

苦皮藤内生真菌中杀虫杀菌活性物质的初步研究^{*}

兰 琪, 姬志勤, 顾爱国, 师宝君, 吴文君

(西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 对杀虫植物苦皮藤植株中的内生真菌进行了研究。从苦皮藤根中和侧枝中分别分离得到 24 株和 15 株内生真菌, 其中表皮层 10 株, 韧皮部 27 株, 木质部 2 株。对分离出的菌株进行液体培养, 并对其发酵产物进行了杀虫和杀菌活性测定。以生物活性追踪为指导, 对杀虫和杀菌成分分别进行了制备薄层分离和柱层析分离。生物活性测定结果表明, 只有 1B 菌株菌丝体的丙酮粗提物对 3 龄粘虫有毒杀作用, 在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理下, 24 h 后的死亡率为 85.3%; 在 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理下, 1L, 2B 和 5J 3 个菌株的发酵液和菌丝体粗提物对番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌、苹果炭疽病菌和玉米小斑病菌表现出了不同程度的抑制菌丝生长活性; 其菌丝体粗提物对番茄灰霉病菌、玉米小斑病菌和烟草赤星病菌有明显的抑制孢子萌发作用, 在盆栽试验中, 对小麦白粉病和黄瓜霜霉病的盆栽防效均在 50% 以上; 从 1B 菌株中分离到 1 个杀虫化合物 1B-4; 从 1L 菌株中分离出 3 个杀菌化合物 1L-3, 1L-6 和 1L-8, 其中 1L-6 杀菌活性最高。

[关键词] 苦皮藤; 内生真菌; 活性成分; 杀虫植物

[中图分类号] S481+.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)10-0079-06

苦皮藤 (*Celastrus angulatus* Max) 是卫矛科 (Celastraceae) 南蛇藤属 (*Celastrus*) 的一种多年生木质藤本植物^[1]。吴文君等从 1980 年开始对苦皮藤进行了多学科的系统研究, 发现苦皮藤有 4 类生物活性, 即对昆虫的拒食、麻醉、毒杀活性和对某些病原菌的杀菌活性。他们从苦皮藤的根皮和叶子中分离出 20 多个杀虫活性化合物, 从其果实中分离出 3 个杀菌活性化合物; 开发研制的 0.2% 苦皮藤素乳油已取得农药临时登记, 投入批量生产, 该制剂的原料是苦皮藤的根皮。虽然苦皮藤在我国分布广泛, 贮量丰富, 但采挖野生苦皮藤根皮, 会对植被造成某种程度的破坏, 不符合我国目前的“退耕还林, 封山育林”的政策。苦皮藤人工栽培生长周期长 (3~4 年), 且会受地域及气候等条件的制约。因此, 要持续地规模化生产苦皮藤制剂, 途径有 2 条: 一是化学合成, 但由于苦皮藤素结构复杂, 目前乃至今后很长一段时间还难以实现; 二是生物合成, 特别是利用微生物发酵, 即利用从苦皮藤中分离出的相关内生真菌取代苦皮藤, 来大规模生产以苦皮藤素为有效成分的植物杀虫剂, 这是一条极具潜力, 而且在短期内可以实现的有效途径。为此, 本研究所自 1999 年以来开展了此项研究, 现将初步研究结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 供试昆虫、病原菌和植物 (1) 供试昆虫。粘虫 (*Mythimna separata*), 室内以玉米苗或小麦苗长期累代饲养。(2) 供试病原菌。番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*), 小麦赤霉病菌 (*Gibberella zeae*), 辣椒疫霉病菌 (*Phytophthora capsici*), 苹果炭疽病菌 (*Glomerella cingulata*), 玉米小斑病菌 (*Bipolaris maydis*), 烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*), 黄瓜霜霉病菌 (*Pseudoperonospora cubensis*) 和小麦白粉病菌 (*Blumeria graminis*)。(3) 盆栽植物。黄瓜, 品种为长春密刺; 小麦, 品种为辉县红。

1.1.2 主要试剂与仪器 (1) 试剂。薄层层析硅胶 GF₂₅₄ (60 型), 柱层析硅胶 (Q 051~Q 074 mm), 均由青岛海洋化工厂生产。(2) 仪器。薄层自动铺板器, 重庆南岸新力实验电器厂产品; 薄板自动点样器, 瑞士 CAMAG 公司产品; 高效液相色谱仪, 美国 WATERS 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 内生真菌的分离 取新鲜苦皮藤根、茎和侧

^{*} [收稿日期] 2003-08-22

[基金项目] 国家“863”高技术计划项目 (2002AA 245121); 教育部博士点基金资助项目 (20020712011)

[作者简介] 兰 琪 (1977-), 女, 四川内江人, 硕士, 主要从事农药化学研究。

[通讯作者] 吴文君 (1945-), 男, 四川洪雅人, 教授, 博士生导师, 主要从事农药化学和农药毒理学研究。

枝, 自来水冲洗后用体积分数 75% 酒精漂洗 3~5 min, 以无菌水冲洗 3~4 次, 再用 0.1% 的升汞漂洗 10~30 s, 最后以无菌水冲洗 5 次。

在消毒过的根、茎和侧枝上分别取其表皮、韧皮部和木质部, 在超净工作台上切割成约 0.5 cm × 0.5 cm 的小片, 分别置于马铃薯葡萄糖培养基 (PDA)、Czapek 培养基、水琼脂培养基及苦皮藤煎汁培养基平板上, 在 24~26 °C 下避光培养。3~7 d 后, 待平板上的样品边缘外有菌丝长出后, 对不同菌株进行分离纯化。采用组织印迹法进行灭菌效果的检验, 灭菌不合格的分离结果不能使用。

1.2.2 液体培养及活性成分的提取 液体培养采用改良的 MD 培养液, 于 25~27 °C 的摇床上培养 7 d。发酵产物以双层纱布过滤, 滤液以氯仿萃取, 菌丝体以丙酮提取。

1.2.3 杀虫活性测定 对所分离的 39 株内生真菌进行液体发酵, 并对发酵后的菌丝体和发酵液的粗提物进行杀虫活性筛选。将 39 株内生真菌的 78 个样品配成 500 μg/mL 液, 进行胃毒作用和触杀作用生测。以 3 龄粘虫幼虫为试虫, 胃毒活性测定采用载毒叶碟定量饲喂法, 触杀活性测定采用毛细管点滴法^[2]。

1.2.4 杀菌活性测定 将 39 株内生真菌的菌丝体和发酵液的粗提物共 78 个样品配成 500 μg/mL 液, 测定其对番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌、苹果炭疽病菌、辣椒疫霉病菌、玉米小斑病菌的菌丝生长抑制作用及孢子萌发抑制作用。(1) 离体生测。采用抑制菌丝生长速率法及抑制孢子萌发法^[2,3]。(2) 盆栽试验保护作用测定。先在盆栽作物(黄瓜、小麦)上喷药, 24 h 后再接种病原菌。(3) 治疗作用测定。先在保湿条件下接种供试病原菌, 24 h 后再喷药处理。接种病原菌 7 d 后, 按照黄瓜霜霉病和小麦白粉病的分级标准, 调查病情指数并计算防治效果。

1.2.5 有效成分的分离 (1) 杀虫活性成分的分离。将 6 000 mL 的 1B 菌株发酵产物中的菌丝体滤出, 在通风橱中吹干, 丙酮提取 3 次。合并提取液, 浓缩得粗提物 543 mg, 取 200 mg 用于分离。采用薄层析 (TLC) 分析, 筛选出的合适展开剂为 $V_{\text{甲苯}}:V_{\text{乙酸乙酯}}:V_{\text{二氧六环}} = 75:20:5$, 再经薄层 (Pre-TLC) 制备, 将 4 条谱带刮下, 甲醇洗脱得 4 个组分。(2) 杀菌活性成分的分离。将 8 000 mL 1L 菌株发酵产物经丙酮提取 3 次, 合并提取液, 浓缩得粗提物 9.6 g。采用湿法装柱, 将 200 g 硅胶装入 4 cm × 80 cm 层析柱中, 取粗提物 8.5 g 上样。以 $V_{\text{石油醚}}:V_{\text{乙酸乙酯}} =$

98:2~50:50 淋柱, 流速为 6 mL/min, 每 250 mL 收集 1 份, 收集 11 份后以 500 mL 甲醇清柱。浓缩得 12 个馏分, 将其配成 500 μg/mL 浓度, 以番茄灰霉病菌为指示菌, 采用抑制菌丝生长速率法测定其活性。对活性最高的馏分进行高效液相色谱分离。经流动相选择试验, 发现以 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{四氢呋喃}} = 75:20:5$ 作为流动相可达到基线分离。考虑到所选馏分含量较少, 故选择反相半制备柱进行分离。色谱条件: C18 柱, 0.9 cm × 30 cm, 10 μm; $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}:V_{\text{四氢呋喃}} = 75:20:5$; 2.5 mL/min; UV 为 229 nm。进样量 200 μL, 浓度 100 g/L。

2 结果与分析

2.1 内生真菌的分离结果

从不同地点采集的苦皮藤植株中共分离到 39 株内生真菌。其中从苦皮藤根中分离到 24 株, 从侧枝中分离到 15 株, 从茎中未分离到内生真菌, 可见从根中分离到的菌株数最多; 从表皮层、韧皮部和木质部得到的菌株数分别为 10、27 和 2 株, 可见从韧皮部中分离到的菌株数最多。

2.2 内生真菌发酵产物的杀虫活性

78 个样品 500 μg/mL 液的胃毒作用生测结果表明, 只有 1B 菌株菌丝体的丙酮粗提物对粘虫有胃毒作用, 试虫取食载毒叶片后没有明显的兴奋症状, 试虫侧位曲身, 不活动, 24 h 后死亡率为 85.3%。所有内生真菌发酵液的三氯甲烷萃取物对粘虫均无作用。触杀作用生测结果表明, 所有样品对 3 龄粘虫无触杀作用。

2.3 内生真菌发酵产物的杀菌活性

2.3.1 离体试验结果 78 个样品 500 μg/mL 液的离体试验结果表明, 1L、2B 和 5J 3 个菌株的发酵液和菌丝体粗提物对 5 种病原菌均表现出了一定的抑制菌丝生长活性; 1L、2B 和 5J 3 个菌株的菌丝体粗提物对番茄灰霉病菌、玉米小斑病菌和烟草赤星病菌均表现出一定的抑制孢子萌发作用, 具体结果见表 1 和表 2。

进一步测定 3 株内生真菌发酵产物的丙酮粗提物对 5 种供试菌抑制菌丝生长的毒力。结果(表 3)表明, 1L、2B 和 5J 3 株内生真菌发酵产物的丙酮粗提物, 都有较强的抑制菌丝生长的活性。特别是 2B, 对番茄灰霉病菌、小麦赤霉病菌、玉米小斑病菌、苹果炭疽病菌和烟草赤星病菌的抑制中浓度 (EC₅₀) 分别为 3.39, 5.33, 14.43, 10.65 和 12.56 μg/mL (表 3)。

表1 1L, 2B 和 5J 菌株发酵液和菌丝体粗提物对菌丝生长的影响

Table 1 Effects of fermentation products of 1L, 2B and 5J strain on mycelium grow th

供试样品 Tested samples	菌丝生长抑制率/% Inhibition rate of mycelium growth				
	小麦赤霉菌 <i>Gibberella zeae</i>	玉米小斑菌 <i>Bipolaris maydis</i>	番茄灰霉菌 <i>Botrytis cinerea</i>	苹果炭疽菌 <i>Gloeosporium fructicola</i>	辣椒疫霉菌 <i>Phytophthora capsici</i>
1L 发酵液 1L fermentation filtrate	98.6	100.0	100.0	67.0	14.7
1L 菌丝体粗提物 1L mycelium extract	71.8	100.0	81.2	76.2	27.7
2B 发酵液 2B fermentation filtrate	70.9	100.0	62.6	56.8	75.2
2B 菌丝体粗提物 2B mycelium extract	78.1	100.0	100.0	81.7	46.1
5J 发酵液 5J fermentation filtrate	98.6	100.0	96.1	72.4	73.9
5J 菌丝体粗提物 5J mycelium extract	71.8	94.5	96.0	74.8	34.1

表2 1L、2B 和 5J 菌株菌丝体粗提物对孢子萌发的影响

Table 2 Effects of mycelium extracts of 1L, 2B and 5J strain on spore germination

供试样品 Tested samples	孢子萌发抑制率/% Inhibition rate of spore germination		
	番茄灰霉菌 <i>B. otrytis cinerea</i>	玉米小斑菌 <i>B. ipolaris maydis</i>	烟草赤星菌 <i>A. alternata alternata</i>
1L 粗提物 1L mycelium extract	72.8	77.9	68.7
2B 粗提物 2B mycelium extract	83.6	84.0	72.7
5J 粗提物 5J mycelium extract	75.6	83.1	71.5

表3 1L, 2B 和 5J 菌株菌丝体粗提物抑制菌丝生长的毒力

Table 3 Toxicity of mycelium extracts of 1L, 2B and 5J strain inhibiting mycelium grow th

供试样品 Tested samples	EC ₅₀ /(μg · mL ⁻¹)				
	小麦赤霉菌 <i>Gibberella</i> <i>zeae</i>	玉米小斑菌 <i>B ipolaris</i> <i>maydis</i>	番茄灰霉菌 <i>B otrytis</i> <i>cinerea</i>	苹果炭疽菌 <i>G lam erella</i> <i>cingulata</i>	烟草赤星菌 <i>A lternaria</i> <i>alternata</i>
1L 粗提物 1L mycelium extract	13.00	46.08	6.47	44.16	15.74
2B 粗提物 2B mycelium extract	5.33	14.43	3.39	10.65	12.56
5J 粗提物 5J mycelium extract	512.52	27.41	41.67	319.22	38.50

表 4 1L, 2B 和 5J 菌株菌丝体粗提物对小麦白粉病的防治效果

Table 4 Effectiveness of mycelium extracts of 1L, 2B and 5J strain against *B lum eria q ram inis* and

<i>Pseudoperonospora cubensis</i> disease					%
供试样品 Tested samples	小麦白粉病 <i>B lum eria gram inis</i>		黄瓜霜霉病 <i>Pseudoperonospora cubensis</i>		
	保护作用 Protective efficacy	治疗作用 Therapeutic efficacy	保护作用 Protective efficacy	治疗作用 Therapeutic efficacy	
1L 粗提物 1L mycelium extract	68.2	84.2	68.5	72.6	
2B 粗提物 2B mycelium extract	82.5	66.8	72.5	55.8	
5J 粗提物 5J mycelium extract	60.6	77.6	-	-	

2 3 2 盆栽试验结果 从表4可知,在500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度下,3株内生真菌发酵产物的丙酮粗提物对小麦白粉病均有不同程度的保护和治疗作用,防效均

在 60% 以上, 其中 1L 和 5J 的粗提物对小麦白粉病的治疗作用稍大于保护作用; 而 2B 的粗提物对小麦白粉病的保护作用较强。1L 和 2B 2 株内生真菌

发酵产物的丙酮粗提物对黄瓜霜霉病均有不同程度的保护和治疗作用,防效均在 50% 以上,其中 1L 的粗提物对黄瓜霜霉病的保护作用和治疗作用相当;2B 的粗提物对黄瓜霜霉病的保护作用较强。

2 4 有效成分的分离结果

2 4 1 杀虫活性成分的分离结果 分离出杀虫活

性成分 1B-1(84 mg), 1B-2(35 mg), 1B-3(19 mg)和 1B-4(25 mg)4 个组分。经杀虫活性生物测定,1B-4 对 3 龄粘虫具有胃毒杀虫活性。

2 4 2 杀菌活性成分的分离结果 杀菌活性成分分离得到 12 个馏分,其对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用见表 5。

表 5 柱层析馏分对番茄灰霉病菌菌丝生长的抑制作用

Table 5 Effects of column chromatography fractions on mycelium growth of *B otry tis cinerea*

馏分编号 Fraction No.	净重/mg Net weight	抑制率/% Inhibition rate	馏分编号 Fraction No.	净重/mg Net weight	抑制率/% Inhibition rate
1	625	35.4	7	1 450	96.7
2	125	1.7	8	228	94.7
3	208	2.4	9	216	55.7
4	310	0	10	380	71.9
5	428	0	11	412	54.7
6	325	43.1	12	890	70.3

从表 5 可以看出,第 7~ 12 号 6 个馏分均有杀菌活性,但以馏分 7 的杀菌活性最强,而且量也较

多。因此,将馏分 7 再进行高效液相色谱分离制备。色谱图及切割收集见图 1。

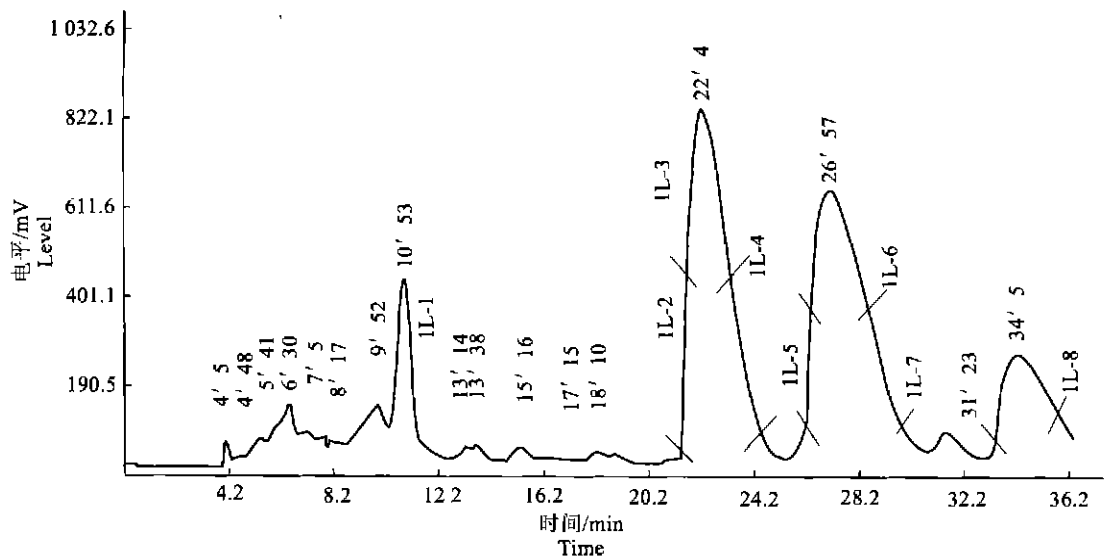


图 1 7 号馏分的高效液相色谱分离图

Fig 1 Separation graph of fraction 7 by HPLC

从图 1 可知,分离得到 1L-1~ 1L-8 共 8 个组分,在 500 μ g/mL 浓度下,以番茄灰霉病菌为指示

菌,采用抑制菌丝生长速率法活性追踪,结果见表 6。

表 6 反相半制备组分对番茄灰霉病菌的菌丝生长作用

Table 6 Effects of RP-HPLC semipreparation fractions on mycelium growth of *B otry tis cinerea*

馏分编号 Fraction No.	净重/mg Net weight	抑制率/% Inhibition rate	馏分编号 Fraction No.	净重/mg Net weight	抑制率/% Inhibition rate
1L-1	11	90.6	1L-6	192	92.7
1L-2	22	38.4	1L-7	173	90.6
1L-3	173	40.8	1L-8	66	72.4
1L-4	66	43.8	杂质 Impurity	56	30.5
1L-5	35	91.2			

表 6 表明, 1L-1 杀菌活性达 90.6%, 但样品不纯且量太少; 1L-5, 1L-6 和 1L-7 的杀菌效果明显, 均达到 90% 以上, 且从图 1 可以看出, 3 个组分为同一色谱峰切下; 1L-2, 1L-3 和 1L-4 的杀菌活性较差, 图 1 显示 3 个组分为同一色谱峰切下; 1L-8 的杀菌活性中等。

3 讨 论

植物内生真菌 (Plant endophytic fungi) 是在寄主植物中度过全部或近乎全部生活周期而不使寄主表现任何症状的一类真菌^[4]。目前, 国内外关于内生真菌的研究与开发主要集中在医药领域, 其标志性成果是 1993 年 Stierle 从太平洋红豆杉 (*Taxus brevifolia*) 的树皮中分离到 1 株产紫杉醇的内生真菌——安德烈紫杉菌 (*Taxomyces andreanae*)。利用安德烈紫杉菌生产抗癌新药紫杉醇的专利已转让给 Cytoclonal 公司, 其工业化生产指日可待^[5]。国内外关于内生真菌在农药领域的研究与开发尚处于起步阶段, 报道极少。迄今国内外仅见 4 篇关于内生真菌产生杀虫活性物质的报道^[6-9], 2 篇关于内生真菌产生杀菌活性物质的报道^[10, 11], 因此值得深入研究与开发。本研究结果表明, 苦皮藤植株中内生真菌的种类相当丰富, 显示了该植物中内生真菌的多样性。特别有价值的是, 所分离的一些内生真菌的液体发酵产物有很高的生物活性, 这充分说明从内生真菌的次生代谢产物中寻找农药活性物质的思路是可行的, 这为新型活性化合物的筛选提供了一条很好的途径。再加上植株中的内生真菌多种多样, 产生的次生代谢产物也非常丰富, 因此内生真菌的研究空间极大, 从中发现高活性的新化合物的可能性也很大。

通常情况下, 内生真菌可产生与寄主植物相同或相似的次生代谢物质, 如从红豆杉植物中分离到产紫杉醇的内生真菌^[5], 从长春花植物中分离到产长春花新碱的内生真菌等^[12]。但也有一些内生真菌可产生与寄主植物不同的活性成分, 如从美登木的老叶中分离到产抗癌活性的物质——球毛壳甲素 A, 但它不是美登木素的内生真菌 (球毛壳菌)。本研究的初衷是分离到产生杀虫活性物质苦皮藤素的内生真菌, 但其中分离到了 1 株产生杀虫活性物质的内生真菌, 其产生的杀虫活性物质不是苦皮藤素的类似物; 另外分离到了 3 株产生杀菌活性物质的内生真菌。这也充分证明了内生真菌不一定产生与寄主植物相同的活性物质, 说明内生真菌与寄主植物关系多种多样, 其自身生长因受微环境的影响, 次生代谢产物非常丰富。

传统的真菌菌种分类地位的鉴定是采用经典的形态学方法, 即结合菌落形态和孢子、分生孢子梗着生状态等进行鉴定。有的内生真菌在人工培养基上不产生有性或无性孢子^[13], 不产孢菌株占总菌株数的比例平均高达 41.3%^[14], 这些不产孢菌株是无法用经典形态学方法进行鉴定的。为了克服现行研究方法带来的缺陷, 对内生真菌 (也有其他真菌) 的鉴定开始采用分子生物学技术, 如采用 ITS 序列分析技术鉴定从棕榈树中分离到的内生真菌^[15]。本研究分离到的 1B, 1L, 2B 和 5J 4 株内生真菌中, 仅 2B 在 PSA 培养基上产孢, 初步鉴定为镰刀菌属 (*Fusarium proliferatum*), 其余 3 株经各种方法诱导均不产生孢子, 因而无法采用经典的形态学方法鉴定其分类地位, 这几株产生活性物质的内生真菌有待于进一步鉴定。

[参考文献]

- [1] 吴文君, 刘惠霞, 朱靖博, 等. 天然产物杀虫剂-原理·方法·实践[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1998
- [2] 慕立义, 吴文君, 王开运. 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994
- [3] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1991
- [4] 郭良栋. 内生真菌研究进展[J]. 菌物系统, 2001, 20(1): 148- 152
- [5] Stierle A, Strobel G, Stierle D. Taxol and taxone production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of pacific yew [J]. Science, 1993, 260: 214
- [6] Findlay J A, Li Guo-qiang, John A Johnson. Bioactive compounds from an endophytic fungus from eastern larch (*Larix laricina*) needles[J]. Canada Journal of Chemistry, 1997, 75: 716- 719
- [7] Findlay J A, Buthelezi S, Lavoie R, et al. Bioactive isocoumarins and related metabolites from conifer endophytes[J]. Journal of Natural Products, 1995, 58: 1759- 1766
- [8] Buthelezi S, Findlay J A, Li Guo-qiang, et al. Insect Toxins from an endophytic fungus from wintergreen[J]. Journal of Natural Products, 1997, 60: 1214- 1215
- [9] Findlay J A, Li Guo-qiang, Penner P E, et al. Novel diterpenoid insect toxins from a conifer endophytes[J]. Journal of Natural Products,

1995, 58: 197- 200

- [10] Li J, Strobel G A, Harper J, et al Cryptocin, a potent tetramic acid antimycotic from the endophytic fungus- *Cryptosporiopsis quercina*[J]. Organic Letter, 2000, 2: 767- 770
- [11] Zou W X, Meng J C, Lu H, et al Metabolites of *Colletotrichum gloeosporioides*, an endophytic fungus in *Artemisia mongolica*[J]. Journal of Natural Products, 2000, 63: 1529- 1530
- [12] 张玲琪, 郭 波, 李海燕, 等. 长春花内生真菌的分离及其发酵产生药用成分的初步研究[J]. 中草药, 2000, 31(11): 805- 807.
- [13] Guo L D, Hyde K D, Li E C Y. A method to promote sporulation in palm endophytic fungi[J]. Fungal Diversity, 1998, 1: 105- 109
- [14] Fisher P J, Petrini O, Petrini L E, et al Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Marjorca and Switzerland[J]. New Phytol, 1994, 127: 133- 137.
- [15] Guo L D, Hyde K D. Identification of endophytic fungi from *Livistona chinensis* based on morphology and rDNA sequences[J]. New Phytol, 2000, 147: 617- 630

Preliminary study on the insecticidal and fungicidal components of endophytic fungus in *Celastrus angulatus*

LAN Qi, JI Zhi-qin, GU Ai-guo, SHI Bao-jun, WU Wen-jun

(Institute of Pesticide Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract Taking PDA as separating culture medium, 24 and 15 strains of endophytic fungi were separated from the roots and twigs of *Celastrus angulatus*, respectively. In these strains, 10, 27 and 2 strains were separated from the epidermis, phloem and xylem of the plant, respectively. The insecticidal and fungicidal activities of their fermentation products were examined, and the active ingredients were separated by p-TLC and HPLC. The results of insecticidal bioassay indicated that only the acetone extract of 1B strain mycelium exhibited poisonous activity, and had a mortality of 85.3% against the 3rd instar larvae of *Mythimna separata* at the concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$. By means of mycelium growth rate, the acetone extracts of mycelium of 1L, 2B, and 5J strains had a certain degree fungicidal activity against *Botrytis cinerea*, *Gibberella zeae*, *Phytophthora capsici*, *Glomerella ingulata*, *Bipolaris maydis*, *Alternaria alternata* at the concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$, and exhibited moderate activity against *Botrytis cinerea*, *Bipolaris maydis*, *Alternaria alternata* in the test of spore germination. The results of pot test indicated that the acetone extracts of 1L, 2B and 5J strain exhibited more than 50% of protective and therapeutic efficacy against *Blumeria graminis* disease and *Pseudoperonospora cubensis* disease at the concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$. An insecticidal component 1B-4, three fungicidal components 1L-3, 1L-6 and 1L-8 were isolated from the acetone extracts of the mycelium of 1B and 1L strain by bioassay-guided separation.

Key words: *Celastrus angulatus*; plant endophytic fungi; bioactive components; insecticidal plants