

一株牛蒡共生真菌杀虫活性的研究

李 昉*, 杜方鹏

青岛科技大学化学与分子工程学院, 青岛 266042

摘要: 为寻找新型微生物农药, 对分离自牛蒡茎的一株共生真菌 NJ-1 菌丝体和发酵液粗提物分别进行杀虫活性研究。采用组织块法从健康牛蒡植物的茎中进行菌株分离; 采用卤虫作为生物模型进行杀虫活性物质的筛选。通过 PCR 扩增鉴定真菌 NJ-1 为四孢脉孢菌 (*Neurospora tetrasperma*); 该真菌菌丝体和发酵液粗提物对卤虫的半数致死量 (LD₅₀) 分别是 0.84 mg/mL 和 0.27 mg/mL; 经与三种常见化学农药氯氰菊酯、敌敌畏和氧乐果对卤虫半数致死量对比, 该真菌发酵液粗提物 LD₅₀ 是对照组活性最好的敌敌畏 LD₅₀ 的 2.3 倍。牛蒡共生真菌 NJ-1 粗提代谢物具有很强的杀虫活性, 可为新型微生物农药开发提供生物来源。

关键词: 牛蒡; 共生真菌; 四孢脉孢菌; 卤虫; 半数致死量

中图分类号: Q939

文献标识码: A

Study on Insecticidal Activity of a Symbiotic Fungi from *Arctium lappa* L.

LI Fang*, DU Fang-peng

College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China

Abstract: To develop a new microbial pesticide, a symbiotic fungi named as NJ-1 was isolated from the stem of *Arctium lappa* L. and the extracts from the mycelium and the fermentation broth were studied in terms of insecticidal activity. The fungus was isolated from stems of health *A. lappa*, and the crude extracts were obtained by purification and fermentation. Brine shrimp was used as a biological model to screen substance with the insecticidal activity. NJ-1 was identified to be *Neurospora tetrasperma*. The median lethal dose LD₅₀ of the extracts from the mycelium and the fermentation broth were 0.84 mg/mL and 0.27 mg/mL respectively. The activity of the extract from NJ-1 fermentation broth was 1.3 times greater than DDVP when compared with three kinds of chemical pesticides (cypermethrin, DDVP and omethoate). NJ-1 had significant insecticidal activity to brine shrimp, which may provide a new biological resource to explore new microbial insecticide.

Key words: *Arctium lappa* L.; symbiotic fungi; *Neurospora tetrasperma*; brine shrimp; LD₅₀

为挽救虫害对粮食造成的损失, 化学农药的使用确实起到了立竿见影的效果, 但同时也给人类及环境带来了不可忽视的负面影响。由于化学农药的难降解性, 直接渗透到土壤、水体及农产品的农药达 70% 至 80%, 对生态环境及人类健康具有严重持续的危害^[1]。同时化学农药的长期大量使用也使得具有抗药性的害虫数量逐年增加。为解决上述问题, 具有低毒低残留、高效高特异性、易降解、易与环境兼容的生物农药成为了现在农药的研究热点。而杀虫效果较好的微生物农药成为了生物农药的主要研究方向^[2], 目前市场上应用最多的微生物农药有

Bt^[3]、阿维菌素、多杀菌素^[4]等, 其中阿维菌素和多杀菌素都是菌类发酵得到的杀虫抗生素。

牛蒡 (*Arctium lappa* L.), 又名白肌人参、牛菜、大力子等, 属于菊科牛蒡属、直根系二年生草本植物, 药食兼用。近年来, 研究报道表明牛蒡具有抗菌^[5]、抗病毒^[6]、抗突变及防癌^[7]、抗氧化^[5]、抗疲劳^[6]、增强免疫功能、降血糖和降血脂^[7]等药理作用, 但对牛蒡共生真菌及其共生真菌提取物的活性鲜有报道。本实验从牛蒡中分离出一株共生真菌, 并对该真菌菌丝体及发酵液粗提物进行杀虫活性研究。

卤虫 (brine shrimp) 又名盐水丰年虫, 是一种耐高盐的水生生物。卤虫 II-III 期无节幼虫 (接触毒物 24~48 h) 对活性物质敏感^[8], 而且由于其个体微小、检测快速、操作简单等优点, 国内很多实验室将

收稿日期: 2014-03-31 接受日期: 2014-06-11

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (BS2012N Y002); 青岛市科技计划基础研究项目 (1314144-JCH)

* 通讯作者 Tel: 86-015269258418; E-mail: fangli@qust.edu.cn

卤虫作为生物模型进行杀虫活性筛选^[9]。本实验将卤虫作为靶标生物,对真菌粗提代谢物进行杀虫活性检测。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛蒡(*Arctium lappa* L.):采自安丘牛蒡种植基地。卤虫(brine shrimp):其休眠卵由中国科学院烟台海岸带研究所提供。实验仪器:VD-850型桌上式洁净工作台,苏州净化设备有限公司;DNA提取试剂盒,天根生化科技有限公司;电热恒温培养箱DNP-9052BS-Ⅲ,上海新苗医疗器械制造有限公司;氯氰菊酯,北京顺意生物农药厂;敌敌畏和氧乐果,山东大成农药股份有限公司;DMSO,分析纯,天津市凯通化学试剂有限公司;其它化学试剂均为重蒸分析纯。

分离培养基:土豆 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,Na₂HPO₄ 2 g,MgSO₄ 0.5 g,VB1 10 mg,链霉素 0.5 mg,自来水定容至 1000 mL。自然 PH 值。115 °C 灭菌 30 min。发酵培养基:土豆 200 g,葡萄糖 20 g,酵母浸膏 5 g,蛋白胨 3 g,自来水定容至 1000 mL。自然 PH 值。115 °C 灭菌 30 min。

1.2 牛蒡共生真菌的分离纯化

1.2.1 牛蒡共生真菌的分离

将牛蒡样品用无菌水冲洗 3 次,去除表面杂质。然后用 70% 的乙醇浸泡 30 s,做表面消毒,再用无菌水洗净残留乙醇。用无菌刀片于无菌玻璃片上切开牛蒡活体,暴露出切口。切取小块内部组织,挑取形态完好、健康的组织,放入培养基平板,将切口与培养基表面相接,于 25 °C 恒温箱培养 5 d。牛蒡组织切口与培养基接触的地方长出的菌落即为牛蒡的共生真菌。

1.2.2 共生真菌的纯化

采用分区划线法将分离出的真菌用接种环在无菌平板上接种。于 25 °C 恒温箱培养。反复接种直至得到纯种真菌,纯化好的平板留作种子板备用。

1.3 真菌分子鉴定

利用 DNA 提取试剂盒提取 DNA,选用真菌 ITS 序列通用引物对 ITS1(TCCGTAGGTGAACCTGCGG)和 ITS4(TCCTCCGCTTATTGATATGC)做引物。PCR 扩增交由中国水产科学研究院完成。PCR 产物的纯化和测序交由华大基因完成。所得测序结果与 GenBank 数据库中相关真菌的 18S rDNA 序列进行

比对分析。

1.4 牛蒡共生真菌粗提物的提取

1.4.1 共生真菌的发酵

将种子板切块放入装有 300 mL 发酵培养液的三角烧瓶中发酵培养 20 d。发酵 10 瓶。

1.4.2 共生真菌次级代谢产物的提取

用滤网分离菌丝体和发酵液,发酵液用等体积的乙酸乙酯萃取三次;菌丝体烘干后,用研钵研碎,并用 250 mL 乙酸乙酯浸泡 48 h。分别将提取液蒸去溶剂,得到粗提物。

1.5 杀虫活性测试

1.5.1 卤虫孵化

取适量保存于 4 °C 冰箱中的卤虫虫卵,投入经灭菌过滤处理过的 500 mL 海水中,置于 25 °C 水浴中孵化 48 h,持续通空气,得到卤虫幼虫悬浮液备用。

1.5.2 杀虫活性测试方式

取卤虫幼虫悬浮液 200 (L,加入到 96 孔板中,每个孔含有卤虫 14 ~ 16 条。将样品配制成系列浓度梯度 (mg/mL): 0.047、0.095、0.191、0.238、0.429、0.476、0.714、0.762、0.857、0.952、1.191、1.429、1.667、1.905。每孔加入 10 (L 样品。每个浓度作 6 个平行,并做海水和 5% DMSO 溶液作为空白对照。置于 25 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后记录死亡卤虫个数,利用公式(a)^[10]计算死亡率。

校正死亡率% =

$$\frac{\text{处理组死亡率} - \text{对照组死亡率}}{1 - \text{对照组死亡率}} \times 100\% \quad (\text{a})$$

2 结果与分析

2.1 牛蒡共生真菌 NJ-1 菌落描述及其 ITS 鉴定

该真菌菌落为分生孢子团少而松,呈淡鲑鱼肉色。取真菌 NJ-1 菌丝体加入液态氮研磨至粉末状,进行基因组 DNA 提取,ITS 序列 PCR 扩增,扩增后产物送至华大基因测序,测序结果与 GenBank 数据库进行同源性比较分析,比较结果显示菌株 NJ-1 属于 *Neurospora* 属,与其最近的为四孢脉孢菌(*Neurospora tetrasporuma*)最大相似度为 100%,故可将真菌 NJ-1 定名为四孢脉孢菌(*Neurospora tetrasporuma*)。该菌株基因序列在 Genbank 上的序列号为 KF999642。保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期:2013 年 7 月 16 日,保藏号:CCTCC M 2013346。

2.2 杀虫活性测试结果

2.2.1 海水和 DMSO 空白对照组杀虫活性结果

24 h 后海水和 DMSO 空白对照组卤虫死亡率为 0。

2.2.2 农药杀虫活性结果

按 1.4.2 中卤虫活性测试方法,根据公式(a)计算校正死亡率,三种常见农药杀虫活性结果如表 1 所示。

表 1 三种农药杀虫活性结果

Table 1 The insecticidal activities of three chemical pesticides

氯氰菊酯 Cypermethrin		敌敌畏 DDVP		氧乐果 Omethoate	
浓度 Concentration (mg/mL)	校正死亡率 Corrected mortality (%)	浓度 Concentration (mg/mL)	校正死亡率 Corrected mortality (%)	浓度 Concentration (mg/mL)	校正死亡率 Corrected mortality (%)
0.20	18.21	0.52	47.23	0.80	10.98
0.25	25.12	0.65	62.01	1.99	23.14
0.33	32.28	0.77	49.44	3.96	35.70
0.50	51.06	0.97	70.30	7.84	60.77
0.99	61.62	1.29	92.68	36.36	98.93
1.96	76.64	1.55	95.27	200.00	100.00
9.10	83.28	-	-	-	-
50.00	96.42	-	-	-	-

注:-表示未做该浓度的活性实验。

Note:- represents not determined.

2.2.3 NJ-1 次级代谢产物杀虫活性结果

共生真菌 NJ-1 的菌丝体及发酵液粗提物用 DMSO 助溶,再用无菌海水配制成 14 个浓度梯度的样品,每份样品 DMSO 含量为 5%,按 1.4.2 杀虫活性测试方法,根据公式(a)计算校正死亡率,该菌粗

表 2 NJ-1 菌丝体及发酵液粗提物杀虫活性结果

Table 2 The insecticidal activity of the crude extracts from NJ-1 mycelium and fermentation broth

浓度 Concentration (mg/mL)	NJ-1 菌丝体 (校正死亡率) Mycelium of NJ-1 (Corrected mortality%)	NJ-1 发酵液 (校正死亡率) Fermentation broth of NJ-1 (Corrected mortality%)
0.05	11.31%	6.84%
0.10	-	18.34%
0.19	-	30.37%
0.24	22.51%	45.00%
0.43	-	54.16%
0.48	34.11%	66.69%
0.71	44.81%	-
0.76	-	76.54%
0.86	-	84.73%
0.95	53.45%	98.81%
1.19	54.67%	100.00%
1.43	65.20%	100.00%
1.67	74.24%	100.00%
1.91	80.82%	100.00%

注:-表示未做该浓度的活性实验。

Note:- represents not determined.

提代谢物杀虫活性测试结果如下表 2 所示。

从表 2 可以看出 NJ-1 菌丝体及发酵液粗提物加样浓度与卤虫死亡率大致成正比关系。而且发酵液乙酸乙酯提取物在加样浓度为 1.19 mg/mL 左右时应该与表一致,卤虫死亡率已经达到 100.00%,说明 NJ-1 的次级代谢产物具有很强的杀虫活性。从表中还可以看出 NJ-1 发酵液粗提物的杀虫活性明显要高于菌丝体粗提物杀虫活性,说明真菌将在体内合成具有杀虫活性次级代谢产物后,将活性物质释放到体外。

2.3 真菌 NJ-1 次级代谢产物与常见化学农药杀虫活性的对比

所得到的校正死亡率数据经 Bliss 方法的计算软件得到 LD₅₀ 值(见表 3)。对应的半数致死量 LD₅₀ 的柱状图见图 1。

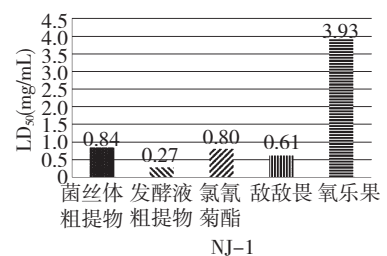


图 1 NJ-1 次级代谢产物与三种农药的 LD₅₀ 值

Fig. 1 The LD₅₀ of NJ-1 secondary metabolites and pesticides

表3 NJ-1(菌丝体/发酵液)粗提取物与三种化学农药的LD₅₀值Table 3 The LD₅₀ of NJ-1 crude extract (fungal mycelium and fermentation broth, respectively) and three chemical pesticides

样品 Sample	NJ-1 菌丝体粗提取物 Crude extract of mycelium from NJ-1	NJ-1 发酵液粗提取物 Crude extract of fermentation broth from NJ-1	氯氰菊酯 Cypermethrin	敌敌畏 DDVP	氧乐果 Omethoate
LD ₅₀ (mg/mL)	0.84	0.27	0.80	0.61	3.93

由图1可以得出: NJ-1 菌丝体乙酸乙酯提取物的杀虫活性明显低于发酵液的乙酸乙酯提取物的杀虫活性; NJ-1 发酵液的粗提取物的杀虫活性明显优于常见农药, 而菌丝体粗提取物的杀虫活性也达到了如敌敌畏等高毒农药的水平。

3 讨论

从牛蒡中分离纯化出菌株 NJ-1, 通过 ITS 序列检测, 鉴定菌株 NJ-1 为四孢脉孢菌 (*Neurospora tetrasporuma*)。同属于脉孢菌属 (*Neurospora*) 的粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 是天然纤维素降解真菌, 具有产纤维素酶能力^[11]。其出色的纤维素降解及其产黑色素^[12]的能力得到国内外研究者的关注。本论文首次报道了四孢脉孢菌 (*Neurospora tetrasporuma*) 次级代谢产物杀虫活性的研究结果, 为脉孢菌属的进一步开发利用提供了理论基础。

生物共生 (symbiosis) 是自然界非常普遍的现象, 真菌共生于植物体, 其之间的协同作用形成的共生体可以为两者提供生物保护, 使得两者共同适应恶劣的环境而繁衍生存。牛蒡主要生长于海滨盐碱地, 具有耐盐习性。四孢脉孢菌 (*Neurospora tetrasporuma*) 共生于牛蒡茎部组织内部, 理论上也增加了牛蒡自身的抗虫性。基于牛蒡与其共生真菌之间互利共生的微妙生态关系, 牛蒡在为该菌提供生存环境的同时, 该菌是否为牛蒡提供水分、营养盐、生长激素及微量元素等^[13]值得进一步研究。

对其菌丝体与发酵液粗提取物进行杀虫活性检测, 得到 LD₅₀ 值分别为 0.84 mg/mL 与 0.27 mg/mL。并与三种市场上常见的农药杀虫活性作对比, 发现菌株 NJ-1 次级代谢产物的杀虫活性达到化学农药水平, 其中发酵液粗提取物的杀虫活性明显优于高毒的敌敌畏, 并且毒性相当于低毒的氧乐果的 14.8 倍。微生物农药较化学农药有着诸多优点。首先微生物农药活性成分复杂, 药效作用位点多, 使害虫不易产生抗药性; 其次, 微生物农药的活性成分是微生物体内在相关酶的催化下, 经过一系列生物化学途径合成的, 自然界有其顺畅的降解途径, 不会

破坏生态平衡, 而且降解时间短, 特别适用于蔬菜水果等被人类直接食用的农产品, 对人畜无害。同时微生物农药生产工艺简单, 成本低。牛蒡共生真菌 NJ-1 具有很强的杀虫活性, 是一种良好的微生物杀虫剂的来源。

参考文献

- 1 Wang YX(王玉霞), Zhao XX(赵晓宇), Zhang XC(张先成), et al. The pollution of chemical pesticides to the environment and bioremediation measures. *Terr Nat Res Study* (国土与自然资源研究), 2008, 4: 69-70.
- 2 Zeng Z(曾智), Sun YJ(孙运军), Qian RH(钱荣华), et al. Present situation and prospect of microbial pesticide research and application in China. *Reas Agric Modern* (农业现代化研究), 2008, 29: 254-256.
- 3 Kumar S, Chandra A, Pandey KC. Bacillus thuringiensis (Bt) Transgenic crop: an environment friendly insect-pest management strategy. *J Environ Biol*, 2008, 29: 641-653.
- 4 Wang D(王东), Ren XX(任学祥), Zhang XF(张晓芳). Research progress on resistance and its mechanism of spinosad. *World Pest* (世界农药), 2009, 31: 7-10.
- 5 Lin XZ(林学政), Liu CY(柳春燕), Chen KS(陈靠山), et al. Extraction and content comparison of chlorogenic acid in *Arctium lappa* L. leaves collected from different terrain and its restraining bacteria test. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16: 328-330.
- 6 Guo M(郭敏), Chen KS(陈靠山). Study on the antifatigue effect of Burdock Fructooligosaccharide in mice. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2007, 19: 642-644.
- 7 Xu ZH(徐朝晖), Zhao AH(赵爱华), Gao XF(高先富), et al. Chemical constituents of antihyperglycemic active fraction from *Arctium lappa* L. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2006, 4: 444-447.
- 8 Zhang S(张爽), Pan HQ(潘华奇), Ren DM(任大明), et al. Identification and preliminary study on active substance of a marine bacterium B177. *J Shenyang Agric Univ* (沈阳农业大学学报), 2011, 42: 329-334.
- 9 Pan YD(潘云娣), Yang WG(杨文鸽), Hou WP(侯温甫). Screening and identifying of marine actinomycetes producing substance with insecticidal activity. *Mar Sci Bull* (海洋通报), 2006, 25: 92-95.