



## 黑翅土白蚁共生真菌 BYSTW3 的抗菌活性代谢产物

王滢<sup>1#</sup>, 徐晓<sup>1#</sup>, 石靖晶<sup>1</sup>, 尹彩萍<sup>1,2</sup>, 翁垚霞<sup>1</sup>, 郭威<sup>1\*</sup> 张应烙<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

<sup>2</sup> 安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

**摘要:**【目的】黑翅土白蚁共生真菌 BYSTW3 菌株的鉴定及其活性次级代谢产物的研究。【方法】对目标菌株 BYSTW3 进行形态学观察和 ITS 序列分析, 初步确定其分类地位。采取滤纸片法和生长速率法, 分别对该菌株粗提物进行抗细菌、抗真菌活性的测定。综合运用多种色谱柱分离方法对活性成分进行分离纯化, 结合多种谱图数据对化合物结构进行解析。【结果】经鉴定, BYSTW3 为 Pleosporales (格孢腔目) 真菌, 是一潜在新种。在测试浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时, 粗提物对苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)和苦瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *mornordicae*)表现出中等强度的抑制活性, 分别为 54.5% 和 53.4%。通过分离纯化, 共得到 3 个活性化合物 Physcion (1)、FK-17-p2a (2) 和 Citrinin (3), 其中化合物 1 和 3 均首次从格孢腔目真菌中分离得到。当供试浓度为 30  $\mu\text{g}$ /滤纸片时, 化合物 3 对金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)均具有良好的抑菌作用, 抑菌圈直径分别为 23.0、24.2、20.7 mm。【结论】BYSTW3 是一株发展前景较为良好的潜在新菌, 具有开发微生物源杀菌剂的潜在研究价值。

**关键词:** 黑翅土白蚁, 共生真菌, 格孢腔目, 代谢产物, 抗菌活性

在农业日渐发展的今天, 化学农药虽然被广泛应用, 但由于其对环境 and 人类健康的不利影响, 生物源农药作为一种替代品渐渐走进了人们的视野, 且引起了各方面的重视<sup>[1-2]</sup>。生物源农药有许多优势, 如农用抗生素易被土壤微生物分解而不污染环境, 且其对人畜安全, 选择性高<sup>[3]</sup>。文献报道

昆虫共生真菌能产生丰富的新型次级代谢产物<sup>[4]</sup>, 可能是新型生物源农药的重要来源, 如从蜻蜓肠道真菌 *Paraphaeosphaeria* sp. QTYC11 中分离到的 lunatoic acid C 具有很好的抗植物致病真菌活性<sup>[5]</sup>; 从象白蚁巢穴共生真菌的活性次级产物中发现可作为杀菌剂的酸类化合物<sup>[6]</sup>。另外, 已有研究表明,

基金项目: 国家自然科学基金(31770007); 浙江省自然科学基金(LY17C010002); 浙江省大学生科技创新活动计划(2017R404021)

\*通信作者。郭威, Tel: +86-579-82282269, E-mail: weiguo817@zjnu.cn; 张应烙, Tel: +86-551-65786129, E-mail:

zhangyl@ahau.edu.cn

#并列第一作者。

收稿日期: 2018-03-09; 修回日期: 2018-04-23; 网络出版日期: 2018-04-27

昆虫共生菌是微生物新种的重要来源,如 White 和 Strongman 在蜉蝣中发现了 2 株新真菌物种<sup>[7]</sup>; Harrington 等从甲虫中分离得到 4 株真菌新种<sup>[8]</sup>。因此,昆虫共生微生物菌群是发现新型活性次级代谢产物和新物种的重要来源,具有重要的研究价值。本研究以黑翅土白蚁的共生真菌 BYSTW3 为研究对象,对其进行鉴定并分离纯化其抗菌次生代谢产物,旨在为开发抗菌生物农药等奠定一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 样品采集:**供试白蚁于 2017 年 2 月捕自浙江师范大学(29°00'17.37"N, 119°29'54.84"E)校内阴暗潮湿的枯草堆与腐木的交界处。

**1.1.2 供试种子和病原菌:**(1) 供试致病细菌:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*, ATCC 6538)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*, ATCC 6633)、大肠杆菌(*Escherichia coli*, ATCC 8739)。(2) 供试植物病原真菌:杨树溃疡病菌(*Dothiorella gregaria*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、黄瓜枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)、苦瓜枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *mornordicae*)、玉米弯孢叶斑病菌(*Curvularia lunata*)、苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)和棉花黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)。上述病原菌均保藏于浙江师范大学微生物实验室。(3) 杂草种子:稗草(*Echinochoia crusgalli* L.) 采自浙江师范大学实验稻田。

**1.1.3 培养基:**M7 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)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA 培养基)。

**1.1.4 主要仪器与试剂:**超净工作台、紫外分析仪、恒温培养箱、恒温培养振荡器、高压灭菌锅、旋转蒸发仪、电子分析天平、PCR 反应扩增仪(加拿大 BBI 公司)、SW-CJ-1D 洁净工作台(江苏苏净化设备厂)、DK-8D 型电热恒温水槽(上海森信实验仪器有限公司)、DYY-8 型稳压稳流电泳仪(上海琪特分析仪器有限公司)、YXJ-2 离心机(湘仪离心机仪器有限公司)、H6-1 微型电泳槽(上海精益有机玻璃制品仪器厂)、移液枪(加拿大 BBI 公司)等。乙酸乙酯(分析纯)、甲醇(分析纯)、二氯甲烷(分析纯)等。

### 1.2 菌株的分离纯化

将捕捉到的黑翅土白蚁饥饿处理 24 h, 然后于无菌条件下用无菌水洗涤 3 次, 置于已灭过菌的研钵中, 加少量无菌水在研钵中研磨, 并将研磨液梯度稀释成  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ , 分别取各稀释液 200  $\mu$ L 涂布于 M7 培养基平板上, 后于 28  $^{\circ}$ C 恒温箱中培养。待菌落长出后, 使用接种钩挑取少量菌丝, 进行再纯化, 最后保存于 MEA 试管斜面中, 4  $^{\circ}$ C 冷藏备用。

### 1.3 菌株 BYSTW3 的鉴定

**1.3.1 形态学鉴定:**将事先纯化好的菌株 BYSTW3 接种到 MEA 平板中, 于 28  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养, 每 3 d 定时观察并记录其生长状态。利用光学显微镜观察其培养性状、微观形态特征, 并索引相关文献, 比对观察结果, 初步确定其分类地位。

**1.3.2 分子学鉴定:**将培养 3–4 d 的新鲜菌体作为提取 DNA 的材料, 参照新型快速真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取菌株的 DNA。采用文献<sup>[9]</sup>中的方法, 以提取的 DNA 为模板, 选用 ITS1 (forward): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3', ITS4 (reverse): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'作为

通用引物,对菌株 ITS-rDNA 序列进行 PCR 扩增。将得到的 PCR 扩增产物送往上海生工公司测序。将最终所得的 ITS 序列,按相似性高低对目标菌株进行 BLAST 比对分析,选取不同相似度序列,利用 MEGA 5.0 软件进行系统发育分析,采取邻位相接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树,同时进行 1000 次自举分析(Bootstrap),分析所得的 Bootstrap 值标记在各分支上,最终确定菌株的分类地位。

#### 1.4 BYSTW3 的发酵产物提取

将分离得到的菌株 BYSTW3 分别接种于装有 150 mL ME 液体培养基的 250 mL 三角锥瓶中,30 °C、150 r/min 条件下,摇床培养 7 d 后所得发酵液经 2–3 层纱布过滤,滤液用乙酸乙酯萃取 2–3 次,萃取液经减压旋蒸浓缩得到粗浸膏。

#### 1.5 抗细菌活性测定

采用滤纸片法对 BYSTW3 的粗提物和单体化合物进行抗菌活性测试:将菌株的粗提物和阳性对照药物(硫酸庆大霉素)配制成浓度为 6 mg/mL 的溶液,用 0.22 µm 滤膜过滤后,备用。移取 5 µL 溶液均匀洒在直径为 5 mm 的滤纸片上,将滤纸片均匀贴在涂布有细菌悬浊液的平板上,于 28 °C 恒温生化培养箱中倒置培养。

#### 1.6 抗真菌活性测定

采用生长速率法对 BTSTW3 粗提物进行植物致病真菌的抗菌活性测试:将粗提物用丙酮配成浓度为 1 mg/mL 的母液,备用。分别吸取 1 mL 母液与 9 mL MEA 培养基于无菌培养皿中,充分混匀后得到最终浓度为 100 µg/mL 的溶液。以等量丙酮作为空白对照。将活化好的植物致病真菌用无菌打孔器打成直径为 5 mm 的菌块,置于上述培养基上,每个处理重复 3 次,培养 3–5 d 后,待空白对照菌

块生长到 20 mm 左右,采用十字交叉法测量供试菌菌落直径。按如下公式(1)计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径})}{(\text{对照菌落直径} - 5 \text{ mm})} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

#### 1.7 活性代谢产物的分离纯化与鉴定

粗提物用有机溶剂溶解后与硅胶(100–200 目)等比例拌样,而后进行硅胶柱(200–300 目硅胶压柱)等梯度洗脱,将不同极性的馏分通过硅胶柱、凝胶柱、HPLC 等反复分离纯化得到单体化合物。通过化合物的波谱数据(<sup>1</sup>H-NMR、<sup>13</sup>C-NMR、HR-ESI-MS 等谱图),参考相应文献对活性单体化合物的结构进行鉴定。

## 2 结果和分析

#### 2.1 菌株 BYSTW3 的初步鉴定

如图 1 所示,在 MEA 培养基中,BYSTW3 菌落生长较为缓慢,培养 25 d 左右后,菌落半径可达 20–25 mm。菌落表面干燥,菌丝具放射状纹理,边缘不整齐,培养初始为金黄色,延长培养时间后菌落颜色渐渐加深,呈现出棕褐色;菌落背面也由初始的金黄色逐渐加深。在光学显微镜下,菌丝呈透明状且有隔膜,分生孢子呈球形,与部分格孢腔目真菌无性性孢子类似,但未发现有性型孢子<sup>[10]</sup>。

通过测序得到该菌 ITS 基因序列的长度为 521 bp (序列号为 MG820090),在 NCBI 上通过 BLAST 分析比对,发现与该菌序列相似度最高的菌株为格孢腔目真菌 *Pleosporales* sp. (序列号 HQ914849),相似度为 92.6%,进一步获取其不同相似度的菌株 20 株,在软件 MEGA 5.0 上构建系统发育树(图 2),从发育树上来看,该菌株单独分支。另外,2012 年 Zhang 等对孢腔目真菌

*Pleosporales* 做了比较详细的系统发育分析<sup>[10]</sup>, 我们的目标菌株与已知的孢腔目真菌 ITS 序列相似度低, 因此, 结合形态学鉴定, 可初步确定菌株 BYSTW3 为格孢腔目真菌的潜在新种。

## 2.2 粗提物的抗细菌活性

菌株 BYSTW3 的粗提物对金黄色葡萄球菌、

枯草芽孢杆菌、大肠杆菌 3 种致病细菌的生长抑制活性如图 3 所示。当供试浓度为 30  $\mu\text{g}$ /滤纸片时, 粗提物对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均表现出一定的抑菌活性, 但与阳性对照硫酸庆大霉素活性效果(抑菌圈直径均>20 mm)相比, 抑制程度相对较弱; 粗提物对枯草芽孢杆菌未表现出抑菌活性。

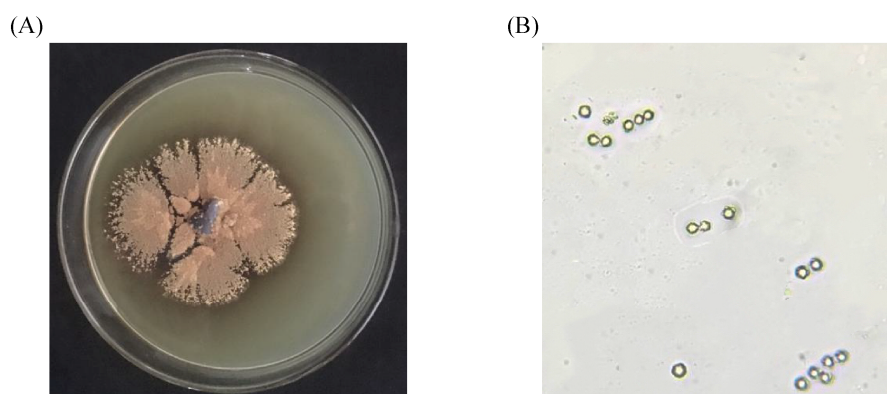


图 1. BYSTW3 菌株的菌落(A)和分生孢子(400×) (B)

Figure 1. Colony of strain BYSTW3 (A) and The conidium of BYSTW3 (400×) (B).

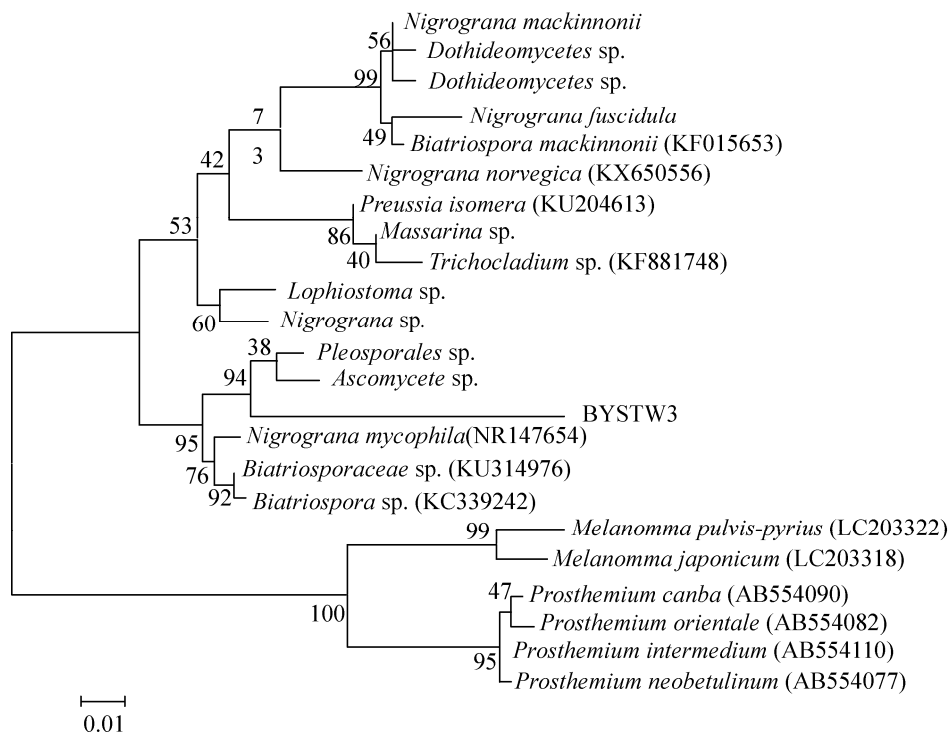


图 2. 基于 BYSTW3 菌株 ITS-rDNA 基因序列所构建的系统发育树

Figure 2. System development tree constructed based on BYSTW3 strain ITS-rDNA gene sequence.

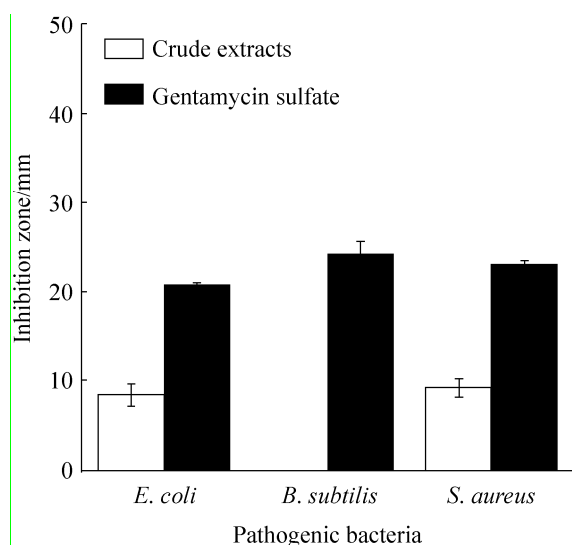


图 3. BYSTW3 粗提物对 3 种致病细菌的生长抑制活性 (30 µg/滤纸片)

Figure 3. Inhibitory activity of crude extracts against three pathogenic bacteria (30 µg/disc). Results are means±SD of three parallel measurements.

## 2.3 粗提物的抗真菌活性

菌株 BYSTW3 的粗提物对以下 8 种植物致病真菌的生长抑制作用如表 1 所示。在测试浓度为 100 µg/mL 时,粗提物对苹果树腐烂病菌和苦瓜枯萎病菌表现出中等强度的抑制活性,分别为 54.5% 和 53.4%; 另外,粗提物除对杨树溃疡病菌和小麦赤霉病菌几乎不表现抑制作用之外,对剩余的 4 种植物致病真菌的生长均表现出一定的抑制活性,抑制率范围为 15%–40%。

## 2.4 活性代谢产物的结构鉴定

通过多种色谱方法,我们从目标菌株 BYSTW3 乙酸乙酯的粗提物中分离纯化得到 3 个次级代谢产物。经其波谱数据分析并查阅相关文献,将这 3 个化合物确定为 Physcion (1)、FK-17-p2a (2)、Citrinin (3) (图 4)。

表 1. BYSTW3 粗提物对 8 种植物致病真菌的生长抑制作用

Table 1. Inhibitory activity of extracts against plant pathogens

Phytopathogens	Crude extract		Cycloheximide		CK
	a	b	a	b	
<i>V. mali</i>	20.0±1.3	54.5±3.8	5.0±0.0	100±0.0	38.0±3.2
<i>D. gregaria</i>	28.5±2.1	8.5±1.3	5.2±0.4	99.7±1.6	30.7±2.7
<i>G. zeae</i>	28.3±1.3	5.7±0.8	5.2±0.4	99.1±2.3	29.7±1.6
<i>A. solani</i>	16.8±3.8	37.1±8.1	5.3±0.5	98.2±2.7	23.8±3.1
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>mornordicae</i>	19.5±8.0	53.4±1.4	5.3±0.5	99.2±1.7	36.1±2.4
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	24.2±5.0	15.9±11.7	5.2±0.4	99.3±1.8	27.8±3.1
<i>C. lunata</i>	27.0±9.9	21.1±10.0	5.3±0.5	98.6±2.1	29.3±2.9
<i>V. dahliae</i>	20.2±3.5	26.3±17.4	5.2±0.4	99.1±2.2	23.9±4.6

“a” means colony average diameter/mm; “b” means inhibiting rate/%; CK means blank control; the concentration of compounds is 100 µg/mL.

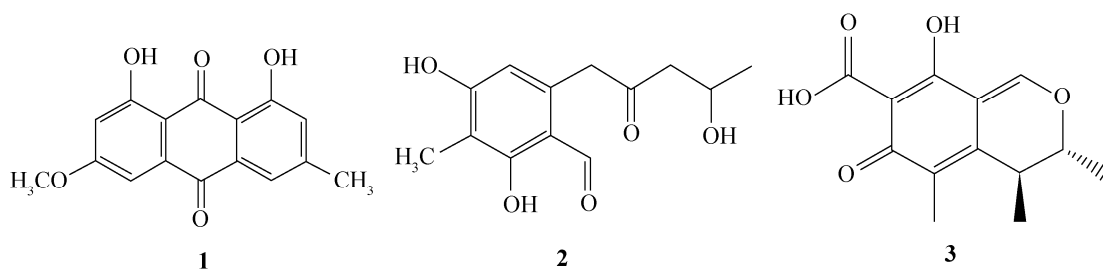


图 4. 化合物 1–3 的结构图

Figure 4. Structures of compounds 1–3.

化合物 1: 橙黄色粉末, 易溶于二氯甲烷。经正源高分辨电喷雾质谱 HR-ESI-MS 分析可知准分子离子峰  $[M+H]^+$   $m/z$  285.0758, 计算值为  $C_{16}H_{13}O_5$  285.0758。因此推测该化合物分子式为  $C_{16}H_{12}O_5$ 。化合物 1 的波谱数据如下:  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz) 7.63 (1H, br, s, 4-H), 7.37 (1H, d,  $J=2.5$ , 5-H), 7.09 (1H, br, s, 2-H), 6.69 (1H, d,  $J=2.6$ , 7-H), 3.94 (3H, s, 16-H), 2.45 (3H, s, 15-H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz) 191.0 (C-9), 182.2 (C-10), 166.5 (C-6), 165.4 (C-8), 162.7 (C-1), 148.6 (C-3), 135.4 (C-14), 133.4 (C-11), 124.7 (C-2), 121.5 (C-4), 113.8 (C-12), 110.4 (C-13), 108.4 (C-5), 106.9 (C-7), 56.3 (C-(16- $OCH_3$ )), 22.3 (C-(15- $CH_3$ ))。该结构的谱图数据与文献[11]报道的相一致, 因此将该化合物最终鉴定为 Physcion。

化合物 2: 白色针状结晶, 易溶于甲醇和丙酮。根据其正源高分辨电喷雾质谱 HR-ESI-MS 得出的准分子离子峰  $[M+H]^+$   $m/z$  253.1067, 计算值  $C_{13}H_{17}O_5$   $m/z$  253.1076, 因此推测该化合物的分子式为  $C_{13}H_{16}O_5$ 。化合物 2 的波谱数据如下:  $^1H$  NMR (Actone- $d_6$ , 600 MHz) 12.82 (1H, s, 1-OH), 9.90 (3H, s, 12-H), 6.42 (1H, s, 4-H), 4.31 (1H, s, 10-H), 4.21 (2H, s, 7-H), 2.72 (2H, m, 9-H), 1.22 (3H, d,  $J=9.3$ , 11-H);  $^{13}C$  NMR (Actone- $d_6$ , 150 MHz) 207.2 (C-8), 195.1 (C-12), 164.8 (C-1), 163.4 (C-5), 139.2 (C-3), 113.7 (C-6), 111.5 (C-4), 110.9 (C-2), 64.8 (C-10), 52.2 (C-9), 47.1 (C-7), 23.9 (C-11), 7.3 (C-13)。该结构的谱图数据与文献[12]报道的相一致, 因此将该化合物最终鉴定为 FK-17-p2a。

化合物 3: 黄色针状结晶, 易溶于二氯甲烷, 微溶于甲醇。根据其正源高分辨电喷雾质谱 HR-ESI-MS 得出的准分子离子峰  $[M+H]^+$   $m/z$  251.0911, 计算值  $C_{13}H_{15}O_5$   $m/z$  251.0919, 因此推测该化合物的分子式为  $C_{13}H_{14}O_5$ 。化合物 3 的波谱数据如下:  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ , 400 MHz) 15.88 (1H, s, 8-OH), 15.13 (1H, s, 12-OH), 8.75 (1H, s,

1-H), 4.79 (1H, q,  $J=6.7$ , 3-H), 3.00 (1H, q,  $J=7.1$ , 4-H), 2.04 (3H, s, 11-H), 1.37 (3H, q,  $J=6.7$ , 9-H), 1.25 (3H, q,  $J=7.2$ , 10-H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ , 150 MHz) 184.0 (C-6), 177.4 (C-8), 174.7 (C-12), 162.9 (C-1), 139.2 (C-4a), 123.3 (C-5), 107.6 (C-8a), 100.5 (C-7), 81.8 (C-3), 34.8 (C-4), 18.7 (C-9), 18.4 (C-10), 9.6 (C-11)。该结构的谱图数据与文献[13]报道的相一致, 因此将该化合物最终鉴定为 Citrinin。

## 2.5 单体化合物的细菌活性

3 种单体化合物的抗细菌活性如表 2 所示。由表可知, 化合物 3 对所有测试致病细菌均表现出很好的抗菌活性, 对大肠杆菌、枯草芽孢杆菌的抑菌圈直径分别为 21.8 mm 和 24.7 mm, 均略高于阳性对照; 对金黄色葡萄球菌的抑菌活性与阳性对照相当, 抑菌圈直径为 20.6 mm。化合物 2 在一定程度上对 3 种致病细菌均表现出抑制活性。化合物 1 则对革兰氏阳性菌有一定的抑制作用。

表 2. BYSTW3 化合物对三种致病细菌的生长抑制活性 (30  $\mu$ g/滤纸片)

Table 2. Inhibitory activity of compounds against three pathogenic bacteria (30  $\mu$ g/disc)

Compounds	Inhibition zone/mm		
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
1	—	7.3 $\pm$ 0.8	8.8 $\pm$ 0.6
2	6.5 $\pm$ 0.1	6.5 $\pm$ 0.5	9.8 $\pm$ 0.8
3	21.8 $\pm$ 1.1	24.7 $\pm$ 0.3	20.6 $\pm$ 0.7
Gentamycin sulfate	20.7 $\pm$ 0.3	24.2 $\pm$ 1.5	23.0 $\pm$ 0.5

“—” means no inhibition.

## 3 总结和讨论

本研究从黑翅土白蚁中分离得到一株具有生物活性的真菌 BYSTW3。结合该菌的形态学特征和分子学特征, 初步鉴定该菌隶属于格孢腔目, 参照相关文献以及实验所得菌株相似度数据, 该菌极

有可能是一个潜在新种。活性测试表明,该菌的乙酸乙酯粗提物能中等强度地抑制苹果树腐烂病菌和苦瓜枯萎病菌的生长,抑制率分别为 54.5%和 53.4%,另外它还表现出一定的抗菌活性。进一步分离纯化得到 3 个具有生物活性的单体化合物,其中化合物 1 也是植物源抗菌活性化合物,主要存在于大黄等蓼科植物中<sup>[14]</sup>;化合物 3 为抗生素类物质,主要发现于青霉属和曲霉属(曲霉目)真菌的次级代谢物中<sup>[15]</sup>。化合物 1 和 3 均首次从格孢腔目的真菌中分离得到。化合物 2 表现出一定程度的抗菌活性。化合物 3 所表现出来的优于阳性对照的抗菌活性与粗提物微弱的抗菌活性形成鲜明反差,这可能是粗提物中存在相互拮抗的物质,具体的机理仍需后续深入的研究。由于受到分离所得化合物的含量限制,本实验尚未进一步测试化合物的抗植物致病真菌活性。另外,关于该菌的安全性、其他活性化合物的分离鉴定以及活性作用机理等,还有待于进一步的研究探讨。

## 参 考 文 献

- [1] Czaja K, Góralczyk K, Struciński P, Hernik A, Korcz W, Minorczyk M, Łyczewska M, Ludwicki JK. Biopesticides - towards increased consumer safety in the European Union. *Pest Management Science*, 2015, 71(1): 3–6.
- [2] Hunter P. Fight fire with fire: Can biopesticides fill the void left by banning chemical pesticides and herbicides? *EMBO Reports*, 2009, 10(5): 433–436.
- [3] Chen C, Liu W, Shi HP, Wang YY, Xiao R, Yu J, Liu JY. Present status and application perspectives of microbial pesticide in orchards. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(19): 35–40. (in Chinese)  
陈冲, 刘伟, 史华平, 王芸芸, 肖蓉, 于静, 刘靖宇. 微生物农药在我国果树生产中的应用现状与前景. *中国农学通报*, 2015, 31(19): 35–40.
- [4] Bode HB. Insect-associated microorganisms as a source for novel secondary metabolites with therapeutic potential// Vilcinskas A. *Insect Biotechnology. Biologically-Inspired Systems*, vol. 2. Dordrecht: Springer, 2011: 77–93.
- [5] Shao MW, Kong LC, Jiang DH, Zhang YL. Phytotoxic and antimicrobial metabolites from *Paraphaeosphaeria* sp. QTYC11 isolated from the gut of *Pantala flavescens* larvae. *Records of Natural Products*, 2016, 10(3): 326–331.
- [6] Nirma C, Eparvier V, Stien D. Antibacterial ilicicolinic acids C and D and ilicicolinal from *Neonectria discophora* SNB-CN63 isolated from a termite nest. *Journal of Natural Products*, 2015, 78(1): 159–162.
- [7] White MM, Strongman DB. New species of *Spartiella* and *Legeriosimilis* from mayflies and other arthropod-associated trichomycetes from Nova Scotia, Canada. *Botany*, 2012, 90(11): 1195–1203.
- [8] Harrington TC, Aghayeva DN, Fraedrich SW. New combinations in *Raffaelea*, *Ambrosiella*, and *Hyalorhinocladia*, and four new species from the redbay ambrosia beetle, *Xyleborus glabratus*. *Mycotaxon*, 2010, 111(1): 337–361.
- [9] 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 and Food Chemistry*, 2014, 62(36): 8997–9001.
- [10] Zhang Y, Crous PW, Schoch CL, Hyde KD. *Pleosporales*. *Fungal Diversity*, 2012, 53(1): 1–221.
- [11] Smetanina OF, Kalinovskii AI, Khudyakova YV, Slinkina NN, Pivkin MV, Kuznetsova TA. Metabolites from the marine fungus *Eurotium repens*. *Chemistry of Natural Compounds*, 2007, 43(4): 395–398.
- [12] Yamaguchi Y, Masuma R, Kim YP, Uchida R, Tomoda H, Omura S. Taxonomy and secondary metabolites of *Pseudobotrytis* sp. FKA-25. *Mycoscience*, 2004, 45(1): 9–16.
- [13] Marinho AMD, Rodrigues-Fo E. Dicitrinol, a citrinin dimer, produced by *Penicillium janthinellum*. *Helvetica Chimica Acta*, 2011, 42(36): 835–841.
- [14] Tong Y, Jin Z. Research progress of pharmacological effect of physcion. *Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine*, 2015, 33(4): 938–940. (in Chinese)  
童妍, 金钊. 大黄素甲醚的药理作用研究进展. *中华中医药学刊*, 2015, 33(4): 938–940.
- [15] Reddy CS, Reddy RV, Hayes AW. High-performance liquid chromatographic analysis of the mycotoxin secalononic acid d and its application to biological fluids. *Journal of Chromatography A*, 1981, 208(1): 17–26.



## Antimicrobial metabolites of BYSTW3, a symbiotic fungus from *Odontotermes formosanus*

Ying Wang<sup>1#</sup>, Xiao Xu<sup>1#</sup>, Jingjing Shi<sup>1</sup>, Caiping Yin<sup>1,2</sup>, Luxia Weng<sup>1</sup>, Wei Guo<sup>1\*</sup>, Yinglao Zhang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, Zhejiang Province, China

<sup>2</sup> School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China

**Abstract:** [Objective] We identified fungus BYSTW3, from *Odontotermes formosanus*, and studied its active secondary metabolites. [Methods] BYSTW3 was identified by morphological observation and ITS (Internal Transcribed Spacer) sequence analysis. The antibacterial and antifungal activities of crude extracts were tested by filter paper method and growth rate method respectively. The crude extracts were separated and purified by a variety of chromatographic column separation methods, and the structures of the compounds were analyzed with a variety of spectral data. [Results] Strain BYSTW3 was identified as a potential new species of *Pleosporales* sp. The crude extract of BYSTW3 inhibited radical growth of *Valsa mali* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *mornordicae* with the inhibition rates of 54.5% and 53.4% at the concentration of 100 µg/mL. Bioactivity-guided fractionation lead to the isolation of three fungal metabolites 1–3, including physcion (1), FK-17-p2a (2) and citrinin (3). Both compounds 1 and 3 were firstly isolated from the fungus of *Pleosporales* sp.. At the concentration of 30 µg/disc, compound 3 showed potent antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* with the mean halo diameter of 23.0 mm, 24.2 mm and 20.7 mm, respectively. [Conclusion] BYSTW3 is a potential new strain with good prospects as a new antimicrobial agents from microbial resources.

**Keywords:** *Odontotermes formosanus*, symbiotic fungus, *Pleosporales* sp., metabolites, antimicrobial activity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770007), by the Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LY17C010002) and by the Projects Funded by Scientific and Technological Innovation Activities for Zhejiang Undergraduate (2017R404021)

\*Corresponding author. Wei Guo, Tel: +86-579-82282269, E-mail: weiguo817@zjnu.cn; Yinglao Zhang, Tel: +86-551-65786129, E-mail: zhangyl@ahau.edu.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 9 March 2018; Revised: 23 April 2018; Published online: 27 April 2018



张应烙, 1976年2月生, 博士, 安徽农业大学皖江学者特聘教授, 博士生导师, 中国昆虫学会昆虫微生物组专业委员会委员。主要从事昆虫共生菌及其活性代谢产物研究, 先后主持国家自然科学基金3项, 省部级项目8项; 以第一或通讯作者在国内刊物上发表论文40余篇, 其中SCI论文18篇, 主要论文发表在 *Journal of the American Chemical Society*, *Angewandte Chemie International Edition*, *Bioresource Technology*, *Food Chemistry*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 等主流杂志上; 获授权发明专利9件。