

研究报告

珊瑚礁泥砂真菌多样性及真菌 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 天然产物分离与鉴定

夏辰曦¹, 刘昕明¹, 彭亮², 罗志宏¹, 李秋源¹, 高程海¹, 刘永宏^{*1}, 陈显强^{*1}

1 广西中医药大学海洋药物研究院 广西海洋药物重点实验室, 广西 南宁 530200

2 江西科技师范大学药学院 江西省高等学校精细化学品工程技术研究中心, 江西 南昌 330013

夏辰曦, 刘昕明, 彭亮, 罗志宏, 李秋源, 高程海, 刘永宏, 陈显强. 珊瑚礁泥砂真菌多样性及真菌 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 天然产物分离与鉴定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4784-4795.

XIA Chenxi, LIU Xinming, PENG Liang, LUO Zhihong, LI Qiuyuan, GAO Chenghai, LIU Yonghong, CHEN Xianqiang. Fungal diversity in coral reef sand and separation and identification of the natural products from *Cladosporium* sp. GXIMD02067[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4784-4795.

摘要: 【背景】海洋沉积物真菌富含生物活性天然产物, 但珊瑚礁泥砂真菌及其天然产物的研究较少。【目的】分离珊瑚礁泥砂真菌及其天然产物, 探究珊瑚礁泥砂来源真菌多样性, 为海洋真菌天然产物开发奠定基础。【方法】采用稀释涂布平板法分离珊瑚礁泥砂真菌并基于 ITS rDNA 序列分析鉴定真菌; 综合运用硅胶柱、反相柱和制备 HPLC 色谱技术分离枝孢属真菌(*Cladosporium* sp.) GXIMD02067 的天然产物, 通过核磁共振波谱技术和文献数据比对鉴定化合物结构。【结果】19 株真菌被分离, 隶属 1 纲 4 目 4 科 6 属, 包括 7 株曲霉属(*Aspergillus*)、6 株青霉属(*Penicillium*)、2 株枝孢属(*Cladosporium*)、1 株蜡蚧菌属(*Lecanicillium*)、2 株路霉属(*Lulworthia*)和 1 株 *Parengyodontium*。GXIMD02065 和 GXIMD02066 ITS rDNA 序列的相似度小于 87%, 是潜在新菌种。7 个化合物从 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 中分离并鉴定为 pyrenocine A (1)、pyrenocine B (2)、胸腺嘧啶脱氧核苷(3)、1H-咪唑-3-甲醛(4)、对羟基苯甲酸(5)、对羟基苯乙酸甲酯(6)和对羟基苯甲醛(7)。化合物 1 对表皮葡萄球菌、粘性放线菌的 MIC 值为 62.5 $\mu\text{g/mL}$, 对枯草芽孢杆菌的 MIC 值为 125 $\mu\text{g/mL}$, 其他化合物在测试浓度下未显示抗菌活性。化合物 1-7 在测试浓度下未显

资助项目: 广西壮族自治区科技基地和人才专项(桂科 AD21075016); 广西壮族自治区自然科学基金(2020GXNSFAA297163, 2020GXNSFGA297002); 国家自然科学基金(U20A20101); 江西省高等学校精细化学品工程技术研究中心开放基金(JFCEC-KF-2101); 广西壮族自治区八桂学者专项经费(05019055); 广西中医药大学桂派中医药传承创新团队项目(2022A007); 广西中医药大学海洋药物研究院团队科研专项经费(2018ZD005-A02)

This work was supported by the Guangxi Zhuang Autonomous Region Science and Technology Base and Talent Special Project (AD21075016), the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2020GXNSFAA297163, 2020GXNSFGA297002), the National Natural Science Foundation of China (U20A20101), the Open Project of Engineering Center of Jiangxi University for Fine Chemicals (JFCEC-KF-2101), the Special Fund for Bagui Scholars of Guangxi Zhuang Autonomous Region (05019055), the GuiPai Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Team Project of Guangxi University of Chinese Medicine (2022A007), and the Special Scientific Research Fund for Team of Institute of Marine Drugs of Guangxi University of Chinese Medicine (2018ZD005-A02).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Xianqiang, xianqiangchen@yeah.net; LIU Yonghong, yonghongliu@scsio.ac.cn

Received: 2023-03-16; Accepted: 2023-03-30; Published online: 2023-05-09

示 α -葡萄糖苷酶抑制活性。【结论】本研究报道了珊瑚礁泥砂真菌多样性和该海域微生物的天然产物, 丰富了珊瑚礁泥砂真菌的种类和天然产物的多样性, 为进一步研究珊瑚礁泥砂真菌的活性天然产物奠定了基础。

关键词: 海洋真菌; 珊瑚礁; 枝孢属; 天然产物; 抗菌

Fungal diversity in coral reef sand and separation and identification of the natural products from *Cladosporium* sp. GXIMD02067

XIA Chenxi¹, LIU Xinming¹, PENG Liang², LUO Zhihong¹, LI Qiuyuan¹, GAO Chenghai¹, LIU Yonghong^{*1}, CHEN Xianqiang^{*1}

1 Guangxi Key Laboratory of Marine Drugs, Institute of Marine Drugs, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, Guangxi, China

2 Engineering Research Center for Fine Chemicals in Universities of Jiangxi Province, School of Pharmacy, Jiangxi Science & Technology Normal University, Nanchang 330013, Jiangxi, China

Abstract: [Background] The fungi in marine sediments are rich in bioactive natural products, while little is known about the fungi in coral reef sand and their natural products. **[Objective]** To isolate fungi from coral reef sand and separate their natural products, explore the fungal diversity, and lay a foundation for the development of natural products from marine fungi. **[Methods]** The fungi from coral reef sand were isolated with the dilution-plate method and identified based on the ITS rDNA sequences. The natural products of *Cladosporium* sp. GXIMD02067 were separated by silica gel column, reversed phase column, and preparative HPLC. The chemical structures of natural products were identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy and comparison with literature data. **[Results]** Nineteen fungal strains belonging to 6 genera, 4 families, 4 orders, and 1 class were isolated, including 7 strains of *Aspergillus*, 6 strains of *Penicillium*, 2 strains of *Cladosporium*, 1 strain of *Lecanicillium*, 2 strains of *Lulworthia*, and 1 strain of *Parengyodontium*. GXIMD02065 and GXIMD02066 shared the ITS rDNA sequence similarity less than 87%, which indicated that they may be new strains. Seven compounds were separated from *Cladosporium* sp. GXIMD02067 and identified as pyrenocine A (1), pyrenocine B (2), thymidine (3), 1H-indole-3-carbaldehyde (4), *p*-hydroxybenzoic acid (5), methyl 2-(4-hydroxyphenyl)acetate (6), and *p*-hydroxybenzaldehyde (7). Compound 1 showed inhibitory activities against *Staphylococcus epidermidis*, *Actinomyces viscosus*, and *Bacillus subtilis*, with the minimal inhibitory concentrations of 62.5, 62.5, and 125 $\mu\text{g/mL}$, respectively, while other compounds were inactive at the test concentrations. Compounds 1–7 demonstrated no inhibitory activities against α -glucosidase. **[Conclusion]** The paper reported the fungi from coral reef sand and their natural products for the first time, which enriched the knowledge about the diversity of fungi in coral reef sand and their natural products and laid a foundation for further research on such active natural products.

Keywords: marine fungi; coral reef; *Cladosporium*; natural products; antimicrobial activity

随着对陆生生物资源大量的开发和利用, 从中发现新化合物或先导化合物的概率大大降低, 开发程度较低的海洋生物资源越来越被关注。海洋沉积物中含有大量的有机质, 能为海洋微生物提供良好的生境, 孕育了丰富的微生物群落。海洋沉积物中的微生物长期共存并相互竞争生产空间, 真菌相对丰度显著低于细菌和古菌, 这也导致海洋沉积物来源真菌可产生结构新颖、活性良好的天然产物^[1]。在世界多个海域和各种海洋环境海洋沉积物中的真菌被相继报道, 常见的有曲霉属(*Aspergillus*)、青霉属(*Penicillium*)、镰刀菌属(*Fusarium*)和枝孢属(*Cladosporium*)等^[2-5]。海洋沉积物来源真菌被报道具有抗病毒、抗菌、抗炎、细胞毒等作用的生物活性物质, 主要包括聚酮、生物碱、萜类等结构类型^[1]。珊瑚礁泥砂来源微生物化学成分较少被研究, 仅见珊瑚礁泥砂放线菌化学成分被报道, 如南海海洋研究所鞠建华研究员团队报道了珊瑚礁泥砂来源放线菌的含卤素化合物^[6], 但是珊瑚礁泥砂来源真菌化学成分鲜见报道。

枝孢属(*Cladosporium*)真菌广泛分布于陆地和海洋环境中, 如高等植物、昆虫、根际土壤、海洋沉积物、海绵、海藻、刺胞动物、海水等^[7]。Mohamed 等总结了海洋来源枝孢属真菌的 286 个次级代谢产物, 这些次级代谢产物包括生物碱、大环内酯、特特拉姆酸、吡喃酮衍生物和酚类等化合物, 32%以上化合物具有抗菌、抗病毒、抗氧化、细胞毒、抗炎、 α -葡萄糖苷酶抑制等相关活性^[8]。该属真菌是发掘先导化合物的重要资源。

玉琢礁位于中国南海, 有丰富的海洋生物资源。Noor Ifatul 等从该岛海域的海洋动物中分离了对伤寒沙门氏菌、单核细胞增生李斯特氏菌、金黄色葡萄球菌和大肠杆菌有抗性的 4 株

海洋真菌, 4 株菌基于形态特征和 ITS rDNA 序列比对分析被鉴定为桔青霉(*Penicillium citrinum*)、紧密帚枝霉(*Sarocladium strictum*)、萨氏曲霉(*Aspergillus sydowii*)和曲霉(*Aspergillus* sp.)^[9]。产聚羟基脂肪酸的细菌从海绵和沉积物中分离得到^[10]。虽然该海域微生物资源有少量相关研究, 但该海域微生物的天然产物、珊瑚礁泥砂真菌及其天然产物研究鲜见报道。

本研究将开展玉琢礁的珊瑚礁底泥真菌进行分离, 为真菌天然产物研究提供菌株。同时, 开展 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 天然产物的研究, 旨在丰富珊瑚礁泥砂真菌天然产物的多样性, 探讨具有潜在应用前景的海洋真菌天然产物, 为合理开发和利用珊瑚礁泥砂真菌提供更多科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

珊瑚礁泥砂于 2019 年 7 月在中国南海玉琢礁采集。珊瑚礁表面沉积物被装入保鲜袋, 保存于冰盒中, 送至实验室并存放在 4 °C 冰箱。

铜绿假单胞菌(*Pseudomona aeruginosa*) ATCC 10145^T、耐甲氧西林金黄葡萄球菌(methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, MRSA) ATCC 43300^T、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*) ATCC 12228^T、金黄葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 14222^T、粘性放线菌(*Actinomyces viscosus*) ATCC 15987^T、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*) ATCC 13883^T、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*) ATCC 19606^T、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) ATCC 6051^T、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*) ATCC 49732^T、大肠杆菌(*Escherichia coli*)

ATCC 25922^T 保藏于广西中医药大学海洋药物研究院。

1.1.2 主要试剂和仪器

氯仿、乙酸乙酯、DMSO 等试剂均为分析纯, 广东光华科技股份有限公司; 离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; PCR 试剂盒, 北京全式金生物科技股份有限公司; 引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 薄层色谱硅胶、100–200 目硅胶和薄层硅胶板, 烟台江友硅胶开发有限公司; 反相硅胶, YMC 公司。超导核磁共振波谱仪, Bruker 公司; 高效液相色谱仪, 岛津公司; 旋转蒸发仪, 东京理化器械株式会社; 中压制备色谱仪, Buchi 公司; 多功能酶标仪, 珀金埃尔默公司; 培养箱, 上海精宏实验设备有限公司; PCR 仪, Bio-Rad 公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 凝胶成像分析仪, Vilber Lourmat 公司; 台式高速冷冻离心机, 北京智杰方远科技有限公司。

1.1.3 培养基

微生物分离所用培养基包括 PDA 培养基(g/L) (马铃薯 200.00, 葡萄糖 20.00, 琼脂 20.00, 氯霉素和氨苄青霉素各 0.10)和孟加拉红琼脂培养基(g/L) (蛋白胨 5.00, 葡萄糖 10.00, 磷酸二氢钾 1.00, 硫酸镁 0.50, 琼脂 20.00, 孟加拉红 0.03, 氯霉素和氨苄青霉素各 0.10)。大米培养基(g/L) (大米 1 000.00, 海盐 20.00)和麦芽提取物培养基(malt extract broth, MB) (g/L) (麦芽提取粉 15.00, 海盐 30.0)用于真菌的发酵。抑菌活性测试所用培养基为 LB 固体培养基(g/L) (胰蛋白胨 10.00, NaCl 10.00, 酵母提取粉 5.00, 琼脂 13.00, pH 7.2–7.4), 不加琼脂为液体培养基。

1.2 方法

1.2.1 珊瑚礁泥砂真菌的分离纯化

珊瑚礁泥砂加入无菌水稀释至 10^{-2} 、 10^{-3} 和 10^{-4} 后, 用移液枪吸取 100 μ L 悬液均匀涂布到 PDA 和孟加拉红琼脂培养基平板上, 放在 25 $^{\circ}$ C 培养箱培养。自第 3 天开始每日观察菌落生长情况, 待菌落长出后, 挑取形态、色泽不同的菌落接种于新的 PDA 培养基上, 连续多次纯化, 直至得到单一菌落, 记录菌落数及菌落的形态特征。纯化后的菌株保藏在 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.2.2 珊瑚礁泥砂真菌分子鉴定

取 1.2.1 所得菌株的菌丝体放在研钵中, 加入液氮研磨, 使用离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA。使用 ITS rDNA 序列扩增引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 进行靶向扩增。PCR 反应体系: 模板 DNA (20 ng/ μ L) 2 μ L, 正、反向引物 (20 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 5 μ L, dNTPs (5 mmol/L) 1 μ L, 3 U *Taq* 聚合酶 (3 U/ μ L) 0.3 μ L, ddH₂O 15.7 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。通过 BLAST 数据库比对 ITS rDNA 序列, 获得相似度高的种属信息。使用 MEGA 11 软件的 UPGMA 法构建系统发育树, 置信值检测设为 bootstrap 1 000 次。

1.2.3 菌株 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 发酵与天然产物的提取

切取 1 cm \times 1 cm 带有菌落的琼脂块接种至 MB 液体培养基, 于 25 $^{\circ}$ C、180 r/min 条件下培养 5 d, 即获得种子液。将种子液均匀接种到装有大米培养基的 1 000 mL 锥形瓶中, 共 100 瓶, 在 25 $^{\circ}$ C 条件下静置培养 30 d。乙酸乙酯浸提

发酵产物,提取3次,合并提取液,减压回收溶剂,得到菌株发酵产物的浸膏48 g。

1.2.4 天然产物的分离

提取浸膏经正相硅胶(300–400目)柱层析分离,二氯甲烷-甲醇(100:0–0:100,体积比)梯度洗脱得到5个组分(Fr. A–E)。再次采用硅胶柱色谱分离 Fr. A (9.27 g),石油醚-乙酸乙酯(2:1,体积比)洗脱得到5个流分(Fr. A1–Fr. A5)。Fr. A3 经 sephadex LH-20 纯化后,再经半制备 HPLC 制备(乙腈-水, 35:65, 体积比)获得化合物 7 (23.9 mg)。Fr. A4 经 ODS 柱层析纯化,甲醇-水(30:70–70:30, 体积比)梯度洗脱后,再经半制备 HPLC 制备(乙腈-水, 25:75, 体积比)得到化合物 5 (81.6 mg)。Fr. A5 经 ODS 柱层析纯化(甲醇-水, 30:70–70:30, 体积比)梯度洗脱后,半制备 HPLC 制备(乙腈-水, 35:65, 体积比)得到化合物 4 (11.4 mg)。Fr. B (2.1 g)经 ODS 柱层析(甲醇-水, 30:70–70:30, 体积比)纯化得到5个组分(Fr. B1–Fr. B5)。Fr. B3 经硅胶色谱柱分离(石油醚-乙酸乙酯, 4:1–1:1, 体积比)后,半制备 HPLC 制备(乙腈-水, 38:62, 体积比)得到化合物 6 (9.1 mg)。Fr. C 经 ODS 柱分离(甲醇-水, 30:70–70:30, 体积比)得到4个组分(Fr. C1–Fr. C4)。Fr. C3 经半制备 HPLC 纯化(乙腈-水, 25:75, 体积比)得到化合物 1 (10.0 mg) 和 2 (3.2 mg)。Fr. E (12.8 g)经 ODS 柱层析纯化,甲醇-水(30:70–70:30, 体积比)梯度洗脱得到3个组分(Fr. E1–Fr. E3)。Fr. E1 经半制备 HPLC 纯化,乙腈-水(25:75, 体积比)洗脱得到化合物 3 (16.2 mg)。

1.2.5 抑菌活性测定

参考文献[11]方法采用96孔板微量法测定单体化合物对指示菌的抑制活性。二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解样品,单体化合物初始浓度为5 mg/mL,阳性对照药氨苄青霉

素钠初始浓度为1 mg/mL。96孔板的第1列加入195 μ L 灭菌 LB 液体培养基,第2–11列加入100 μ L 灭菌 LB 液体培养基。第1列加入5 μ L 样品溶液,混合均匀,采用2倍比稀释法稀释至第9列。第10列不加菌液作为阴性对照,第11列不加药作为空白对照。每孔加入100 μ L 菌液,混合均匀,样品终浓度为125、62.5、31.25、15.6、7.8、3.9、1.95、0.97和0.485 mg/mL(第1–9列)。置37 $^{\circ}$ C恒温培养箱培养24 h,观察试验结果,以孔内澄清对应最小质量浓度为抑制致病菌的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。

1.2.6 α -葡萄糖酶抑制活性测试

参照文献[12]方法测试单体化合物活性。化合物用10% DMSO 溶解配成900 μ g/mL的母液。阳性药物阿卡波糖用磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)溶解配制成1 mg/mL的母液。试验在96孔板中进行,每孔加入 α -葡萄糖苷酶(0.2 U/mL)、4-硝基苯- α -D-吡喃葡萄糖苷(2.5 mmol/L)、被测化合物各20 μ L。在阴性对照中用 PBS 缓冲液代替 α -葡萄糖苷酶,在空白对照中用 PBS 缓冲液代替被测化合物。每个水平设3个平行孔,试验重复3次。37 $^{\circ}$ C 孵育15 min,每孔加入80 μ L Na_2CO_3 (0.2 mol/L) 终止反应,测定405 nm处OD值。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定结果

根据形态排重后获得19株真菌,ITS rDNA 序列测序数据已上传至 GenBank 数据库中,获得登录号为OQ632577–OQ632595。利用BLAST 比对 ITS rDNA 序列相似性,比对结果见表1。从表1可知,菌株 GXIMD02065 和 GXIMD02066 与菌株 *Lulworthia* sp. (EU668901 和 EU735849) 的相似度小于87%,是潜在的新菌。GXIMD02065

表 1 珊瑚礁泥砂来源真菌 ITS rDNA 序列在 GenBank 数据库比对结果

Table 1 The matching results in GenBank database of ITS rDNA sequence of fungi derived from coral reef sands

菌株编号 Strain code	菌株登录号 Accession No.	相似菌种 Similar species	相似菌株登录号 Accession No. of similar species	相似度 Identity (%)
GXIMD02051	OQ632577	<i>Lecanicillium fusisporum</i>	ON005314	99.64
GXIMD02052	OQ632578	<i>Penicillium citrinum</i>	MZ595779	99.62
GXIMD02053	OQ632579	<i>Penicillium citrinum</i>	MT582768	99.24
GXIMD02054	OQ632580	<i>Aspergillus sydowii</i>	MH712267	99.63
GXIMD02055	OQ632581	<i>Aspergillus sydowii</i>	KX894658	100.00
GXIMD02056	OQ632582	<i>Aspergillus sydowii</i>	MN809362	100.00
GXIMD02057	OQ632583	<i>Aspergillus sydowii</i>	ON332124	99.63
GXIMD02058	OQ632584	<i>Aspergillus sydowii</i>	OP797658	99.81
GXIMD02059	OQ632585	<i>Parengyodontium album</i>	MF040203	99.64
GXIMD02060	OQ632586	<i>Aspergillus sydowii</i>	MT582755	99.82
GXIMD02061	OQ632587	<i>Penicillium citrinum</i>	OM373020	99.62
GXIMD02062	OQ632588	<i>Penicillium citrinum</i>	MW014916	100.00
GXIMD02063	OQ632589	<i>Penicillium citrinum</i>	ON629801	99.62
GXIMD02064	OQ632590	<i>Aspergillus sydowii</i>	OP797658	99.63
GXIMD02065	OQ632591	<i>Lulworthia</i> sp. NIOCC 9V	EU668901	86.37
GXIMD02066	OQ632592	<i>Lulworthia</i> sp. NIOCC 28V	EU735849	85.94
GXIMD02067	OQ632593	<i>Cladosporium</i> sp.	MT214694	100.00
GXIMD02068	OQ632594	<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	AB572910	99.23
GXIMD02069	OQ632595	<i>Penicillium simplicissimum</i>	HM469430	99.46

和 GXIMD02066 菌落直径 0.5–1.5 cm, 表面有较薄的气生菌丝, 气生菌丝灰白色至灰黄色; GXIMD02065 气生菌丝略发达且菌落直径略小, GXIMD02066 产生黄色基内菌丝, 这些与路霉属真菌形态特征较相似。扫描电镜下观察的 GXIMD02065 和 GXIMD02066 菌丝形态见图 1, 它们的菌丝均为线型无分枝。其他菌株与已报道菌株的相似度均大于 99%, 包括 7 株曲霉属(*Aspergillus*)菌株、6 株青霉属(*Penicillium*)菌株、2 株枝孢属(*Cladosporium*)菌株、1 株 *Lecanicillium* 菌株和 1 株 *Parengyodontium* 菌株。

基于 UPGMA 法构建系统发育树见图 2。从图 2 中可见, 19 株菌均与相似菌属形成聚类分支。GXIMD02054–GXIMD02058、GXIMD02060 和 GXIMD02064 与萨氏曲霉(*Aspergillus sydowii*)

形成了 100%支持率的聚类。GXIMD02069 与筒青霉(*Penicillium simplicissimum*) HM469430.1 形成了 100%支持率的末端聚类。GXIMD02052、GXIMD02053 和 GXIMD02061–GXIMD02063 与桔青霉形成聚类分支。GXIMD02051、GXIMD02059、GXIMD02067 和 GXIMD02068 均与表 1 中对应的相似菌株形成了 100%支持率的末端聚类。GXIMD02065、GXIMD02066、*Lulworthia* sp. (EU668901 和 EU735849)形成了 100%支持率的聚类。

2.2 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 天然产物的分离与结构鉴定结果

综合运用硅胶柱、高效液相色谱、ODS 柱等手段从真菌 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 中分离鉴定得到 7 个化合物, 化合物结构见图 3。

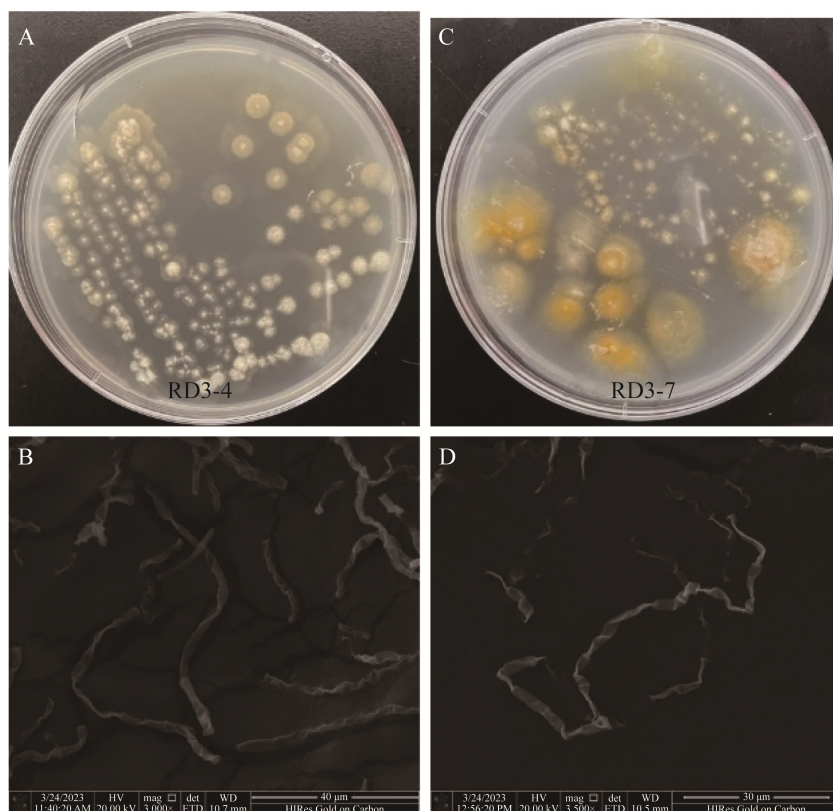


图 1 菌株形态特征 A: GXIMD02065 菌落. B: GXIMD02065 菌丝. C: GXIMD02066 菌落. D: GXIMD02066 菌丝

Figure 1 Morphological characteristics of strains. A: The colony of GXIMD02065. B: The mycelium of GXIMD02065. C: The colony of GXIMD02066. D: The mycelium of GXIMD02066.

化合物 **1**: 白色粉末, ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 6.79 (1H, dq, $J=13.0, 6.0$ Hz, H-9), 6.30 (1H, dq, $J=13.0, 1.5$ Hz, H-8), 5.46 (1H, s, H-3), 3.79 (3H, s, 4-OCH₃), 2.16 (3H, s, H-7), 1.96 (3H, dd, $J=5.5, 1.5$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 190.6 (C-7), 168.7 (C-4), 163.0 (C-2), 161.4 (C-6), 147.4 (C-9), 133.0 (C-8), 113.9 (C-5), 87.6 (C-3), 56.3 (C-4-OCH₃), 18.5 (C-7), 18.2 (C-10)。上述数据与文献[13]报道基本一致, 化合物 **1** 鉴定为 pyrenocine A。

化合物 **2**: 白色粉末, ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ_{H} : 5.48 (1H, s, H-3), 4.30 (1H, m, H-9), 3.87 (3H, s, 4-OCH₃), 2.90 (1H, dd, $J=14.5,$

3.5 Hz, H-8a), 2.81 (1H, dd, $J=14.5, 7.5$ Hz, H-8a), 2.28 (3H, s, H-7), 1.24 (3H, d, $J=5.0$ Hz, H-10); ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ_{C} : 201.1 (C-7), 168.2 (C-4), 163.9 (C-2), 162.3 (C-6), 115.4 (C-5), 87.8 (C-3), 64.3 (C-9), 56.5 (C-4-OCH₃), 52.8 (C-8), 22.7 (C-10), 18.7 (C-7)。上述数据与文献[13]报道基本一致, 化合物 **2** 鉴定为 pyrenocine B。

化合物 **3**: 白色粉末, ^1H NMR (500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ_{H} : 7.68 (1H, s, H-6), 6.15 (1H, t, $J=6.0$ Hz, H-1'), 4.22 (1H, m, H-4'), 3.74 (1H, m, H-3'), 3.54 (2H, m, H-5'), 2.05 (2H, m, H-2'), 1.76 (3H, s, H-7); ^{13}C NMR (125 MHz,

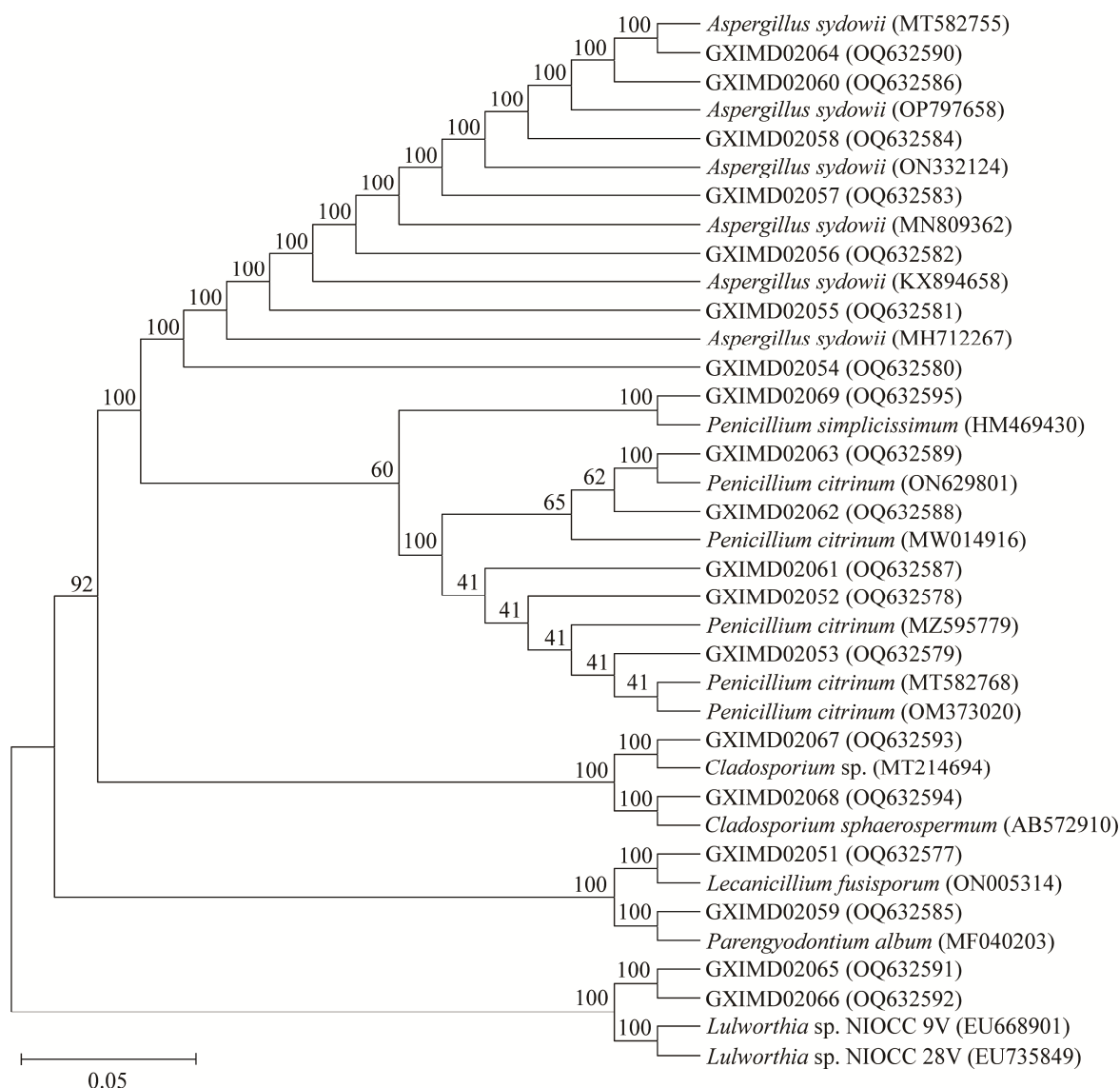


图 2 运用 UPGMA 法基于 ITS rDNA 序列构建的系统发育树 标尺 0.05 代表序列偏差值. 分支点上的数字代表计算 1 000 次后聚类到一起的概率. 括号中的序号为菌株 ITS rDNA 序列的 GenBank 登录号. 进化距离使用 logDet (Tamura-Kumar) 方法计算, 以每个位点的碱基替换数为单位. 该分析涉及 37 个核苷酸序列. 密码子位置包括 1+2+3+非编码. 所有包含空白和缺失数据的位置都被删除(完全删除选项). 最终数据集中共有 439 个位置

Figure 2 Phylogenetic tree constructed by UPGMA method based on the ITS rDNA sequence. The value of 0.05 represents the sequence deviation value. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1 000 replicates) are shown next to the branches. The serial number in brackets is the GenBank login number of ITS rDNA sequence of the strain. The evolutionary distances were computed using the logDet (Tamura-Kumar) method and are in the units of the number of base substitutions per site. This analysis involved 37 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated (complete deletion option). There were a total of 439 positions in the final dataset.

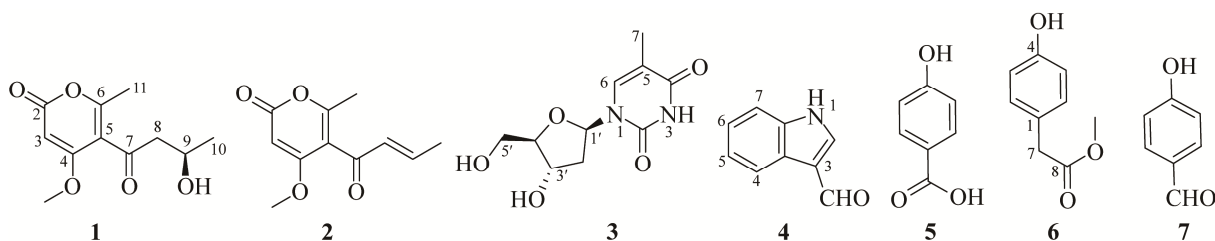


图3 从 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 中鉴定的化合物结构 1: Pyrenocine A; 2: Pyrenocine B; 3: 胸腺嘧啶脱氧核苷; 4: 1H-吲哚-3-甲醛; 5: 对羟基苯甲酸; 6: 对羟基苯乙酸甲酯; 7: 对羟基苯甲醛

Figure 3 Chemical structures identified from *Cladosporium* sp. GXIMD02067. 1: Pyrenocine A; 2: Pyrenocine B; 3: Thymine DNA nucleotides; 4: 1H-indole-3-carbaldehyde; 5: *p*-hydroxybenzoic acid; 6: Methyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate; 7: *p*-hydroxybenzaldehyde.

DMSO- d_6) δ_C : 163.8 (C-4), 150.5 (C-2), 136.2 (C-6), 109.4 (C-5), 87.3 (C-4'), 83.8 (C-1'), 70.5 (C-3'), 61.4 (C-5'), 12.3 (C-7)。上述数据与文献[14]报道基本一致, 化合物 3 鉴定为胸腺嘧啶脱氧核苷(thymine DNA nucleotides)。

化合物 4: 无色油状物, ^1H NMR (500 MHz, Acetone- d_6) δ_H : 10.03 (1H, s, CHO), 8.22 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H-4), 8.19 (1H, s, H-2), 7.53 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-7), 7.27 (1H, t, $J=7.5$ Hz, H-5), 7.23 (t, $J=7.5$ Hz, H-6); ^{13}C NMR (125 MHz, Acetone- d_6) δ_C : 185.3 (3-CHO), 138.3 (C-7a), 138.0 (C-2), 125.5 (C-3a), 124.5 (C-6), 123.0 (C-5), 122.2 (C-4), 120.0 (C-3), 112.9 (C-7)。上述数据与文献[15]报道基本一致, 化合物 4 被鉴定为 1H-吲哚-3-甲醛(1H-indole-3-carbaldehyde)。

化合物 5: 无色油状物, ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H : 7.87 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-2, H-6), 6.80 (2H, d, $J=9.0$ Hz, H-3, H-5); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C : 170.2 (COOH), 163.4 (C-4), 133.0 (C-2, C-6), 122.7 (C-1), 116.0 (C-3, C-5)。上述数据与文献[16]报道基本一致, 化合物 5 被鉴定为对羟基苯甲酸(*p*-hydroxybenzoic acid)。

化合物 6: 黄色油状物, ^1H NMR (500 MHz,

CD_3OD) δ_H : 7.06 (2H, d, $J=8.4$ Hz, H-2, H-6), 6.71 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3, H-5), 3.65 (3H, s, -OCH₃), 3.51 (2H, s, H-7); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C : 174.6 (C-8), 157.6 (C-4), 131.3 (C-2, C-6), 126.3 (C-1), 116.3 (C-3, C-5), 40.9 (C-7), 52.3 (-OCH₃)。上述数据与文献[17]报道基本一致, 化合物 6 被鉴定为对羟基苯乙酸甲酯[methyl 2-(4-hydroxyphenyl) acetate]。

化合物 7: 白色粉末, ^1H NMR (500 MHz, CD_3OD) δ_H : 9.76 (1H, s, CHO), 7.76 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-2, H-6), 6.91 (2H, d, $J=8.6$ Hz, H-3, H-5); ^{13}C NMR (125 MHz, CD_3OD) δ_C : 192.8 (CHO), 165.2 (C-4), 133.4 (C-2, C-6), 130.3 (C-1), 116.9 (C-3, C-5)。上述数据与文献[16]报道基本一致, 化合物 7 被鉴定为对羟基苯甲醛(*p*-hydroxybenzaldehyde)。

2.3 化合物生物活性

化合物 1-7 均被测试了抑菌和 α -葡萄糖苷酶抑制活性。化合物 1 对表皮葡萄球菌、粘性放线菌的 MIC 值为 62.5 $\mu\text{g/mL}$, 对枯草芽孢杆菌的 MIC 值为 125 $\mu\text{g/mL}$, 对其他指示菌在 125 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时未显示抑制活性。化合物 2-7 在 125 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时对所有指示菌未显示抑制

活性。化合物 1–7 在 300 $\mu\text{g/mL}$ 浓度时对 α -葡萄糖苷酶未显示抑制作用。

3 讨论与结论

海洋沉积物真菌富含生物活性天然产物, 是发掘先导化合物的重要资源。目前, 珊瑚礁泥砂真菌鲜有报道, 因此, 本研究开展珊瑚礁泥砂真菌的研究工作, 以提高人们对珊瑚礁真菌多样性的认知。本研究从中国南海玉琢礁的珊瑚礁采集泥砂, 并从中分离得到 19 株真菌, 分属于 1 纲 4 目 4 科 6 属, 曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)为优势菌属, 属于该海域珊瑚礁泥砂来源真菌的报道。前人研究表明曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)是海洋沉积物真菌的优势菌属^[1], 本研究的结果与前人研究一致。GXIMD02065 与 *Lulworthia* sp. NIOCC 9V 的 ITS rDNA 序列相似度为 86.37%, GXIMD02066 与 *Lulworthia* sp. NIOCC 28V 的 ITS rDNA 序列相似度为 85.94%。相似度 94.9%–98.0%或平均相似度 96.4%被认为是区分新种的界限^[18], 推测 GXIMD02065 和 GXIMD02066 是潜在的新菌, 但其种属鉴定需要进一步研究。在后续研究中应该根据子囊和子囊孢子等重要形态特征、LSU 和 SSU rRNA 基因序列分析进一步确定 GXIMD02065 和 GXIMD02066 的分类地位。*Lecanicillium*、*Parengyodontium*、*Lulworthia* 菌株在海洋沉积物中未见分离报道。*Cladosporium* 菌株在珊瑚礁泥砂中未见分离报道, 本研究从珊瑚礁泥砂中报道 *Cladosporium* 菌株, 丰富了珊瑚礁泥砂真菌的种类。

Cladosporium 真菌富含结构多样的生物活性天然产物, 是潜在的药用资源。前期研究发现 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 提取物具有一定的抗菌活性, HPLC 分析表明 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 含有丰富的天然产物, 因此,

本研究开展了 *Cladosporium* sp. GXIMD02067 天然产物的研究并鉴定了 7 个化合物(1–7), 包括 2 个吡喃酮化合物(1 和 2)、3 个苯酚类化合物(5–7)、1 个吡啶类化合物(4)和 1 个核苷类化合物(3)。化合物 1–7 均从玉琢礁海域微生物中分离得到。化合物 1 和 2 从棘壳孢属(*Pyrenochaeta*)、青霉属(*Penicillium*)、曲霉属(*Aspergillus*)、*Rousoella*、湾孢属(*Curvularia*)真菌中被报道, 具有抗菌、细胞毒、抗炎等生物活性^[19–24]。化合物 1 具有一定的抗菌活性, 化合物 2 在 125 $\mu\text{g/mL}$ 条件下未测到抑菌活性, 研究结果与文献^[19]报道基本一致, 根据该结果推测化合物 1 侧链的双键可能是增强抗菌活性的重要基团。化合物 3 从植物、海绵、珊瑚、真菌、细菌等分离得到, 参与 DNA 代谢过程, 是 DNA 组成成分, 具有抗肿瘤、抗病毒、基因治疗等多种生物活性^[25]。化合物 4–7 是植物和真菌中常见的天然产物, 具有多种生物活性。化合物 4 具有抗菌、抗炎、抗过敏、抗氧化、抗凝血等生物活性^[15,26–28]。化合物 5 具有抗菌、抗突变、抗雌激素、降糖、抗炎、杀线虫、抗病毒等生物活性^[29]。化合物 6 具有抗菌、抗烟草花叶病毒、抑制萝卜和芦子草胚根延长的作用^[30–31]。化合物 7 具有抗氧化和对 γ -氨基丁酸能神经元的正向调节作用^[32]。前人研究表明本研所得化合物具有较好的生物活性, 在医药、农药等领域有潜在的应用价值, 因此, 珊瑚礁泥砂真菌可作为发掘活性天然产物的切入点。本研究丰富了珊瑚礁泥砂真菌天然产物的多样性, 为开发珊瑚礁泥砂真菌的天然产物研究提供了一定的研究基础, 也为枝孢属的活性物质研究提供了一定的参考。

REFERENCES

- [1] YURCHENKO AN, GIRICH EV, YURCHENKO EA. Metabolites of marine sediment-derived fungi: actual

- trends of biological activity studies[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(2): 88.
- [2] ZHANG T, WANG NF, ZHANG YQ, LIU HY, YU LY. Diversity and distribution of fungal communities in the marine sediments of Kongsfjorden, Svalbard (High Arctic)[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 14524.
- [3] SINGH P, RAGHUKUMAR C, VERMA P, SHOUCHE Y. Assessment of fungal diversity in deep-sea sediments by multiple primer approach[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012, 28(2): 659-667.
- [4] XU W, LUO ZH, GUO SS, PANG KL. Fungal community analysis in the deep-sea sediments of the Pacific Ocean assessed by comparison of ITS, 18S and 28S ribosomal DNA regions[J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2016, 109: 51-60.
- [5] 冯丽, 蒋群, 孙伟, 李英新, 张凤丽, 李志勇. 中国南海部分深海沉积物真菌多样性及其抗菌活性[J]. *微生物学报*, 2017, 57(9): 1332-1341.
- FENG L, JIANG Q, SUN W, LI YX, ZHANG FL, LI ZY. Diversity and antimicrobial activity of fungi isolated from deep-sea sediments in South China Sea[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2017, 57(9): 1332-1341 (in Chinese).
- [6] WU QL, ZHU HJ, SUN CL, ZHOU L, WANG HM, SHI SB, TIAN XP, JU JH. Halo- and thiocarbazomycins from coral- and coral reef sands-derived *Actinomycetes*[J]. *Marine Drugs*, 2022, 20(8): 537.
- [7] SALVATORE MM, ANDOLFI A, NICOLETTI R. The genus *Cladosporium*: a rich source of diverse and bioactive natural compounds[J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 3959.
- [8] MOHAMED GA, IBRAHIM SRM. Untapped potential of marine-associated *Cladosporium* species: an overview on secondary metabolites, biotechnological relevance, and biological activities[J]. *Marine Drugs*, 2021, 19(11): 645.
- [9] NOOR IFATUL HMD, LEE HY, NAZAMID S, WAN NORHANA MN, MAHYUDIN NA. *In vitro* antibacterial activity of marine-derived fungi isolated from Pulau Redang and Pulau Payar Marine Parks, Malaysia against selected food-borne pathogens[J]. *International Food Research Journal*, 2016, 23(6): 2681-2688.
- [10] ALSAADI A, GANESEN SSK, AMELIA TSM, MOANIS R, PEETERS E, VIGNESWARI S, BHUBALAN K. Polyhydroxyalkanoate (PHA) biopolymer synthesis by marine bacteria of the Malaysian coral triangle region and mining for PHA synthase genes[J]. *Microorganisms*, 2022, 10(10): 2057.
- [11] 王府润, 张圣良, 孔凡栋, 马青云, 谢晴宜, 戴好富, 陈萍, 赵友兴. 曲霉属真菌 *Aspergillus clavatonanicus* HNMF114 的次生代谢产物及其抗菌活性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(6): 971-976.
- WANG FR, ZHANG SL, KONG FD, MA QY, XIE QY, DAI HF, CHEN P, ZHAO YX. Secondary metabolites and their antibacterial activity from the marine fungus *Aspergillus clavatonanicus* HNMF114[J]. *Natural Product Research and Development*, 2021, 33(6): 971-976 (in Chinese).
- [12] CHEN XQ, ZHAO J, CHEN LX, WANG SF, WANG Y, LI SP. Lanostane triterpenes from the mushroom *Ganoderma resinaceum* and their inhibitory activities against α -glucosidase[J]. *Phytochemistry*, 2018, 149: 103-115.
- [13] HASHIDA J, NIITSUMA M, IWATSUKI M, MORI M, ISHIYAMA A, NAMATAME M, NISHIHARA-TSUKASHIMA A, NONAKA K, UI H, MASUMA R, OTOGURO K, YAMADA H, SHIOMI K, ŌMURA S. Pyrenocine I, a new pyrenocine analog produced by *Paecilomyces* sp. FK1-3573[J]. *The Journal of Antibiotics*, 2010, 63(9): 559-561.
- [14] 季宇彬, 郑婷, 尹姣定. 中国南海海绵 *Cinachyrella* sp. 的化学成分研究[J]. *中国海洋药物*, 2018, 37(2): 7-12.
- JI YB, ZHENG T, YIN JD. Chemical constituents from Chinese marine sponge *Cinachyrella* sp.[J]. *Chinese Journal of Marine Drugs*, 2018, 37(2): 7-12 (in Chinese).
- [15] GUTIERREZ-LUGO MT, WOLDEMICAHEL GM, SINGH MP, SUAREZ PA, MAIESE WM, MONTENEGRO G, TIMMERMAN BN. Isolation of three new naturally occurring compounds from the culture of *Micromonospora* sp. P1068[J]. *Natural Product Research*, 2005, 19(7): 645-652.
- [16] NGUYEN DH, ZHAO BT, LE DD, KIM KY, KIM YH, YOON YH, KO JY, WOO KS, WOO MH. Phenolic constituents and their anti-inflammatory activity from *Echinochloa utilis* grains[J]. *Natural Product Sciences*, 2016, 22(2): 140.
- [17] 戴昱, 林秀萍, 庞小艳, 罗小卫, Limbadri Salendra, 杨斌, 王俊锋, 周雪峰, 刘永宏. 一株秋茄内生真菌 *Colletotrichum* sp. SCSIO KcB3-2 的次级代谢产物研

- 究[J]. 天然产物研究与开发, 2019, 31(3): 450-454, 555.
- DAI Y, LIN XP, PANG XY, LUO XW, SALENDRA L, YANG B, WANG JF, ZHOU XF, LIU YH. Secondary metabolites of an endophytic fungus *Colletotrichum* sp. SCSIO KcB3-2 isolated from *Kandelia candel*[J]. Natural Product Research and Development, 2019, 31(3): 450-454, 555 (in Chinese).
- [18] YARZA P, RICHTER M, PEPLIES J, EUZEBY J, AMANN R, SCHLEIFER KH, LUDWIG W, GLÖCKNER FO, ROSSELLÓ-MÓRA R. The all-species living tree project: a 16S rRNA-based phylogenetic tree of all sequenced type strains[J]. Systematic and Applied Microbiology, 2008, 31(4): 241-250.
- [19] SPARACE SA, REELEDER RD, KHANIZADEH S. Antibiotic activity of the pyrenocines[J]. Canadian Journal of Microbiology, 1987, 33(4): 327-330.
- [20] ZHANG H, MAO LL, QIAN PT, SHAN WG, WANG JD, BAI H. Two new metabolites from a soil fungus *Curvularia affinis* strain HS-FG-196[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2012, 14(11): 1078-1083.
- [21] TOLEDO TR, DEJANI NN, MONNAZZI LGS, KOSSUGA MH, BERLINCK RGS, SETTE LD, MEDEIROS AI. Potent anti-inflammatory activity of pyrenocine A isolated from the marine-derived fungus *Penicillium paxilli* Ma(G)K[J]. Mediators of Inflammation, 2014, 2014: 767061.
- [22] SOMMART U, RUKACHAISIRIKUL V, SAITHONG S, PHONGPAICHIT S, SAKAYAROJ J, PREEDANON S, CHAINOK K, KHUNRONG T. 2-Oxaspiro[4.5]decane and α -pyrenocine derivatives from the endophytic fungus *Roussoella* sp. PSU-H51[J]. Natural Product Research, 2022, 36(19): 4911-4920.
- [23] WANG YH, ZHONG ZW, ZHAO F, ZHENG JX, ZHENG X, ZHANG K, HUANG HR. Two new pyrone derivatives from the mangrove-derived endophytic fungus *Aspergillus sydowii* #2B[J]. Natural Product Research, 2022, 36(15): 3872-3878.
- [24] ZOU ZB, ZHANG G, ZHOU YQ, XIE CL, XIE MM, XU L, HAO YJ, LUO LZ, ZHANG XK, YANG XW, WANG JS. Chemical constituents of the deep-sea-derived *Penicillium citreonigrum* MCCC 3A00169 and their antiproliferative effects[J]. Marine Drugs, 2022, 20(12): 736.
- [25] KINAHAN JJ, KOWAL EP, GRINDEY GB. Biochemical and antitumor effects of the combination of thymidine and 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine against leukemia L1210[J]. Cancer Research, 1981, 41(2): 445-451.
- [26] XIE CL, LIU QM, XIA JM, GAO YY, YANG Q, SHAO ZZ, LIU GM, YANG XW. Anti-allergic compounds from the deep-sea-derived actinomycete *Nesterenkonia flava* MCCC 1K00610[J]. Marine Drugs, 2017, 15(3): 71.
- [27] GÓMEZ-BETANCUR I, ZHAO JP, TAN L, CHEN C, YU G, REY-SUÁREZ P, PRECIADO L. Bioactive compounds isolated from marine bacterium *Vibrio neocaledonicus* and their enzyme inhibitory activities[J]. Marine Drugs, 2019, 17(7): 401.
- [28] CHIU CY, LI CY, CHIU CC, NIWA M, KITANAKA S, DAMU AG, LEE EJ, WU TS. Constituents of leaves of *Phellodendron japonicum* MAXIM. and their antioxidant activity[J]. Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 2005, 53(9): 1118-1121.
- [29] AFNAN, SALEEM A, AKHTAR MF, SHARIF A, AKHTAR B, SIDDIQUE R, ASHRAF GM, ALGHAMDI BS, ALHARTHY SA. Anticancer, cardio-protective and anti-inflammatory potential of natural-sources-derived phenolic acids[J]. Molecules, 2022, 27(21): 7286.
- [30] SHEN S, LI W, WANG J. A novel and other bioactive secondary metabolites from a marine fungus *Penicillium oxalicum* 0312F₁[J]. Natural Product Research, 2013, 27(24): 2286-2291.
- [31] PIMJUK P, NOPPAWAN P, KATRUN P, MONGKOLTHANARUK W, SUWANNASAI N, TANAKA J, McCLOSKEY S. New furan derivatives from *Annulohypoxylon spougei* fungus[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2022, 24(10): 971-978.
- [32] HA JH, LEE DU, LEE JT, KIM JS, YONG CS, KIM JA, HA JS, HUH K. 4-hydroxybenzaldehyde from *Gastrodia elata* Bl. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2000, 73(1/2): 329-333.