



单体江, 段志豪, 吴春银, 李志强, 王松, 毛子翎. 杜比亚蟑螂共生真菌次生代谢产物及其生物活性 [J]. 环境昆虫学报, 2020, 42 (1): 170–179.

杜比亚蟑螂共生真菌次生代谢产物及其生物活性

单体江¹, 段志豪^{1*}, 吴春银¹, 李志强², 王松¹, 毛子翎^{1**}

(1. 华南农业大学林学与风景园林学院, 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室, 广州 510642;

2. 广东省生物资源应用研究所, 广州 510260)

摘要: 为探究杜比亚蟑螂体内共生真菌种类, 测定共生真菌次生代谢产物的抑菌活性和抗氧化活性, 筛选出具有抗菌和抗氧化活性的菌株, 本研究采用组织块分离法分离杜比亚蟑螂体内的共生真菌, 通过形态学和分子生物学相结合的方法对分离到的共生真菌进行鉴定; 分别采用薄层层析-生物自显影法和 DPPH 法测定共生真菌次生代谢产物的抗菌活性和抗氧化活性。结果表明, 从杜比亚蟑螂体内共分离鉴定得到 5 种不同的共生真菌, 主要分布于青霉属 (1 株)、曲霉属 (3 株) 和聚孢霉属 (1 株)。活性测定的结果表明, 菌株 Bdf-2、Bdf-4 和 Bdf-5 表现出较好的抗菌活性, 且菌液提取物的抗菌活性要强于菌丝。Bdf-1, Bdf-2 和 Bdf-3 菌液次生代谢产物表现出抗氧化活性, IC₅₀ 值分别为 0.26 mg/mL、2.20 mg/mL 和 0.75 mg/mL。杜比亚蟑螂共生真菌以青霉属和曲霉属为主, 且具有抗菌和抗氧化活性的次生代谢产物主要分布于菌液中。

关键词: 杜比亚蟑螂; 共生真菌; 次生代谢产物; 抗菌活性; 抗氧化活性

中图分类号: Q968.1; S476

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2020) 01-0170-10

Secondary metabolites of symbiotic fungi isolated from *Blaptica dubia* and their biological activities

SHAN Ti-Jiang¹, DUAN Zhi-Hao^{1*}, WU Chun-Yin¹, LI Zhi-Qiang², WANG Song¹, MAO Zi-Ling^{1**}

(1. Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangzhou 510260, China)

Abstract: This study was to explore the species of symbiotic fungi in *Blaptica dubia*, determine the antibacterial and antioxidant activities of secondary metabolites extracted from symbiotic fungi, and screen the strains with antibacterial and antioxidant activities. Tissue block separation method was used for the isolation of symbiotic fungi in *B. dubia*. Morphology observation associated with molecular biology assay was used for the identification of symbiotic fungi isolated from *B. dubia*. The antibacterial activity of the secondary metabolites produced by symbiotic fungi was determined by Thin Layer Chromatography-Bioautography assay and the antioxidant activity was determined by a microplate spectrophotometric method based on the reduction of DPPH. Five strains in total were identified from *B. dubia*. The symbiotic fungi were mainly distributed in *Penicillium* sp. (1 strain), *Aspergillus* sp. (3 strains) and *Clonostachys* sp. (1 strain). The results showed that Bdf-2, Bdf-4 and Bdf-5 displayed good antibacterial activities, and the

基金项目: 广东省科学院科技发展专项 (2017GDASCX-0107); 广东省自然科学基金 (2017A030313200); 国家青年自然科学基金 (31400544)

作者简介: 单体江, 男, 1983 年生, 讲师, 博士, E-mail: tjshan@scau.edu.cn

* 共同第一作者: 段志豪, 男, 1996 年生, 硕士研究生, E-mail: zhduan@stu.scau.edu.cn

** 通讯作者: 毛子翎, 女, 1988 年生, 博士, 副教授, E-mail: zlmiao@scau.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-12-11; 接受日期 Accepted: 2019-05-09

antibacterial activities of extracts from broth were stronger than that of mycelia. Bdf-1, Bdf-2 and Bdf-3 broth extracts also showed better antioxidant activities, and the IC_{50} values were 0.26 mg/mL, 2.20 mg/mL and 0.75 mg/mL, respectively. *Penicillium* and *Aspergillus* species were the main symbiotic fungi of *B. dubia*, and the secondary metabolites with antibacterial and antioxidant activities were mainly distributed in the broth.

Key words: *Blaptica dubia*; symbiotic fungi; secondary metabolites; antibacterial activity; antioxidant activity

杜比亚蟑螂 *Blaptica dubia* 又名度比亚大蠊、度比亚蟑螂, 属蜚蠊目 Blattaria、蜚蠊科 Blattellidae 碧蠊属 *Blaptica* 卵胎生昆虫 (Wu *et al.*, 2013), 主要分布于中美洲、南美洲, 属于卫生害虫 (Alamer *et al.*, 2014a; 2014b)。杜比亚蟑螂体内的蛋白质含量丰富, 现多用于爬行动物和两栖动物的活体饲料, 为开发潜力较大的资源昆虫之一 (Yi *et al.*, 2013; Tian *et al.*, 2016)。杜比亚蟑螂产生的几丁质、抗菌肽和壳聚糖等已用于生产医药保健品、化妆品等 (章敏等, 2012)。随着昆虫体内微生物研究方法的不断改善, 其体内大量的共生真菌不断被人们所认知 (戈惠明等, 2009; Tee *et al.*, 2015)。昆虫体内微生物参与到昆虫生活的许多方面, 包括昆虫的生理和进化, 协助肠道消化食物, 改善宿主营养, 有利于种间种内通讯, 抵御捕食者、病原菌以及寄生虫的入侵等 (Crotti *et al.*, 2012; Engel *et al.*, 2013)。昆虫共生真菌及其产生的次生代谢产物类型丰富、结构新颖、抗性较好, 是目前国内外研究的重点 (汪福源等, 2017)。从棉蝗肠道菌 *Phoma* sp. 中分离得到化合物 epoxydon 6-methylsalicylateester, 具有中等的免疫抑制活性和较强的除草活性 (张应烙等, 2010); 从菜粉蝶肠道中分离得到的共生真菌 *Alternaria* sp., 发酵培养后得到 7 种对酪氨酸激酶具有不同程度抑制活性的次生代谢产物 (郭玲芝等, 2014)。

目前关于蜚蠊科共生真菌的研究报道较少, 从德国小蠊 *Blattella germanica* 肠道和粪便中分离出 22 株具有抗真菌活性和产铁能力的菌株, 表明肠道菌群对保护蟑螂免受真菌侵染和定植有重要作用 (Zhang *et al.*, 2018)。从美洲大蠊 *Periplaneta americana* 体内分离出假丝酵母、曲霉和红曲霉等 23 种真菌 (Kassiri *et al.*, 2018), 此外, 美洲大蠊的甲醇提取物含有甾醇类和具有抗菌活性的异黄酮类化合物 (尹卫平等, 2012)。然而尚未见杜比亚蟑螂共生真菌及其次生代谢产

物的研究。杜比亚蟑螂体内是否存在共生真菌, 共生真菌种类以及共生真菌次生代谢产物的生物活性等问题值得研究和探讨。本论文以杜比亚蟑螂为研究对象, 分离并鉴定其中的共生真菌, 通过发酵培养提取共生真菌的次生代谢产物, 并测定其抗菌和抗氧化活性, 以期为杜比亚蟑螂及其共生真菌的综合开发与利用提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

杜比亚蟑螂 *Blaptica dubia* 于 2016 年 11 月 30 日购自青岛连万家杜比亚专卖店。

1.2 仪器与试剂

SW-CJ-2G 型超净工作台 (苏州净化设备有限公司); LRH 系列生化培养箱 (上海一恒科学仪器有限公司); ZF-2 型三用紫外仪 (上海安亭科学仪器有限公司); HQ45 恒温摇床 (中国科学院武汉科学仪器有限公司); BCD-280W 医用冷藏箱 (海尔生物医疗有限公司); 旋转蒸发仪 OSB-2100 (东京理化器械株式会社); DSX-280KB30 手提式压力蒸汽灭菌器 (上海申安医疗器械厂); Exceed-C 超纯水机 (成都唐氏康宁科技发展有限公司); JA2003N 分析天平 (上海精密科学仪器有限公司); DIS-2012R 全温振荡摇床 (上海世平实验设备有限公司); LC-16 高效液相色谱 (日本岛津); Thermo Varioskan TMLUX 多功能酶标仪 (赛默飞世尔科技有限公司)。

乙酸乙酯、无水乙醇、二氯甲烷等均为分析纯 (天津富宇精细化工厂); 分析纯甲醇 (天津富宇精细化工厂); 色谱纯甲醇 (上海星可高纯溶剂有限公司); 升汞 (广逸化工有限公司); GF254 薄层层析硅胶 (青岛海洋化工厂); 羧甲基纤维素钠 (国药集团化学试剂有限公司); 噻唑蓝 (MTT) 生物显色剂 (Amresco 公司); 硫酸链霉素 (美国 Sigma 公司, 99%)。

1.3 共生真菌的分离和纯化

共生真菌的分离参照 Shan 等 (2012) 的方法。将活体杜比亚蟑螂用清水清洗 20 min, 晾干。先用 75% 乙醇处理 30 s, 再用 0.2% 氯化汞处理 20 min, 而后用无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min, 最后置于无菌滤纸上晾干。去除杜比亚蟑螂的翅、足和头胸部, 将蟑螂的腹部剖开后放置在 PDA 培养基平板中 (含 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的硫酸链霉素), 在 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内暗培养。待共生真菌长出后, 从每个菌落的边缘挑取少量菌丝接种到新的 PDA 培养基上, 连续纯化多次, 直至菌落形态均匀一致为止。将分离纯化得到的杜比亚蟑螂共生真菌依次编号为 Bdf-1 ~ Bdf-5。将纯化好的共生真菌接种到 PDA 斜面上, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 备用。共生真菌分离频率 (CF) 的计算公式如下:

$$\text{CF 值}(\%) = \frac{\text{分离出共生真菌的组织块数}}{\text{总组织块数}} \times 100$$

1.4 共生真菌的鉴定

1.4.1 共生真菌的形态学鉴定

将共生真菌菌株接种于 PDA 平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 5 ~ 10 d, 观察、记录菌落形态并拍照, 并在光学显微镜下观察菌丝形态和产孢情况, 记录菌丝有无隔膜以及孢子的大小等。

1.4.2 共生真菌的分子生物学鉴定

参照宋慧云等 (2018) 的方法对分离到的共生真菌进行鉴定。将纯化后的菌株 (在 PDA 平板上生长 5 d) 接种到 PDB 培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 150 rpm 振荡培养 6 ~ 7 d, 减压抽滤后获得其菌丝。用液氮将菌丝充分研磨至粉末状, 采用试剂盒法 (上海生工 DNA 抽提取试剂盒) 提取其 DNA。使用真菌通用引物 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') 和 ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAA GG-3') 扩增其 ITS 序列, PCR 反应体系 (50 μL): 2 \times Taq PCR Master Mix (含染料) 25 μL , ITS4 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL , ITS5 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL , DNA 模板 (10 ng/ μL) 2 μL , 双蒸水 21 μL , 混匀。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 40 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min 20 s, 共 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序。所得序列使用 DNAMAN 软件进行互补拼接, 将正向与反向引物互补序列两端加上引物序列拼接成完整序列, 所得的 rDNA-ITS 序列提交到 GenBank 数据库, 获得其登录号。

将扩增所得的 rDNA-ITS 序列在 NCBI 网站上 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 进行 Blast, 在 GenBank 数据库中进行同源性检索, 下载与其相似性较高的序列及其近似属的序列, 通过 MAFFT version 7 处理后, 使用 MEGA 7.0.26 软件采用最大似然法构建系统发育树, 其中 Bootstrap method 中重复抽样次数设置 500, 模式为 General Time Reversible Model。

1.5 共生真菌次生代谢产物的制备

采用 PDB 培养基对分离鉴定后的共生真菌进行发酵培养, 通过减压抽滤分别得到菌丝和菌液。菌丝经乙酸乙酯冷浸提取 3 次, 每次 7 d, 菌液直接采用乙酸乙酯萃取 3 次, 分别将提取液和萃取液减压浓缩, 得到菌丝和菌液次生代谢产物, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 抗细菌活性的测定

采用薄层层析 (TLC) - 噻唑蓝 (MTT) - 生物自显影法测定共生真菌次生代谢产物对不同供试细菌的抑制活性 (欧阳锦逵等, 2017)。供试细菌为大肠杆菌 (*Escherichia coli*, G^{-})、黄瓜角斑病菌 (*Pseudomonas lachrymans*, G^{-})、番茄疮痂病菌 (*Xanthomonas vesicatoria*, G^{-})、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*, G^{+})、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*, G^{-})、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*, G^{-}) 和溶血葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*, G^{+})。将提取物用丙酮溶解, 在薄层层析板上用直径 0.5 mm 的毛细管点样, 点样量为 5 μL 。采用二氯甲烷和甲醇的混合溶液作为展开剂进行薄层层析, 浓度为 0.2 mg/mL 硫酸链霉素作为阳性对照。向灭菌的 LB 半固体培养基中加入菌液 (45 mL LB + 5 mL 菌液), 调其浓度约为 10^8 CFU/mL, 振荡均匀。用喷样器将菌液均匀快速地喷洒到硅胶板上, 待培养基冷却凝固后, 将硅胶板置于培养皿中于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中放置 4 h, 以利于抗菌成分的扩散; 再将硅胶板置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 下保湿培养, 12 h 后取出硅胶板, 均匀喷洒 0.5 mg/mL MTT, 静待几分钟后观察实验结果。有抗菌活性成分处, 供试细菌由于受到活性成分的抑制而出现抑菌斑; 无抗菌活性成分处, 供试细菌正常生长, 喷洒 MTT 后显蓝紫色。通过抑菌斑的迁移率 (即 R_f 值) 来初步评价样品中抗菌化合物的极性, 根据抑菌斑的大小和多少来初步评价活性化合物的抑菌活性和数量。 R_f 值计算公式如下:

$$R_f \text{ 值} = \frac{\text{斑点与点样处之间的距离}}{\text{展开剂前沿与点样处之间的距离}}$$

1.7 抗氧化活性的测定

采用多孔板 - DPPH 显色法测定共生真菌次生代谢产物对 DPPH 的清除率, 以 IC_{50} 值来表示共生真菌次生代谢产物的抗氧化能力 (Ouyang *et al.*, 2018)。精密称取 DPPH 20.0 mg 溶于 100 mL 无水乙醇中, 振荡摇匀, 使其终浓度为 0.2 mg/mL。阳性对照 BHT 和各提取物的初始浓度为 10.0 mg/mL,

而后用 DMSO 依次对半稀释成浓度为 5 mg/mL ~ 0.0390625 mg/mL 的溶液。向 96 微孔板中加入 80 μ L 浓度为 0.2 mg/mL DPPH 无水乙醇溶液, 而后加入 20 μ L 系列浓度的待测样品溶液或阳性对照溶液, 震荡摇匀。在 37 $^{\circ}$ C 下水浴 30 min, 517 nm 下测定吸光值。以 20 μ L DMSO 溶液代替样品溶液作为空白对照, 每个处理 3 个重复, 供试样品对 DPPH 清除率的有效中浓度 (IC_{50}) 计算公式如下:

$$\text{DPPH 清除率} (\%) = \frac{\text{空白对照 OD}_{517 \text{ nm}} - \text{样品溶液 OD}_{517 \text{ nm}}}{\text{空白对照 OD}_{517 \text{ nm}}} \times 100$$

所得数据采用 Excel 软件进行作图分析, 供试样品浓度取对数 (X), 清除率换算成机率值 (Y), 初步求得抗氧化活性的回归方程 ($Y = aX + b$) 和 IC_{50} 值。

1.8 共生真菌次生代谢产物的高效液相分析

为进一步探究杜比亚蟑螂共生真菌次生代谢产物的情况, 本研究采用高效液相对其次生代谢产物进行分析。将发酵得到的 5 株共生真菌菌丝和菌液提取物各 10 mg, 用 1 mL 色谱甲醇溶解后, 再用 0.22 μ m 有机滤膜过滤, 将滤液转移到样品瓶中, 待测。使用甲醇 - 水梯度洗脱, 其色谱条件为: 0 ~ 2 min 使用 20% 甲醇等度洗脱; 2 ~ 20 min, 甲醇浓度由 20% 线性递增至 100%; 20 ~ 25 min, 使用 100% 甲醇进行洗脱; 25 ~ 30 min, 使用 20% 甲醇对色谱柱进行平衡, 紫外检测器设置为 254 nm 单通道采样。

2 结果与分析

2.1 共生真菌的分离和鉴定

从杜比亚蟑螂中总共分离得到 13 株共生真菌, 通过菌落和显微形态观察, 合并相同的菌株, 最后得到 5 株形态各异的共生真菌, 分别编号为 Bdf-1 ~ Bdf-5。其菌落和显微形态如图 1 所示。

光学显微镜下观察发现, 分离到的所有菌株菌丝均为有隔菌丝, 在正常培养条件下均有孢子产生。杜比亚蟑螂共生真菌形态学描述见表 1。菌株 Bdf-2、Bdf-3 和 Bdf-5 均有曲霉属真菌典型的分生孢子头产生, 但菌落形态却存在较大差异, 因此采用分子生物学方法对筛选出的形态各异的共生真菌进行进一步的鉴定。

表 1 杜比亚蟑螂共生真菌形态学描述

Table 1 Symbiotic fungal colony morphology of *Blaptica dubia*

菌株 Strain	形态学描述 Morphological description
Bdf-1	菌落白色, 不透明, 规则圆形, 中央凸起, 边缘整齐。菌丝有隔, 顶端产生扫帚状的分生孢子梗, 分生孢子无色, 单孢, 球形, 光滑, 直径大小为 1.87 ~ 3.33 μ m。
Bdf-2	菌落白色, 不透明, 圆形, 气生菌丝不发达, 背面中央黄褐色, 边缘整齐。菌丝无色有隔, 分生孢子球形, 光滑, 大小为 1.86 ~ 3.78 μ m。
Bdf-3	菌落中央灰褐色, 边缘白色呈放射状, 背面中央黄色, 有环状条带, 菌丝发达, 边缘不整齐。菌丝有隔, 顶端产生近半球形顶囊, 分生孢子无色, 单孢, 球形, 光滑, 直径大小为 2.46 ~ 3.12 μ m。
Bdf-4	菌落白色, 中央有凹陷, 边缘呈不规则放射状, 表面蓬松, 气生菌丝发达, 菌落整体近圆形, 背面中央黄色, 生长缓慢。菌丝有隔, 分生孢子无色, 单孢, 圆柱形或长椭圆形, 两端圆润, 内含油滴, 大小为 2.00 ~ 2.98 μ m \times 4.00 ~ 4.36 μ m。
Bdf-5	菌落中央浅黄色, 边缘灰白色, 中央有凸起, 表面粗糙, 菌落整体较规则圆, 背面中央黄色。营养菌丝有隔, 菌丝顶端产生近球形顶囊, 分生孢子无色, 单孢, 球形, 光滑, 直径大小为 1.93 ~ 2.78 μ m。

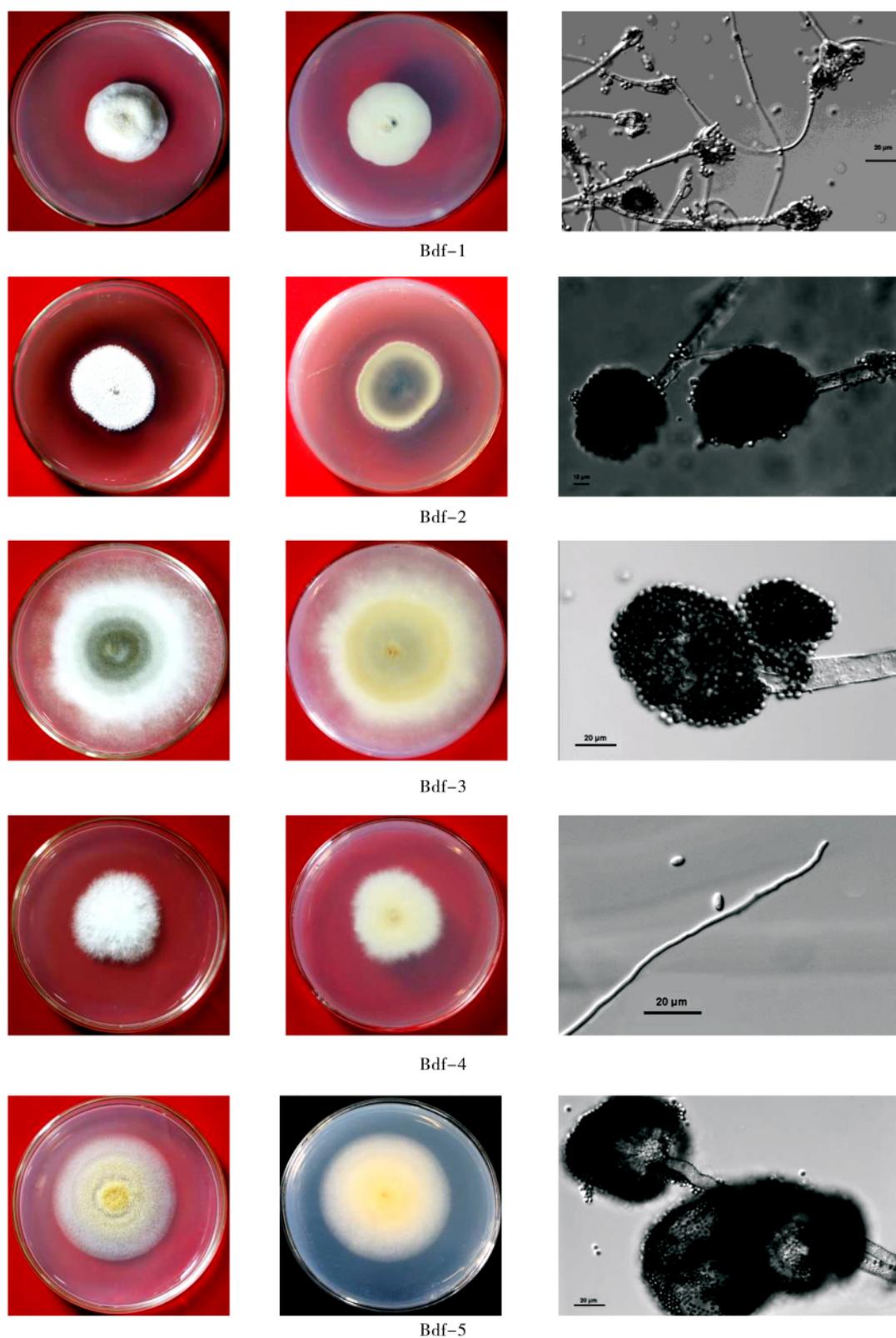


图 1 杜比亚蟑螂共生真菌菌落形态及其显微结构

Fig. 1 The morphological characters of symbiotic fungi in *Blaptica dubia*

通过 PCR 扩增、测序后, 将拼接完整的 ITS 序列提交至 GenBank, 获得其登录号, 并构建系统发育树 (图 2)。结合菌落形态、显微观察以及构建的系统发育树, 杜比亚蟑螂共生真菌的最终鉴定结果如表 2 所示。5 株共生真菌主要分布于青霉属、曲霉属和聚孢霉属, 其中曲霉属的种类最多 (3 株), 说明曲霉属为优势种群, 其余两属各有 1 株。青霉属虽然只有 1 株 Bdf-1, 但其分离频率高达 30.77%, 仅次于曲霉属的 Bdf-3 (46.15%)。曲霉属和青霉属真菌虽多为腐生菌, 但也常常作

为昆虫的共生真菌被报道。中华剑角蝗肠道共生真菌草酸青霉 *Penicillium oxalicum* 产生的次生代谢产物对人体多种癌细胞具有显著的生长抑制作用 (喻梦岚等, 2014; 郑燕丽等, 2014)。

2.2 共生真菌的抗细菌活性

采用 TLC-MTT-生物自显影法测定了杜比亚蟑螂共生真菌菌液和菌丝提取物对不同供试细菌的抑制活性 (表 3)。结果表明, 5 种共生真菌菌液和菌丝提取物均表现出一定的抗菌活性, 但同一提取物对不同供试细菌的抑制活性存在一定的差

表 2 杜比亚蟑螂共生真菌鉴定结果

Table 2 Identification of symbiotic fungi isolated from *Blaptica dubia*

菌株 Strain	登录号 Accession number	GenBank 最大相似菌株 Maximum similar strain in GenBank	最大相似度 (%) Maximum similarity	鉴定结果 Identification	分离频率 (%) Isolation frequency
Bdf-1	MH681591	NR121310.1 <i>Penicillium chermesinum</i>	99	<i>Penicillium</i> sp.	30.77
Bdf-2	MH681592	LT626955.1 <i>Aspergillus candidus</i>	100	<i>Aspergillus</i> sp.	7.69
Bdf-3	MH681593	MH279388.1 <i>Aspergillus nomius</i>	99	<i>Aspergillus</i> sp.	46.15
Bdf-4	MH681594	MH259861.1 <i>Clonostachys rosea</i>	100	<i>Clonostachys</i> sp.	7.69
Bdf-5	MH681595	HQ832844.1 <i>Aspergillus</i> sp.	99	<i>Aspergillus</i> sp.	7.69

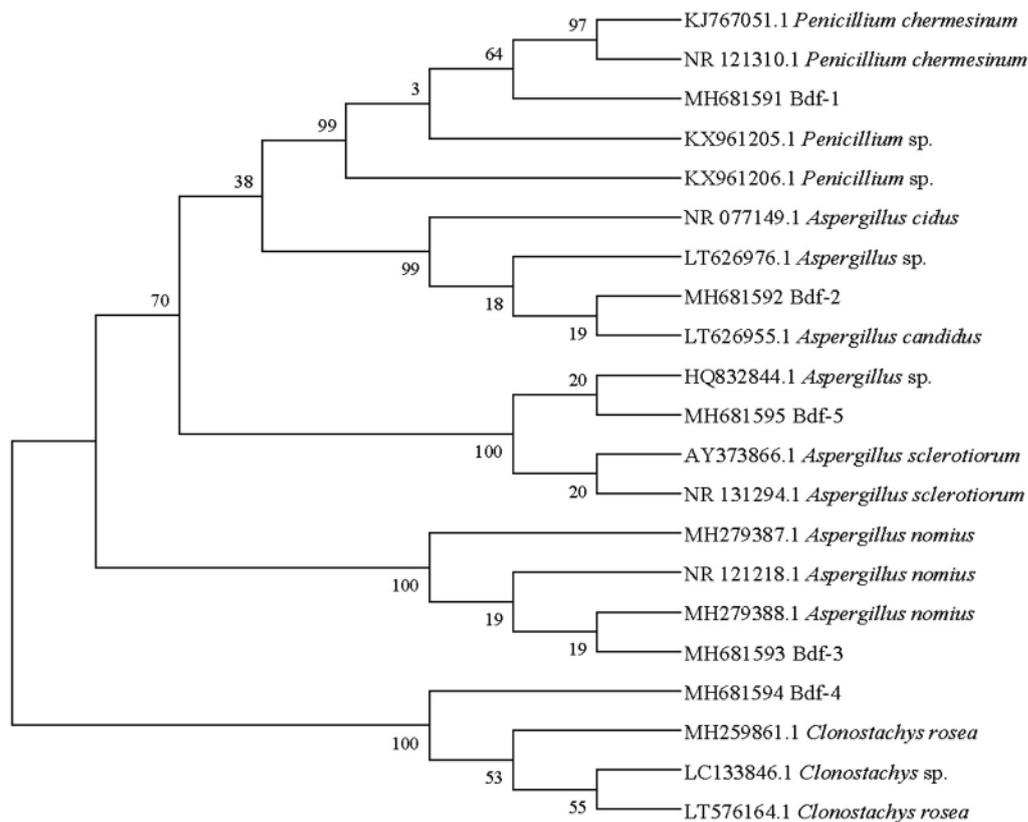


图 2 依据杜比亚蟑螂共生真菌 rDNA-ITS 序列构建的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of symbiotic fungi isolated from *Blaptica dubia* based on the rDNA-ITS sequence

表3 杜比亚蟑螂共生真菌菌液和菌丝提取物对不同供试细菌的抑制活性
Table 3 Antibacterial activities for broth and mycelium crude extracts of symbiotic fungi isolated from *Blattica dubia*

菌株 Strains	R_i 值(抑菌斑的最大直径) R_i value (Maximum inhibition spot diameter)							
	<i>A. tumefaciens</i>	<i>R. solanacearum</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. lachrymans</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. haemolyticus</i>	
Bdf-1	B	0.0~0.15 ⁺⁺	0.0~0.15 ⁺⁺	0.47~0.58 ⁺⁺	0.02~0.10 ⁺	0.0~0.10 ⁺⁺	0.0~0.12 ⁺⁺	0.05~0.15 ⁺⁺
	Bdf-1	0.33~0.47 ⁺⁺⁺	0.35~0.48 ⁺⁺	0.32~0.42 ⁺⁺	0.32~0.42 ⁺⁺	0.30~0.37 ⁺⁺	0.27~0.45 ⁺⁺⁺	0.33~0.48 ⁺⁺⁺
	M	0.38~0.45 ⁺⁺	0.42~0.50 ⁺⁺	0.35~0.50 ⁺⁺	0.42~0.48 ⁺⁺	-	0.37~0.47 ⁺⁺	0.43~0.57 ⁺⁺
Bdf-2	B	0.0~0.43 ⁺⁺⁺	0.0~0.43 ⁺⁺⁺	0.0~0.55 ⁺⁺⁺	0.0~0.42 ⁺⁺⁺	0.0~0.38 ⁺⁺	0.0~0.38 ⁺⁺⁺	0.0~0.42 ⁺⁺⁺
	Bdf-2	0.03~0.2 ⁺	0.10~0.18 ⁺	0.22~0.32 ⁺⁺	0.23~0.47 ⁺⁺	0.23~0.43 ⁺⁺	0.28~0.37 ⁺⁺	0.25~0.35 ⁺⁺
	M	0.23~0.47 ⁺⁺	0.25~0.47 ⁺⁺⁺	0.35~0.42 ⁺⁺	0.35~0.43 ⁺⁺	0.30~0.37 ⁺⁺	0.42~0.50 ⁺⁺	0.4~0.48 ⁺⁺
Bdf-3	B	0.0~0.13 ⁺	0.0~0.15 ⁺⁺	0.0~0.15 ⁺⁺	0.0~0.12 ⁺⁺	0.0~0.07 ⁺⁺	0.0~0.42 ⁺⁺	0.03~0.13 ⁺⁺
	Bdf-3	0.25~0.28 ⁺	0.18~0.25 ⁺	0.42~0.58 ⁺⁺	0.35~0.43 ⁺⁺	0.30~0.37 ⁺⁺	0.0~0.42 ⁺⁺	0.03~0.13 ⁺⁺
	M	0.35~0.43 ⁺⁺	0.33~0.45 ⁺⁺	0.47~0.55 ⁺⁺	-	0.42~0.50 ⁺⁺	0.42~0.53 ⁺⁺	0.4~0.58 ⁺
Bdf-4	B	0.0~0.13 ⁺⁺⁺	0.0~0.15 ⁺⁺⁺	0.0~0.70 ⁺⁺⁺	0.0~0.13 ⁺⁺⁺	0.0~0.10 ⁺⁺⁺	0.0~0.25 ⁺⁺⁺	0.0~0.13 ⁺⁺⁺
	Bdf-4	0.33~0.37 ⁺⁺⁺	0.33~0.37 ⁺⁺⁺	0.37~0.40 ⁺⁺	0.37~0.40 ⁺⁺	0.0~0.10 ⁺⁺⁺	0.32~0.38 ⁺⁺	0.0~0.13 ⁺⁺⁺
	M	0.0~0.10 ⁺⁺	0.0~0.10 ⁺⁺	0.0~0.10 ⁺⁺	0.02~0.08 ⁺⁺	0.0~0.17 ⁺⁺⁺	0.0~0.12 ⁺⁺⁺	0.0~0.08 ⁺⁺
Bdf-5	B	0.0~0.73 ⁺⁺⁺	0.0~0.72 ⁺⁺⁺	0.0~0.63 ⁺⁺⁺	0.0~0.73 ⁺⁺⁺	0.0~0.68 ⁺⁺⁺	0.0~0.73 ⁺⁺⁺	0.0~0.67 ⁺⁺⁺
	Bdf-5	0.33~0.43 ⁺⁺	0.42~0.50 ⁺⁺	0.03~0.15 ⁺⁺	0.35~0.45 ⁺⁺	0.43~0.48 ⁺⁺	0.0~0.15 ⁺⁺	0.22~0.42 ⁺⁺
	M	0.45~0.55 ⁺⁺	0.42~0.50 ⁺⁺	0.37~0.57 ⁺⁺	0.48~0.53 ⁺⁺	0.40~0.50 ⁺⁺	0.28~0.35 ⁺	0.45~0.52 ⁺⁺
硫酸链霉素	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

注：“B”表示菌液提取物；“M”表示菌丝提取物；“-”表示无抑菌斑；“+”表示抑菌斑的最大直径 $d=0\sim 5$ mm，“++”表示 $d=5$ mm $\leq d < 10$ mm，“+++”表示 $d \geq 10$ mm。Note: “B” was the crude extract from broth; “M” was the crude extract from mycelia; “-” was the crude extract from mycelia; “+”; Maximum inhibition spot diameter $d=0\sim 5$ mm; “++”; Maximum inhibition spot diameter 5 mm $\leq d < 10$ mm; “+++”; Maximum inhibition spot diameter $d \geq 10$ mm.

异。其中 Bdf-1 菌丝提取物对黄瓜角斑病菌未表现出抑制活性, 而 Bdf-3 菌丝提取物对枯草芽孢杆菌未表现出抑制活性。所有菌株菌液提取物抑菌斑的 R_i 值范围明显大于菌丝提取物, 说明菌液中含有更多的抗菌活性化合物。 R_i 值主要与化合物的极性有关, R_i 值越小, 化合物极性越大, Bdf-1、Bdf-3 和 Bdf-4 菌液提取物 R_i 值在 0.0 ~ 0.5 之间均有分布, 说明三株菌的菌液中具有抗菌活性的次生代谢产物其极性为中等偏大。Bdf-1 和 Bdf-3 菌丝提取物 R_i 值主要分布在 0.35 ~ 0.60 之间, 说明两菌的菌丝中具有抗菌活性的物质主要为中等极性的次生代谢产物, 而 Bdf-4 菌丝提取物 R_i 值主要分布在 0.0 ~ 0.12 之间, 说明抗菌活性物质的极性偏大。Bdf-2 和 Bdf-5 菌液提取物抑菌斑的 R_i 值范围完全覆盖菌丝提取物, 说明菌液提取物中具有抑菌活性的次生代谢产物更为丰富。从抑菌斑的最大直径来看, Bdf-4 和 Bdf-5 菌液提取物对所有供试细菌的抑菌斑最大直径均超过 10 mm, 而菌丝提取物要明显弱于菌液, 抑菌斑最大直径一般在 5 ~ 10 mm 之间, 其中 Bdf-4 菌丝提取物对黄瓜角斑病菌和大肠杆菌抑菌斑的最大直径要大于 10 mm。除

黄瓜角斑病菌外, Bdf-2 菌液提取物对其他供试细菌的抑菌斑的最大直径也超过 10 mm, 且菌丝提取物弱于菌液提取物。Bdf-1 和 Bdf-3 对不同供试细菌的抑制活性要弱于 Bdf-2、Bdf-4 和 Bdf-5, 但也表现一定的抗菌活性, 抑菌斑的最大直径多集中于 5 ~ 10 mm 之间。

综上所述, 菌株 Bdf-2、Bdf-4 和 Bdf-5 表现出较好的抗菌活性, 且菌液提取物的抗菌活性要强于菌丝, 说明杜比亚蟑螂共生真菌产生的活性次生代谢产物主要分泌到胞外, 为极性偏大的化合物, 这与抑菌斑的 R_i 值偏小的结果相一致。

2.3 共生真菌的抗氧化活性

采用 DPPH 法测定了 5 株杜比亚蟑螂共生真菌菌液和菌丝提取物的抗氧化活性 (表 4)。结果表明, Bdf-4 和 Bdf-5 菌液和菌丝提取物在供试浓度下均未表现出任何抗氧化活性。Bdf-1、Bdf-2 和 Bdf-3 的菌液提取物均表现出明显的抗氧化活性, IC_{50} 值分别为 0.26 ± 0.01 mg/mL、 2.20 ± 0.99 mg/mL 和 0.75 ± 0.16 mg/mL; 而菌丝提取物的 IC_{50} 值均大于 5 mg/mL。说明 Bdf-1、Bdf-2 和 Bdf-3 中具有抗氧化活性的次生代谢产物主要分布于菌液中。

表 4 杜比亚蟑螂共生真菌不同提取物对 DPPH 的清除力

Table 4 DPPH radical scavenging for different crude extracts of symbiotic fungi isolated from *Blattella germanica*

供试样品 Tested samples	Bdf-1		Bdf-2		Bdf-3		Bdf-4		Bdf-5		CK ⁺
	B	M	B	M	B	M	B	M	B	M	
IC_{50} (mg/mL)	0.26 ± 0.01	-	2.20 ± 0.99	-	0.75 ± 0.16	-	-	-	-	-	0.10 ± 0.01

注 “B” 表示菌液提取物 “M” 表示菌丝提取物。Note “B” was the crude extract from broth “M” was the crude extract from mycelia.

2.4 共生真菌次生代谢产物的高效液相分析

采用 HPLC 对分离得到的 5 株杜比亚蟑螂共生真菌菌丝和菌液提取物进行分析, 其色谱图如下所示 (图 3)。HPLC 分析结果表明, 在波长为 254 nm 的检测条件下, 5 株共生真菌都含有一定量的次生代谢产物, 其中菌株 Bdf-1、Bdf-3 以及 Bdf-5 菌液次生代谢产物的数量要高于其菌丝, 且主要差异均表现在化合物极性偏大的区域, 即保留时间在 20 min 之前的区域, 通过前面的研究发现, 菌株 Bdf-1 和 Bdf-3 菌液提取物表现出较好的抗氧化活性, 而 Bdf-5 菌液提取物表现出较好的抗菌活性, 是否与这些成分有关还有待于进一步研究。此外, 菌株 Bdf-2 和 Bdf-4 菌液中的化合物种类与菌丝差异不大, 但其紫外吸收明显弱于菌丝, 说明次生代谢产物主要分布于菌丝中, 而菌株 Bdf-2

和 Bdf-4 菌丝提取物的抗菌活性要弱于菌液, 说明 254 nm 下含量较高的化合物其抗菌活性并不强。本实验所得到的高效液相色谱图, 可以为杜比亚蟑螂共生真菌活性次生代谢产物的分离和纯化提供参考。

3 结论与讨论

本研究采用组织块分离法从杜比亚蟑螂中分离鉴定出 5 株共生真菌, 分属于青霉属、曲霉属和聚孢霉属, 其中青霉属和曲霉属菌株为优势菌株, 可能与杜比亚蟑螂生活的环境有关。青霉属和曲霉属真菌作为常见的昆虫和植物共生菌以及腐生菌, 也能够产生多种活性次生代谢产物, 且生活环境不同, 共生真菌所产生的次生代谢产物

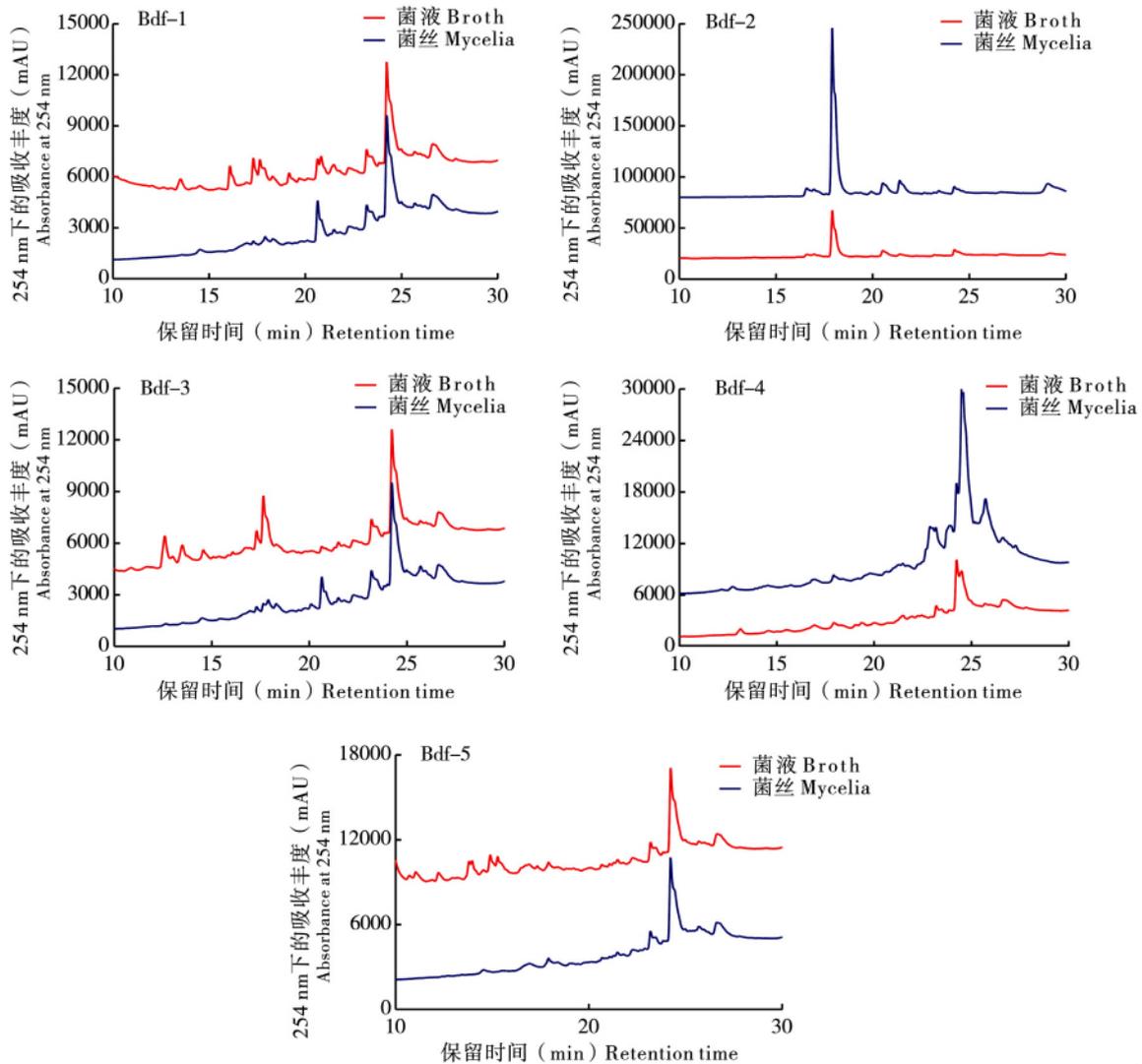


图3 杜比亚蟑螂共生真菌的菌丝和菌液不同提取物 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms for different crude extracts of symbiotic fungi isolated from *Blaptica dubia*

和生物活性也大不相同。从南海红树林中分离得到的鲜红青霉，能够产生对葡萄糖苷酶和乙酰胆碱酯酶具有不同程度抑制活性的化合物（Huang *et al.*, 2011）。*Aspergillus nomius* 是巴西坚果中黄曲霉毒素的重要生产者（Olsen *et al.*, 2008）。从吉兰泰盐田沉积物中分离出 *Penicillium citrinum*，并从该菌的发酵物中得到两个桔霉素二聚体化合物，对 DPPH 自由基表现出一定的清除活性（Lu *et al.*, 2008）。本研究所采用的供试材料为人工饲养的杜比亚蟑螂，生活环境相对单一，且并不是所有的共生真菌均能在人工培养基上生长，所以分离到的共生真菌种类和数量偏少。本论文分别提取共生真菌菌丝与菌液的次生代谢产物，进而比较共生真菌胞内（菌丝）和胞外（菌液）次生代谢产物在抗细菌和抗氧化活性方面的差异。其

中菌液提取物的抗细菌和抗氧化活性要强于其菌丝提取物，菌株 Bdf-2、Bdf-4 和 Bdf-5 菌液提取物表现出较强的抑菌活性，而 Bdf-1，Bdf-2 和 Bdf-3 的菌液提取物均表现出较好的抗氧化活性。其中 Bdf-4 鉴定为 *Clonostachys* sp.，Roberti 等（2008）发现从感染镰刀菌的小麦冠中分离出的粉红螺旋聚孢霉 *Clonostachys rosea*，可以抑制谷物的种传镰刀菌病害。杜比亚蟑螂共生真菌次生代谢产物是否具有抗真菌、抗肿瘤和酶抑制活性还有待于进一步研究，此外，这些次生代谢产物对杜比亚蟑螂的抗病性和环境适应性等的影响也是接下来研究的重点。本研究为进一步分离杜比亚蟑螂共生真菌中的抗菌和抗氧化活性成分奠定了基础，为杜比亚蟑螂及其共生真菌的综合开发与利用提供了新的思路。

参考文献 (References)

- Alamer AH, Hoffmann KH. Effects of juvenile hormone analogue treatment in adult females of the ovoviviparous cockroach, *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae) [J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2014a, 58 (1): 53–59.
- Alamer AH, Hoffmann KH. Endocrine aspects of ovary growth and gestation in the Argentinian cockroach, *Blattella germanica* (Dictyoptera, Blattellidae) [J]. *Invertebrate Reproduction & Development*, 2014b, 58 (1): 34–41.
- Crotti E, Balloi A, Hamdi C, et al. Microbial symbionts: A resource for the management of insect-related problems [J]. *Microbial Biotechnology*, 2012, 5 (3): 307–317.
- Engel P, Moran NA. The gut microbiota of insects – diversity in structure and function [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2013, 37 (5): 699–735.
- Ge HM, Tan RX. Symbionts, an important source of new bioactive natural products [J]. *Progress in Chemistry*, 2009, 21 (1): 30–46. [戈惠明, 谭仁祥. 共生菌—新活性天然产物的重要来源 [J]. 化学进展, 2009, 21 (1): 30–46]
- Guo LZ, Liu CX, Xu B, et al. Secondary metabolites from the insect-derived endophytic fungus *Alternaria* sp. [J]. *Chemical Research and Application*, 2014, 26 (2): 306–310. [郭玲芝, 刘呈雄, 徐帮, 等. 一株昆虫内生真菌 *Alternaria* sp. 次级代谢产物研究 [J]. 化学研究与应用, 2014, 26 (2): 306–310]
- Huang H, Feng X, Xiao Z, et al. Azaphilones and *p*-terphenyls from the mangrove endophytic fungus *Penicillium chermesinum* (ZH4-E2) isolated from the South China Sea [J]. *Journal of Natural Products*, 2011, 74 (5): 997–1002.
- Kassiri H, Zarrin M, Veys – Behbahani R. Pathogenic fungal species associated with digestive system of *Periplaneta americana* (Blattaria: Blattellidae) trapped from residential dwellings in Ahvaz city, Southwestern Iran [J]. *Journal of Arthropod – Borne Diseases*, 2018, 12 (1): 16–23.
- Lu ZY, Lin ZJ, Wang WL, et al. Citrinin dimers from the halotolerant fungus *Penicillium citrinum* B-57 [J]. *Journal of Natural Products*, 2008, 71 (4): 543–546.
- Olsen M, Johnsson P, Möller T, et al. *Aspergillus nomius*, an important aflatoxin producer in Brazil nuts? [J]. *World Mycotoxin Journal*, 2008, 1 (2): 123–126.
- Ouyang JK, Mao ZL, Guo H, et al. Mollicellins O-R, four new depsidones isolated from the endophytic fungus *Chaetomium* sp. Eef-10 [J]. *Molecules*, 2018, 23 (12): 3218–3229.
- Ouyang JK, Wu CY, Wang XQ, et al. The crude extracts of *Balaophora polyandra* and their antimicrobial activities [J]. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2017, 37 (11): 61–64, 75. [欧阳锦逵, 吴春银, 王小晴, 等. 多蕊蛇菰不同提取物及其抑菌活性 [J]. 热带农业科学, 2017, 37 (11): 61–64, 75]
- Roberti R, Veronesi A, Cesari A, et al. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum* [J]. *Plant Science*, 2008, 175 (3): 339–347.
- Shan TJ, Lou JF, Gao S, et al. Antibacterial activity of the endophytic fungi from a traditional Chinese herb *Paris polyphylla* var. *chinensis* [J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, 6 (14): 3440–3446.
- Song HY, Duan ZH, Zhang WH, et al. Pathogen identification and fungicides screening of *Bauhinia variegata* Linn. anthracnose [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, 49 (10): 1975–1981. [宋慧云, 段志豪, 张伟豪, 等. 宫粉羊蹄甲炭疽病原鉴定及其药剂筛选 [J]. 南方农业学报, 2018, 49 (10): 1975–1981]
- Tee HS, Lee CY. Water balance profiles, humidity preference and survival of two sympatric cockroach egg parasitoids *Enania appendigaster* and *Aprostocetus hagenowii* (Hymenoptera: Euclyptidae; Eulophidae) [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2015, 77: 45–54.
- Tian X, Ma G, Cui Y, et al. The complete mitochondrial genomes of *Opisthoptera orientalis* and *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) [J]. *Mitochondrial DNA Part A*, 2017, 28 (1): 139–140.
- Wang FY, Gu JF, Gao XD, et al. Research progress of animal endophytic fungi [J]. *World Notes on Antibiotics*, 2017, 38 (2): 58–61. [汪福源, 顾觉奋, 高向东, 等. 动物内生真菌研究进展 [J]. 国外医药 (抗生素分册), 2017, 38 (2): 58–61]
- Wu H, Appel AG, Hu XP. Instardetermination of *Blattella germanica* (Blattodea: Blattellidae) using Gaussian mixture models [J]. *Annals of the Entomological Society of America*, 2013, 106 (3): 323–328.
- Yi L, Lakemond CMM, Sagis LMC, et al. Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species [J]. *Food Chemistry*, 2013, 141 (4): 3341–3348.
- Yin WP, Jiang YL, Li PF, et al. Insect nature products from *Periplaneta americana*, Blattellidae and their chemotaxonomic significance [J]. *Journal of Henan University of Science and Technology (Natural Science)*, 2012, 33 (5): 101–104. [尹卫平, 姜亚玲, 李鹏飞, 等. 昆虫美洲大蠊天然产物的研究及其化学分类学意义 [J]. 河南科技大学学报 (自然科学版), 2012, 33 (5): 101–104]
- Yu ML, Xu B, Cheng F, et al. The study of antitumor secondary metabolites from *Penicillium oxalicum*, a fungus residing in *Acrida cinerea* [J]. *Natural Product Research and Development*, 2014, 26 (8): 1165–1169. [喻梦岚, 徐帮, 程凡, 等. 中华剑角蝗共生真菌 *Penicillium oxalicum* 中抗肿瘤次级代谢产物研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26 (8): 1165–1169]
- Zhang F, Sun XX, Zhang XC, et al. The interactions between gut microbiota and entomopathogenic fungi: A potential approach for biological control of *Blattella germanica* (L.) [J]. *Pest Management Science*, 2018, 74 (2): 438–447.
- Zhang YL, Yin CP, Ye ST, et al. Studies on the herbicidal and immunosuppressive composition of *Phoma* sp. HC03, a fungus residing in *Chondracris rosea* gut [J]. *Natural Product Research and Development*, 2010, 22 (4): 600–602. [张应烙, 尹彩萍, 叶圣涛, 等. 棉蝗肠道真菌 *Phoma* sp. HC03 除草和免疫抑制成分研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2010, 22 (4): 600–602]
- Zheng YL, Zou K, Xu B, et al. Secondary metabolites from *Penicillium oxalicum* of an insect endophytic fungus [J]. *Journal of Huazhong Normal University (Natural Sciences)*, 2014, 48 (5): 689–692. [郑燕丽, 邹坤, 徐帮, 等. 昆虫内生真菌 *Penicillium oxalicum* 次级代谢产物的研究 [J]. 华中师范大学学报 (自然科学版), 2014, 48 (5): 689–692]