

苦皮藤内生真菌Hd3 菌株的研究

杨春平¹, 陈华保², 钱 勇¹, 姬志勤¹

(1 西北农林科技大学 农药研究所, 陕西 杨凌 712100;

2 四川农业大学 农学院, 四川 雅安 625014)

[摘 要] 从新鲜苦皮藤根韧皮部分离筛选到1株内生真菌, 编号为Hd3。生测结果表明, 当质量浓度为50.0 mg/mL时, Hd3菌株菌丝乙酸乙酯提取物对3龄粘虫、小菜蛾的胃毒活性分别为100%和26.67%; 盆栽法处理中, 当质量浓度为44.0 mg/mL时, Hd3菌株菌丝乙酸乙酯提取物对小麦蚜虫的杀虫活性为94.11%。选用硅胶柱层析和反相半制备高效液相色谱切割分离, 从Hd3菌株菌丝体乙酸乙酯提取物中得到1个杀虫活性物质H4-5, 经波谱数据分析, 化合物H4-5的结构为2, 3-二甲氧基-5-甲基苯酚。通过形态特征、培养特性等方面的研究, 将Hd3菌株初步鉴定为曲霉属(*Aspergillus* spp.) 环绕亚属(*Subgen. Girum dati*) 真菌。

[关键词] 苦皮藤; 内生真菌; 2, 3-二甲氧基-5-甲基苯酚; 杀虫活性

[中图分类号] Q949.32; S432.44 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2006)11-0203-04

杀虫植物苦皮藤(*Celastrus angulatus* Max.) 属卫矛科南蛇藤属多年生木质藤本植物。姬志勤等^[1]研究发现, 苦皮藤中富含二氢沉香呋喃倍半萜类及生物碱类化合物, 并分离到20多种对农林害虫有毒杀作用的杀虫活性成分, 进一步成功开发出苦皮藤素制剂。由于苦皮藤中杀虫活性化合物含量甚微, 结构复杂, 人工合成十分困难。同时, 苦皮藤植物生长周期较长(3~4年), 人工栽培成本高, 而野生资源的大规模采挖势必会破坏生态平衡, 这使苦皮藤素制剂的大规模生产受到资源限制。因此, 研究苦皮藤杀虫活性成分的新来源显得尤为重要。基于某些植物内生真菌能产生与宿主相同或相似的活性成分^[2], 西北农林科技大学农药研究所从2001年开始对苦皮藤的内生真菌进行研究, 从中分离出1株产生杀虫活性和3株产生杀菌活性的内生真菌, 并从编号为2B的活性菌株内分离到3个环肽类抗菌化合物^[3-4]。

本研究采集不同生态环境下的苦皮藤样品, 对苦皮藤中的内生真菌进行进一步筛选, 得到1株编号为Hd3的产杀虫活性物质的内生真菌菌株, 并对其有效成分进行了较为系统的研究, 同时对Hd3菌株的种属地位进行了初步鉴定。现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 Hd3菌株从新鲜的苦皮藤根韧皮部分离得到。分离方法: 取采自陕西杨凌的新鲜苦皮藤根组织, 用自来水冲洗干净后, 参照曹理想等^[5]的方法进行表面消毒。将处理过的样品在超净工作台上切割成1 mm × 10 mm的小片, 置于PDA平板上, 24~26℃条件下避光培养。3~5 d后, 待平板上样品边缘有菌丝长出, 然后经分离、纯化后转接到PDA斜面上培养, 备用。

1.1.2 供试昆虫 人工饲养的3龄粘虫(*Mythimna separata* Walker)、3龄小菜蛾(*Plutella xylostella*) 和小麦蚜虫(主要种类为麦长管蚜 *Macrosiphum avenae*)。

1.1.3 主要仪器 恒温双层摇瓶机、制备型高效液相色谱仪、Bruker RPX300核磁共振仪、X4型显微熔点测定仪(温度未校正)。

1.2 方法

1.2.1 Hd3菌株菌丝体提取物的制备 (1) Hd3菌株的液体培养。在250 mL的三角瓶中装入100~125 mL马铃薯液体培养基, 封口, 灭菌。待冷却后用接种针挑取少量Hd3菌落接种于培养瓶中, 置于恒

· [收稿日期] 2005-11-21

[基金项目] 国家“863”计划项目“利用植物内生真菌生物合成新型植物杀虫剂”(2002AA245121)

[作者简介] 杨春平(1979-), 女, 四川西充人, 在读博士, 主要从事生物源农药研究。

[通讯作者] 姬志勤(1971-), 男, 山西永济人, 讲师, 主要从事天然产物农药研究。E-mail: jizhijun@163.com

温摇床上,在180~200 r/min、26~30 °C条件下培养6~7 d。

(2) Hd3 菌株发酵产物的提取。发酵终止后,发酵产物用4层纱布过滤,菌丝体自然挥干后,用组织捣碎机捣碎,用石油醚、乙酸乙酯和甲醇分别回流提取3次,每次2 h,用旋转蒸发器去除溶剂,分别获得菌丝体石油醚、乙酸乙酯和甲醇粗提物。

1.2.2 杀虫活性测定 (1)对3龄粘虫和小菜蛾的活性测定。触杀活性:采用点滴法^[6]。将50.0 mg/mL的Hd3菌株菌丝体粗提物丙酮溶液用1 μ L微量毛细管点滴器点滴试虫的前胸背板,观察试虫的中毒反应。胃毒活性:采用载毒叶碟定量饲喂法^[6]。挑选蜕皮1 d以内的3龄粘虫幼虫,置于直径5 cm培养皿中,每皿1虫,饥饿8 h。将Hd3菌株菌丝体粗提物以丙酮配成50.0 mg/mL的溶液,用微量毛细管点样器将1 μ L样品溶液均匀涂布于0.5 cm $\times$ 0.5 cm小麦叶片上,即得载毒叶片。每处理10头试虫,每虫饲喂1片载毒叶片。以丙酮点滴叶片作对照。记录试虫的症状表现,计算24 h后的死亡率。

(2)对小麦蚜虫的活性测定。点滴法:同1.2.2(1)(微量毛细管点滴器容积为0.032 μ L)。浸叶法:将Hd3菌株菌丝体乙酸乙酯粗提物配成44.0 mg/mL的丙酮溶液,采集带蚜虫的小麦叶片,毛笔仔细剔除不合要求的个体,将蚜虫连同叶片一并浸入药液3~5 s后取出,用吸水纸吸去多余药液,以丙酮溶液作对照,重复4次。饲养24 h后检查死亡率。

盆栽法:将Hd3菌株菌丝体乙酸乙酯粗提物配成乳油,用清水稀释成44.0 mg/mL,对有蚜虫危害的盆栽小麦作喷雾处理,以不含样品但其他成分相同的乳油作为对照,每处理1盆,重复4次。分别于处理前和处理24 h后调查活蚜虫数。

1.2.3 杀虫活性成分的分离 取Hd3菌株菌丝体乙酸乙酯浸膏10.8 g,用少许乙酸乙酯溶解。选用层析柱(40 mm $\times$ 700 mm),以粒径为40~50 μ m的硅胶作为吸附剂,甲苯湿法装柱,甲苯和乙酸乙酯混合液(V(甲苯):V(乙酸乙酯)=75:25)为洗脱剂,流速6 mL/min,等体积收集洗脱液(100 mL),共收集56份,薄层检测合并相同流分后得9个流分。对活性较高的流分NO. 7(0.974 g),选用C18色谱柱(200 mm $\times$ 250 mm, 10 μ m),以甲醇-水-乙腈混合液(V(甲醇):V(水):V(乙腈)=60:50:10)为流动相,流速8 mL/min,检测波长为210 nm(UV),进行反相高效液相制备分离,得化合物H4.5。

1.2.4 杀虫活性成分的结构鉴定 对分离得到的

化合物经质谱(MS)、核磁共振氢谱(¹H NMR)、碳谱(¹³C NMR)等光谱数据分析,并与化合物标准图谱对比,确定其结构。

1.2.5 Hd3菌株鉴定 采用形态学方法,观察Hd3菌株菌落性状及菌丝、分生孢子、产孢结构等的形态,参考文献[7-8]的分类方法,初步确定Hd3菌株的种属地位。

2 结果与分析

2.1 Hd3菌株菌丝体粗提物的杀虫活性

Hd3菌株菌丝体粗提物对3龄粘虫的杀虫活性测定结果见表1。由表1可知,Hd3菌株菌丝体乙酸乙酯粗提物对3龄粘虫有很强的胃毒活性,24 h其对3龄粘虫的胃毒活性为100%;3种溶剂粗提物对3龄粘虫的触杀作用均不明显。

表1 Hd3菌株菌丝体不同溶剂粗提物对3龄粘虫的杀虫活性

Table 1 Results of the insecticidal activity of mycelium extracts against the 3rd larvae of *Mythimna separata*

Hd3菌株菌丝体粗提物 Mycelium extract of Hd3 strain	杀虫活性/% Insecticidal activity	
	胃毒 Stomach poison	触杀 Contact poison
石油醚提取物 Petroleum ether extract	0.00	0.00
乙酸乙酯提取物 Ethyl acetate extract	100.00	25.00
甲醇提取物 Methanol extract	5.00	0.00

Hd3菌株菌丝体乙酸乙酯粗提物对3龄小菜蛾和小麦蚜虫的杀虫活性测定结果见表2。从表2可以看出,Hd3菌株菌丝体乙酸乙酯粗提物对小菜蛾和小麦蚜虫均有不同程度的毒杀作用,其中盆栽法处理中,Hd3菌株菌丝体乙酸乙酯粗提物对小麦蚜虫的杀虫活性高达94.11%。

表2 Hd3菌株菌丝体乙酸乙酯粗提物对小菜蛾和小麦蚜虫的杀虫活性

Table 2 Insecticidal activity of ethyl acetate extracts against *Plutella xylostella* and *Macrosiphum avenae*

供试昆虫 Insect	测定方法 Test method	杀虫活性/% Insecticidal activity
小菜蛾 <i>P. xylostella</i>	点滴法 Topical application test	11.54
	载毒叶碟法 The leaf disk test	26.67
小麦蚜虫 <i>M. avenae</i>	点滴法 Topical application test	55.00
	浸叶法 Leaf-dip test	75.93
	盆栽法 Pot test	94.11

2.2 化合物H4.5结构鉴定

化合物H4.5为橙色片状结晶,m.p. 49~

51。ESI-MS m/z : 167 $[M-H]^-$, 169 $[M+H]^+$, 191 $[M+Na]^+$, 359 $[2M+Na]^+$, 说明其分子质量为168。H4 5的红外光谱显示有下列特征吸收峰: 羟基 3210 cm^{-1} ; 饱和碳氢 2965 cm^{-1} , 2876 cm^{-1} ; 苯环 1605 cm^{-1} , 1580 cm^{-1} , 1500 cm^{-1} 。

在化合物H4 5的 ^1H NMR谱中, 观察到 δ 65 (d, $J = 2.0\text{ Hz}$), δ 96 (d, $J = 2.0\text{ Hz}$), δ 68 (s), δ 70 (s), δ 29 (s) 和 δ 21 (s) 6组峰, 共12个质子, δ 21处的质子在加 D_2O 后消失, 说明其为活泼质子。 ^{13}C NMR谱, DEPT谱给出了 δ 158.72 (C), δ 146.15 (C), δ 159.93 (C), δ 104.34 (CH), δ 129.97 (C), δ 108.96 (CH), δ 52.54 (CH_3), δ 56.60 (CH_3) 和 δ 21.02 (CH_3) 共9个碳原子(表3)。

表3 化合物H4 5的NMR数据

Table 3 NMR data of compound H4 5

碳原子位置 Position of carbon	^1H NMR	^{13}C NMR
1		158.72
2		146.15
3		159.93
4	δ 65 (d, $J = 2.0\text{ Hz}$)	104.34
5		129.97
6	δ 96 (d, $J = 2.0\text{ Hz}$)	108.96
2-O CH_3	δ 68 (s)	52.54
3-O CH_3	δ 70 (s)	56.60
5- CH_3	δ 29 (s)	21.02
1-OH	δ 21 (s)	

以上波谱数据和文献[9-10]报道的2, 3-二甲氧基-5-甲基苯酚波谱数据一致, 可确定化合物H4 5为2, 3-二甲氧基-5-甲基苯酚, 其结构见图1。

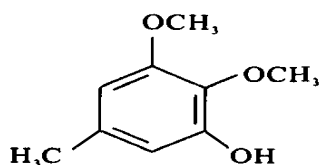


图1 化合物H4 5的结构式

Fig 1 Molecular structures of H4 5

2.3 Hd3 菌株的初步鉴定

2.3.1 形态特征 Hd3 菌株菌丝较细, 有隔, 分生孢子头球形(图2), 直径 $12.5\text{ }\mu\text{m}$, 分生孢子梗直立, 生自气生菌丝, 孢梗径光滑, 顶囊近球形, 全部表面可育, 偶有小顶囊存在, 仅顶部可育; 产孢结构双层,

分生孢子球形或近球形, 壁光滑。

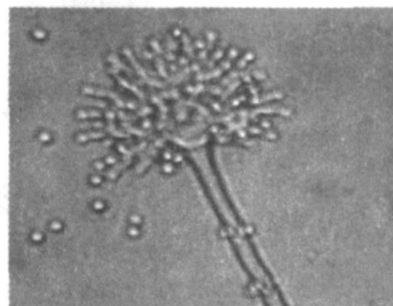


图2 Hd3 菌株的分生孢子形态

Fig 2 Pycnidium and conidium of strain Hd3

2.3.2 培养特征 Hd3 菌株在查氏琼脂培养基上25℃条件下, 培养7 d 直径20~25 mm, 培养10~14 d 直径30~40 mm; 质地絮状, 厚度中等, 中央稍隆起; 分生孢子结构中部较密, 边缘较稀; 颜色为浅黄色至奶油色, 渗出液少, 黄色; 稍具霉味; 菌落反面初为浅黄色, 后变为红褐色, 中央颜色较深, 分泌浅黄绿色可溶性色素。

Hd3 菌落在PDA培养基上25℃条件下, 培养7 d 直径22~27 mm, 培养10~14 d 直径35~44 mm; 2 d 后产生大量产孢结构, 颜色黄褐色; 有大量无色或黄色的渗出液; 菌落反面深红褐色, 分泌大量黄褐色可溶性色素。

据文献[7-8]和Hd3 菌株的形态特征和培养特性, 将 Hd3 菌株定为半知菌亚门, 曲霉属 (*Aspergillus* spp.) 环绕亚属 (Subgen. *Cirumdati*) 真菌。

3 讨论

从苦皮藤内生真菌Hd3 菌株菌丝体代谢产物中分离得到的化合物H4 5为2, 3-二甲氧基-5-甲基苯酚, 为首次从微生物代谢产物中分离得到的天然产物, 也是首次证明其有明显杀虫活性。

菌株的鉴定一般采用形态特征、生物学特征及分子生物学鉴定相结合的办法, 而本研究对Hd3 菌株只进行了形态学方面的鉴定, 未进一步观察其有性世代的产孢结构及孢子形态。因此, 要确定Hd3 菌株的准确归属地位, 还应从生物学特征和分子生物学特征两方面进行更深入的研究。

[参考文献]

- [1] 姬志勤, 胡兆农, 刘国强, 等. 卫矛科植物苦皮藤杀虫成分化学研究新进展[J]. 西北植物学报, 2004, 24(4): 748-753
- [2] 杨春平, 陈华保, 顾爱国, 等. 植物内生真菌次生代谢产物的多样性及潜在应用价值[J]. 西北农业学报, 2005, 14(2): 126-132
- [3] 兰琪, 姬志勤, 顾爱国, 等. 苦皮藤内生真菌中杀虫杀菌活性物质的初步研究[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(10): 79-84

- [4] 姬志勤, 吴文君, 王明安, 等. 苦皮藤内生真菌层出镰刀菌中杀菌成分的结构鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(5): 61-64
- [5] 曹理想, 田新莉, 周世宁. 香蕉内生真菌、放线菌类群分析[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2003, 42(2): 70-73
- [6] 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
- [7] 张继忠. 微生物分类学[M]. 上海: 复旦大学出版社, 1996
- [8] 齐祖同, 孔华忠, 孙曾美. 中国真菌志: 曲霉属及其相关有性型[M]. 5卷. 北京: 科学出版社, 1997
- [9] Paola B, Roberto A, Maurizio B, et al. New convenient synthesis of iridol, An approach to the synthesis of ubiquinones[J]. Tetrahedron Letters, 2005, 46: 1255-1257.
- [10] Andreas M, Manfred R. Synthesis of crown ethers related to ubiquinones[J]. Synthesis, 1993(8): 797-802

Studies on the endophytic fungus Hd3 strain of *Celastrus angulatus*

YANG Chun-ping¹, CHEN Hua-bao², QIAN Yong¹, JI Zhi-qin¹

(1 Institute of pesticide, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Agriculture, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: Endophytic fungus Hd3 strain was isolated from the phloem of the root of *Celastrus angulatus*. The results of bioassay indicated the ethyl acetate extract of the endophytic fungus Hd3 strain mycelium had stomach toxicity against the 3rd instar larvae of *Mythimna separata* and *Plutella xylostella* at the concentration of 50.0 mg/mL, and the mortalities were 100% and 26.67% respectively. The extract had a mortality of 94.11% against *Macrosiphum avenae* at the concentration of 44.0 mg/mL in the pot test. An activity compound H4.5 was isolated from the extracts by p-TLC and HPLC. On the basis of spectral technology ¹H NMR, ¹³C NMR and MS, the structure of H4.5 was identified as 2, 3-dimethoxy-5-methyl phenol. Based on its morphological, cultivation and physiological characteristics, strain Hd3 was identified as *Aspergillus* spp.

Key words: *Celastrus angulatus*; endophytic fungus; 2, 3-dimethoxy-5-methyl phenol; insecticidal activity

(上接第202页)

Abstract ID: 1671-9387(2006)11-0199-CA

Study on the occurrence and prevention of root knot nematode of balloon flower in Shangluo, Shaanxi

TANG Yang-xuan¹, ZHANG Hui²

(1 Biological Medicine Engineering Department of Shangluo, Shangluo, Shaanxi 726000, China;

2 Medicine Engineering Department of Yangling Vocational and Technical College, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The occurrence rate of root knot nematode of balloon flower and its living surroundings and the harm it does in Shangluo, Shaanxi were investigated. Results show that root knot nematode of balloon flower, mainly living in sandy soil, is widespread in Shangluo, Shaanxi, with 6.45% to 44.6% plants infected. But chemical medicament produces better controlling results on it than plant powder.

Key words: root knot nematode of balloon flower; occurrence law; living surrounding; test of prevention