



黄蜻幼虫肠道分离菌 QTYC38 活性代谢产物的分离和鉴定

徐晓^{1#}, 卢贻会^{1#}, 张应烙^{1,2*}

¹浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

²浙江省野生动物生物技术与保护利用重点实验室, 浙江 金华 321004

摘要:【目的】黄蜻幼虫肠道分离菌 QTYC38 菌株的鉴定及抗菌除草活性代谢物的研究。【方法】通过形态学观察及分子生物学 ITS 序列分析, 对菌株 QTYC38 进行鉴定。利用生长速率法和琼脂扩散法测定菌株粗提物及其单体化合物的抗菌活性, 结合培养皿生物分析法测定菌株粗提物及其单体化合物的除草活性。同时运用多种色谱方法分离发酵产物中的活性成分, 并根据质谱和核磁共振谱数据确定其结构。【结果】菌株 QTYC38 被鉴定为浅黄新萨托菌 *Neosartorya aureola*, 在供试浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 其粗提物对稗草和反枝苋的生长抑制活性较好, 抑制率均大于 65%; 当供试浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{滤纸片}$ 时, 其对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)具有较好的抑菌活性, 抑菌圈直径为 22.7 mm, 与阳性对照药(硫酸庆大霉素 23.2 mm)活性相当。从该菌固体发酵产物中分离纯化得到 4 个单体化合物: helvolic acid (1), aromatic lactones (2), questin (3)和 erogosterol (4)。其中, 化合物 1 对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)均具有较好的生长抑制活性, 最低抑菌浓度分别为 3.1 和 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 当供试浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 化合物 3 和化合物 4 分别对杨树溃疡病菌(*Dothiorella gregaria*)和小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)具有较好的抑制效果, 抑制率分别为 52.4%和 72.3%。【结论】菌株 QTYC38 具有开发为微生物源除草剂和新型杀菌剂的潜能。

关键词: 黄蜻幼虫, 浅黄新萨托菌, 活性成分, 微生物源除草剂, 杀菌剂

稗草(*Echinochoia crusgalli*)是十大恶性杂草之一, 对农作物的产量和品质有严重的影响^[1]。反枝苋(*Amaranthus retroflexus*)分布广泛^[2-3], 也是一种能够大大降低农作物产量的恶性杂草。化学防治是治理稗草和反枝苋危害的主要措施, 但化学

除草剂的长期使用带来了诸如环境污染日趋严重和耐药杂草种群上升等问题^[1,4]。植物病害是一种影响较为广泛的自然灾害。在农业生产上, 植物病害同样是造成作物产量下降的主要原因之一^[5]。食品安全问题也一直是人们重点关注的问题^[6]。

基金项目: 国家自然科学基金(21272215); 浙江省自然科学基金(LY17C010002)

*通信作者。Tel: +86-579-82286419; E-mail: ylzhang@zjnu.cn

#共同第一作者。

收稿日期: 2016-12-11; 修回日期: 2017-02-18; 网络出版日期: 2017-02-28

误食被致病菌(如大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌等)污染的食品容易引起人类产生一系列不良反应,如呕吐、腹泻等^[7]。而且,被微生物污染的食品因销售不出去,而因此容易造成经济损失^[8]。在食品生产中,虽然采取诸如紫外、高温消毒、使用合成杀菌剂等方法对食物进行杀菌处理,但是这些方法并不能够彻底消灭存在于食品内部的病原菌,有的方法甚至还会对人类自身造成一定程度的伤害^[9]。因此开发一种环境友好的除草剂和杀菌剂正越来越引起人们的重视。昆虫肠道微生物菌群是一种研究较少的特境微生物,可能是新型除草剂和杀菌剂的重要来源之一^[10]。本文旨在以一株具有生物活性的黄蜻幼虫肠道分离菌 QTYC38 为研究对象,并对其代谢产物进行分离鉴定,旨在为开发新型微生物源除草剂和杀菌剂奠定一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫: 实验所用黄蜻幼虫于 2012 年采自浙江师范大学附近的郊区河流(29°00'17.37"N, 119°29'54.84"E)。

1.1.2 供试种子和致病菌: (1) 主要杂草种子: 反枝苋(*A. retroflexus* L.) 购买于河北种子基地; 稗草(*E. crusgalli* L.) 采自浙江师范大学实验稻田。(2) 主要作物种子: 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)、莴苣(*Lactuca sativa* L.)、辣椒(*Capsium annuum* L.) 和水稻(*Oryza sativa*) 等 4 种常见农作物种子; 上述 4 种作物种子均购买于浙江省金华市农贸市场, 生产商为福州永荣种子有限公司。(3) 供试植物病原真菌: 杨树溃疡病菌(*Dothiorella gregaria*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solan*)、小麦赤霉病菌

(*Fusarium graminearum*)、黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerium*)、苦瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *mornordicae*)、水稻稻瘟病菌(*Magnapotha oryzae*)、苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*) 和水稻纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)。(4) 供试病原细菌和酵母菌: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) 和白色念珠菌(*Candida albicans*)。

1.1.3 供试培养基: 麦芽浸汁培养基(MEA 培养基); 牛肉膏蛋白胨培养基(NA 培养基); 大米培养基。

1.2 菌株的分离、纯化以及鉴定

1.2.1 菌株的分离、纯化: 将昆虫黄蜻幼虫饥饿处理 24 h, 无菌水冲洗干净。75%的消毒酒精表面消毒 3 min, 无菌水清洗 3 次后解剖。将解剖后的肠道置于无菌研钵中, 加水, 充分研磨后稀释得到 10^{-1} 和 10^{-2} 的肠道稀释液。取 200 μ L 于加有抗生素(青霉素和氯霉素, 各 100 μ g/mL)的 MEA 培养基中, 涂布均匀, 于 28 °C 分离纯化培养, 转接入 MEA 斜面, 4 °C 保存。

1.2.2 菌株的鉴定: ①形态学特征观察: 将 QTYC38 接种于 MEA 培养基中, 28 °C 培养, 每天定时观察菌落的外部形态特征并利用显微镜观察该菌的菌丝、产孢结构及孢子形态。②分子生物学鉴定: 将培养好的 QTYC38 新鲜菌体作为 DNA 提取的材料, 按照生工 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取基因组 DNA。采用真菌通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAT TGATATGC-3'), 进行 PCR 扩增反应。PCR 反应程序为: 94 °C 2 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存。将 PCR 产物纯化后送往上海生工公司测序。将 QTYC38 菌株的核酸序列与 GenBank 中相关核酸序列进行 BLAST

比对,之后利用 MEGA 5.05 软件构建系统发育树,确定菌株的分类地位。

1.3 除草活性测定

将使用次氯酸钠溶液表面消毒后的种子置于 25 °C 的培养箱催芽备用,将粗提物、单体化合物和阳性对照药物(2,4-D)用丙酮配置成 100 µg/mL 的药液备用,吸取上述药液于铺有滤纸的直径为 9 cm 的培养皿中,待丙酮完全挥发后加入 5 mL 无菌水。空白对照用不含样品的丙酮做同样的处理;选取露白的种子(每皿 12–15 粒)置于培养皿中,培养 2–3 d,每个处理设置 3 个平行实验,4 d 后测量种子根长。幼根平均生长抑制率计算公式如下^[11]:
抑制率(%)=[(空白对照组平均根长–处理组平均根长)/空白对照组平均根长]×100。

1.4 抗菌活性测定

参考文献[12]中的琼脂扩散法测试 QTYC38 粗提物或单体化合物对酵母菌和致病细菌的抑制活性,参考文献[13]中的 96 孔板法进一步测定最小抑菌浓度(MIC);参考文献[12]中的生长速率法测试 QTYC38 单体化合物的抗植物致病真菌活性。

1.5 活性代谢产物的分离、纯化与鉴定

将 40 瓶大米培养基(每瓶 200 g)固体发酵培养的 QTYC38 发酵物使用乙酸乙酯浸泡,每次浸泡 3 h 后超声处理 30 min,过滤出浸泡液。反复几次,直至浸泡液的颜色变浅为止。合并浸泡液,真空减压旋转蒸发得到黄褐色颗粒状粗提物 56.4 g。将上述粗提物经硅胶色谱柱进行粗分离,得到 7 种不同极性的馏分。采用多种色谱分离方法分别对上述不同极性馏分进行再次分离,共得到 4 个单体化合物。用 Mariner System 5304 (美国 ABI 公司)质谱仪测定单体化合物的分子量。用 Bruker

AVANCE-600MHz 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司)对活性物质的 ¹H-NMR 和 ¹³C-NMR 谱进行测试。

2 结果和分析

2.1 QTYC38 的鉴定

在 MEA 培养基上, QTYC38 菌落生长缓慢且表面为白色,数天后颜色逐渐加深直至黄绿色,平坦或有少量不规则的沟纹,反面黄褐色,无渗出液,无气味;边缘白色、不整齐且有絮状的菌丝(图略);数天后可发现分生孢子结构,分生孢子头呈较疏松的短柱状(图 1)。参照文献[14]中描述, QTYC38 菌株的形态学特征与 *Neosartorya* 属的特征类似,因此将 QTYC38 菌株初步鉴定为 *Neosartorya* 属真菌。

通过测序可知 QTYC38 菌株的 5.8S rDNA 序列的长度为 575 个碱基对(GenBank 序列号: KM 103297)。在 NCBI 上通过 BLAST 分析比对, QTYC38 菌株与 *Neosartorya aureola*(序列号: EF669945.1)的相似度高达 99.6%,在系统发育树上处于同一分支(图 2)。因此,结合形态特征,将菌株 QTYC38 鉴定为浅黄新萨托菌 *Neosartorya aureola*。



图 1. 菌株 QTYC38 的分生孢子头形态(400×)
Figure 1. The conidial head morphology of strain QTYC38 (400×).

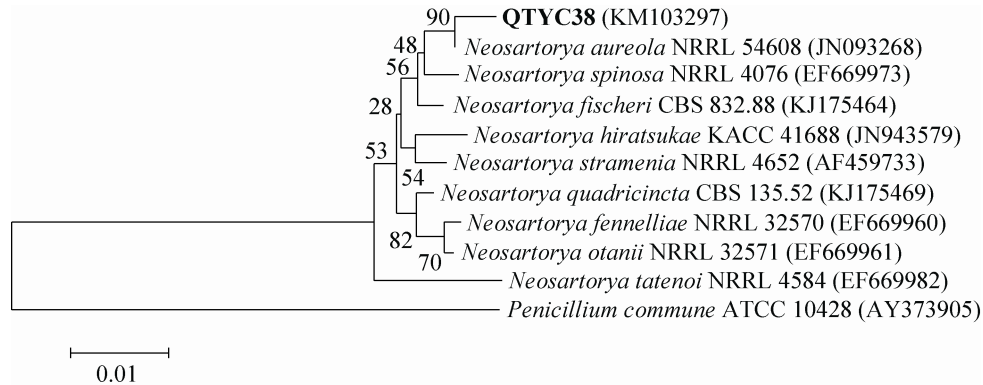


图 2. 基于真菌 QTYC38 5.8S rDNA 基因片段序列构建的系统发育树

Figure 2. Neighbour-joining phylogenetic tree of 5.8S rDNA-ITS sequences of QTYC38. Numbers in bracket represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.01 sequence divergence.

2.2 粗提物的除草活性

菌株 *N. aureola* QTYC38 的粗提物对反枝苋和稗草、供试农作物种子的生长抑制活性结果均如图 3 所示。由图可知，在测试浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 下，粗提物对反枝苋和稗草的生长抑制活性较好，

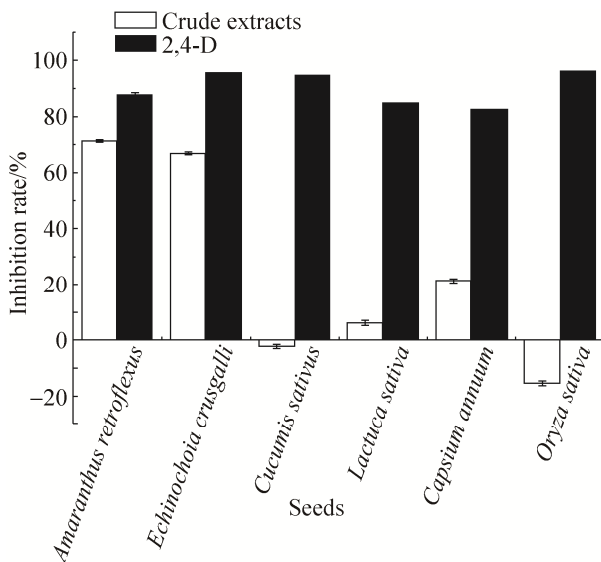


图 3. QTYC38 粗提物对供试杂草和作物的生长抑制活性(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Figure 3. Inhibitory activity of the QTYC38 crude extracts on the tested weeds and crops (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Results are means \pm SD of three parallel measurements.

抑制率均大于 65%。然而在同等浓度下对常见作物水稻(*O. sativa*)和黄瓜(*C. sativus*)的生长具有一定的促进作用，且对水稻(*O. sativa*)的促进作用较大；对莴苣(*L. sativa* L.)和辣椒(*C. annuum* L.)的生长抑制作用也较弱，抑制率不超过 21%。因此，菌株 QTYC38 粗提物具有较好的除草活性且对常见作物较安全。

2.3 粗提物的抗菌活性

菌株 *N. aureola* QTYC38 的粗提物对致病细菌的抑制活性如表 1 所示。由表 1 可知，当供试浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{滤纸片}$ 时，粗提物对金黄色葡萄球(*S. aureus*)有较好的抑菌活性，抑菌圈直径为 22.7 mm，与阳性对照药(硫酸庆大霉素，23.2 mm)抑菌圈直径相当。同时，粗提物对枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的生长也表现出中等强度的抑制活性，抑菌圈直径为 13.5 mm (阳性对照硫酸庆大霉素的抑菌圈直径为 32.1 mm)。结果表明，菌株 *N. aureola* QTYC38 的粗提物具有较好的抗细菌活性。

2.4 活性代谢产物的结构鉴定

通过综合运用各种色谱分离方法，从黄蜻幼

虫肠道分离菌 QTYC38 固体发酵物的乙酸乙酯粗提物中分离到 4 个次级代谢产物。采用质谱和核磁共振谱测试技术对单体化合物进行分析并参考相关文献, 4 个次级代谢产物分别被鉴定为 helvolic acid (**1**)、aromatic lactones (**2**)、questin (**3**) 和 ergosterol (**4**)(图 4)。

化合物 **1**: 白色絮状, 易溶于二氯甲烷。从质谱 ESI-MS 得出的准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 567.1297, 计算值 $C_{33}H_{43}O_8$ m/z 567.1258, 因此推测该化合物的分子式为 $C_{33}H_{44}O_8$ 。化合物 **1** 的波谱数据如下: 1H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.33 (d, $J = 10.1$ Hz, 1H), 5.90 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 5.88 (d, $J = 5.0$ Hz, 1H), 5.25 (s, 1H), 5.12 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H), 2.80 (dd, $J = 12.5, 6.7$ Hz, 1H), 2.63 (dd, $J = 13.2, 2.4$ Hz, 2H), 2.59 (s, 1H), 2.45 (d, $J = 3.3$ Hz, 1H), 2.43 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H), 2.30 (s, 1H), 2.27 (d, $J = 5.8$ Hz, 1H), 2.13 (s, 3H), 1.96 (s, 3H), 1.92 (s, 1H),

1.85 (s, 1H), 1.71 (s, 3H), 1.63 (s, 4H), 1.59 (d, $J = 3.4$ Hz, 1H), 1.47 (s, 3H), 1.30 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H), 1.20 (s, 3H), 0.94 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, $CDCl_3$) δ 208.77, 201.43, 174.50, 170.20, 168.93, 157.30, 147.81, 132.92, 130.31, 127.83, 122.77, 73.79, 73.48, 52.66, 49.43, 47.19, 46.57, 41.72, 40.65, 40.40, 38.17, 28.55, 28.35, 27.54, 25.93, 25.74, 23.92, 20.74, 20.49, 18.34, 17.95, 17.77, 13.10。以上波谱数据与文献[15]报道基本一致, 将该化合物鉴定为 helvolic acid。

表 1. QTYC38 粗提物对致病细菌的生长抑制活性
Table 1. Inhibitory activity of the QTYC38 crude extracts against pathogenic bacteria

| Pathogens | Inhibition zone/mm | |
|--------------------|--------------------|----------------|
| | Gentamycin sulfate | Crude extracts |
| <i>B. subtilis</i> | 32.1±0.7 | 13.5±0.6 |
| <i>S. aureus</i> | 23.2±1.0 | 22.7±1.0 |

Gentamycin sulfate as the positive control of pathogenic bacteria; the concentration for the test is 30 μ g/filter paper.

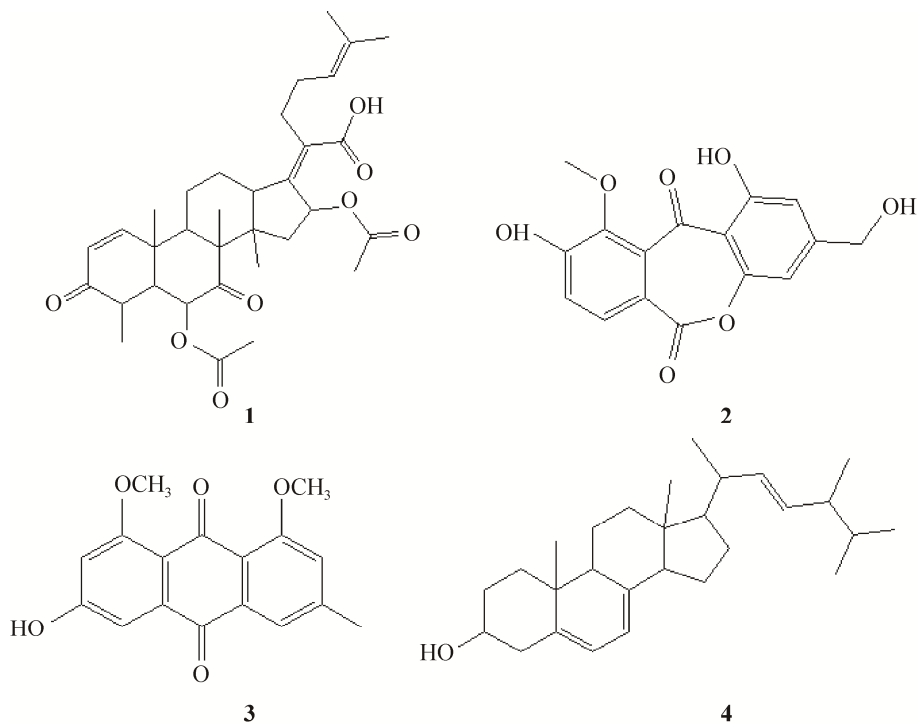


图 4. 化合物 1-4 的结构

Figure 4. The structure of compound 1-4.

化合物 **2**: 黄色粉末状, 溶于二甲基亚砷。从质谱 ESI-MS 得出的准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 315.0510, 计算值 $C_{16}H_{11}O_7$ m/z 315.0505, 因此推测该化合物的分子式为 $C_{16}H_{12}O_7$ 。化合物 **2** 的波谱数据如下: 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 12.21 (s, 1H), 10.47 (s, 1H), 7.65 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.49 (d, $J = 9.1$ Hz, 1H), 7.00 (s, 1H), 6.76 (s, 1H), 5.54 (s, 1H), 4.60 (s, 2H), 3.86 (s, 3H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 180.82, 167.26, 160.93, 156.00, 154.58, 151.18, 149.38, 125.81, 120.63, 117.69, 107.61, 107.08, 104.40, 62.81, 52.73。以上数据与文献[16]报道的数据基本一致, 将该化合物鉴定为 aromatic lactones。

化合物 **3**: 黄色絮状, 易溶于二氯甲烷。从质谱 ESI-MS 得出的准分子离子峰 $[M-H]^-$ m/z 283.0616, 计算值 $C_{16}H_{11}O_5$ m/z 283.0617, 因此推测该化合物的分子式为 $C_{16}H_{12}O_5$ 。化合物 **3** 的波谱数据如下: 1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ 13.24 (s, 1H), 7.43 (d, $J = 1.1$ Hz, 1H), 7.21 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.85 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H), 3.91 (s, 2H), 2.40 (s, 2H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, DMSO- d_6) δ 186.79, 182.76, 164.92, 163.91, 162.17, 147.07, 137.27, 132.50, 124.63, 119.57, 114.85, 113.12, 107.42, 105.44, 56.79, 21.84。以上数据与文献[17]报道的数据基本一致, 将该化合物鉴定

为 questin。

化合物 **4**: 白色粉末状, 易溶于二氯甲烷。从质谱 ESI-MS 得出的准分子离子峰 $[M+K]^+$ m/z 437.2153, 计算值 $C_{28}H_{46}OK$ m/z 437.3186, 因此推测该化合物的分子式为 $C_{28}H_{46}O$ 。化合物 **4** 的波谱数据如下: 1H NMR (600 MHz, Acetone- d_6) δ 5.55 (dd, $J = 5.6, 2.5$ Hz, 1H), 5.39 (dd, $J = 5.6, 2.8$ Hz, 1H), 5.27 (dd, $J = 13.0, 7.6$ Hz, 1H), 5.26 (s, 1H), 3.76 (s, 1H), 3.52 (s, 1H), 1.08 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.87 (d, $J = 2.9$ Hz, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.69 (s, 3H)。以上数据与文献[18]报道的数据基本一致, 将该化合物鉴定为 erogosterol。

2.5 单体化合物的生物活性

2.5.1 除草活性: 4种单体化合物的除草活性结果如表 2 所示。从该菌粗提物中分离得到的化合物都能在一定程度上抑制反枝苋和稗草幼根的生长, 但抑制活性较低, 当测试浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 抑制率为 6.0%–37.2%, 远远低于阳性对照 2,4-D 的除草活性(抑制率均为 80%左右)。

2.5.2 病原细菌和酵母菌的生长抑制活性: 采用琼脂扩散法和最小抑菌浓度(MIC)测试了4个单体化合物的抗病原细菌和酵母菌活性。由表 3 可知, 测试浓度为 30 μg /滤纸片时, 化合物 **1–4** 都能够一定程度上抑制枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)的生

表 2. 化合物对反枝苋和稗草幼根生长的抑制活性

Table 2. Inhibitory activity of compounds against the radical growth of *A. retroflexus* and *E. crusgalli* L.

| Compounds | <i>A. retroflexus</i> L. | | <i>E. crusgalli</i> L. | |
|--------------------|--------------------------|-----------------|------------------------|----------|
| | ARL ^a | IR ^b | ARL | IR |
| 1 | 15.8±1.6 | 12.5±2.4 | 8.7±0.5 | 37.2±0.3 |
| 2 | 16.9±2.1 | 6.0±1.8 | 12.3±0.5 | 11.5±2.3 |
| 3 | 15.5±0.7 | 14.1±2.8 | 12.5±0.7 | 10.3±2.7 |
| 4 | 14.4±0.6 | 20.5±2.3 | 12.9±1.0 | 6.8±2.7 |
| 2,4-D ^c | 2.3±0.4 | 87.1±1.7 | 2.8±0.4 | 79.6±2.1 |
| CK ^d | 18.1±3.9 | – | 13.9±0.7 | – |

^aARL means root average length/mm; ^bIR means inhibiting rate/%; 2,4-D means positive control; the concentration for the test is 100 $\mu\text{g/mL}$; CK means blank control; All results are means±SD of three parallel measurements.

表 3. 化合物对几种病原菌的生长抑制活性

Table 3. Inhibitory activity of compound against *C. albicans* and three pathogenic bacteria

| Compounds | <i>E. coli</i> | <i>C. albicans</i> | <i>B. subtilis</i> | <i>S. aureus</i> |
|-----------------|----------------|--------------------|--------------------|------------------|
| 1 | – | 9.7±0.3 | 18.1±0.3 | 15.8±0.7 |
| 2 | – | 8.1±0.5 | 11.5±0.4 | – |
| 3 | – | 9.6±0.7 | 11.5±0.6 | 7.1±0.2 |
| 4 | – | – | 11.6±0.5 | 7.0±0.2 |
| PC ^a | 19.9±0.2 | 19.1±0.3 | 24.7±0.5 | 19.6±0.7 |

Gentamycin sulfate and amphotericin as the positive control of pathogenic bacteria and *C. albicans* respectively; the concentration for the test is 30 µg/filter paper. All results are means±SD of three parallel measurements.

长。其中以化合物 1 的抑制活性最佳, 抑菌圈直径为 18.1 mm, 最小抑菌浓度测试表明其 MIC 值为 3.1 µg/mL。化合物 1、3、4 都能够一定程度上抑制金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的生长, 抑菌圈直径为 15.8 mm, MIC 值为 1.5 µg/mL; 除了化合物 4 以外, 其他化合物都对白色念珠菌(*C. albicans*)有着中等强度的生长抑制活性, 抑菌圈直径为 8.1–9.7 mm 之间。在同等供试浓度下, 待测化合物对大肠杆菌(*E. coli*)均未表现出生长抑制活性。

2.5.3 植物致病真菌的生长抑制活性: 4 种单体化合物的抗植物致病真菌活性如表 4 所示。由表 4 可知, 在测试浓度为 100 µg/mL, 化合物 3 对杨树溃疡病菌(*D. gregaria*)表现出中等强度的抑制活性, 抑制率为 52.4%; 化合物 4 对小麦赤霉病菌(*F.*

graminearum)具有较好的抑制作用, 抑制率为 71.3%; 而其他化合物对苹果树腐烂病菌(*V. mali*)、杨树溃疡病菌(*D. gregaria*)、小麦赤霉病菌(*F. graminearum*)和番茄早疫病菌(*A. solani*)生长抑制活性则较弱, 抑制率均不超过 40%。在同等实验浓度下, 化合物 1–4 对黄瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、苦瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *mornordicae*)、水稻稻瘟病菌(*M. oryzae*)和水稻纹枯病菌(*R. solani*) 4 种植物致病真菌抑制活性较弱。

3 讨论

本研究从黄蜻幼虫肠道中分离出一株具有生物活性的共生真菌 QTYC38。结合该菌的形态学特征和分子生物学特征, 最终将该菌鉴定为浅黄新萨托菌。活性测试发现其乙酸乙酯粗提物能够很好地抑制革兰氏阳性细菌的生长; 同时也能够有效抑制农业生产上两种主要杂草(反枝苋和稗草)的生长。在其粗提物中分离纯化得到 4 个具有生物活性的化合物。化合物 1 可以较好地抑制枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和金黄色葡萄球菌(*S. aureus*)的生长, 最小抑菌浓度分别为 3.1 和 1.5 µg/mL。化合物 3 对杨树溃疡病菌(*D. gregaria*)具有中等强度

表 4. 化合物对几种植物致病真菌的生长抑制活性

Table 4. Inhibitory activity of compound against plant pathogens

| Compounds | <i>V. mali</i> | | <i>D. gregaria</i> | | <i>F. gramineasun</i> | | <i>A. solani</i> | |
|-----------------|------------------|-----------------|--------------------|----------|-----------------------|----------|------------------|----------|
| | CAD ^a | IR ^b | CAD | IR | CAD | IR | CAD | IR |
| 1 | 26.5±1.1 | 25.2±2.3 | 20.8±2.2 | 36.5±1.9 | 23.5±0.9 | 19.3±0.6 | 20.7±1.0 | 15.1±1.3 |
| 2 | 23.2±2.2 | 36.6±0.9 | 27.4±4.7 | 9.9±3.4 | 25.5±0.8 | 10.2±2.4 | 21.1±0.6 | 13.1±1.4 |
| 3 | 28.6±1.7 | 17.7±0.9 | 16.8±1.1 | 52.4±2.9 | 23.5±0.5 | 19.0±2.2 | 20.4±1.0 | 16.8±2.4 |
| 4 | 24.6±1.9 | 31.8±1.9 | 27.8±2.3 | 8.3±2.6 | 11.6±0.4 | 71.3±1.7 | 19.1±1.3 | 23.9±2.2 |
| CK ^c | 33.7±3.8 | – | 29.9±3.1 | – | 27.9±0.8 | – | 23.5±0.9 | – |

^aCAD means colony average diameter/mm; ^bIR means inhibiting rate/%; CK means blank control; the concentration for the test is 100 µg/mL; All results are means±SD of three parallel measurements.

的抑制活性,抑制率为 52.4%;化合物 4 能够有效抑制小麦赤霉病菌(*F. graminearum*)的生长,抑制率为 71.3%。然而,我们并没有发现活性结果与粗提物初步测试结果相当的、能够很好抑制杂草生长的化合物。因此,我们推测活性强的化合物还没分离得到或粗提物的活性可能是由多种化合物综合作用的结果。虽有报道浅黄新萨托菌具有拮抗真菌活性^[19],但尚未见拮抗细菌和除草活性的报道。因此菌株 *N. aureola* QTYC38 在一定程度上具有开发为微生物源除草剂和杀菌剂的潜力,值得深入研究。至于该菌的活性作用机理、大田实验、活性化合物的生物安全性及其他活性化合物的分离,还有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Zhang CX, Ni HW, Wei SH, Huang HJ, Liu Y, Cui HL, Sui BF, Zhang M, Guo F. Current advances in research on herbicide resistance. *Scientia Agriculture Science*, 2009, 42(4): 1274–1289. (in Chinese)
张朝贤,倪汉文,魏守辉,黄红娟,刘延,崔海兰,隋标峰,张猛,郭峰. 杂草抗药性研究进展. *中国农业科学*, 2009, 42(4): 1274–1289.
- [2] Pirzad A, Jamali M, Zareh MA, Shokrani F. Effect of water extract originated from different parts of Russian knapweed (*Acroptilon repens* L.) on growth of *Amaranthus retroflexus* L. *International Journal of Agriculture*, 2012, 2(5): 589–594.
- [3] Zadeh A, Baghestani MMA, Barary M, Nejad AAN, Siahbidi MMP. Effect of planting pattern and plant density of maize (*Zea mays* L.) on the morphophysiological characteristics and growth indices of maize and redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus* L.) under competition conditions. *Iranian Journal of Crop Sciences*, 2012, 14(1): 44–57.
- [4] Petroski RJ, Stanley DW. Natural compounds for pest and weed control. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(18): 8171–8179.
- [5] 刘辉. 马陆共生放线菌及其抗真菌活性物质的分离鉴定. 东北农业大学硕士学位论文, 2015.
- [6] 程雷. 两种酵母对“红富士”苹果采后病害的生物防治研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2010.
- [7] Demirci F, Guven K, Demirci B, Dadandi MY, Baser KHC. Antibacterial activity of two *Phlomis* essential oils against food pathogens. *Food Control*, 2008, 19(12): 1159–1164.
- [8] Oroojalian F, Kasra-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami MR. Phytochemical composition of the essential oils from three *Apiaceae* species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food Chemistry*, 2010, 120(3): 765–770.
- [9] Negi PS. Plant extracts for the control of bacterial growth: efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology*, 2012, 156(1): 7–17.
- [10] Zhang YL, Kong LC, Jiang DH. Phytotoxic and antifungal metabolites from *Curvularia* sp. FH01 isolated from the gut of *Atractomorpha sinensis*. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3575–3577.
- [11] Tsao R, Romanchuk FE, Peterson CJ, Coats JR. Plant growth regulatory effect and insecticidal activity of the extracts of the tree of heaven (*Ailanthus altissima* L.). *British Medical Council Ecology*, 2002, 2(1): 1–6.
- [12] Lu YL, Li S, Zhou DX, Zhang YL. Isolation and identification of termitarium antagonistic actinomycetes BYC01 and its active metabolites. *Acta Microbiologica Sinica*, 2014, 54(7): 754–759. (in Chinese)
卢贻会,李帅,周端瑛,张应烙. 白蚁巢拮抗放线菌 BYC01 代谢产物的分离和鉴定. *微生物学报*, 2014, 54(7): 754–759.
- [13] Li S, Shao MW, Lu YH, Kong LC, Jiang DH, Zhang YL. Phytotoxic and antibacterial metabolites from *Fusarium proliferatum* ZS07 isolated from the gut of long-horned grasshoppers. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2014, 62(36): 8997–9001.
- [14] Kong HZ. Investigations on resources of cultural Hyphomycetes in Yunnan province IV. *Chinese Biodiversity*, 1996, 4(2):78–82. (in Chinese)
孔华忠. 云南省可培养丝孢真菌资源的调查研究(IV). *生物多样性*, 1996, 4(2): 78–82.
- [15] Qin L, Li BG, Guan JF, Zhang GL. Chemical study on *Aspergillus* sp.. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2007, 13: 66–68.
- [16] Marcia RC, Luiz CAB, Jose HQ, Oliver WH. Novel lactones from *Aspergillus versicolor*. *Tetrahedron Letters*, 2001, 42(5): 809–811.
- [17] Haruhiro F, Toshiyuki F, Emi O, Mikio Y. Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1999, 47(13): 1426–1423.
- [18] Xiao L, Liu HZ, Wu N, Liu M, Wei JT, Zhang YY, Lin XK. Characterization of the high cytochalasin E and rosellichalasin producing *Aspergillus* sp. nov. F1 isolated from marine solar saltern in China. *World Journal of Microbiology Biotechnology*, 2013, 29(1): 11–17.
- [19] Kaur A, Swenson DC, Wicklow DT, Gloer JB. New fiscalin, tryptoquivaline, and fumiquinazoline analogues from an endophytic isolate of *Neosartorya aureola*. *Planta Medica*. 2013, 79(10): 852–852.

Isolation and identification of bioactive secondary metabolites produced by strain QTYC38, a fungus isolated from the gut of *Pantala flavescens* larvae

Xiao Xu^{1#}, Yihui Lu^{1#}, Yinglao Zhang^{1,2*}

¹ College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang Province, China

² Key Laboratory of Wildlife Biotechnology and Conservation and Utilization of Zhejiang Province, Jinhua 321004, Zhejiang Province, China

Abstract: [Objective] To identify strain QTYC38, a fungus isolated from the gut of *Pantala flavescens* larvae, and study its phytotoxic and antimicrobial metabolites. [Methods] QTYC38 was identified by morphological observation and molecular biological analysis. Growth rate method and agar disc diffusion assays were used to test the antimicrobial activities. Petri-dish bioassay was used to test the phytotoxic activity. Bioactive components were isolated via chromatographic methods, and the structures were determined by mass spectrum and nuclear magnetic resonance analyses. [Results] QTYC38 was identified as *Neosartorya aureola*. Ethyl acetate extract of QTYC38 inhibited radical growth of *Echinochloa crusgalli* and *Amaranthus retroflexus* with the inhibition rates above 65% with the concentration of 100 µg/mL. The extract also inhibited *Staphylococcus aureus* with the mean halo diameter of 22.7 mm with the concentration of 30 µg/filter. Four compounds were purified from the solid fermentation product: helvolic acid, aromatic lactones, questin and ergosterol. Helvolic acid inhibited the growth of *Bacillus subtilis* and *S. aureus* with the MIC values of 3.1 and 1.5 µg/mL, respectively. Questin and ergosterol inhibited *Dothiorella gregaria* and *Fusarium graminearum* at the concentration of 100 µg/mL, with the inhibition rates of 52.4% and 71.3%, respectively. [Conclusion] Strain QTYC38 could be potentially developed as a microbial herbicide and new antimicrobial agent.

Keywords: *Pantala flavescens* larvae, *Neosartorya aureola*, active ingredient, microbial herbicides, microbicide agent

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21272215) and by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY17C010002)

*Corresponding author. Tel: +86-579-82286419; E-mail: ylzhang@zjnu.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 11 December 2016; Revised: 18 February 2017; Published online: 28 February 2017