

· 研究论文 ·

DOI: 10.16801/j.issn.1008-7303.2017.0060

Cylindrocarpon olidum W1 菌株代谢物中壳二孢氯素及其类似物的分离及抑菌活性

魏少鹏^{1,2}, 姬志勤^{*,1,2}

(1. 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100;

2. 西北农林科技大学 陕西省植物源农药研究与开发重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 采用硅胶柱层析及高效液相色谱等技术从冬青卫矛内生真菌 *Cylindrocarpon olidum* W1 次生代谢物中分离鉴定出 8 个抑菌活性化合物 **W1-1~W1-8**。经核磁共振氢谱和碳谱、高分辨质谱等技术, 并结合相关文献确认其为壳二孢氯素及其类似物, 分别为 Illicicolin A (**W1-1**)、5-Chlorocolletorin B (**W1-2**)、Illicicolin B (**W1-3**)、Deacetylchloronectrin (**W1-4**)、Illicicolin C (**W1-5**)、壳二孢氯素 (**W1-6**)、Cylindrol A₄ (**W1-7**) 和 Cylindrol B (**W1-8**)。抑菌活性测定结果表明: 壳二孢氯素及其类似物对烟草青枯病菌有较强的抑制作用, 上述化合物的最小抑制浓度分别为 6.25、3.13、> 100、3.13、6.25、12.5、25 和 25 μg/mL; 化合物 **W1-2**、**W1-4** 和 **W1-5** 对番茄灰霉病菌和油菜菌核病菌菌丝生长亦有较强的抑制作用, 其中对番茄灰霉病菌的抑制中浓度 (IC₅₀) 分别为 36.45、21.60 和 26.69 μg/mL, 对油菜菌核病菌的抑制中浓度分别为 20.21、16.79 和 12.11 μg/mL。

关键词: *Cylindrocarpon olidum* W1; 壳二孢氯素; 分离鉴定; 抑菌活性

中图分类号: Q965

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2017)04-0457-08

Isolation and antimicrobial activities of ascochlorin and its analogues from the metabolites of *Cylindrocarpon olidum* W1

WEI Shaopeng^{1,2}, JI Zhiqin^{*,1,2}

(1. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. Shaanxi Province Key Laboratory Research & Development on Botanical Pesticides, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract: Eight compounds **W1-1~W1-8** were isolated from the secondary metabolites of *Cylindrocarpon olidum* W1, which is an endophytic fungus from *Euonymus japonica*, by silica gel column chromatography and pre-HPLC techniques. Based on the ¹H NMR and ¹³C NMR and HRMS-MS data, as well as the published literatures, these chemicals were identified as Illicicolin A (**W1-1**), 5-Chlorocolletorin B (**W1-2**), Illicicolin B (**W1-3**), Deacetylchloronectrin (**W1-4**), Illicicolin C (**W1-5**), Ascochlorin (**W1-6**), Cylindrol A₄ (**W1-7**) and Cylindrol B (**W1-8**). The obtained Ascochlorin and its analogues showed strong antibacterial activities against *Ralstonia solanacearum*, with minimum

收稿日期: 2017-06-09; 录用日期: 2017-07-21.

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0200506); 国家自然科学基金资助项目 (31371973, 31301700); 陕西省科技攻关项目 (2016NY-139).

作者简介: 魏少鹏, 男, 副研究员; E-mail: weishaopeng@nwsuaf.edu.cn; *姬志勤, 通信作者 (Author for correspondence), 男, 研究员, 主要从事天然产物化学研究, E-mail: jizhiqin@nwsuaf.edu.cn

inhibitory concentrations (MIC_5) of 6.25, 3.13, > 100, 3.13, 6.25, 12.5, 25 and 25 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Compounds **W1-2**, **W1-4** and **W1-5** could also effectively inhibit the mycelial growth of plant pathogenic fungi *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. Their medium inhibitory concentrations (IC_{50}) against *B. cinerea* were 36.45, 21.60 and 26.69 $\mu\text{g/mL}$, respectively. Their IC_{50} values against *S. sclerotiorum* were 20.21, 16.79 and 12.11 $\mu\text{g/mL}$, respectively.

Keywords: *Cylindrocarpon olidum* W1; ascochlorin; isolation and identification; antimicrobial activity

从植物内生菌次生代谢物中筛选抗菌、杀虫和除草活性农用抗生素,是新型生物农药研发的一个重要途径^[1-2]。前期研究中,笔者所在课题组从冬青卫矛中分离鉴定出一株内生真菌 *Cylindrocarpon olidum* W1,发现其代谢产物对多种植物病原细菌和真菌均有明显的抗菌活性^[3]。*Cylindrocarpon* (柱孢属)真菌是人参和西洋参锈腐病的重要病原菌,其主要代谢产物为具有抗癌活性的酚醛倍半萜类化合物^[4]。为了明确 *C. olidum* W1 活性代谢物的结构,在抑菌活性追踪指导下,笔者从其代谢产物中分离鉴定出 8 个具有抑菌活性化合物,经高分辨质谱、核磁共振波谱等技术将其鉴定为壳二孢氯素 (ascochlorin) 及其类似物。现将部分结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株 *Cylindrocarpon olidum* W1,保存于西北农林科技大学农药研究所。

1.1.2 培养基 PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0,用于 *C. olidum* W1 菌株斜面、平板培养及病原真菌培养;

马铃薯葡萄糖液体培养基:土豆 200 g,蛋白胨 0.5 g,葡萄糖 10 g,乙酸钠 1.66 g,蔗糖 10 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.02 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0,用于 *C. olidum* W1 菌株摇瓶发酵;

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基:牛肉膏 3.0 g、蛋白胨 10 g、氯化钠 5.0 g、琼脂 15 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0~7.2 及 Mueller-Hinton 肉汤培养基 (杭州大和微生物试剂有限公司) 用于病原细菌培养。

所有培养基在 121 $^{\circ}\text{C}$ 、 1×10^5 Pa 下灭菌 30 min,备用。

1.1.3 供试病原细菌 白菜软腐病菌 *Erwinia carotovora*、猕猴桃溃疡病菌 *Pseudomonas*

syringae 和水稻白叶枯病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 由西北农林科技大学植物病理研究室提供;烟草青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 由西南大学植物保护学院提供。将病原细菌接种于牛肉膏蛋白胨琼脂培养基,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 1 d。

1.1.4 供试病原真菌 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、苹果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、玉米弯孢病菌 *Curvularia lunata*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*、茄子黄萎病菌 *Verticillium dahlia*、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 和苹果树腐烂病菌 *Valsa mali* 由西北农林科技大学农药研究所提供;棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* 由西北农林科技大学植物病理研究室提供。将病原真菌接种于 PDA 培养基,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 3~7 d。

1.1.5 主要仪器及试剂 分析型 HPLC 系统:Shimadzu LC-6AD 高效液相色谱仪,具二极管阵列检测器,日本岛津公司;制备型 HPLC 系统:LC3000 高效液相色谱仪,配紫外检测器,北京创新通恒科技有限公司;Bruker APEX II 质谱仪和 Bruker RPX 500 MHz 核磁共振仪,德国布鲁克公司;WPR 熔点仪,上海精科仪器有限公司;Synergy 超纯水系统,美国密理博公司。

甲醇 (HPLC 级) (美国 Tedia 公司); 200~300 目 (粒径 54~74 μm) 硅胶 (青岛海洋化工厂); 氨苄青霉素 (USP 级) (上海国药集团化学试剂有限公司); 噁菌酯 (azoxystrobin), (百灵威科技有限公司); 石油醚、乙酸乙酯均为市售分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 种子液制备 将斜面保存的 W1 菌株接种于 PDA 平板培养基上,于 25 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 7 d,无菌条件下,将活化好的平板制成 3 cm $\times$ 3 cm 菌饼接种于 100 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基中,于 180 r/min、25 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 16 h。

1.2.2 发酵液制备 将制备好的种子液以体积分数为 20% 的量接种于 100 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基中, 于 180 r/min、25 °C 振荡培养 12 d。

1.2.3 活性成分的分离及鉴定 将 50 L 发酵液用多层纱布过滤后收集菌体, 置于 -70 °C 冰箱中冷冻 24 h, 转移至冻干机中冻干。冻干后的菌丝体以甲醇为溶剂超声提取 2 次, 每次 1 h; 合并有机相, 减压浓缩, 浓缩液用少量硅胶拌匀晾干后进行硅胶柱层析, 依次用 V (石油醚): V (乙酸乙酯)=9:1~1:1、乙酸乙酯、 V (乙酸乙酯): V (甲醇)=9:1~1:1 及甲醇梯度洗脱。每 200 mL 收集 1 份, 经薄层层析 (TLC) 检测后合并相同组分, 共得 6 个馏分 Fr01-Fr06, 其中 Fr02 为一纯化合物 **W1-6** (10.5 g)。以烟草青枯病菌 *R. solanacearum* 为活性指示菌, 采用滤纸片法进行抑菌活性追踪测试, 将活性组分 Fr01 (2.34 g) 和 Fr03 (1.21 g) 采用反相高效液相色谱进行制备纯化, 分别得化合物 **W1-1**~**W1-5** (214、389、154、261 和 94 mg)、**W1-7** (394 mg) 和 **W1-8** (287 mg)。采用 ^1H NMR、 ^{13}C NMR 和 ESI-MS 等技术对其进行结构鉴定。

1.2.4 抑菌活性测定

1.2.4.1 对病原细菌的抑制作用 采用微量稀释法^[5]。从琼脂培养基中挑取 4~5 个相同形态的供试菌菌落, 接入 1.0 mL 灭菌的 Mueller-Hinton 肉汤

中, 于 35 °C 培养至轻度混浊后转入 0.9% 生理盐水中, 调整到麦氏浊度为 0.5, 再用 Mueller-Hinton 肉汤稀释 200 倍, 其接种量相当于 7.5×10^5 cfu/mL。将稀释好的接种液转入 96 孔板中, 每孔 100 μL , 再分别加入 100 μL 不同质量浓度的药液, 使最终浓度分别为 100、50、25、12.5、6.25、3.13、1.56、0.78 和 0.39 $\mu\text{g/mL}$, 每板另设不加药剂的空白对照、氨苄青霉素 (Ampicillin) 阳性对照和加药不接菌阴性对照。每处理重复 3 次。于 35 °C 培养 20 h, 记录药剂对供试细菌的最低抑菌浓度 (MIC)。

1.2.4.2 对病原真菌的抑制作用 采用菌丝生长速率法^[6]。准确称取 10 mg 待测化合物, 先用 500 μL 二甲基亚砜 (DMSO) 溶解后, 用无菌水配制成质量浓度为 10 mg/mL 的母液。用无菌水将供试药液母液进行梯度稀释, 得到系列浓度药液。将 1.0 mL 药液与 9.0 mL 融化的 PDA 培养基混匀, 倒入无菌培养皿中制成带药培养基平板。待培养基凝固后, 在每个培养基平面接入 1 个供试真菌菌饼 (直径为 4 mm), 使带菌丝的一面贴在培养基表面。每处理 3 次重复。于 25 °C 恒温箱中培养 72~96 h, 用十字交叉法测量菌落生长直径, 按 (1) 式计算菌丝生长抑制率。

$$\text{菌丝生长抑制率}/\% = \frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100 \quad (1)$$

所得数据用 SPSS 软件求出毒力回归方程及抑制中浓度 (EC_{50} 值) 及相关性分析。

2 结果与分析

2.1 活性成分分离及结构鉴定

以抑菌活性追踪为指导, 经大孔吸附树脂吸附, 甲醇解析, 硅胶柱层析等方法从菌株 *C. olidum* W1 发酵产物中分离出 8 个活性化合物 **W1-1**~**W1-8**, 经高分辨质谱、核磁共振波谱等技术将其鉴定为壳二孢氯素及其类似物, 其结构见图式 1, 相关核磁共振氢谱和碳谱数据见表 1 和表 2。

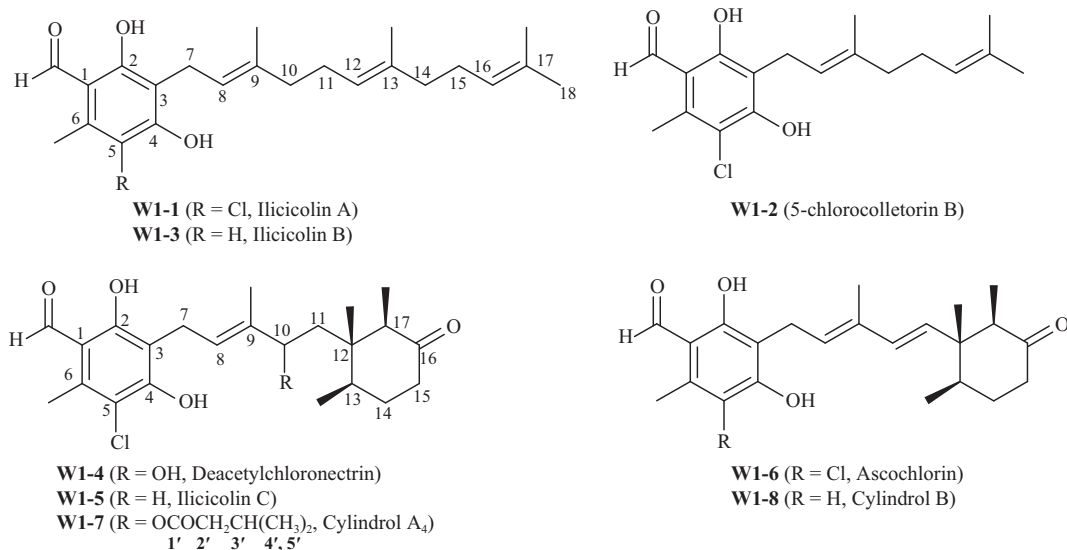
W1-1, 淡黄色晶体, $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{ClO}_3$, 熔点: 71~72 °C (文献值^[7]: 72~72.5 °C); UV (λ_{MeOH}): 202, 229, 293, 368 nm; HRMS: $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 389.187 9 (计算值: 389.188 3), 相对分子质量为 390。 ^1H 、 ^{13}C NMR 数据与 Hosono 等^[8]报道的

Illicicolin A 基本一致, 故将化合物 **W1-1** 鉴定为 Illicicolin A。

W1-2, 淡黄色粉末, $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{ClO}_3$, 熔点: 88.1~88.4 °C (文献值^[9]: 88 °C); UV (λ_{MeOH}): 204, 228, 293 nm; HRMS: $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 321.126 1 (计算值: 321.125 7), 相对分子质量为 322。 ^1H 、 ^{13}C NMR 数据与 Singh 等^[4]报道的 5-chlorocolletorin B 基本一致, 故将化合物 **W1-2** 鉴定为 5-chlorocolletorin B。

W1-3, 淡黄色粉末, $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{O}_3$, 熔点: 97~98 °C (文献值^[7]: 97~98.5 °C); UV (λ_{MeOH}): 206, 298 nm; HRMS: $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 354.219 9 (计算值: 354.219 5), 相对分子质量为 355。 ^1H 、 ^{13}C NMR 数据与 Guo 等^[10]报道的 Illicicolin B 基本一致, 故将化合物 **W1-3** 鉴定为 Illicicolin B。

W1-4, 无色晶体, $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{ClO}_5$, 熔点: 136.5~138.1 °C (文献值^[11]: 138 °C); UV (λ_{MeOH}):



图式 1 Ascochlorin 及其类似物的结构

Scheme 1 Structure of Ascochlorin and its analogues

206, 228, 293, 337 nm; HRMS: $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 421.177 9 (计算值: 421.178 2), 相对分子质量为 422。 ^1H 、 ^{13}C NMR 数据与 Seephonkai 等^[12]报道的 Deacetylchloronectrin 基本一致, 故将化合物 **W1-4** 鉴定为 Deacetylchloronectrin。

W1-5, 淡黄色晶体, $\text{C}_{23}\text{H}_{31}\text{ClO}_4$, 熔点: 135.1~136.5 °C (文献值^[7]: 134~136 °C); UV(λ_{MeOH}): 206, 228, 294 nm; HRMS: $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 405.183 0 (计算值: 405.183 3), 相对分子质量为 406。 ^1H 、 ^{13}C NMR 数据与 Gutiérrez 等^[13]报道的 Illicicolin C 基本一致, 故将化合物 **W1-5** 鉴定为 Illicicolin C。

W1-6, $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{ClO}_4$, 淡黄色晶体, 熔点: 151~153 °C (文献值^[7]: 153~154 °C); UV(λ_{MeOH}): 206, 222, 298 nm; HRMS: $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 406.167 9 (计算值: 403.167 6), 相对分子质量为 404。 ^1H 、 ^{13}C NMR 数据与 Takamatsu 等^[14]报道的 Ascochlorin 基本一致, 故将化合物 **W1-6** 鉴定为 Ascochlorin。

W1-7, 无色油状, $\text{C}_{28}\text{H}_{39}\text{ClO}_6$, UV(λ_{MeOH}): 209, 225, 291 nm; HRMS: $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 505.235 5 (计算值: 505.235 7), 相对分子质量为 506。 ^1H 、 ^{13}C NMR 数据与 Singh 等^[4]报道的 Cylindrol A₄ 基本一致, 故将化合物 **W1-7** 鉴定为 Cylindrol A₄。

W1-8, 无色油状, $\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_4$, UV(λ_{MeOH}): 205, 222, 298 nm; HRMS: $[\text{M}-\text{H}]^-$, m/z 369.207 0 (计算值: 369.206 6), 相对分子质量为 370。 ^1H 、

^{13}C NMR 数据与 Singh 等^[4]报道的 Cylindrol B 基本一致, 故将化合物 **W1-8** 鉴定为 Cylindrol B。

2.2 化合物的抑菌活性

2.2.1 对病原细菌的抑制作用 由表 3 可以看出, **W1-1**~**W1-8** 对供试 4 种农业病原细菌的抑菌活性差异较大, 其中, 对烟草青枯病菌的抑制活性较为明显, 其 MIC 值分别为 6.25、3.13、>100、3.13、6.25、12.5、25 和 25 $\mu\text{g/mL}$, 对白菜软腐病菌抑菌活性较差, 其 MIC 值均 $\geq 50 \mu\text{g/mL}$ 。化合物 **W1-2**、**W1-4** 和 **W1-5** 的抑菌活性优于其余化合物。

2.2.2 对植物病原真菌的抑制作用 由表 4 可以看出, 目标化合物对供试的 9 种植物病原真菌菌丝生长均有不同程度的抑制作用, 其中对番茄灰霉病菌和油菜菌核病菌菌丝生长的抑制作用尤为明显。与抗菌活性类似, 化合物 **W1-2**、**W1-4** 和 **W1-5** 的抗真菌活性亦明显高于其余化合物。进一步毒力测定结果表明 (表 5), 化合物 **W1-2**、**W1-4** 及 **W1-5** 对番茄灰霉病菌的 IC_{50} 值分别为 36.45、21.60 和 26.69 $\mu\text{g/mL}$; 对油菜菌核病菌的 IC_{50} 值分别为 20.21、16.79 和 12.11 $\mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

壳二孢氯素属于异戊烯酚类抗生素, 研究发现, 该类抗生素具有多种生物学活性, 如抗真菌、杀灭疟原虫和杰氏肺囊虫、抑制肿瘤细胞增殖等^[15]。壳二孢氯素最初由日本学者 Tamura^[16]于 1968 年从丝孢纲壳二孢属真菌蚕豆壳二孢的代谢

表 1 化合物 W1-1~W1-8 的核磁共振氢谱数据
Table 1 ¹H NMR data of W1-1~W1-8 in CDCl₃

位置 Position	δ_{H} (mult CDCl ₃ , 500 MHz)							
	W1-1	W1-2	W1-3	W1-4	W1-5	W1-6	W1-7	W1-8
5			6.21, s					6.24, s
7	3.40, d, $J=7.0$ Hz	3.40, d, $J=7.0$ Hz	3.40, d, $J=7.0$ Hz	3.38, d, $J=7.0$ Hz	3.38, d, $J=7.0$ Hz	3.53, d, $J=7.0$ Hz	3.26~3.30, m	3.42, d, $J=7.0$ Hz
8	5.06, t, $J=7.0$ Hz	5.06, t, $J=7.0$ Hz	5.08, t, $J=7.0$ Hz	5.47, t, $J=7.0$ Hz	5.23, t, $J=7.0$ Hz	5.52, t, $J=7.0$ Hz	5.49, t, $J=7.0$ Hz	5.51, t, $J=7.0$ Hz
10	1.93~1.94, m	1.98~2.00, m	1.95~1.97, m	4.21, dd, $J=4.0, 7.0$ Hz	1.95~2.00, m	5.90, d, $J=16$ Hz	5.30, dd, $J=7.5, 4.0$ Hz	5.86, d, $J=16$ Hz
11	2.05~2.08, m	2.04~2.07, m	2.02~2.13, m	1.45, dd, $J=16.5, 4.0$ Hz; 1.67, dd, $J=16.5, 7.5$ Hz	1.31~1.44, m	5.38, d, $J=16$ Hz	1.44~1.48, m; 1.85~1.88, m	5.31, d, $J=16$ Hz
12	5.22, t, $J=7.0$ Hz	5.23, t, $J=7.0$ Hz	5.26, t, $J=7.0$ Hz					
13				2.02~2.13, m	1.82~1.86, m	1.91~1.94, m	1.98~2.00, m	1.52~1.57, m
14	1.98~2.01, m	1.57, s	2.02~2.13, m	2.19~2.31, m	1.57~1.63, m; 1.82~1.86, m	1.57~1.63, m; 1.91~1.94, m	1.44~1.48, m; 1.85~1.88, m	2.28~2.33, m; 1.85~1.88, m
15	1.98~2.01, m		2.02~2.13, m	2.19~2.31, m	2.29~2.32, m	2.37~2.40, m	2.04~2.08, m; 2.15~2.18, m	2.37~2.40, m
16	5.06, t, $J=7.0$ Hz		5.08, t, $J=7.0$ Hz					
17				2.54, q, $J=7.0$ Hz	2.44, q, $J=6.5$ Hz	2.37~2.40, m	2.45~2.46, m	2.37~2.40, m
18	1.57, s		1.58, s					
1-CHO	10.13, s	10.14, s	10.06, s	10.09, s	10.13, s	10.14, s	10.00, s	9.96, s
2-OH	12.68, s	12.69, s	12.73, s	12.66, s	12.68, s	12.69, s	12.56, s	12.58, s
4-OH	6.43, brs	6.45, brs	6.37, brs	6.60, brs	6.48, brs	6.40, brs	7.03, brs	8.53, brs
6-CH ₃	2.59, s	2.59, s	2.48, s	2.57, s	2.59, s	2.60, s	2.48, s	2.40, s
9-CH ₃	1.79, s	1.79, s	1.81, s	1.80, s	1.80, s		2.09, s	1.87, s
12-CH ₃				0.52, s	0.55, s		0.46, s	0.64, s
13-CH ₃	1.67, s	1.64, s	1.67, s	0.94, d, $J=6.5$ Hz	0.89, d, $J=7.0$ Hz		0.86, d, $J=7.0$ Hz	0.75, d, $J=6.5$ Hz
17-CH ₃	1.58, s		1.59, s	0.79, d, $J=6.5$ Hz	0.86, d, $J=7.0$ Hz		0.72, d, $J=7.0$ Hz	0.79, d, $J=6.5$ Hz
2'							2.10~2.13, m	
3'							2.04~2.08, m	
4'							0.82, d, $J=7.0$ Hz	
5'							0.82, d, $J=7.0$ Hz	

表 2 化合物 W1-1~W1-8 的核磁共振碳谱数据

Table 2 ¹³C NMR data of W1-1~W1-8

位置 Position	δ_{C} (CDCl ₃ , 125 MHz)							
	W1-1	W1-2	W1-3	W1-4	W1-5	W1-6	W1-7	W1-8
1	113.6	113.7	111.8	113.7	113.4	113.4	113.2	113.0
2	162.2	162.3	163.8	162.2	162.3	162.4	162.0	163.9
3	114.4	114.5	111.0	113.7	114.5	114.0	113.3	112.5
4	156.4	156.6	162.8	156.3	156.4	156.3	156.5	162.6
5	113.3	113.4	113.4	113.3	113.7	113.9	113.4	110.5
6	137.6	137.7	142.1	138.0	137.8	137.9	137.9	141.9
7	22.0	22.2	21.4	21.6	22.2	22.4	21.5	21.3
8	120.8	120.8	121.7	122.9	121.0	127.7	124.9	128.8
9	136.9	137.1	139.7	139.9	136.7	134.3	135.2	134.9
10	33.9	39.9	26.4	74.8	35.7	133.4	75.6	133.4
11	26.5	26.7	26.8	41.5	32.8	135.8	39.5	133.5
12	124.0	124.0	123.7	44.2	43.6	48.6	44.0	48.5
13	135.1	131.8	135.8	36.8	36.2	41.1	36.5	40.7
14	39.7	25.8	39.8	31.4	31.1	31.3	31.1	31.1
15	39.9		39.8	41.7	41.7	41.7	41.4	41.5
16	124.5		124.5	214.3	214.1	212.6	213.4	214.5
17	131.2		131.4	50.6	50.6	53.8	50.3	53.7
18	24.7		25.8					
1-CHO	193.2	193.4	193.1	193.4	193.4	193.3	193.2	192.7
6-CH ₃	14.4	14.6	17.8	14.6	16.5	14.6	14.3	17.9
9-CH ₃	16.2	16.3	18.0	11.5	14.6	12.8	11.8	12.5
12-CH ₃				15.5	15.5	10.5	15.5	10.3
13-CH ₃	16.0	17.7	16.2	15.9	7.7	16.5	15.3	16.2
17-CH ₃	22.7		16.4	8.0	15.1	9.0	7.8	8.8
1'							172.2	
2'							43.7	
3'							25.6	
4'							22.2	
5'							22.3	

表 3 目标化合物对 4 种农业病原细菌的 MIC 值

Table 3 MIC values of target compounds against four strains of agricultural bacteria

供试病原细菌 Tested bacteria	MIC/($\mu\text{g/mL}$)								
	W1-1	W1-2	W1-3	W1-4	W1-5	W1-6	W1-7	W1-8	氨苄青霉素 Ampicillin
白菜软腐病菌 <i>E. carotovora</i>	>100	>100	>100	>100	50	>100	>100	>100	25
猕猴桃溃疡病菌 <i>P. syringae</i>	>100	12.5	>100	25	25	>100	50	>100	12.5
水稻白叶枯病菌 <i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	>100	12.5	>100	25	25	>100	>100	6.25	12.5
烟草青枯病菌 <i>R. solanacearum</i>	6.25	3.13	>100	3.13	6.25	12.5	25	25	12.5

产物中分离得到。1994 年, Takamatsu^[14]又于日本静冈土壤真菌 *Verticillium* sp. FO-2787 的菌丝体中分离得到该化合物。壳二孢氯素作用于真菌线粒体, 通过抑制微生物的呼吸作用破坏其能量代

谢, 与目前大多数呼吸电子链抑制剂仅选择性地作用于 Q₀ 或 Q_i 位点不同, 壳二孢氯素同时可结合于 Q₀ 和 Q_i 两个作用位点^[17]。作用靶标单一的杀菌剂面临的重要问题就是抗性问题, 如甲氧基

表 4 目标化合物对 9 种供试病原真菌菌丝生长的抑制作用 (100 μg/mL)

Table 4 Inhibition effect of target compounds against the mycelial growth of nine tested fungi (100 μg/mL)

供试病原真菌 Tested fungi	抑制率 Inhibition rate (Mean ± SD)/%								
	W1-1	W1-2	W1-3	W1-4	W1-5	W1-6	W1-7	W1-8	啞菌酯 azoxystrobin [*]
烟草赤星病菌 <i>A. alternata</i>	33.3 ± 0.8	46.3 ± 0.6	42.0 ± 0.8	49.2 ± 1.2	43.4 ± 0.5	40.3 ± 0.6	30.4 ± 1.2	33.3 ± 0.7	71.7 ± 1.5
茄子黄萎病菌 <i>V. dahliae</i>	36.3 ± 0.5	53.9 ± 1.2	39.2 ± 0.8	56.8 ± 1.3	45.1 ± 0.5	31.2 ± 1.1	30.3 ± 0.7	37.2 ± 1.3	50.3 ± 0.9
苹果炭疽病菌 <i>C. gloeosporioides</i>	18.8 ± 0.8	27.5 ± 0.6	24.6 ± 0.8	66.1 ± 0.9	55.1 ± 0.8	42.3 ± 1.0	23.1 ± 0.9	28.9 ± 0.7	93.8 ± 1.8
苹果树腐烂病菌 <i>V. mali</i>	50.6 ± 0.5	65.0 ± 0.6	8.44 ± 0.8	67.4 ± 1.2	66.2 ± 0.6	52.5 ± 0.5	48.0 ± 0.8	59.4 ± 0.8	99.3 ± 2.1
玉米弯孢病菌 <i>C. lunata</i>	25.3 ± 0.5	38.6 ± 0.6	34.6 ± 0.8	45.3 ± 1.2	56.2 ± 0.6	32.4 ± 0.4	26.6 ± 1.2	40.0 ± 0.5	58.4 ± 0.9
棉花枯萎病菌 <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>vasinfectum</i>	5.80 ± 0.5	46.4 ± 0.6	31.8 ± 0.6	43.4 ± 1.3	66.3 ± 0.5	16.1 ± 0.4	4.35 ± 0.9	23.9 ± 0.5	57.1 ± 1.1
小麦赤霉病菌 <i>F. graminearum</i>	33.1 ± 0.8	49.3 ± 1.4	27.4 ± 1.0	59.4 ± 1.3	63.1 ± 0.5	52.5 ± 0.9	39.2 ± 1.2	42.1 ± 0.6	79.3 ± 0.9
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	72.3 ± 0.5	83.5 ± 0.6	55.5 ± 0.8	90.2 ± 1.2	89.5 ± 0.8	72.7 ± 1.2	70.5 ± 0.9	74.5 ± 0.7	85.7 ± 1.5
油菜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	70.6 ± 0.5	88.9 ± 0.6	53.5 ± 0.6	94.4 ± 1.2	98.1 ± 0.5	74.7 ± 1.3	76.7 ± 1.2	78.9 ± 0.5	97.3 ± 2.3

*啞菌酯的测试浓度为 50 μg/mL。
*azoxystrobin concentration at 50 μg/mL.

表 5 目标化合物对供试植物病原真菌的毒力

Table 5 Toxicity of target compounds against tested fungi

供试真菌 Pathogenic fungi	化合物 Compound	回归方程 Regression equation	R ²	IC ₅₀ (95%CL)/(μg/mL)
番茄灰霉病菌 <i>B. cinerea</i>	W1-1	y = 1.628 1 + 1.880 9x	0.977 2	62.0 (33.8~114)
	W1-2	y = 1.952 5 + 1.951 3x	0.982 2	36.5 (239~55.7)
	W1-3	y = 1.106 1 + 2.001 6x	0.991 8	88.2 (52.6~148)
	W1-4	y = 2.500 + 1.873 3x	0.990 6	21.6 (13.8~33.8)
	W1-5	y = 2.211 3 + 1.954 9x	0.989 8	26.7 (17.6~40.4)
	W1-6	y = 2.648 4 + 1.457 1x	0.995 8	41.1 (23.4~72.1)
	W1-7	y = 2.612 5 + 1.441 4x	0.993 8	45.3 (25.0~82.1)
	W1-8	y = 2.325 9 + 1.617 0x	0.994 3	45.1 (26.3~77.3)
油菜菌核病菌 <i>S. sclerotiorum</i>	啞菌酯 azoxystrobin	y = 4.132 4 + 1.152 8x	0.999 0	5.65 (2.71~11.8)
	W1-1	y = 2.231 9 + 1.621 4x	0.993 5	50.9 (28.4~91.4)
	W1-2	y = 2.789 1 + 1.693 5x	0.979 8	20.2 (12.2~33.3)
	W1-3	y = 1.188 5 + 1.887 7x	0.984 9	105 (55.6~196)
	W1-4	y = 2.673 3 + 1.899 1x	0.995 7	16.8 (10.2~27.6)
	W1-5	y = 2.908 2 + 1.930 7x	0.961 6	12.11 (6.79~21.6)
	W1-6	y = 2.077 9 + 1.707 0x	0.986 6	51.5 (29.3~90.6)
	W1-7	y = 1.515 7 + 2.018 9x	0.989 2	53.2 (31.5~89.7)
	W1-8	y = 2.390 1 + 1.705 1x	0.990 8	33.9 (21.2~54.2)
	啞菌酯 azoxystrobin	y = 4.293 2 + 1.468 1x	0.992 2	3.03 (1.41~6.50)

丙烯酸酯类杀菌剂。从作用机理上来看，壳二孢氯素属于多靶点杀菌剂，与大多数呼吸抑制剂相比更不容易产生抗药性。本研究从冬青卫矛内生真菌 *C. olidum* W1 中分离鉴定出壳二孢氯素及多个类似物，首次系统评价了其多种农业致病细菌和致病真菌的抑菌活性，丰富了壳二孢氯素及其类似物的农用生物活性。结果表明，该类化合

物的抑菌活性与其侧链异戊烯基的长短有关 (如化合物 **W1-2** 抑菌活性明显高于 **W1-1**)，同时受侧链 C₁₁-C₁₂ 化学键类型影响较大，C₁₁-C₁₂ 为不饱和和碳碳双键时活性较差，为饱和碳碳单键时抑菌活性明显提高 (**W1-4** 和 **W1-5** 抑菌活性明显高于 **W1-6**)。这一结果为新型微生物农药的开发提供了素材和理论依据。

参考文献(Reference):

[1] 曹艳, 魏少鹏, 姬志勤. 冬青卫矛内生放线菌*Streptomyces flavofuscus* G1发酵液中抑菌活性成分研究[J]. 农药学报, 2015, 17(5): 616-621.

CAO Y, WEI S P, JI Z Q. Investigation on antimicrobial compounds from fermentation broth of *Streptomyces flavofuscus* G1, an endophyte isolated from *Euonymus japonicas*[J]. Chin J Pestic Sci, 2015, 17(5): 616-621.

[2] 俞晓平, 陈列忠, 申屠旭萍. 植物内生菌及其代谢物在生物农药创制中的应用[J]. 浙江农业学报, 2006, 18(5): 289-293.

YU X P, CHEN L Z, SHENTU X P. Review on plant endophyte and its secondary metabolites in the application of producing bio-pesticides[J]. Acta Agric Zhejiangensis, 2006, 18(5): 289-293.

[3] 曹艳. 冬青卫矛内生菌的分离及其活性代谢物研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2016.

CAO Y. Investigation on endophytes of *Euonymus japonicas* and its bioactive metabolites[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2016.

[4] SINGH S B, BALL R G, BILLS G F, et al. Chemistry and biology of cylindrols: novel inhibitors of ras farnesyl-protein transferase from *Cylindrocarpon lucidum*[J]. J Org Chem, 1996, 61(22): 7727-7737.

[5] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for Bacteria that grow aerobically; approved standard[S]. 8th ed. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

[6] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学与技术出版社, 1988.

WU W J. Introduction to experimental techniques of plant chemical protection[M]. Xi'an: Shanxi Scientific & Technical Press, 1988.

[7] HAYAKAWA S, MINATO H, KATAGIRI K. The ilicicolins, antibiotics from *Cylindrocladium ilicicola*[J]. J Antibiot, 1971, 24(9): 653-654.

[8] HOSONO K, OGIHARA J, OHDAKE T, et al. LL-Z1272a epoxide, a precursor of ascochlorin produced by a mutant of *Ascochyta viciae*[J]. J Antibiot, 2009, 62(10): 571-574.

[9] HUSSAIN H, DROGIES K HHeinz, AL-HARRASI A, et al. Antimicrobial constituents from endophytic fungus *Fusarium* sp.[J]. Asian Pac J Trop Dis, 2015, 5(3): 186-189.

[10] GUO R H, ZHANG Y T, DUAN D, et al. Fibrinolytic evaluation of compounds isolated from a marine fungus *Stachybotrys longispora* FG216[J]. Chin J Chem, 2016, 34(11): 1194-1198.

[11] SASAKI H, HOSOKAWA T, NAWATA Y, et al. Isolation and structure of ascochlorin and its analogs[J]. Agric Biol Chem, 1974, 38(8): 1463-1466.

[12] SEEPHONKAI P, ISAKA M, KITTA KOOP P, et al. A Novel ascochlorin glycoside from the insect pathogenic fungus *Verticillium hemipterigenum* BCC 2370[J]. J Antibiot, 2004, 57(1): 10-16.

[13] GUTIEÁRREZ M, THEODULOZ C, RODRIÁGUEZ J, et al. Bioactive metabolites from the fungus *Nectria galligena*, the main apple canker agent in Chile[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(20): 7701-7708.

[14] TAKAMATSU S, RHO M C, MASUMA R, et al. A novel testosterone 5 α -reductase inhibitor, 8', 9'-dehydroascochlorin produced by *Verticillium* sp. FO-2787[J]. Chem Pharm Bull, 1994, 42(4): 953-956.

[15] 刘小宇. 两株真菌的次生代谢产物结构鉴定及生物学活性研究[D]. 上海: 第二军医大学, 2016.

LIU X Y. Researches on structure elucidation and biological activities investigation of secondary metabolites of two polar fungi[D]. Shanghai: The Second Military Medical University, 2016.

[16] TAMURA G, SUZUKI S, TAKATSUKI A, et al. Ascochlorin, a new antibiotic, found by paper-disc agar-diffusion method. I: isolation, biological and chemical properties of ascochlorin (studies on antiviral and antitumor antibiotics. I)[J]. J Antibiot, 1968, 21(9): 539-544.

[17] BERRY E A, HUANG L S, LEE D W, et al. Ascochlorin is a novel, specific inhibitor of the mitochondrial cytochrome bc₁ complex[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1797(3): 360-370.

(责任编辑: 金淑惠)