup>[7]</sup>,发酵瓶中含大米100 g和改良液体培养基(NaCl 30 g·L<sup>-1</sup>,NaNO<sub>3</sub> 2 g·L<sup>-1</sup>,谷氨酸钠3.5 g·L<sup>-1</sup>,pH 7.5)100 mL,灭菌后,10%的接种量,接种种子液(共计200瓶),28℃下静置培养45 d后,60℃直接将发酵培养物烘干,分别用乙酸乙酯和甲醇浸提5次,提取液浓缩得粗提物935 g。粗提物经硅胶柱色谱,以氯仿-甲醇梯度洗脱(体积比分别为1:0、200:1、100:1、50:1、20:1、10:1、5:1、2:1、1:1、0:1)得到10个部分Fr. A-J。Fr. B以乙酸乙酯和石油醚梯度洗脱,得组分sFr. B(1-12),sFr. B3再次经硅胶柱色谱洗脱和凝胶柱Sephadex LH-20纯化,得到化合物1(192 mg)和化合物2(211 mg)。Fr. C经Sephadex LH-20,以氯仿-甲醇为流动相(1:1),得组分sFr. C(1-8),sFr. C2用氯仿-甲醇(1:1)溶解,以甲醇-水为流动相(2:3;流速4 mL·min<sup>-1</sup>),经半制备HPLC分离得化合物3(45 mg)和化合物4(38 mg);sFr. C3再次经硅胶柱色谱洗脱和凝胶柱Sephadex LH-20纯化,以氯仿-甲醇为流动相(1:1),得到化合物5(96 mg)。Fr. D以乙酸乙酯-石油醚为流动相,梯度洗脱,得组分sFr. D(1-10),sFr. D2经反相ODS减压柱色谱分离,以甲醇-水为流动相(2:3起始),减压洗脱,得组分sFr. D2.1-sFr. D2.10。sFr. D2.3经半制备HPLC,以乙腈-水为流动相(3:7;流速2.5 mL·min<sup>-1</sup>),得化合物6(34 mg)和化合物7(25 mg);sFr. C2.6经SephadexLH-20,以氯仿-甲醇为流动相(1:1),分离得化合物8(81 mg),分离得到的化合物都经一维核磁分析确定其结构。

1.2.3 抑菌黄芪白粉病原菌活性的测试 测试样品为分离到的8个吲哚二酮哌嗪,配制成1 mg·mL<sup>-1</sup>的DMSO溶液。将样品液在96孔培养板上使用察氏液体培养基稀释成列的浓度梯度200、100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78、0.39 μg·mL<sup>-1</sup>,然后在96孔培养板中接种黄芪白粉病原菌,培养48 h,观察结果,找出抑制微生物生长的最低浓度,即为该化合物的最小抑菌浓度MIC<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株AR15的鉴定

AR15生长迅速,菌体生长前期呈白色,慢慢变为墨绿色,有大量的粉末状的孢子粉出现,培养基质由白色变为橙色;显微观察发现,菌丝短、丝绒状,菌丝发达多分枝,主枝上有多个分生的孢子梗,类似扫帚,顶端分生出多个孢子,且是绿色的单胞体,初步

鉴定为青霉属(图1)。

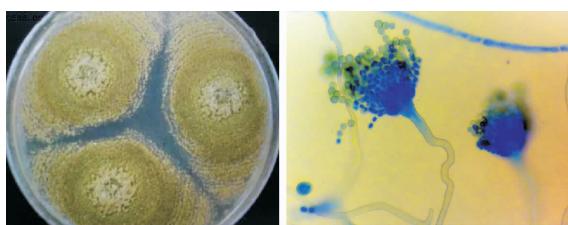


图1 菌株 AR15 菌落形态

Fig. 1 The colonial morphology of strain AR15

进一步分子生物鉴定,经过PCR扩增后获得的ITS序列长590 bp,测序结果如下:

```
TCTTCCGTAGGGTAGACCTGCGAAGGATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGT  
GTTTATTTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCTTAACGGCCGCCGGGGCTTACGCCCGGGCCCG  
CGCCCGCCGAAGACACCCCTCGAACTCTGCTGAAAGATTGTAGTCTGAGTAAAATATAATTATTTAAAC  
TTTCAACAACGGATCTTGGTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCAAATGCGATACGTAATGTGAATTG  
CAAATTCACTGAGTCTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGCATGCCTGTCC  
GAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTGTGTGGGCCCCGTCCTCCGATCCCGGGGGACGGGCCCCG  
AAAGGCAGCGCGGACCACGCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTGTCAACCGCTCTGTAGGCCGGC  
CGCGCTTGCCGATCAACCCGAATTATCCAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATAACCGCTGAACCTT  
AAGCATATCATAAAGCCGGAGGA
```

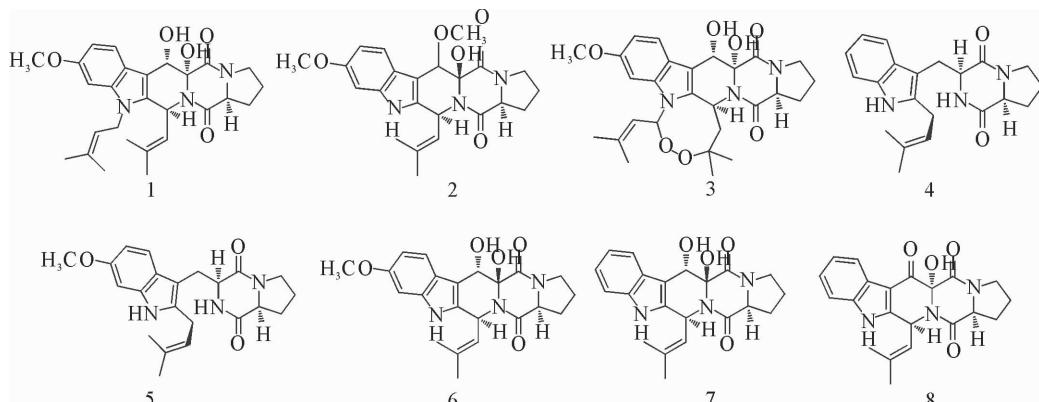


图2 黄芪内生真菌 AR15 的代谢产物

Fig. 2 Compounds isolated from AR15 of *Astragalus membranaceus*

化合物1,白色针状结晶,mp. 210~212 °C,<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, J/Hz) 7.85 (1H, d, J = 8.0, H-4), 6.79 (1H, d, J = 8.0, H-5), 6.69 (1H, s, H-7), 5.77 (1H, s, H-8), 4.45 (1H, t, J = 8.0, H-12), 2.47 (1H, m, H-13a), 2.08 (1H, m, H-13b), 2.10 (1H, m, H-14a), 1.93 (1H, m, H-14b), 3.63 (2H, d, J = 8.0, H-15), 5.98 (1H, d, J = 12.0, H-18), 4.71 (1H, d, J = 12.0, H-19), 1.99 (3H, s, H-21), 1.63 (3H, s, H-22), 4.53 (2H, s, H-23), 5.03 (1H, s, H-24), 1.85 (3H, s, H-26), 1.70 (3H, s, H-27), 3.84 (3H, s, 6-OMe), 4.74 (1H, s, 8-OH), 4.17 (1H, s, 9-OH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm) 131.13 (C-2), 104.42 (C-3),

该序列与 *Penicillium commune* strain (KP120886.1)的ITS序列同源性为99%,结合形态学特征和ITS序列分析,黄芪内生真菌AR15鉴定为 *Penicillium* sp.。

## 2.2 菌株 AR15 的代谢产物的结构鉴定

从AR15中将分离得到的8个代谢产物经过波谱分析,分别被鉴定为fumitremorgin B(1)、cyclotryprostatins B(2)、verruculogen(3)、tryprostatin B(4)、tryprostatin A(5)、cyclotryprostatin A(6)、cyclotryprostatins C(7)、cyclotryprostatins D(8)(图2)。

120.52 (C-3a), 121.34 (C-4), 109.29 (C-5), 156.17 (C-6), 93.82 (C-7), 137.87 (C-7a), 68.95 (C-8), 82.98 (C-9), 170.51 (C-11), 58.76 (C-12), 28.93 (C-13), 22.61 (C-14), 45.26 (C-15), 166.25 (C-17), 49.03 (C-18), 122.97 (C-19), 135.22 (C-20), 18.37 (C-21), 25.71 (C-22), 41.77 (C-23), 120.29 (C-24), 134.61 (C-25), 18.20 (C-26), 25.55 (C-27), 55.72 (6-OMe)。以上数据与文献[9-11]报道的一致,故鉴定该化合物为fumitremorgin B。

化合物2,白色针状结晶,mp. 130~132 °C,ESI-MS *m/z*:436.2[M+H]<sup>+</sup>,<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, J/Hz) 8.10 (1H, s, H-1), 6.66 (1H, d, J = 8.0, H-3), 4.42 (1H, dd, J = 4.0,

4.0, H-6), 2.51 (1H, m, H-7a), 2.05 (1H, m, H-7b), 2.19 (1H, m, H-8a), 1.96 (1H, m, H-8b), 3.75 (1H, m, H-9a), 3.73 (1H, m, H-9b), 4.7 (1H, s, H-13), 7.43 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-16), 6.81 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-17), 6.85 (1H, s, H-19), 5.62 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-21), 2.24 (3H, s, H-23), 1.79 (3H, s, H-24), 3.34 (3H, s, 13-OMe), 3.82 (3H, s, 18-OMe).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm) 133.75 (C-2), 49.11 (C-3), 167.03 (C-5), 59.93 (C-6), 29.69 (C-7), 22.05 (C-8), 45.82 (C-9), 165.73 (C-11), 84.77 (C-12), 76.83 (C-13), 105.22 (C-14), 122.60 (C-15), 118.68 (C-16), 109.99 (C-17), 156.49 (C-18), 95.23 (C-19), 136.69 (C-20), 123.54 (C-21), 137.92 (C-22), 18.10 (C-23), 26.03 (C-24), 556.57 (13-OMe), 5.77 (18-OMe)。以上数据与文献[12]报道的一致, 故鉴定该化合物为 cyclotryprostatin B。

化合物 3, 黄色针状结晶, mp. 218~220 °C, ESI-MS  $m/z$ : 534.1 [M + Na]<sup>+</sup>,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm,  $J/\text{Hz}$ ) 7.95 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-4), 6.88 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-5), 6.58 (1H, s, H-7), 5.66 (1H, s, H-8), 4.45 (1H, t,  $J = 8.0, 8.0$ , H-12), 2.45 (1H, m, H-13a), 2.10 (1H, m, H-13b), 2.08 (1H, m, H-14a), 1.94 (1H, m, H-14b), 3.63 (2H, d,  $J = 8.0$ , H-15), 6.11 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-18), 2.00 (1H, m, H-19a), 1.63 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-19b), 1.99 (3H, s, H-21), 1.02 (3H, s, H-22), 6.73 (1H, s, H-23), 5.03 (1H, s, H-24), 1.77 (3H, s, H-26), 1.70 (3H, s, H-27), 3.84 (3H, s, 6-OMe), 4.74 (1H, s, 8-OH), 4.04 (1H, s, 9-OH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm) 131.13 (C-2), 105.50 (C-3), 120.87 (C-3a), 121.64 (C-4), 109.29 (C-5), 156.36 (C-6), 93.82 (C-7), 136.19 (C-7a), 68.96 (C-8), 82.58 (C-9), 166.10 (C-11), 58.76 (C-12), 28.94 (C-13), 22.61 (C-14), 51.11 (C-15), 170.71 (C-17), 49.03 (C-18), 45.29 (C-19), 82.09 (C-20), 25.71 (C-21), 27.00 (C-22), 85.82 (C-23), 118.40 (C-24), 143.11 (C-25), 18.90 (C-26), 24.09 (C-27), 55.72 (6-OMe)。以上数据与文献[9,13]报道的一致, 故鉴定该化合物为 verruculogen。

化合物 4, 淡黄色针状结晶, mp. 103~104 °C, ESI-MS  $m/z$ : 352.2 [M + H]<sup>+</sup>,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm,  $J/\text{Hz}$ ) 8.12 (1H, s, H-1),

7.45 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-4), 7.07 (1H, dd,  $J = 7.8, 7.6$ , H-5), 7.15 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-6), 7.31 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-7), 3.62 (1H, dd,  $J = 15.0, 4.0$ , H-8a), 3.01 (1H, dd,  $J = 15.0, 12.0$ , H-8b), 4.29 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.0$ , H-9), 5.65 (1H, s, H-10), 4.05 (1H, d,  $J = 8.0, 8.0$ , H-12), 2.31 (1H, m, H-13a), 2.04 (1H, m, H-13b), 2.04 (1H, m, H-14a), 1.91 (1H, m, H-14b), 3.55 (1H, m, H-15a), 3.68 (1H, m, H-15b), 3.45 (2H, m, H-18), 5.29 (1H, m, H-19), 1.79 (3H, s, H-21), 1.75 (3H, s, H-22).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm) 134.99 (C-2), 104.21 (C-3), 127.68 (C-3a), 117.82 (C-4), 119.43 (C-5), 121.55 (C-6), 110.69 (C-7), 136.59 (C-7a), 25.90 (C-8), 55.78 (C-9), 169.51 (C-11), 59.21 (C-12), 28.36 (C-13), 22.05 (C-14), 45.41 (C-15), 165.75 (C-17), 24.99 (C-18), 119.49 (C-19), 135.31 (C-20), 18.01 (C-21), 25.72 (C-22)。以上数据与文献[14]报道的一致, 故鉴定该化合物为 tryprostatin B。

化合物 5, 淡黄色针状结晶, mp. 120~122 °C, ESI-MS  $m/z$ : 382.2 [M + H]<sup>+</sup>,  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm,  $J/\text{Hz}$ ) 7.98 (1H, s, H-1), 7.40 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-4), 6.72 (1H, dd,  $J = 8.0, 3.0$ , H-5), 6.86 (1H, d,  $J = 2.0$ , H-7), 3.62 (1H, dd,  $J = 15.0, 4.0$ , H-8a), 3.01 (1H, dd,  $J = 15.0, 12.0$ , H-8b), 4.30 (1H, dd,  $J = 12.0, 3.0$ , H-9), 5.65 (1H, s, H-10), 4.04 (1H, t,  $J = 8.0, 8.0$ , H-12), 2.31 (1H, m, H-13a), 2.04 (1H, m, H-13b), 2.07 (1H, m, H-14a), 1.95 (1H, m, H-14b), 3.55 (1H, m, H-15a), 3.63 (1H, m, H-15b), 3.79 (2H, m, H-18), 5.11 (1H, d,  $J = 8.0$ , H-19), 1.79 (3H, s, H-21), 1.75 (3H, s, H-22), 3.81 (3H, s, 6-OMe).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , ppm) 135.19 (C-2), 104.38 (C-3), 122.61 (C-3a), 118.84 (C-4), 109.40 (C-5), 156.41 (C-6), 94.36 (C-7), 136.39 (C-7a), 25.90 (C-8), 54.76 (C-9), 169.58 (C-11), 59.21 (C-12), 28.46 (C-13), 22.74 (C-14), 45.41 (C-15), 165.77 (C-17), 25.09 (C-18), 120.09 (C-19), 135.03 (C-20), 18.07 (C-21), 25.72 (C-22), 55.85 (6-OMe)。以上数据与文献[14]报道的一致, 故鉴定该化合物为 tryprostatin A。

化合物 6, 白色针状结晶, mp. 110~112 °C, ESI-

—MS  $m/z$ : 380.2 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, J / Hz) 7.93 (1H, s, H-1), 6.75 (1H, d, J = 10.0, H-3), 4.30 (1H, dd, J = 11.0, 7.0 Hz, H-6), 2.41 (1H, m, H-7a), 2.04 (1H, m, H-7b), 1.95 (1H, m, H-8a), 1.87 (1H, m, H-8b), 3.55 (1H, m, H-9a), 3.68 (1H, m, H-9b), 5.01 (1H, s, H-13), 7.40 (1H, d, J = 8.0, H-16), 6.75 (1H, dd, J = 8.0, 3.0 Hz, H-17), 6.81 (1H, d, J = 2.0, H-19), 5.51 (1H, d, J = 10.0, H-21), 2.09 (3H, s, H-23), 1.78 (3H, s, H-24), 3.80 (3H, s, 18-OMe). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm) 133.51 (C-2), 48.09 (C-3), 165.58 (C-5), 59.61 (C-6), 29.65 (C-7), 21.77 (C-8), 45.70 (C-9), 167.04 (C-11), 84.99 (C-12), 69.90 (C-13), 107.48 (C-14), 120.81 (C-15), 118.44 (C-16), 109.70 (C-17), 156.71 (C-18), 95.36 (C-19), 136.82 (C-20), 123.41 (C-21), 137.93 (C-22), 18.21 (C-23), 25.92 (C-24), 55.74 (18-OMe)。以上数据与文献[12]报道的一致,故鉴定该化合物为 cyclotryprostatin A。

化合物 7,白色针状结晶,ESI-MS  $m/z$ : 382.2 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, J / Hz) 7.91 (1H, s, H-1), 6.01 (1H, d, J = 10.2, H-3), 4.38 (1H, dd, J = 10.4, 7.0, H-6), 2.45 (1H, m, H-7a), 2.07 (1H, m, H-7b), 1.92 (1H, m, H-8a), 2.05 (1H, m, H-8b), 3.63 (2H, m, H-9), 5.73 (1H, d, J = 2.0, H-13), 7.88 (1H, d, J = 7.8, H-16), 7.05 (1H, d, J = 7.7, H-17), 7.11 (1H, d, J = 7.7, H-18), 7.29 (1H, d, J = 7.8, H-19), 4.84 (1H, d, J = 10.2, H-21), 2.03 (3H, s, H-23), 1.68 (3H, s, H-24), 4.19 (1H, s, 12-OH), 4.63 (1H, s, 13-OH). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm) 132.8 (C-2), 49.9 (C-3), 170.4 (C-5), 58.6 (C-6), 29.1 (C-7), 22.3 (C-8), 45.3 (C-9), 166.5 (C-11), 83.4 (C-12), 69.1 (C-13), 106.4 (C-14),

124.7 (C-15), 119.3 (C-16), 119.6 (C-17), 122.1 (C-18), 111.1 (C-19), 136.7 (C-20), 123.6 (C-21), 135.2 (C-22), 18.3 (C-23), 25.4 (C-24)。以上数据与文献[12]报道的一致,故鉴定该化合物为 cyclotryprostatins C。

化合物 8,白色针状结晶,ESI-MS 分析: $m/z$ , 380.2 [ $M + H$ ]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm, J / Hz) 8.84 (1H, s, H-1), 6.93 (1H, d, J = 8.8, H-3), 4.68 (1H, dd, J = 8.0, 7.8, H-6), 2.41 (1H, m, H-7a), 2.00 (1H, m, H-7b), 1.90 (1H, m, H-8a), 2.06 (1H, m, H-8b), 3.58 (2H, m, H-9), 8.14 (1H, d, J = 8.0, H-16), 7.21 (1H, d, J = 7.8, H-17), 7.18 (1H, d, J = 7.8, H-18), 7.29 (1H, d, J = 7.6, H-19), 4.89 (1H, d, J = 8.8, H-21), 1.95 (3H, s, H-23), 1.71 (3H, s, H-24). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, ppm) 148.1 (C-2), 49.3 (C-3), 172.3 (C-5), 59.7 (C-6), 29.1 (C-7), 22.9 (C-8), 45.4 (C-9), 165.0 (C-11), 82.6 (C-12), 181.6 (C-13), 107.6 (C-14), 124.1 (C-15), 121.5 (C-16), 124.6 (C-17), 122.9 (C-18), 111.4 (C-19), 136.7 (C-20), 122.6 (C-21), 137.7 (C-22), 18.6 (C-23), 25.7 (C-24)。以上数据与文献[12]报道的一致,故鉴定该化合物为 cyclotryprostatins D。

### 2.3 吲哚二酮哌嗪对黄芪白粉病原菌的抑制作用

目前影响黄芪生长的主要病害是黄芪白粉病<sup>[15]</sup>,其病原菌主要为 *Erysiphe pisi* DC。本试验通过采用 96 孔法测量了黄芪内生真菌 AR15 产生的 7 个吲哚二酮哌嗪对黄芪白粉病原菌的最小抑菌浓度(MIC)(表 1)。结果表明,7 个吲哚二酮哌嗪对黄芪白粉病原菌均显示出了不同程度的抑制作用,其中 fumitremorgin B(1)、verruculogen(3)、cyclotryprostatin A(6)的抑制活性高于或者相当于阳性对照 Nystatin,其中 verruculogen(3)的抑制活性最强,MIC 值达到  $1.56 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。设置的 DMSO 阴性对照,测试菌生长正常,没有抑制现象。

表 1 化合物 1~8 的抗菌活性

Table 1 Antimicrobial activities of compounds 1~8

指示菌	化合物 MIC/( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )								制霉菌素 Nystatin	二甲基亚砜 DMSO
	1	2	3	4	5	6	7	8		
黄芪白粉病原菌	3.13	12.5	1.56	100	25	6.25	50	200	6.25	—

注:Nystatin 为阳性对照,DMSO 为阴性对照。

### 3 结论与讨论

经形态学和分子生物学鉴定,黄芪内生真菌

AR15 鉴定为 *Penicillium* sp.,从其发酵代谢产物中分离到 8 个吲哚二酮哌嗪,fumitremorgin B(1)、cyclotryprostatins B(2)、verruculogen(3)、trypro-

tatin B(4)、tryprostatin A(5)、cyclotryprostatin A(6)、cyclotryprostatis C(7)、cyclotryprostatis D(8),这8个次生代谢产物是首次从黄芪内生真菌中分离得到。后续的活性测试发现,这些吲哚二酮哌嗪对引起黄芪减产的主要病害——白粉病的病原菌有很好的抑制作用,特别是 fumitremorgin B(1)、verruculogen(3)、cyclotryprostatin A(6)这3个代谢产物,对黄芪白粉病原真菌的 MIC 值分别为 3.13、1.56  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和 6.25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,因而恒山黄芪内生真菌 *Penicillium* sp. 有望成为黄芪白粉病综合防治的备选资源。

## 参考文献:

- [1] BORTHWICK A D. 2,5-Diketopiperazines: synthesis, reactions, medicinal chemistry, and bioactive natural products [J]. *Chem. Rev.*, 2012, 112:3641-3716.
- [2] LI S M. Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis [J]. *Nat. Prod. Rep.*, 2010, 27:57-78.
- [3] LI X J,ZHANG Q,ZHANG A L,*et al*. Metabolites from *Aspergillus fumigatus*, an endophytic fungus associated with *Melia azedarach*, and their antifungal, antifeedant, and toxic activities [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60:3424-3431.
- [4] ZHANG Q,WANG S Q,TANG H Y,*et al*. Potential allelopathic indole diketopiperazines produced by the plant endophytic *Aspergillus fumigatus* using the one strain-many compounds method [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 2013, 61:11447-11452.
- [5] LI H Q,LI X J,WANG Y L,*et al*. Antifungal metabolites from *Chaetomium globosum*, an endophytic fungus in *Ginkgo biloba* [J]. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2011, 39:876-879.
- [6] 田小曼,陈阿敏.火棘抑菌内生真菌的筛选与拮抗植物病原菌作用研究 [J].西北林学院学报,2012,27(5):117-120.  
TIAN X M,CHEN A M. Screening of *Pyracantha fortuneana* endophytic fungus and function examination of antagonism to plant pathogenic fungi [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2012, 27(5):117-120. (in Chinese)
- [7] 王维,马养民,张弘弛,等.黑果枸杞内生真菌 E21 菌株次生代谢产物的研究 [J].中国新药杂志,2013,22(4):460-464.  
WANG W,MA Y M,ZHANG H C,*et al*. Metabolites from the strain E21, an endophytic fungus in *Lycium ruthenicum* [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2013, 22(4):460-464. (in Chinese)
- [8] 屈子睿,马养民,许倩,等.防风内生真菌 DL02 菌株次生代谢产物的结构与活性[J].西北林学院学报,2015,30(6):1-5.  
QU Z R,MA Y M,XU Q,*et al*. Structure and activity of secondary metabolites of endophytic fungus DL02 strain in *Saposhnikovia divaricate* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2015, 30(6):1-5. (in Chinese)
- [9] ZHOU F,ZHANG H C,LIU R,*et al*. Isolation and biological evaluation of secondary metabolites of the endophytic fungus *Aspergillus fumigatus* from *Astragalus membranaceus* [J]. *Chem. Nat. Compd.*, 2013, 49:568-570.
- [10] 任虹,曹学丽,王巧娥,等.真菌萨氏曲霉 D 2-6 抗肿瘤活性代谢产物 [J].中国药学杂志,2011,46(8):569-575.  
REN H,CAO X L,WANG Q E,*et al*. Antitumor metabolites from fungus *Aspergillus sydowi* D 2-6 [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2011, 46(8):569-575. (in Chinese)
- [11] 赵文英,张亚鹏,朱天骄,等.海洋来源真菌 A-f-11 中吲哚二酮哌嗪类抗肿瘤活性成分的研究 [J].中国抗生素杂志,2006,31(12):749-752,764.  
ZHAO W Y,ZHANG Y P,ZHU T J,*et al*. Studies on the indolyl diketopiperazine analogs produced by marine-derived fungus A-f-11 [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2006, 31 (12):749-752,764. (in Chinese)
- [12] CUI C B,KAKEYA H,OSADA H. Novel mammalian cell cycle inhibitor, cyclotryprostatis A-D, produced by *Aspergillus fionigatus*, which inhibit mammalian cell cycle at G2/M phase [J]. *Tetrahedron*, 1997, 53(1):59-72.
- [13] FAYOS J,LOKENSGARD D,CLARDY J,*et al*. Structure of verruculogen, a tremor producing peroxide from *Penicillium verruculosum* [J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 1974, 96:6785-6787.
- [14] CUI C B,KAKEYA H,OSADA H. Novel mammalian cell cycle inhibitor, tryprostatis A, B and other Diketopiperazines produced by *Aspergillus fumigatus* II. physicochemical properties and structures [J]. *J. Antibiot.*, 1996, 49:534-540.
- [15] 杨春清,孙明舒,丁万隆.黄芪病虫害种类及为害情况调查 [J].中国中药杂志,2004,29 (12):1130-1132.  
YANG C Q,SUN M S,DING W L. Investigation of the diseases and insect pests of *Astragalus membranaceus* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2004, 29 (12): 1130-1132. (in Chinese)