



黄蜻幼虫肠道菌QTYC01除草活性代谢产物的分离和鉴定

邵明伟, 靳丽萍, 张应烙*

浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江 金华 321004

摘要: 【目的】从黄蜻幼虫肠道中分离出具有除草活性的真菌, 并在其代谢产物中寻找具有除草活性的先导化合物。【方法】采用涂布平板法对黄蜻幼虫肠道共生真菌进行分离, 通过形态学观察和5.8S rRNA序列分析初步确定目标菌株QTYC01的分类地位。利用离体的方法测定菌株发酵液及其乙酸乙酯提取物的除草活性以及粗提物对常见农作物的安全性; 利用盆栽方法测定发酵液对稗草幼苗的活性。运用重结晶的方法对发酵产物进行分离、纯化, 利用质谱和核磁共振谱分析鉴定出化合物的结构。【结果】菌株QTYC01被鉴定为*Curvularia crepinii*。离体活性测试发现QTYC01发酵液可显著抑制稗草和反枝苋幼根的生长, 其抑制率分别可达95.0%和90.1%, 并可使经喷施发酵液的稗草幼苗的受害率达到71.1%。发酵液的乙酸乙酯提取物对稗草和反枝苋幼根具有很好的抑制效果, 在100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度条件下, 粗提物对稗草和反枝苋的抑制活性分别为56.8%和71.2%, 且在该浓度条件下对一些常见农作物具有很好的安全性, 其抑制率均低于32.6%。进一步从其乙酸乙酯提取物中分离得到化合物(5Z)-7-oxozeaenol, 活性测试表明化合物具有较好的抑制反枝苋活性, 其 IC_{50} 为4.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。【结论】菌株QTYC01具有开发为新型微生物除草剂的潜力。

关键词: 昆虫共生菌, 黄蜻幼虫, *Curvularia crepinii*, 除草活性

1942年, 美国科学家发现具有除草活性的2,4-D后, 兴起了化学除草剂工业^[1]。从1979年高效除草剂氯磺隆开发以来, 合成除草剂工业便进入高速发展时代, 磺酰脲类、咪唑啉酮类等除草剂相继问世^[2]。虽然化学除草剂为人们挽回了大量的损失, 然而长期单一使用农田除草剂的同时引起了杂草种群演变, 增大了一些杂草的选择压力, 致使抗性种群的出现, 增加了人工除草难

度^[3-5], 同时对环境造成了严重的污染。因此寻找一种有效且对环境友好的新型除草剂, 正逐步引起人们的重视。微生物源除草剂具有毒性小、环境兼容性好、残留少、选择性强、对非靶标生物和哺乳动物安全等优点, 受到人们越来越多的关注^[6], 尤其是那些生活在特殊环境里的微生物活性代谢产物^[7], 更是吸引了人们的极大兴趣。

昆虫与微生物的共生是一种普遍存在的自然

基金项目: 国家自然科学基金(21002092)

*通信作者。Tel: +86-579-82286419; Fax: +86-579-82282269; E-mail: ylzhang@zjnu.cn

收稿日期: 2016-01-24; 修回日期: 2016-04-05; 网络出版日期: 2016-06-03

现象。昆虫的种类、数量及分布范围具有复杂多样性,同时在昆虫个体体表以及体内有种类繁多的共生微生物,这些微生物在生态、代谢特征、生理活性等方面均有一定的特殊性。昆虫肠道菌是昆虫共生菌的一种,据报道有些肠道菌能够分泌一些帮助昆虫肠道消化的酶^[8-9],也能合成一些杀死植物以利于昆虫消化的植物毒素^[10]。此外也有研究表明昆虫肠道菌能产生一些结构新颖的活性代谢产物^[11-12],这些代谢产物可能具有与以往农用药剂不同的作用靶点,是开发新颖生物除草剂的重要资源之一^[13-14]。本研究测试了黄蜻幼虫肠道菌*Curvularia crepinii* QTYC01对稗草及反枝苋的抑制作用及对一些常见农作物的安全性并对其活性代谢产物进行了分离鉴定,旨在为开发新型微生物源除草剂奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫: 实验所用昆虫黄蜻(*Pantala flavescens*)幼虫于2012年8月采自浙江师范大学附近的河流(29°00'17.37"N, 119°29'54.84"E)。

1.1.2 供试种子: 杂草种子为反枝苋(*Amaranthus retroflexus*)、稗草(*Echinochloa crusgalli*); 农作物种子为水稻(*Oryza sativa*)、油菜(*Brassica campestris*)、黄瓜(*Cucumis sativus*)、莴苣(*Lactuca sativa*)、辣椒(*Capsicum annuum*)。

1.1.3 培养基: 麦芽浸汁培养基(g/L): 生麦芽20, 蔗糖20, 蛋白胨1, 琼脂15-20, 蒸馏水1 L, pH自然。不加琼脂者为相应的液体培养基。

1.1.4 仪器与试剂: PCR反应扩增仪、移液枪(范围100-1000 μ L、20-200 μ L、0.5-10.0 μ L), 德国Eppendorf公司; SW-CJ-1D洁净工作台, 江苏省苏洁净化设备厂; YXJ-2离心机, 湘仪离心机仪器有限公司; Agilent 1260型高效液相, 安捷伦科技有限公司; H6-1微型电泳槽, 上海市精益有机

玻璃制品仪器厂; Mariner质谱仪, 美国ABI公司; BrukerDRX-600核磁共振仪, 瑞士Bruker公司; CCA-1111旋转蒸发仪, 上海市爱朗仪器有限公司。

主要试剂: 新型快速植物基因组DNA提取试剂盒, 北京市百泰克生物技术股份有限公司; 实验用蔗糖、琼脂粉等, 购自北京市奥博星生物技术有限责任公司; 生麦芽, 购自亳州市中药饮片厂; 200-300目层析柱硅胶和GF₂₅₄薄层层析硅胶, 青岛海洋化工厂; SephadexLH-20, 瑞典Pharmacia Biotech公司; TaKaRa *Taq*酶购于中国大连市宝生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 QTYC01菌株的分离: 参考文献[6]将健康黄蜻幼虫用75%酒精表面消毒2 min, 无菌水冲洗3次, 解剖后得到的肠道放至无菌研钵内进行充分研磨, 用无菌水对研磨液进行梯度稀释成10⁻¹、10⁻²、10⁻³等不同浓度稀释液, 分别取各稀释液0.2 mL涂布于MEA培养基平板上, 28 °C恒温箱中培养。待菌落长出后, 从菌落边缘挑取少量菌丝, 进行再次纯化后保存于MEA试管斜面中备用。

1.2.2 QTYC01菌株的鉴定: 形态学鉴定: 将获得的纯培养物菌饼接种到MEA平板上, 28 °C培养, 每天定时观察菌落生长形态, 利用光学显微镜观察菌丝、产孢结构以及孢子的形态特征。

分子生物学鉴定: 将培养4 d的新鲜菌体作为DNA提取材料, 采用新型快速真菌基因组DNA提取试剂盒提取菌株基因组DNA, 1%浓度的琼脂糖凝胶电泳检测纯度。以上述提取的基因组DNA为模板, 用引物ITS1 (forward): 5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3', ITS4 (reverse): 5'-TCCTCCGCT TATTGATATGC-3'^[15]对供试菌株rRNA的ITS区域进行PCR扩增。反应液体积50 μ L, 包括: 38.8 μ L ddH₂O, 4.0 μ L 10 \times PCR buffer, 4.0 μ L dNTPs, ITS1、ITS4各1.0 μ L, 菌株基因组模板1.0 μ L, 0.2 μ L

Taq DNA聚合酶。PCR反应程序: 94 °C 2 min; 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min, 35个循环; 72 °C 5 min, 16 °C保存。PCR产物用1%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序列通过NCBI数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)中的核酸序列进行比对, 利用MEGA 5.05软件进行系统发育分析。采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)构建系统发育树, 并进行1000次自举分析(Bootstrap)。

1.2.3 QTYC01发酵及产物的提取: 将真菌*C. crepinii* QTYC01菌丝体块接种到含有ME培养基250 mL锥形瓶中, 培养2-3 d作为种子液; 然后将种子液接种于含有ME培养基的1000 mL锥形瓶中, 并在180 r/min、28 °C条件下进行扩大发酵, 获得*C. crepinii* QTYC01的液体培养物。在培养期间每隔1 d (共9 d)在无菌条件下取*C. crepinii* QTYC01发酵液50 mL经2层纱布过滤得到发酵滤液, 并于4 °C保藏备用; *C. crepinii* QTYC01的第7 d发酵滤液用乙酸乙酯1:1等体积萃取3-4次, 合并萃取液, 萃取液再经45 °C、负0.1个大气压下浓缩即得到深棕色膏状的提取物, 即为*C. crepinii* QTYC01发酵液乙酸乙酯提取物。

1.2.4 QTYC01对稗草、反枝苋及常见农作物种子萌发抑制作用: 在直径为9 cm的培养皿中放入同等大小的滤纸。参考文献[13]的方法, 取5 mL分别经过1-9 d培养的发菌滤液、用丙酮配制成的100 μg/mL乙酸乙酯提取物或化合物稀释液于上述培养皿中, 丙酮挥发后加入5 mL无菌水备用。其中分别以蒸馏水和丙酮同样处理过的培养皿为空白对照, 阳性对照为100 μg/mL 2,4-D (2,4-二氯苯氧乙酸)。选取露白的稗草或反枝苋或常见农作物种子放在滤纸上(每皿10粒), 每个处理重复3皿, 然后置于人工气候培养箱内(28.0±0.5) °C、70%相对湿度、在12 h光照, 12

h黑暗的定时光照条件进行培养, 4 d后测量种子根长。以平均根生长抑制率表示结果, 平均根生长抑制率计算方法: 抑制率(%)=[空白对照平均根长-处理平均根长]/空白对照平均根长×100%。

1.2.5 QTYC01发酵液对盆栽稗草的除草活性: 将露白后的稗草或反枝苋种子播于塑料花盆(φ10 cm)中, 在出苗后第3天喷施QTYC01发酵液(发酵1-8 d的发酵滤液), 以蒸馏水为空白对照, 阳性对照为100 μg/mL 2,4-D (2,4-二氯苯氧乙酸)溶液, 喷洒用量为4 mL, 14 d后观察幼苗受害程度, 统计受害率、鲜重和干重, 每个处理设3个重复。稗草受害级别分为4级^[13]: 0级: 全株正常; 1级: 叶或根变色; 2级: 全株1/2以上部分枯黄; 3级: 全株枯萎至死亡。受害率(%)=[(每皿各受害级别株数×级别)/(每皿株数×最高级别)]×100; 干重为新鲜植物体置于70 °C烘箱, 烘干至恒重为止。

1.2.6 活性化合物的分离鉴定: 乙酸乙酯粗提物经重结晶的方法分离活性化合物。测定纯化后的单体化合物分子量, 结合活性物质的¹H-NMR和¹³C-NMR谱图数据, 对活性物质进行结构鉴定。

2 结果和分析

2.1 QTYC01菌株的鉴定

在MEA平板上恒温28 °C培养10 d, 直径可达70-80 mm, 菌落初为浅绿色, 后逐渐转为墨绿色, 短绒状, 紧凑, 菌落近圆形、平展, 边缘不整齐(图1)。分生孢子梗个生或簇生, 产生于菌丝末梢和中间细胞, 分枝少, 顶端屈膝半弯曲, 有隔膜, 顶部颜色稍浅, 光滑, 长可约160 μm, 宽2-7 μm。分生孢子顶侧生, 椭圆形弯曲或近纺锤形, 色较深, 端部细胞颜色渐浅, 脐点不明显, 与文献报道^[16]的*C. crepinii*基本一致, 因此黄蜻幼虫肠道内生真菌QTYC01初步鉴定为*C. crepinii*。

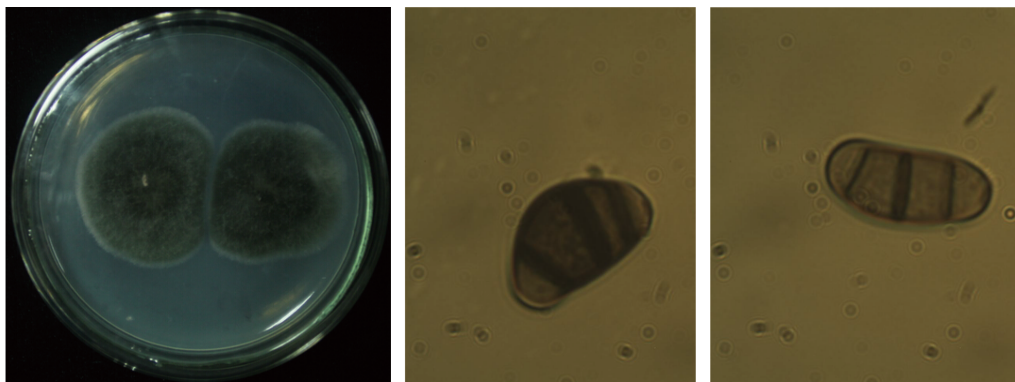


图 1. 菌株QTYC01的菌落与分生孢子(400×)

Figure 1. The colony and spore morphology of strain QTYC01 (400×).

将测序得到的ITS序列通过BLAST与GenBank中的核酸序列进行比对, 与其亲缘关系最近的*C. crepinii* (KF572448.1)序列相似性达100%, 序列比对覆盖率达97%, 在系统发育树上处于同一分支(图2)。结合其形态学特征, 进一步鉴定为*C. crepinii*, 该菌株已保藏于中国典型培养物保藏中心, 其保藏编号: CCTCC M 2014308。

2.2 发酵液对稗草和反枝苋幼根的抑制作用

用不同发酵天数的发酵滤液测定了QTYC01对稗草和反枝苋种子萌发的抑制作用。实验结果表明: *C. crepinii* QTYC01发酵液对稗草和反枝苋幼根均有较强的抑制作用, 其中培养4–8 d的发酵液对反枝苋抑制活性较好(图4), 尤其是培养4–7 d的发酵液抑制率均可达到90%以上, 与阳性对照

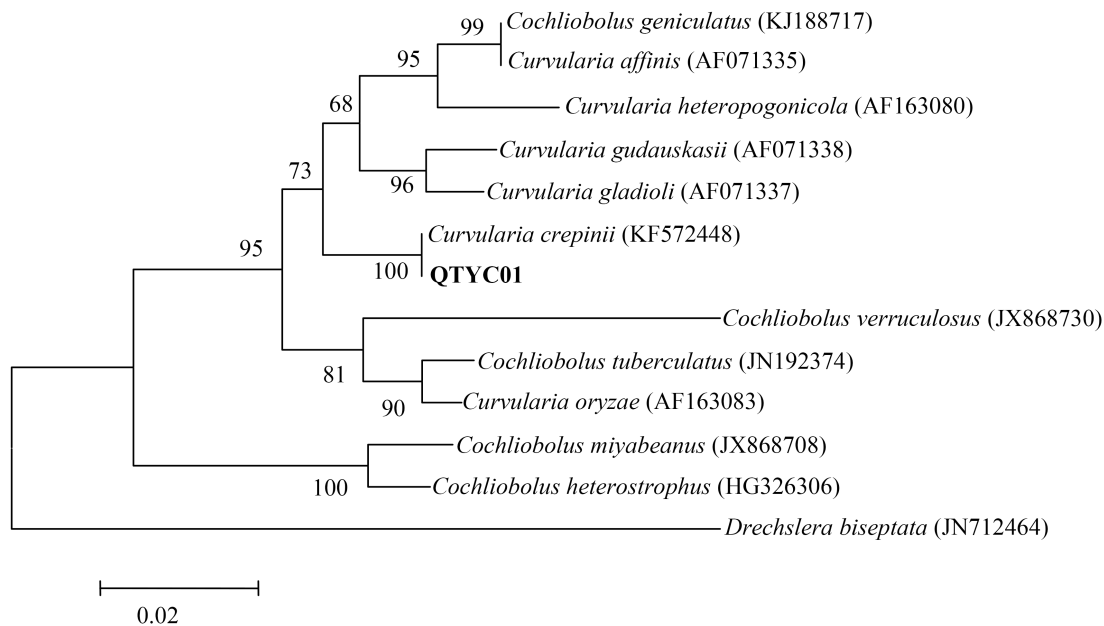


图 2. 基于真菌QTYC01 5.8S rRNA基因片段序列构建的系统发育树

Figure 2. Neighbour-Joining phylogenetic tree of 5.8S rRNA sequences of QTYC01. 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.

2,4-D活性(100 µg/mL, 95.6%)相当; 培养2-5 d的发酵液对稗草抑制活性较好, 其中培养3-4 d的发酵液抑制率能够达到95%, 与阳性对照2,4-D活性(100 µg/mL, 96.6%)相当(图4)。

2.3 乙酸乙酯提取物对稗草、反枝苋和常见农作物种子萌发抑制作用

C. crepinii QTYC01发酵液乙酸乙酯提取物对稗草、反枝苋和常见农作物种子萌发抑制作用见图5。结果表明粗提物对杂草具有较好的抑制活性(图5), 在100 µg/mL的浓度条件下粗提物对稗草和反枝苋的抑制活性分别为56.8%和71.2%。此外研究还发现*C. crepinii* QTYC01发酵液乙酸乙酯提取物对一些常见农作物具有很好的安全性, 在100 µg/mL的浓度条件下, 粗提物对水稻、黄瓜、莴苣、辣椒的抑制率均低于18%, 对油菜的抑制率为32.6%。

2.4 发酵液对盆栽稗草的除草活性

发酵液对盆栽稗草除草活性的结果见表1。结果表明培养5-8 d的发酵液对稗草幼苗活性较好, 其中第5天的发酵液能使稗草受害率达到70%以上; 第7-8天的发酵液可使稗草干重明显减少, 和

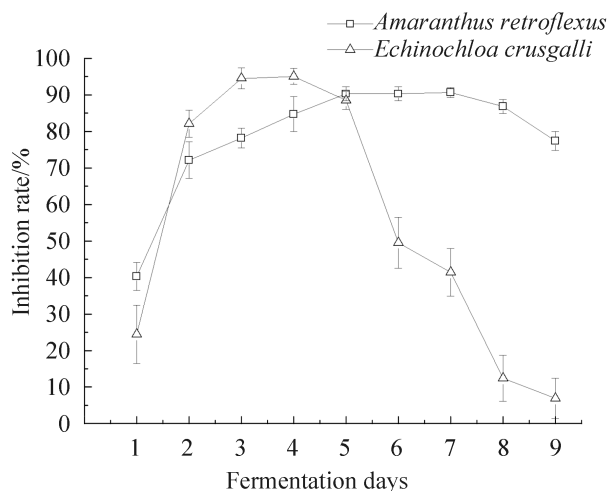


图4. QTYC01发酵液对反枝苋和稗草抑制效果
Figure 4. The inhibition effect of fermented liquid of QTYC01 against *A. retroflexus* and *E. crusgalli*.

阳性对照结果相同(干重均为1.0 mg); 同时第7-8天的发酵液也可明显降低稗草鲜重, 在第7-8天鲜重分别为8.6、8.5 mg, 比阳性对照2,4-D(4.5 mg)效果较差。

2.5 活性化合物的分离鉴定

发酵液300 mL经3层纱布过滤后得滤液, 用乙酸乙酯萃取滤液得1.17 g粗提物(图6), 利用重

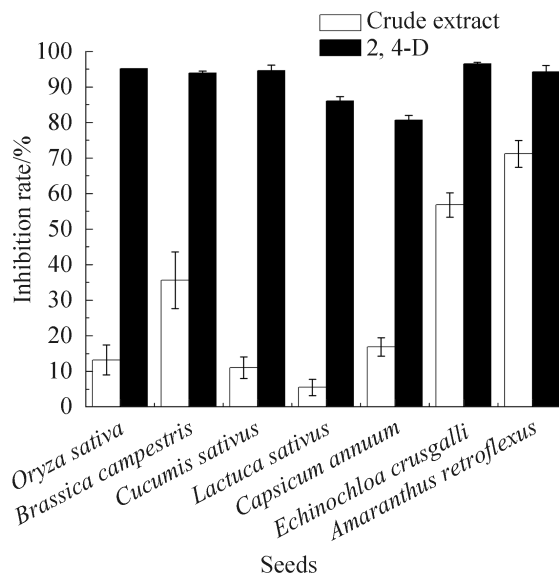


图5. QTYC01发酵液乙酸乙酯提取物的除草活性及其对常见作物的安全性

Figure 5. The herbicidal activity and safety test for crops of ethyl acetate extract of QTYC01.

表1. 真菌QTYC01发酵液对盆栽稗草的除草活性
Table 1. The herbicidal effect of QTYC01 fermentation broth against *E. crusgalli* in vivo

Items	Victimization rates/%	Fresh weight/mg	Dry weight/mg
1 d Fermentation	35.6	17.8	1.7
2 d Fermentation	27.8	24.4	5.6
3 d Fermentation	44.4	16.0	1.5
4 d Fermentation	64.4	23.8	2.5
5 d Fermentation	71.1	11.8	1.4
6 d Fermentation	64.4	10.2	1.5
7 d Fermentation	66.7	8.6	1.0
8 d Fermentation	57.8	8.5	1.0
CK	0	49.2	5.7
2,4-D	96.7	4.5	1.0

2,4-D-as the positive control; CK means blank control.

结晶的方法分离得到了1个单体物质(180 mg)。对该单体物质进行质谱和核磁共振谱分析,具体数据如下: HR-ESI-MS: m/z 385.1264 $[M+Na]^+$, $C_{19}H_{22}O_7Na$ 385.1263; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 1.49 (3H, d, $J = 6.0$ Hz), 2.16 (2H, ddd, $J = 18.3, 14.3, 3.1$ Hz), 2.53 (1H, dd, $J = 17.2, 2.5$ Hz), 3.46–3.68 (1H, m), 3.83 (3H, s), 3.98–4.04 (1H, m), 4.53 (1H, s), 5.26 (1H, ddd, $J = 11.5, 6.0, 2.1$ Hz), 6.01 (1H, ddd, $J = 15.0, 10.5, 4.2$ Hz), 6.23 (1H, td, $J = 11.2, 2.6$ Hz), 6.35 (1H, dd, $J = 11.5, 2.8$ Hz), 6.41 (1H, dd, $J = 8.7, 2.6$ Hz), 6.89 (1H, d, $J = 15.3$ Hz), 12.15 (1H, s); ^{13}C -NMR ($CDCl_3$) δ : 20.8, 37.0, 37.5, 55.4, 73.6, 73.7, 80.8, 100.2, 108.2, 125.3, 130.2, 132.9, 143.1, 164.2, 165.9, 171.3。与Ayers等^[17]报道的(5Z)-7-oxozeaenol数据基本一致,因此活性化合物被鉴定为(5Z)-7-oxozeaenol。

2.6 化合物对反枝苋的抑制作用

离体活性测试结果表明:于*C. crepinii* QTYC01 发酵液提取物中分离得到的化合物(5Z)-7-oxozeaenol具有较好的抑制反枝苋活性,其活性随着浓度的升高而逐渐加强(表2),在供试化合物浓度为100 $\mu g/mL$ 时,其对反枝苋的抑制率约为85%;计算出的 IC_{50} 为4.8 $\mu g/mL$ 。

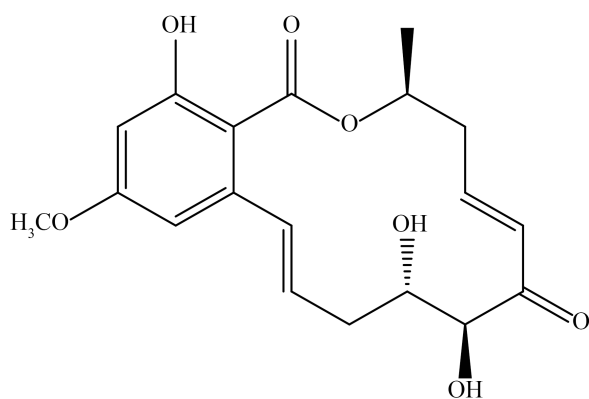


图 6. 活性化合物(5Z)-7-oxozeaenol的分子结构

Figure 6. Molecular structure of active compound(5Z)-7-oxozeaeno.

表2. 化合物对反枝苋的抑制效果

Table 2. Inhibitory activity of compound against *A. retroflexus*

Concentration/ ($\mu g/mL$)	<i>A. retroflexus</i>	
	Root length/mm	Inhibiting rate/%
1	11.8 \pm 1.6 b	30.6 \pm 9.2 e
5	9.1 \pm 1.0 c	46.3 \pm 5.9 d
10	6.0 \pm 0.9 d	65.0 \pm 5.2 c
50	3.6 \pm 0.6 e	79.0 \pm 3.6 b
100	2.6 \pm 0.4 f	84.9 \pm 2.3 a
CK	17.0 \pm 1.0 a	/

Data listed in the table are averages of repeat 10 times; CK means blank control; Data are mean \pm SD. Different letters in the same column indicate significant difference by Duncan's new multiple range test ($P < 0.05$).

3 讨论

目前,我国在微生物源除草剂的研究方面取得了一定的进展,已经陆续分离得到多种有效除草的微生物^[18-20]。然而,当前微生物源除草剂的研究主要集中于土壤和植物致病菌等环境微生物,昆虫相关菌来源的除草剂少有报道。本研究于黄蜻幼虫肠道内分离得到1株真菌QTYC01,经鉴定为*C. crepinii*;其发酵液及乙酸乙酯提取物可显著抑制稗草和反枝苋幼根的生长,发酵液对盆栽稗草也具有很好的抑制生长作用,而且在一定的浓度条件下,乙酸乙酯提取物对一些常见农作物具有很好的安全性。因此,本文中所述QTYC01具有开发成新型除草剂的潜力。

从黄蜻幼虫肠道菌QTYC01中分离得到的化合物(5Z)-7-oxozeaenol是1种二羟基苯甲酸内酯类化合物,最早是由Ellestad等^[21]于1株未鉴定过的真菌中分离得到的,后来Sugawara等^[22]又从1种马齿苋致病真菌(*Drechslera portulacae*)中分离得到该化合物。此外,Liu等^[23]也从1株海葵共附生真菌*Cochliobolus lunatus*分离得到该成分,并报道了其具有较好的抑制藤壶(*Balanus amphitrite*)生长的作用;Ayers等^[17]报道了(5Z)-7-oxozeaenol具有很

好的细胞毒活性并且具有很好的抑制NF- κ B的作用。本文首次发现昆虫肠道菌*C. crepinii*也能产生化合物(5Z)-7-oxozeaenol并具有除草活性。有关该菌的其它活性成分的分离鉴定、活性作用机制和大田试验等还有待进一步的研究探讨。

参考文献

- [1] Song YL. Insight into the mode of action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) as an herbicide. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2014, 56(2): 106–113.
- [2] Pawlonka Z, Rymuza K. The effect of chlorsulfuron on weeds in winter wheat. *Romanian Agricultural Research*, 2014, (31): 239–243.
- [3] Matzrafi M, Gadri Y, Frenkel E, Rubin B, Peleg Z. Evolution of herbicide resistance mechanisms in grass weeds. *Plant Science*, 2014, 229: 43–52.
- [4] Han H, Yu Q, Vila-Aiub M, Powles SB. Genetic inheritance of cytochrome P450-mediated metabolic resistance to chlorsulfuron in a multiple herbicide resistant *Lolium rigidum* population. *Crop Protection*, 2014, 65: 57–63.
- [5] Wang BN, Kong DY, Lu JH, Zhou QS. Transformation of sulfonyleurea herbicides in simulated drinking water treatment processes. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(5): 3847–3855.
- [6] Zhang Y, Shao MW, Zhang YL, Li S, Lu YH, Xiao XH. Inhibition of *Amaranthus retroflexus* by wasp gut fungal isolate *Fusarium oxysporum* MF06. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(3): 292–298. (in Chinese)
张蕴, 邵明伟, 张应烙, 李帅, 卢贻会, 肖孝辉. 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. *微生物学报*, 2015, 55(3): 292–298.
- [7] Zhang YL, Li S, Jiang DH, Kong LC, Zhang PH, Xu JD. Antifungal activities of metabolites produced by a termite-associated *Streptomyces canus* BYB02. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(7): 1521–1524.
- [8] Lundgren JG, Lehman RM. Bacterial gut symbionts contribute to seed digestion in an omnivorous beetle. *PLoS One*, 2010, 5(5): e10831.
- [9] Visôto LE, Oliveira MGA, Guedes RNC, Ribon AOB, Good-God PIV. Contribution of gut bacteria to digestion and development of the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *Journal of Insect Physiology*, 2009, 55(3): 185–191.
- [10] Zhang YL, Yin CP, Ye ST, Liao RT. 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(4): 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(4): 600–602.
- [11] Zhang YL, Ge HM, Zhao W, Dong H, Xu Q, Li SH, Li J, Zhang J, Song YC, Tan RX. Unprecedented immunosuppressive polyketides from *Daldinia eschscholzii*, a mantis-associated fungus. *Angewandte Chemie*, 2008, 120(31): 5907–5910.
- [12] Zhang YL, Zhang J, Jiang N, Lu YH, Wang L, Xu SH, Wang W, Zhang GF, Xu Q, Ge HM, Ma J, Song YC, Tan RX. Immunosuppressive polyketides from mantis-associated *Daldinia eschscholzii*. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(15): 5931–5940.
- [13] Shao MW, Wang NL, Lin FF, Zhang YL. Identification and herbicidal active ingredients of DN02, a fungus residing in a *Ceriagrion* sp. gut. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2014, 41(1): 98–102. (in Chinese)
邵明伟, 王宁璐, 林芳芳, 张应烙. 豆娘肠道真菌DN02的鉴定及其除草活性成分. *植物保护学报*, 2014, 41(1): 98–102.
- [14] Zhang YL, Kong LC, Jiang DH, Yin CP, Cai QM, Chen Q, Zheng JY. Phytotoxic and antifungal metabolites from *Curvularia* sp. FH01 isolated from the gut of *Atractomorpha sinensis*. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3575–3577.
- [15] 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.
- [16] Ellett CW. *Curvularia* blight of *Ophioglossum vulgatum*. *Mycologia*, 1989, 81(5): 815–817.
- [17] Ayers S, Graf TN, Adcock AF, Kroll DJ, Matthew S, Carcache de Blanco EJ, Shen Q, Swanson SM, Wani MC, Pearce CJ, Oberlies NH. Resorcylic acid lactones with cytotoxic and NF- κ B inhibitory activities and their structure-activity relationships. *Journal of Natural Products*, 2011, 74(5): 1126–1131.
- [18] Li MZ, Li YQ, Xu L, Zhang XF, Sun ZL. Screening of bacterial herbicide strain *Xanthomonas campestris* pv. *retroflexus* from rhizosphere. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(2): 226–229. (in Chinese)
李明智, 李永泉, 徐凌, 庄晓峰, 孙自玲. 细菌除草剂黄单胞菌反枝苋致病菌的筛选. *微生物学报*, 2004, 44(2): 226–229.
- [19] Wan ZX, Qiang S, Xu SC, Shen ZG, Dong YF. Culture

- conditions for production of phytotoxin by *Alternaria alternata* and plant range of toxicity. *Chinese Journal of Biological Control*, 2001, 17(1): 10–15. (in Chinese)
- 万佐玺, 强胜, 徐尚成, 沈振国, 董云发. 链格孢菌的产毒培养条件及其毒素的致病范围. *中国生物防治*, 2001, 17(1): 10–15.
- [20] Zhang JL, Xu K, Li C, Ma J, Dong JG. The bioactivity of mutant isolates from *Botrytis cinerea*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(6): 1174–1181. (in Chinese)
- 张金林, 徐扩, 李川, 马娟, 董金皋. 灰葡萄孢诱变菌株毒素的除草活性研究. *中国农业科学*, 2005, 38(6): 1174–1181.
- [21] Ellestad GA, Lovell FM, Perkinson NA, Hargreaves RT, McGahren WJ. New zearalenone related macrolides and isocoumarins from an unidentified fungus. *The Journal of Organic Chemistry*, 1978, 43(12): 2339–2343.
- [22] Sugawara F, Kim KW, Kobayashi K, Uzawa J, Yoshida S, Murofushi N, Takahashi N, Strobel GA. Zearalenone derivatives produced by the fungus *Drechslera portulacae*. *Phytochemistry*, 1992, 31(6): 1987–1990.
- [23] Liu QA, Shao CL, Gu YC, Blum M, Gan LS, Wang KL, Chen M, Wang CY. Antifouling and fungicidal resorcylic acid lactones from the sea anemone-derived fungus *Cochliobolus lunatus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(14): 3183–3191.

Phytotoxic metabolite from QTYC01, a fungus residing in the gut of *Pantala flavescens* larvae

Mingwei Shao, Liping Jin, Yinglao Zhang*

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

Abstract: [Objective] To isolate the fungus with phytotoxic activity from the gut of *Pantala flavescens* larvae and find the phytotoxic lead compound from the fungal metabolites. [Methods] QTYC01 was isolated from the gut of *P. flavescens* larvae by means of spread plate and identified by 5.8S rRNA sequence analysis and morphologic observation. Phytotoxic activities of the fermentation broth and ethyl acetate extracts against the radical growth of weeds as well as the safety of crude extract to the selected crops were tested by *Petri* dish bioassay. The herbicidal activity of QTYC01 against *Echinochloa crusgalli* seedlings was carried out by potted bioassay. Fermentation product was purified by recrystallization and identified by extensive spectroscopic analysis. [Results] QTYC01 was identified as *Curvularia crepinii*. The fermentation broth of QTYC01 significantly inhibited the radical growth of *E. crusgalli* and *Amaranthus retroflexus* with the inhibition rate of 95.0% and 90.1%, respectively. The fermented liquid showed significant inhibitory activity to the seedling of *E. crusgalli* with the victimization rate of 71.1%. Under the concentration of 100 µg/mL, ethyl acetate extracts exhibited significant phytotoxic activities against the radical growth of *E. crusgalli* and *A. retroflexus* with inhibitory rates of 56.8% and 71.2%, respectively, and showed good security to the selected common crops with the inhibition rate of lower than 33%. Therewith, a bioactive compound was isolated from the ethyl acetate extract and determined as (5Z)-7-oxozeaenol. The compound showed good phytotoxic activity against *A. retroflexus* with the IC_{50} value of 4.8 µg/mL. [Conclusion] Strain QTYC01 could be potentially developed as a new microbial herbicide.

Keywords: insect symbiont, *Pantala flavescens* larvae, *Curvularia crepinii*, phytotoxic activity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (NSFC) (21002092)

*Corresponding author. Tel: +86-579-82286419; Fax: +86-579-82282269; E-mail: ylzhang@zjnu.cn

Received: 24 January 2016; Revised: 5 April 2016; Published online: 3 June 2016