

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (3) :292 - 298; 4 March 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140294

## 马蜂肠道菌抑制反枝苋的活性筛选及菌株 MF06 的活性代谢产物

张蕴<sup>1</sup>, 邵明伟<sup>1</sup>, 张应烙<sup>1,2\*</sup>, 李帅<sup>1</sup>, 卢贻会<sup>1</sup>, 肖孝辉<sup>1\*</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>南京大学, 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093

**摘要:** 【目的】研究马蜂肠道真菌对反枝苋的抑制活性, 为开发微生物源除草剂奠定基础。【方法】通过测试 11 种肠道真菌发酵液对反枝苋根生长的抑制效果筛选出活性菌株 MF06。通过形态学观察和分子生物学鉴定确定 MF06 的分类地位。通过硅胶柱层析法、薄层层析法、葡聚糖凝胶柱层析法对乙酸乙酯粗提物进行分离、纯化, 得到代谢产物 1, 研究代谢产物 1 对反枝苋根生长的抑制作用。利用核磁共振谱和质谱确定代谢产物 1 的化学结构。【结果】经形态学观察和 ITS 序列分析确定 MF06 菌株为尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)。当供试质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 该菌株发酵液的乙酸乙酯提取物对反枝苋根生长的抑制率大于 68%。从乙酸乙酯粗提物中分离得到代谢产物 1, 经过结构鉴定为镰刀菌酸与 9,10-脱氢镰刀菌酸以 1:1 比例形成的混合物。活性测试表明代谢产物 1 对反枝苋根生长具有很强的抑制作用, 抑制活性的  $\text{IC}_{50}$  值为  $(0.51 \pm 0.18) \mu\text{g}/\text{mL}$ , 与阳性对照药 2,4-二氯苯氧乙酸的活性 [ $\text{IC}_{50}$  值为  $(0.30 \pm 0.14) \mu\text{g}/\text{mL}$ ] 相当。【结论】MF06 菌株具有开发为微生物源除草剂的潜力。

**关键词:** 马蜂肠道菌, 反枝苋, 尖孢镰刀菌, 除草活性

**中图分类号:** Q935      **文章编号:** 0001-6209 (2015) 03-0292-07

反枝苋 (*Amaranthus retroflexus*) 是一种分布广泛的恶性杂草<sup>[1-2]</sup>, 对农业生产有很大的破坏作用。现在人们一般使用化学农药对反枝苋进行防除, 但是长期使用化学农药导致了诸如耐药性增强、环境污染、生态破坏等一系列恶性问题<sup>[3]</sup>, 因此寻找一种有效且对环境友好的除草剂显得尤为重要。微生物源除草剂以其毒性小、不破坏生态环境、残留少、选择性强、对非靶标生物和哺乳动物安全、环境兼容性好等优点, 正逐步引起人们的重视<sup>[4-6]</sup>。由于微

生物种类繁多, 如何选择合适的微生物是微生物源除草剂所面临的重要问题之一。特境微生物是指特殊环境下生存的微生物, 由于特境微生物生存环境的特殊性, 导致特境微生物可能具有一些特殊的活性, 如除草活性、抗真菌活性、抗癌活性等等。昆虫肠道微生物属于特境微生物的一种。研究表明部分昆虫肠道菌具有较好的除草活性, 如张应烙等<sup>[7-8]</sup>报道了从棉蝗肠道中分离出了棉蝗肠道菌 *Phoma* sp. 和 *Pestalotiopsis* sp. 具有较好的除草活性。本实

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (21272215); 南京大学医药生物技术国家重点实验室开放课题 (KF-GN-201411)

\* 通信作者。张应烙, Tel: +86-579-82286419, E-mail: ylzhang@zjnu.cn; 肖孝辉, E-mail: xxh@zjnu.cn

**作者简介:** 张蕴 (1990 -), 女, 黑龙江人, 硕士研究生, 主要研究天然药物化学。E-mail: zhangy\_90@163.com

**收稿日期:** 2014-06-09; **修回日期:** 2014-10-04

验研究了马蜂肠道真菌对反枝苋活性的抑制作用, 筛选出具有活性的菌株并对其活性发酵产物进行了分离和鉴定, 旨在为开发新型微生物源除草剂奠定一定的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试昆虫: 马蜂 (*Vespa mandarinia* Smith) 成虫, 捕捉于浙江师范大学北门附近 (北纬 29.14°, 东经 119.64°)。

供试种子: 反枝苋 (*A. retroflexus*) 种子, 购自河北省唐山市北方种子基地。

培养基: 麦芽浸汁固体培养基 (MEA) 成份为生麦芽 20 g (煮沸 20 min, 滤去残渣), 蔗糖 20 g, 蛋白胨 1 g, 琼脂 15–20 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 自然。不加琼脂者为相应的液体培养基 (ME)。

实验试剂: 75% 消毒酒精, 杭州擦擦净卫生用品有限公司; 生麦芽, 购自亳州市中药饮片厂; 蔗糖、牛肉膏、蛋白胨、琼脂粉等, 购自北京博奥星生物技术有限责任公司; 葡聚糖凝胶 LH-20, 瑞典 Pharmacia Biotech 公司; 100–200 目硅胶、200–300 目硅胶、GF254 薄层层析硅胶, 青岛海洋化工; 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D), 上海信然生物科技有限公司; 新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒, 北京百泰克生物技术有限公司。

实验仪器: BrukerDrx-500 核磁共振仪, 瑞士 Bruker 公司; Mariner 质谱仪, 美国 ABI 公司; SW-CJ-1D 超净工作台, 江苏苏洁净化设备厂; CCA-1111 旋转蒸发仪, 上海爱朗仪器有限公司; 高速冷冻离心机 MIKRO22/22R, 德国 Hettich 公司。

### 1.2 菌株的分离

按照文献 [7–8] 的方法, 将捕捉到的马蜂饥饿处理 24 h, 然后在无菌操作台上用 75% 的医用消毒酒精对马蜂虫体进行表面消毒, 无菌水清洗。对上述处理过的马蜂进行解剖, 取出肠道, 研磨, 加入无菌水将肠道研磨物母液依次稀释为  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$  稀释液, 分别取上述浓度的研磨液 200  $\mu$ L 涂布于 MEA 培养基中, 置于 28°C 的恒温箱中培养。待菌体长出后, 挑选菌株的边缘菌丝进行培养, 如此反

复直至得到纯净的菌体。本实验共分离纯化到 11 株马蜂肠道真菌。

### 1.3 菌株的发酵及活性测定

将纯化得到的 11 株真菌分别接种于已灭菌的装有 100 mL ME 培养基的 250 mL 锥形瓶中。28°C、180 r/min 的摇床中培养 7 d。7 d, 将锥形瓶从摇床上撤下, 并用纱布滤去菌体, 保留发酵液。除草活性测试采用培养皿生物分析法 (Petri dish bioassay) [9], 分别取 5 mL 上述发酵液均匀洒在对应的铺有滤纸的直径为 9 cm 的培养皿中。选取 10 粒露白的反枝苋种子均匀撒在上述处理好的培养皿中。阳性对照组为 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D), 用丙酮配制成浓度为 100  $\mu$ g/mL 的溶液并加 5 mL 于滤纸片上。对照组的滤纸片也需加入 5 mL 的丙酮, 其余方法如上。将培养皿置于 28°C、相对湿度 70%、定时光照 (白天 12 h, 黑夜 12 h) 的人工气候箱中培养 2 天, 测量根长。计算公式为: 根生长抑制率 (%) = [(对照平均根长 - 处理平均根长) / 对照平均根长]  $\times$  100%。

### 1.4 MF06 菌株的鉴定

形态学鉴定: 将 MF06 菌株接种于 MEA 培养基中, 于 28°C 条件下培养 3–4 d, 采用插片法观察 MF06 孢子形态特征。

分子生物学鉴定: 按照 1.3 的方法将培养 3 d 的 MF06 新鲜菌体作为提取 DNA 的材料。以上述提取的基因组 DNA 为模板, 采用真菌通用引物 (ITS1, ITS4) 对供试菌株 rDNA 的 ITS 区域进行 PCR 扩增。反应液体积 50  $\mu$ L, 包括: ddH<sub>2</sub>O 39  $\mu$ L、10  $\times$  PCR buffer 4.0  $\mu$ L、dNTPs 4.0  $\mu$ L、ITS1 和 ITS4 各 1.0  $\mu$ L、Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L。PCR 反应程序: 94°C 预变性 2 min; 94°C 变性 1 min, 55°C 复性 1 min, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72°C 延伸 5 min, 4°C 保存。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶测其纯度。PCR 扩增产物经检测后送至上海生工生物工程有限公司进行测序。将测序得到的 ITS 序列与 GenBank 中的已知核酸序列进行比对, 利用 MEGA 5.05 软件进行系统发育分析并构建系统发育树。

### 1.5 MF06 发酵液不同极性产物的提取

将 MF06 菌株按照 1.3 的方法发酵 6 瓶, 共发酵 3 d。将上述发酵液作为种子液, 接入已灭菌的装

有 500 mL ME 培养基的 1000 mL 锥形瓶中。28℃, 180 r/min 的摇床中培养 7 天。7 d 后撤下锥形瓶, 用 3 层纱布滤去菌体。本次发酵共得到发酵液 20 L。取其中 1 L 发酵液分别用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇以 1:1 的比例反复进行萃取, 直到有机相基本无色。分别合并有机层并在 45℃ 条件下减压旋蒸, 共得到石油醚相、乙酸乙酯相、和正丁醇相粗提物, 经上述有机相萃取后的发酵液减压干燥后得水相。将上述 4 种粗提物分别配制成 100 μg/mL 的溶液, 按照 1.2.2 的方法测试其对反枝苋生长的抑制情况。

### 1.6 MF06 活性产物的提取与分离

将 MF06 发酵液和乙酸乙酯以体积比为 1:1 的比例反复进行萃取, 直至乙酸乙酯相基本无色。合并乙酸乙酯层并用旋蒸仪在 45℃ 的条件下减压旋干。实验共得到 14.8 g 粗提物。将得到的粗提物以质量比为 1:1 的比例与 100–200 目的硅胶搅拌均匀, 并置于 45℃ 的烘箱中烘干。将质量为粗提物 10 倍的 200–300 目的硅胶装柱, 用二氯甲烷将硅胶反复压实。本实验采取干法上样, 以二氯甲烷-甲醇为洗脱剂并用硅胶柱层析进行梯度洗脱。二氯甲烷与甲醇的体积比分别为 100:0、100:1、100:2、100:4、100:8、100:16、100:32。经过 TLC 检测, 合并相似成分。在洗脱剂为 100:2 的样品中发现一点, 经过反复纯化, 得到 1.2 g 代谢产物 1。

### 1.7 代谢产物 1 对反枝苋的抑制活性及其结构鉴定

将代谢产物 1 配制成 100、50、10、5、1 μg/mL 5 种浓度的溶液, 采用 1.3 的方法测试代谢产物 1 对反枝苋生长的抑制活性并计算其 IC<sub>50</sub> 值。

代谢产物 1 的结构鉴定分为质谱和核磁共振谱分析两部分。采用 Mariner System 5304 质谱仪测定代谢产物 1 的分子量, Bruker AVANCE-400 MHz 核磁共振仪测试物质的 <sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR。

## 2 结果和讨论

### 2.1 马蜂肠道菌对反枝苋的抑制作用

马蜂肠道菌发酵液对反枝苋的抑制活性见表 1。从表 1 中可以看出当所取的发酵液均为 5 mL

时, MF06 对反枝苋的抑制活性最好, 抑制率大于 80%。所以本次实验选取 MF06 作为进一步实验对象。

### 2.2 菌种鉴定

形态学鉴定: 在 MEA 平板上, MF06 的菌落为灰白色絮状突起, 菌落中间为紫粉色, 边缘为浅粉色。短绒状, 平整。气生菌丝不发达, 质地较疏松。在显微镜下观察到散落的分生孢子有两种形态, 一种是弯曲的镰刀型, 另一种是圆柱形(图 1)。上述特征与文献<sup>[10]</sup>报道的尖孢镰刀菌基本一致, 因此, 初步鉴定 MF06 为镰刀菌。

表 1. 11 株马蜂肠道菌发酵液对反枝苋生长的抑制作用  
Table 1. Inhibitory effect of fermentation broth from 11 wasp gut fungi against the radicle growth of *A. retroflexus*

Fungi	Inhibiting rate /%	Fungi	Inhibiting rate /%
MF01	50.00 ± 6.41	MF07	79.34 ± 3.12
MF02	72.89 ± 4.16	MF08	69.76 ± 5.09
MF03	73.13 ± 5.74	MF09	67.23 ± 4.74
MF04	77.47 ± 2.79	MF10	67.17 ± 3.53
MF05	70.30 ± 3.87	MF11	72.77 ± 2.52
MF06	82.89 ± 3.02	2,4-D	88.25 ± 1.82

2,4-D as the positive control, the concentration is 100 μg/mL.

分子生物学鉴定: 以 ITS1 和 ITS4 为引物, 扩增出长度为 517 bp 基因序列, Blast 对比发现 MF06 的序列与尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* JN020659 同源性高达 99%, 在系统发育树上处于同一分支(图 2)。因此, 结合形态特征, 可以确定 MF06 即为尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* (GenBank 登录号: KM013802)。

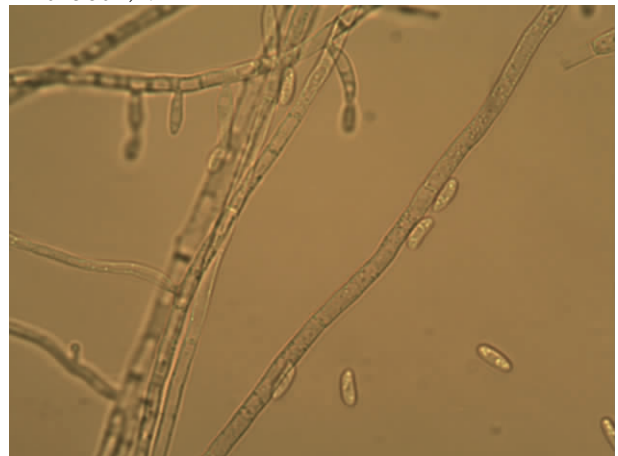


图 1. MF06 的孢子形态 (400 ×)

Figure 1. The spore morphology of MF06 (400 ×).

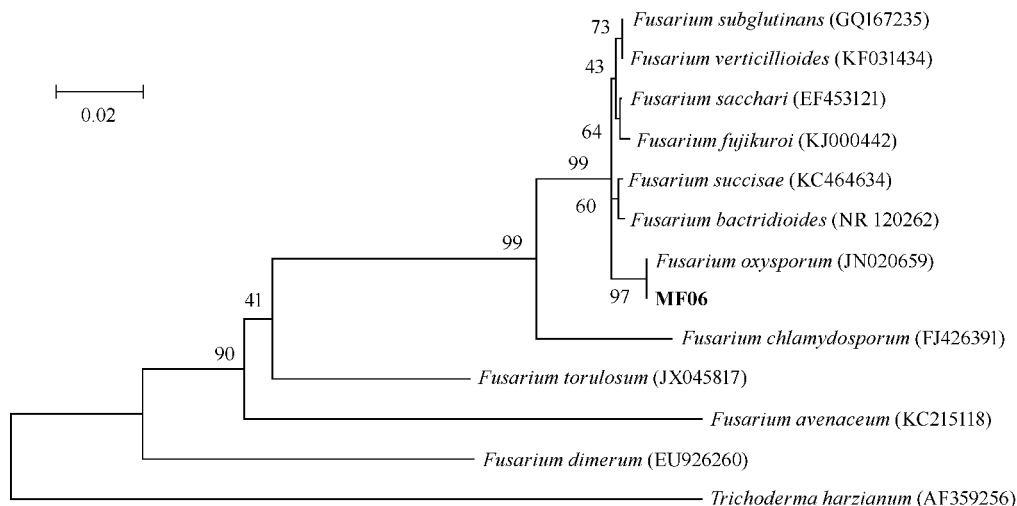


图 2. 基于 5.8S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree based on the 5.8S rDNA sequences. Numbers in bracket represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 0.02 sequence divergence.

### 2.3 MF06 粗提物对反枝苋的抑制作用

MF06 不同极性溶剂粗提物对反枝苋的抑制活性见表 2。从表 2 中可以得知当供试浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, 4 种不同极性的粗提物对反枝苋抑制活性最好的是乙酸乙酯相粗提物, 抑制率近 69%。其次是石油醚相粗提物, 抑制率约 51%。活性最低的是水相的粗提物, 抑制率小于 24%。因此 MF06 发酵液能够有效抑制反枝苋生长的活性部分主要集中在中等极性的乙酸乙酯相。

进一步测试了不同浓度乙酸乙酯相粗提物对反枝苋根的抑制作用, 结果见图 3。根据相应的实验数据计算出 MF06 乙酸乙酯相粗提物的  $\text{IC}_{50}$  值为  $(1.39 \pm 0.12) \mu\text{g}/\text{mL}$ , 其活性比阳性对照 2,4-D [ $\text{IC}_{50}$  值为  $(0.30 \pm 0.14) \mu\text{g}/\text{mL}$ ] 略低。

表 2. MF06 不同极性粗提物对反枝苋根生长的抑制作用

Table 2. Inhibitory effect of MF06's crude extracts of different polarities against the radicle growth of *A. retroflexus*

Extracts	Inhibiting rate /%
petroleum ether extract	50.73 $\pm$ 4.55
ethyl acetate extract	68.71 $\pm$ 3.87
butanol extract	38.15 $\pm$ 4.43
water extract	23.88 $\pm$ 4.28
2,4-D	87.61 $\pm$ 1.70

The concentration for the test is 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 2,4-D is the positive control.

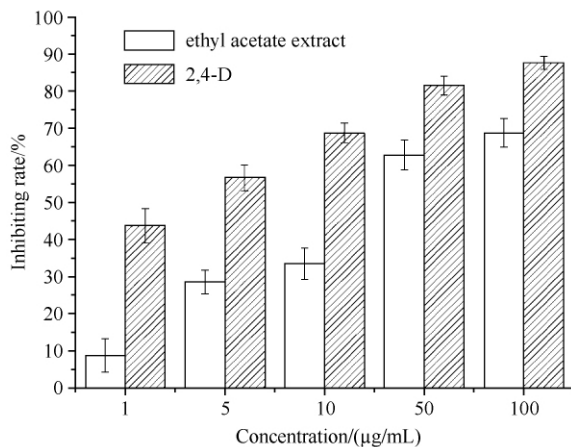


图 3. 不同浓度 MF06 乙酸乙酯粗提物及 2,4-D 对反枝苋根生长的抑制作用

Figure 3. Inhibitory effect of ethyl acetate extracts of MF06 and 2,4-D against the radicle growth of *A. retroflexus* in different concentration.

### 2.4 代谢产物 1 对反枝苋的抑制作用及其结构鉴定

通过硅胶柱层析、薄层层析、葡聚糖凝胶柱层析等方法分离得到 MF06 的 1 种主要代谢产物 1 (占粗浸膏含量的 8.1%)。

不同浓度代谢产物 1 对反枝苋的抑制作用见图 4。根据图中数据计算出代谢产物 1 的  $\text{IC}_{50}$  值为  $(0.51 \pm 0.18) \mu\text{g}/\text{mL}$ , 其活性与阳性对照 2,4-

D 相当。

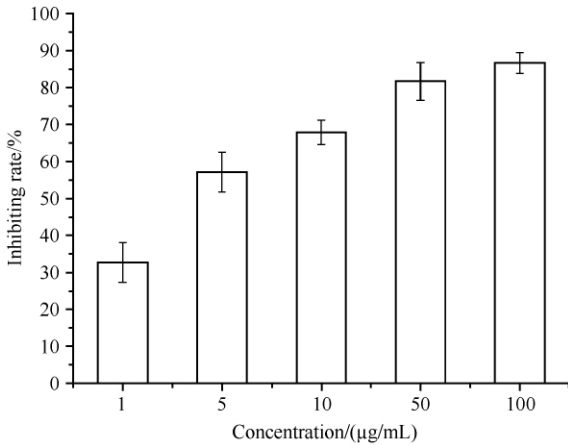


图 4. 不同浓度代谢产物 1 对反枝苋根生长的抑制作用

Figure 4. Inhibitory effect of the metabolite 1 against the radicle growth of *A. retroflexus* in different concentration.

采用质谱和核磁共振谱对化合物的结构进行分析,代谢产物 1 的波谱数据如下:

ESI-MS:  $m/z$  178.0888  $[M + H]^+$ ,  $C_{10}H_{13}NO_2$ ; 180.1050  $[M + H]^+$ ,  $C_{10}H_{15}NO_2$ ; 379.0838  $[C_{10}H_{12}NO_2 + C_{10}H_{14}NO_2 + Na]^+$ ; 395.0644  $[C_{10}H_{12}NO_2 + C_{10}H_{14}NO_2 + K]^+$ ; 735.1755  $[2(C_{10}H_{12}NO_2 + C_{10}H_{14}NO_2) + Na]^+$ ; 751.1381  $[2(C_{10}H_{12}NO_2 + C_{10}H_{14}NO_2) + K]^+$ .  $^1H$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 10.88 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 8.22 (d, 5.9 Hz, 1H), 7.82 (d, 7.8 Hz, 1H), 5.81 (m, 1H), 5.04 (d, 5.0 Hz, 1H), 5.01 (s, 1H), 2.87 (t, 7.6 Hz, 1H), 2.76 (t, 7.8 Hz, 1H), 2.44 (dd, 14.4 Hz, 7.1 Hz, 1H), 1.66 (m, 1H), 1.39 (dq, 14.8 Hz, 7.4 Hz, 1H), 0.94 (t, 7.4 Hz, 2H);  $^{13}C$  NMR ( $CDCl_3$ )  $\delta$ : 165.2, 147.8, 147.6, 138.8, 138.7, 136.3, 124.6, 124.5, 116.4, 34.6, 32.9, 32.8, 32.4, 22.2, 13.8.

上述数据与文献<sup>[11]</sup>报道基本一致,是镰刀菌酸与 9,10-脱氢镰刀菌酸的混合物(1:1)。

尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 是一种分布广泛的真菌,一般分为致病型和非致病型两种<sup>[12]</sup>。尖孢镰刀菌的代谢产物较多,且部分具有活性。如 Breinholt 等人<sup>[13]</sup>从 *F. oxysporum* CBS330.95 的发酵液中分离得到了新的化合物 N-methyl-4-hydroxy-2-pyridone

具有较好的抗真菌活性;Wang 等人<sup>[14]</sup>从相应的牛樟树内生真菌 *F. oxysporum* 中分离到的 beauvericin 具有很好的抗癌活性;Cui 等人<sup>[15]</sup>从银杏内生真菌 *F. oxysporum* SYP0056 中分离得到的 ginkgolide B 是血小板活化因子拮抗剂,可用于治疗缺血性脑中风的痰瘀阻络证。但尚未见尖孢镰刀菌及其代谢产物对反枝苋抑制活性的报道。

### 3 讨论

本研究从马蜂肠道中筛选出 1 株抑制反枝苋生长效果较好活性的菌株 MF06。经鉴定 MF06 为尖孢镰刀菌 *F. oxysporum*。活性测试表明 MF06 乙酸乙酯萃取物对反枝苋根的生长有较好的抑制活性。采用活性跟踪方法从其发酵液乙酸乙酯粗提取物中分离得到主要代谢产物 1,根据核磁共振谱和质谱确定代谢产物 1 为 fusaric acid 和 9,10-dehydrofusaric acid 的混合物(1:1)。该主要代谢产物对反枝苋根的生长具有很好的抑制活性,是 MF06 具有除草活性的物质基础。因此,MF06 具有开发为微生物除草剂的潜力,值得深入研究。至于 MF06 对作物的安全性、田间防效和作用机理等,还有待于进一步的研究探讨。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Zhang C, Ni H, Wei S, Huang H, Liu Y, Cui H, Sui B, Zhang M, Guo F. Current advances in research on herbicide resistance. *Scientia Agricultura Sinica*, 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. 杂草抗性研究进展. 中国农业科学, 2009, 42 (4): 1274-1289.
- [4] Zhang H, Wang K. Progress of research on microbial herbicides. *Weed Science*, 2010, (2): 1-7. (in Chinese)
- 仇欢, 王开运. 微生物除草剂研究进展. 杂草科学, 2010, (2): 1-7.
- [5] Zhang JP, Duan GF, Zhou YJ, Yu LQ. Fungal phytotoxins for weed management. *Allelopathy Journal*, 2011, 27: 1-13.
- [6] 张正波. 除草微生物禾长蠕孢的菌种改良与制剂的研究. 中国农业科学院博士学位论文, 2007 年.
- [7] Zhang Y, Yin C, Ye S, Miao R. Studies on the herbicidal and immunosuppressive composition of *Phoma* sp. HC03, a fungus residing in *Chondracris rosea* gut. *Natural Product Research and Development*, 2010, 22: 600-602. (in Chinese)
- 张应烙, 尹彩萍, 叶圣涛, 缪仁挺. 棉蝗肠道真菌 *Phoma* sp. HC03 除草和免疫抑制成分研究. 天然产物研究与开发, 2010, 22: 600-602.
- [8] Zhang YL, Ge HM, Li F, Song YC, Tan RX. New phytotoxic metabolites from *Pestalotiopsis* sp. HC02, a fungus residing in *Chondracris rosea* gut. *Chemistry & Biodiversity*, 2008, 5: 2402-2407.
- [9] Matsuura K. Nestmate recognition mediated by intestinal bacteria in a termite, *Reticulitermes speratus*. *Oikos-A Journal of Ecology*, 2001, 92 (1): 20-26.
- [10] Yi X, Zhu M, Feng J, Li Y, Zhang X. Identification of endophytic fungi in *Pyrethrum cinerariifolium* Trev. *Journal of Northwest A&F University*, 2008, 36 (8): 165-169. (in Chinese)
- 易晓华, 朱明旗, 冯俊涛, 李琰, 张兴. 一株具抑菌活性除虫菊内生真菌的菌种鉴定. 西北农林科技大学学报, 2008, 36 (8): 165-169.
- [11] Wang J, Li GW, Lin YC, Zhou SN, Ng SW. 5-(But-3-enyl) pyridinium-2-carboxylate-5-butylpyridine-2-carboxylic acid (1/1), a co-crystal from *Fusarium moniliforme*. *Acta Crystallographica*, 2005, E61, 1515-1516.
- [12] Liu X, Li F, Chen H, Guo J, Zhang P. Advances in biocontrol of pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Journal of Yunnan University*, 2008, 30 (S1): 89-93. (in Chinese)
- 刘新月, 李凡, 陈海如, 郭俊, 张萍. 致病性尖孢镰刀菌生物防治研究进展. 云南大学学报, 2008, 30 (S1): 89-93.
- [13] Jens B, Svend L, Birgitte RR, Connie NR. Oxysporidinone: A novel, antifungal N-Methyl-4-hydroxy-2-pyridone from *Fusarium oxysporum*. *Journal of Natural Products*, 1997, 60: 33-35
- [14] Wang QX, Li SF, Zhao F, Dai HQ, Bao L, Ding R, Gao H, Zhang LX, Wen HA, Liu HW. Chemical constituents from endophytic fungus *Fusarium oxysporum*. *Fitoterapia*, 2011, 82: 777-781.
- [15] Cui Y, Yi DW, Bai XF, Sun BS, Zhao YQ, Zhang YX. Ginkgolide B produced endophytic fungus (*Fusarium oxysporum*) isolated from *Ginkgo biloba*. *Fitoterapia*, 2012, 83: 913-920.

# Inhibition of *Amaranthus retroflexus* by wasp gut fungal isolate *Fusarium oxysporum* MF06

Yun Zhang<sup>1</sup>, Mingwei Shao<sup>1</sup>, Yinglao Zhang<sup>1,2\*</sup>, Shuai Li<sup>1</sup>, Yihui Lu<sup>1</sup>, Xiaohui Xiao<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210093, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] To study the inhibitory effect of wasp gut fungus against the radicle growth of *Amaranthus retroflexus* for the development of herbicides from microorganisms. [Methods] Eleven strains were isolated from wasp gut. Among them the fermentation broth of strain MF06 showed potent herbicidal activity against *A. retroflexus*. MF06 was identified by morphological observation and molecular biology identification. Fermentation product was isolated and purified by silica column chromatography, TLC and Sephadex LH-20 column chromatography. Metabolite 1 was obtained from fermentation product, and the inhibitory effect of metabolite 1 against the radicle growth of *A. retroflexus* was studied. The structure was determined by mass spectrum and nuclear magnetic resonance analyses. [Results] By the morphological observation and ITS sequence analysis, MF06 was identified as *Fusarium oxysporum*. The ethyl acetate extract of MF06 had strong activity against *A. retroflexus* with inhibition rate of more than 68% under the concentration of 100  $\mu\text{g/mL}$ . It is better than other polarities crude extracts. Metabolite 1 was separated from ethyl acetate extract, and it was determined as a mixture of fusaric acid and 9,10-dehydrofusaric acid. The mixture is co-crystallizing in a 1:1 molar stoichiometry. It inhibited radical growth of *A. retroflexus* with  $\text{IC}_{50}$  value of  $(0.51 \pm 0.18) \mu\text{g/mL}$ , comparable to that of 2-(2,4-dichlorophenoxy) acetic acid  $(0.30 \pm 0.14 \mu\text{g/mL})$  used as a positive control. [Conclusion] Strain MF06 could be potentially developed as a microbial herbicide.

**Keywords:** wasp gut fungi, *Amaranthus retroflexus*, *Fusarium oxysporum*, herbicidal activity

(本文责编:张晓丽)

---

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21272215) and by the Open Project of State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University (KF-GN-201411)

\* Corresponding author. Yinglao Zhang, Tel: +86-579-82286419, E-mail: ylzhang@zjnu.cn; Xiaohui Xiao, E-mail: xxh@zjnu.cn

Received: 9 June 2014 / Revised: 4 October 2014