



植物病原真菌抑制杂草的活性筛选及菌株 CY-H 的活性代谢产物

张金新[#], 刘颖[#], 张蜀香, 张振, 范孝叶, 史淑萍, 左贤, 张应烙, 尹彩萍^{*}

安徽农业大学生命科学学院, 安徽 合肥 230036

摘要:【目的】分离并鉴定具有较好除草活性的植物病原真菌菌株, 进一步分离活性化合物, 为开发新型生物源除草剂奠定一定的基础。【方法】采用固体培养基接种法分离纯化植物病原真菌, 通过形态学特征观察和 5.8S rDNA 测序鉴定目标菌株; 在活性筛选追踪下, 对活性组分进行追踪分离及纯化, 经波谱分析确定活性单体化合物结构; 采用培养皿生物分析法测定活性单体化合物的除草活性及对常见作物的安全性。【结果】茶叶致病菌 CY-H 具有较好的除草活性, 其发酵液对稗草和反枝苋根的抑制率分别为 94.6% 和 77.3%。CY-H 被鉴定为间座壳属菌(*Diaporthe* sp.)。从 CY-H 菌中分离得到单体化合物 CY1 被鉴定为 cytosporaphenones C。在供试浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, CY1 具有较好的抑制反枝苋根的活性, 抑制率为 57.1%, 且其对小麦和油菜的安全性较好, 抑制率均在 20% 左右。【结论】茶叶致病菌 CY-H 具有开发成微生物源除草剂的潜力。

关键词: 植物病原真菌, 除草活性, 间座壳属菌, cytosporaphenones C, 天然产物

据调查统计, 全世界广泛分布着 3 万种左右的有害杂草, 在我国主要有 60 多种农田杂草对农业生产造成危害^[1], 在农业领域, 与任何其他农业虫害相比, 杂草可导致作物产量和质量更大幅度的下降^[2]。化学除草剂是一种非常有效的控制杂草的方法^[3], 由于化学除草剂的生态环境污染和抗药性杂草产生等危害日益突出, 使得人们不得不采用更环保有效的方式去防除杂草。已有研究

表明植物病原真菌或其次生代谢产物对植物的生长起抑制作用, 且对环境相对安全^[4], 如真菌除草剂 Devine 是利用美国佛罗里达州的棕榈疫霉 (*Phytophthora palmivora* Butler) 致病菌株的厚垣孢子配制成悬浮剂, 对杂草 *Morrenia odorat* 的防效高达 90% 以上^[5]; 植物致病菌 *Ascochyta caulina* 产生的两种植物毒素, 可用来生物防治杂草藜^[6]。因此, 植物病原真菌源除草剂具有许多潜在的优

基金项目: 国家自然科学基金(31770007)

[#]并列第一作者。

^{*}通信作者。Tel: +86-551-65786129; E-mail: 247390386@qq.com

收稿日期: 2019-06-10; 修回日期: 2019-08-13; 网络出版日期: 2019-11-20

势, 是新型除草剂的重要研究方向^[7-8]。本研究拟从多种发病植株中分离植物致病真菌, 并从除草活性较好的菌株中分离活性化合物, 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

1.1.1 样品的采集: 植株病叶采自安徽农业大学(31°51'51.87"N, 117°15'6.95"E)农萃园中。

1.1.2 供试种子: (1) 杂草种子: 稗草(*Echinochloa crusgalli* L.)、反枝苋(*Amaranthus retroflexus* L.); (2) 作物种子: 油菜(*Brassica napus* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)。

1.2 菌株的分离纯化

用蒸馏水将植株病叶清洗干净。在无菌操作台中, 对病叶组织进行表面消毒(75%酒精浸泡 1 min, 3% NaClO 浸泡 3 min, 无菌水冲洗 5 次), 用无菌滤纸吸取叶片表面水分。接着用无菌剪刀沿病健交界处将病叶剪成组织小块, 呈三角分布接种于 MEA 培养基平板。在避光条件下置于 28 °C 恒温培养箱中培养 3-5 d。在无菌操作台中用接种针从长出的菌落边缘挑取少量菌丝, 转接到 MEA 培养基上, 重复上述操作得到单菌落菌株, 挖取单菌株菌落接种到 MEA 斜面培养基中, 4 °C 冷冻保藏备用^[9]。

1.3 菌株发酵与发酵产物提取

用接种针挑取活化的植物病原真菌菌落接种到装有 100 mL ME 培养基的 250 mL 锥形瓶中, 摇床培养 7 d (28 °C, 200 r/min) 后经 6 层纱布过滤后获得发酵液, 将少量发酵液(约 10 mL)在无菌条件下, 通过直径为 0.45 μm 无菌滤膜过滤除菌, 将所得滤液保存在已灭菌的 10 mL 离心管中备用;

在分液漏斗中用乙酸乙酯多次萃取其余发酵液, 直至上层乙酸乙酯层无色为止, 合并乙酸乙酯萃取液并经减压旋蒸浓缩得到粗浸膏。

1.4 植物病原真菌发酵液的除草活性测试

用培养皿生物分析法(Petri dish bioassay)测定植物病原真菌发酵液对稗草和反枝苋的除草活性。具体操作如下: 用 0.2% NaClO 浸泡稗草和反枝苋种子 15 min 后用蒸馏水洗涤 3 次, 将处理过的种子置于光照培养箱中 28 °C 培养 1-2 d。定期观察, 待种子露白后取出备用。用移液枪吸取植物病原真菌发酵液 5 mL 置于铺有滤纸的培养皿中, 空白对照加入同等量的无菌水。挑选露白的反枝苋或稗草的种子均匀放于培养皿中(每皿 20-30 粒), 并放置在 20 °C、空气相对湿度为 50% 的恒温气候培养箱中培养 2-3 d。测量供试种子的茎和根长, 测定发酵液粗提物对反枝苋、稗草的除草活性以及对作物油菜、小麦的安全性(对露白种子根茎的抑制率)^[10]。抑制率的计算公式: 抑制率(%)=[(空白对照组幼苗茎或根的长度-处理组幼苗茎或根的长度)/(空白对照组幼苗茎或根的长度)]×100%。

1.5 目标菌株的菌种鉴定

(1) 形态学鉴定: 将已纯化的菌株 CY-H 接种到 MEA 固体培养基中, 于 28 °C 恒温培养箱中培养 3-5 d, 每日定时观察菌落的形态特征。在生物显微镜下观察其培养性状、菌丝、孢子等微观形态特征, 查阅相关文献, 比对观察结果, 初步确定其分类地位。(2) 分子学鉴定: 取适量培养 3-4 d 的 CY-H 菌株菌体于洁净、干燥的研钵中, 加入液氮充分研磨成细粉, 按照真菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书中的操作步骤提取基因组 DNA, 采用 ITS 通用引物 ITS1: 5'-CCGTAGGTGAACCTGG-3' 和 ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

对菌株 5.8S rDNA 的 ITS 区域进行 PCR 扩增, 利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测纯度, 将 PCR 扩增产物送往通用生物技术公司测序。利用 BLAST 将获得的 5.8S rDNA 序列在 GenBank 的核酸序列库中进行同源性序列分析, 选取不同相似度序列, 利用 MEGA 5.0 软件进行系统发育分析, 并采取邻位相接法(Neighbor-joining, NJ)构建系统发育树, 确定 CY-H 菌株的分类地位。

1.6 CY-H 菌株活性物质的分离纯化及结构鉴定

使用大米固体培养基对目标菌株 CY-H 进行大量发酵。从斜面培养基中挖取 CY-H 菌株菌落接种到 MEA 培养基上, 在 28 °C 温培养箱中避光培养 3–4 d。待菌丝长至培养皿边缘时, 将新鲜活化的菌丝接入装有 ME 液体培养基的 1000 mL 锥形瓶中, 摇床培养 3 d (28 °C, 200 r/min) 获得种子液。用移液枪向 50 瓶固体大米培养基中加入 10 mL 先前获得的种子液, 28 °C 条件下静止培养 40 d, 培养至 20 d 时搅拌菌体与大米使其充分混匀。将培养 40 d 的 CY-H 大米培养基用玻璃棒划块, 倒入乙酸乙酯溶液中浸泡并超声处理 1 h。重复上述步骤直至乙酸乙酯相无色。利用旋转蒸发器将所得滤液减压浓缩得到粗浸膏^[11]。通过硅胶柱层析、凝胶柱层析、薄层层析等多种色谱方法从乙酸乙酯粗提取物中分离并纯化得到单体化合物。用 600 MHz 核磁共振波谱仪(美国 Agilent 公司)对化合物进行 ¹H-NMR 谱和 ¹³C-NMR 谱数据分析, 用 Mariner System 5304 质谱仪(美国 ABI 公司)测定单体化合物的分子量, 比对参考文献确定单体化合物的化学结构。

1.7 化合物的除草活性及对作物安全性测试

采用 1.4 中的培养皿生物分析法测定活性单体化合物的除草活性及对常见作物的安全性。具体操作如下: 将分离得到的单体化合物溶于 2%丙

酮中, 得到浓度为 100 µg/mL 的药液; 用移液枪吸取 5 mL 配好的药液均匀置于铺有两张滤纸的 9 cm 的培养皿中, 放入烘箱使溶剂挥发干得到药膜; 向培养皿中加入 5 mL 蒸馏水, 挑选 25 粒大小相同、成熟度一致的稗草、反枝苋、小麦、油菜露白种子均匀放置在滤纸上, 盖好皿盖, 在 28 °C、空气相对湿度为 50%的恒温气候培养箱中培养 1–2 d; 测定稗草、反枝苋、小麦、油菜幼苗的根长, 计算抑制率, 每处理均重复 3 次; 相同操作设置 2%丙酮和 100 µg/mL 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D) 分别作为空白和阳性对照。

2 结果和分析

2.1 目标菌株的确定

采集大量长有病斑的植株, 并从中分离纯化出 39 株植物病原真菌。测定菌株发酵液对稗草的除草活性(表 1), 进一步选择对稗草除草活性较好的 8 株植物病原真菌发酵液, 测定其对反枝苋的除草活性, 结果见表 2。活性测试表明, 菌株 SN-1、ZJ、CY-H 和 HT-3 的发酵液对稗草根具有很强的抑制活性, 抑制率均大于 90%, 菌株 HL、RBNZ、SH 和 YJ 的发酵液对稗草根具有较好的抑制活性, 抑制率在 70%–85%之间; 菌株 SN-1 的发酵液对反枝苋根具有很强的抑制活性, 抑制率大于 90%, ZJ、CY-H、HT-3、HL、RBNZ 和 SH 的发酵液对反枝苋根具有较好的抑制活性, 抑制率在 74%–87%之间。薄层层析(TLC)结果表明 CY-H 的层析条带清晰明显, 且在解剖镜下可观察到它们的粗浸膏中含有大量晶体, 这表明 CY-H 的粗浸膏中的次生代谢产物可能易于分离。所以, 我们将引起茶叶褐斑病的 CY-H 初步定为下一步研究的目标菌株。

表 1. 39 株植物病原真菌发酵液对稗草茎和根生长的抑制作用

Table 1. Inhibitory activities of the fermentation broth of 39 plant phytopathogenic fungi on the growth of *A. retroflexus*' stem and root

Fungi	a	b	Sources	Fungi	a	b	Sources
XQH	8.4±3.3	67.6±2.4	<i>H. macrophylla</i>	YM-1	12.4±4.4	74.1±3.3	<i>M. rubra</i>
SQ	42.0±2.5	39.0±3.3	<i>P. notoginseng</i>	YM-2	20.8±4.3	31.6±4.5	<i>M. rubra</i>
YL	40.1±2.8	67.6±3.3	<i>M. denudata</i>	JXC	20.8±4.0	43.0±3.3	<i>R. carnea</i>
RBNZ	25.2±5.6	83.5±2.4	<i>L. japonicum</i>	JC	44.6±4.2	52.5±4.6	<i>H. cordata</i>
SH	39.2±2.6	80.8±1.9	<i>C. rubrum</i>	PT-1	36.2±3.0	84.8±1.4	<i>V. vinifera</i>
GZSN	1.8±7.2	29.8±4.2	<i>P. bodinieri</i>	HT-3	52.4±3.1	90.1±2.2	<i>P. tobira</i>
HL	–	71.2±6.6	<i>S. matsudana</i>	HT-4	16.8±14.0	63.7±5.5	<i>P. tobira</i>
PT-2	–	17.7±6.5	<i>V. vinifera</i>	HT-2	2.8±1.6	57.7±4.9	<i>P. tobira</i>
SN-3	–	51.5±3.0	<i>P. serrulata</i>	HT-5	9.1±2.7	69.2±8.9	<i>P. tobira</i>
NZ-5	37.0±7.9	27.1±10.7	<i>L. lucidum</i>	MG	40.0±9.2	98.9±5.3	<i>R. rugosa</i>
ZJ	62.6±3.7	96.0±1.3	<i>C. chinensis</i>	CY-5	17.5±3.7	39.6±4.0	<i>C. sinensis</i>
YJ	30.7±3.5	84.6±2.1	<i>R. chinensis</i>	NZ-1	17.9±5.4	43.0±4.7	<i>L. lucidum</i>
SZ	48.0±2.2	72.2±2.5	<i>D. kaki</i>	HT-1	12.4±4.5	13.0±4.3	<i>P. tobira</i>
CM	9.4±4.3	76.6±2.1	<i>C. sasanqua</i>	GH-1	22.1±4.3	94.4±1.0	<i>O. fragrans</i>
YNHX	41.5±4.8	62.9±3.7	<i>J. mesnyi</i>	CY-B	61.4±4.9	63.5±2.4	<i>C. sinensis</i>
XZ	38.9±2.8	46.0±2.9	<i>C. camphora</i>	CY-6	14.1±4.4	23.4±2.9	<i>C. sinensis</i>
GH-2	65.6±4.5	98.4±1.0	<i>O. fragrans</i>	CM'	31.5±3.3	41.0±3.1	<i>F. Ananassa</i>
SN-1	76.3±4.3	98.7±0.6	<i>P. serrulata</i>	CY-H	60.9±3.2	94.6±1.8	<i>C. sinensis</i>
GH-3	9.6±5.7	22.2±5.6	<i>O. fragrans</i>	NZ-2	23.9±2.8	40.1±2.6	<i>L. lucidum</i>
SCH	32.6±3.4	64.1±3.5	<i>C. japonica</i>				

a: inhibiting rate of stem/%; b: inhibiting rate of root/%. All results are means±SD of three parallel measurements.

表 2. 部分植物病原真菌发酵液对反枝苋茎和根生长的抑制作用

Table 2. Inhibitory activities of the fermentation broth of some phytopathogenic fungi on the growth of *A. retroflexus*' stem and root

Fungi	a	b	Source
HL	58.0±1.3	77.3±0.8	<i>S. matsudana</i>
RBNZ	60.4±1.3	86.7±0.5	<i>L. japonicum</i>
ZJ	76.0±0.6	86.7±0.6	<i>C. chinensis</i>
SH	68.8±0.8	81.8±0.6	<i>V. odoratissimum</i>
SN-1	40.1±0.6	90.9±0.4	<i>P. serrulata</i>
HT-3	63.5±1.0	86.7±0.5	<i>P. tobira</i>
YJ	44.4±0.9	50.0±0.4	<i>R. chinensis</i>
CY-H	60.0±1.1	74.3±0.2	<i>C. sinensis</i>

a: inhibiting rate of stem/%; b: inhibiting rate of root/%. All results are means±SD of three parallel measurements.

2.2 菌株 CY-H 的鉴定

2.2.1 形态学鉴定: 从斜面培养基中挖取 CY-H 菌株菌落接种到 MEA 培养基上, 在 28 °C 恒温避光培养 7 d, 菌落直径达到 90 mm, 初期菌丝呈乳白色, 边缘规则, 至培养后期, 菌丝逐步转变为灰黑色。培养至 30 d 出现黑色的分生孢子器, 继续培养 6 d 后在分生孢子器顶端释放出黄色的分生孢子角(图 2-A), 在光学显微镜下分生孢子呈椭圆形和线条型(图 2-B), 参考文献[12], 与徐成楠等关于间座壳属菌的形态结构相类似, 初步确定目标菌株属于间座壳属。

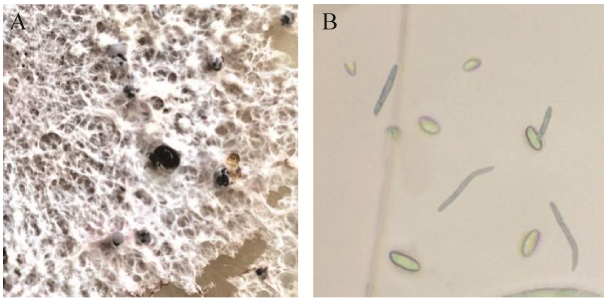


图 1. 菌株 CY-H 的菌落与分生孢子形态(400×)
Figure 1. The colony and spore morphology of strain CY-H (400×).

2.2.2 分子生物学鉴定: 通过测序可知 CY-H 菌株的 5.8S rDNA 序列的长度为 582 个碱基对(GenBank 序列号: MN294467), 在 NCBI 进行 BLAST 比对后, 我们发现该菌与 *Diaporthe pseudomangiferae* strain KFRD-61 序列相似度高达 99.6%, 进一步获取其不同相似度的菌株 14 株, 运用软件 MEGA 5.0 构建系统发育树(图 2), 该菌同 *D. pseudomangiferae* strain KFRD-61 进化树距离最近, 结合形态学特征, 确定该菌为间座壳属真菌 *Diaporthe* sp.。

2.3 目标菌种活性化合物的分离与结构鉴定

50 瓶大米固体培养物经乙酸乙酯萃取、浓缩后获得粗浸膏 140 g, 经硅胶(200–300 目)层析分离, 二氯甲烷: 甲醇梯度洗脱, 得到 7 个组分(A 100:0、B 100:1、C 100:2、D 100:3、E 100:5、F 100:8、G 100:12), 对 E 组分进一步使用硅胶柱层析, 二氯甲烷: 甲醇=100:1 极性洗脱, 经重结晶获得化合物 CY1 (44.4 mg), 占粗浸膏含量的 0.32%。化合物 CY1 为黄褐色粉末, 易溶于二氯甲烷。通过质谱和核磁共振谱分析化合物 CY1, 得到的波谱数据如下: 质谱(图 3)显示 HR-ESI-MS: m/z 287.0173[M-H]⁻, 计算值 $C_{14}H_7O_7$ m/z 287.0192, 推测该化合物的分子式为 $C_{14}H_8O_7$; ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ 6.50 (1H, d, J=1.5 Hz), 6.64 (1H, d, J=1.5 Hz), 7.35 (1H, s), 7.50 (1H, s), 10.42 (2H, s), 13.74 (2H, s)。¹³C-NMR (600 MHz, DMSO-d₆): δ 97.5, 102.2, 102.9, 108.2, 113.5, 115.8, 129.5, 141.0, 141.7, 158.5, 161.1, 161.2, 162.7, 165.1。

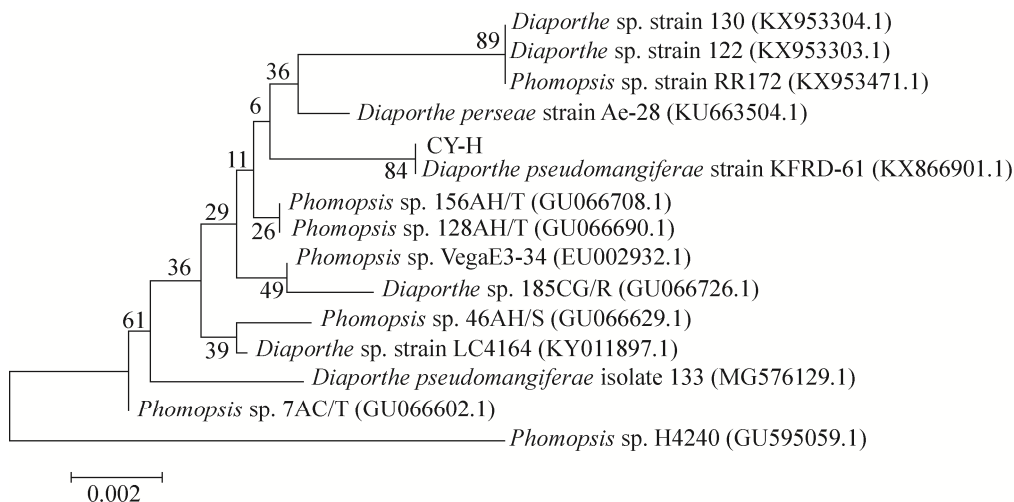


图 2. 基于真菌 CY-H 5.8S-ITS rDNA 基因序列构建的系统发育树

Figure 2. Phylogenetic tree generated from rDNA ITS sequences of isolate CY-H using neighbour-joining method. Clades are indicated by the corresponding bootstrap support values and each taxon follows by isolate number and GenBank accession number in bracket.

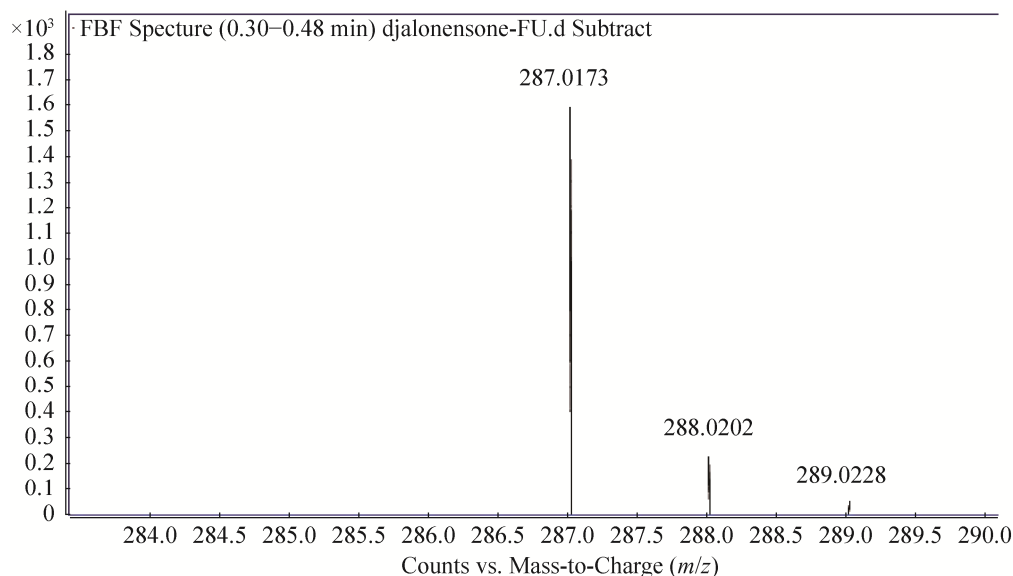


图 3. 活性化合物 CY1 的质谱图

Figure 3. ESI-MS spectrum of compound CY1.

比对文献[13],发现其波谱数据与 cytosporaphenones C 基本一致,因此,单体化合物 CY1 被鉴定为 cytosporaphenones C,其分子结构如图 4 所示。

2.4 单体化合物 CY1 的除草活性及对作物的安全性测定结果

采用培养皿生物分析法,测定了单体化合物 CY1 对稗草、反枝苋、小麦和油菜露白种子根的抑制作用(表 3)。在供试浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,单体化合物 CY1 对反枝苋根的抑制率低于阳性对照 2,4-D,为 57.1%;对稗草根的抑制活性较低,抑制率在 20%以下。对作物小麦和油菜根的抑制率

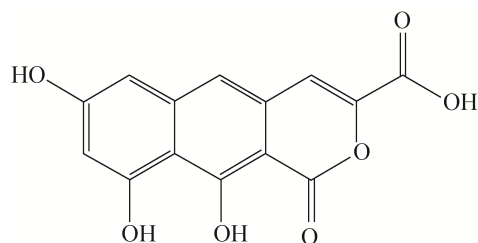


图 4. 活性化合物 CY1 的分子结构

Figure 4. Structure of compound CY1.

表 3. 单体化合物 CY1 对杂草和作物根抑制活性的抑制率(%)

Table 3. Inhibitory rate of monomer compound CY1 on the inhibitory activity of weeds and crop roots (%)

Compounds	<i>E. crusgalli</i>	<i>A. retroflexus</i>	<i>T. aestivum</i>	<i>B. napus</i>
CY1	17.2 \pm 4.7	57.1 \pm 1.3	20.0 \pm 5.3	21.9 \pm 4.5
2,4-D	100.0	82.6 \pm 0.8	83.7 \pm 1.5	95.6 \pm 0.8

2,4-D means positive control; the concentration for the test is 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; All results are means \pm SD of three parallel measurements.

远低于 2,4-D,均在 20%左右。因此 CY1 对反枝苋根具有较好的抑制活性,且其对作物安全性较高。

3 讨论和结论

本实验从多种发病植株中分离得到 39 株植物病原真菌,活性筛选结果表明从发病茶叶中分离的菌 CY-H 乙酸乙酯粗提物对稗草、反枝苋具有较好的除草活性,并对其进行菌株鉴定及活性代谢产物分离。根据形态学和分子生物学鉴定结果,确定菌株 CY-H 为间座壳属菌(*Diaporthe* sp.)。间

座壳属菌是重要的植物病原真菌,有文献表明^[13],间座壳属菌具有产生除草活性物质的潜力,但目前主要是针对间座壳属真菌的鉴定和致病性测定,对其活性次级代谢产物的研究较少。

在活性筛选追踪下,从 CY-H 菌发酵液的乙酸乙酯粗提物中分离纯化得到 1 个单体化合物 CY1。经核磁共振谱和质谱分析并比对文献,单体化合物 CY1 被鉴定为 cytosporaphenones C, 该化合物由刘洪新等于 2017 年首次从巴戟天内生真菌 *Cytospora rhizophorae* A761 分离得到,该内生菌与本文目标菌株同属于间座壳菌目^[13];但马双刚等从内生真菌 *Diaporthe pseudomangiferae* (间座壳菌目)中分离到 9 个化合物,却没有 cytosporaphenones C 存在^[14]。因此,对于单体化合物 cytosporaphenones C 是否在间座壳菌目菌株中存在普遍性仍需要进一步的实验证明。此外,尚未见关于 cytosporaphenones C 生物活性的报道。本文首次对化合物 CY1 进行除草活性测试,结果表明在供试浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, CY1 具有较好的抑制反枝苋根的活性(抑制率为 57.1%),且对小麦、油菜的安全性较好(抑制率均在 20%左右),具有除草活性的基础。因此, CY-H 具有开发为新型微生物源除草剂的潜力,具有深入研究的意义。其他诸如田间防效、活性作用机理、生物安全性等问题还需进一步研究讨论。

参 考 文 献

- [1] 张杰. 周口地区农业耕作模式对田间杂草的影响. 河南师范大学硕士学位论文, 2014.
- [2] Ma SJ, Fu LL, He SQ, Lu XP, Wu YY, Ma ZQ, Zhang X. Potent herbicidal activity of *Sapindus mukorossi* Gaertn. against *Avena fatua* L. and *Amaranthus retroflexus* L.. *Industrial Crops and Products*, 2018, 122: 1–6.
- [3] Ziveh PS, Mahdavi V. Evaluation of the effectiveness of different herbicides on weed invasion in the fields of triticale. *Journal of Plant Protection Research*, 2012, 52(4): 435–439.
- [4] 王晓阳. 莲子草假隔链格孢菌(*Nimbya alternantherae*)生防潜力的研究. 南京农业大学硕士学位论文, 2009.
- [5] Chen SG, Qiang S. The status and future directions of bioherbicide study and development. *Chinese Journal of Biological Control*, 2015, 31(5): 770–779. (in Chinese)
陈世国, 强胜. 生物除草剂研究与开发的现状及未来的发展趋势. *中国生物防治学报*, 2015, 31(5): 770–779.
- [6] Vurro M, Zonno MC, Evidente A, Andolfi A, Montemurro P. Enhancement of efficacy of *Ascochyta caulina* to control *Chenopodium album* by use of phytotoxins and reduced rates of herbicides. *Biological Control*, 2001, 21(2): 182–190.
- [7] Ji H, Wang KY. Research progress of microbial herbicides. *Weed Science*, 2010, (2): 1–7.
- [8] Vurro M, Boari A, Evidente A, Andolfi A, Zermane N. Natural metabolites for parasitic weed management. *Pest Management Science*, 2009, 65(5): 566–571.
- [9] Yu WH, Chen TT, Zou YY, Zhu ML, Wang LJ, Zhang YL. Separation, identification & antimicrobial activity of endophytic fungi isolated from endangered plant of *Heptacodium miconioides*. *Journal of Microbiology*, 2015, 35(2): 37–41. (in Chinese)
余文华, 陈婷婷, 邹园园, 朱蔓莉, 王丽君, 张应烙. 濒危植物七子花内生真菌的分离鉴定及抗菌活性筛选. *微生物学杂志*, 2015, 35(2): 37–41.
- [10] 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.
- [11] Stewart A, Hill R. Applications of *Trichoderma* in plant growth promotion//Gupta VK, Schmoll M, Herrera-Estrella A, Upadhyay RS, Druzhinina I, Tuohy MG. *Biotechnology and Biology of Trichoderma*. Amsterdam: Elsevier, 2014: 415–428.
- [12] Xu CN, Chi FM, Ji ZR, Zhang JX, Wang N, Tian H, Zhou ZS. Identification of the *Diaporthe* pathogen causing stem blight in Liaoning Province. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2018, 48(5): 577–581. (in Chinese)
徐成楠, 迟福梅, 冀志蕊, 张俊祥, 王娜, 田惠, 周宗山. 辽宁梨树间座壳菌枝枯病的病原鉴定. *植物病理学报*, 2018, 48(5): 577–581.
- [13] Liu HX, Tan HB, Liu Y, Chen YC, Li SN, Sun ZH, Li HH, Qiu SX, Zhang WM. Three new highly-oxygenated metabolites from the endophytic fungus *Cytospora rhizophorae* A761. *Fitoterapia*, 2017, 117: 1–5.
- [14] Liu Z, Zhao JY, Liang X, Lv XX, Li Y, Qu J, Liu YB. Dothiorelone derivatives from an endophyte *Diaporthe pseudomangiferae* inhibit the activation of human lung fibroblasts MRC-5 cells. *Fitoterapia*, 2018, 127: 7–14.

Screening of herbicidal activities of plant pathogenic fungi and active metabolites of strain CY-H

Jinxin Zhang[#], Ying Liu[#], Shuxiang Zhang, Zhen Zhang, Xiaoye Fan, Shuping Shi, Xian Zuo, Yinglao Zhang, Caiping Yin^{*}

School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to isolate and identify plant pathogenic fungal strains with good herbicidal activity and to isolate active metabolites, for the development of new biological herbicides. [Methods] Phytopathogenic fungi were isolated and purified by solid medium inoculation. The targeted strain was identified by morphological observation and 5.8S rDNA sequencing analysis. The active components were separated and purified after screening and tracing, and the structure of the active monomer compounds was determined by spectral analysis. The herbicidal activity of active metabolite and its safety to common crops were determined by Petri dish biological analysis. [Results] Tea pathogen CY-H had good herbicidal activity. The inhibition rates of fermentation broth on radical growth of *Echinochloa crusgalli* and *Amaranthus retroflexus* were 94.6% and 77.3% respectively. CY-H was identified as *Diaporthe* sp.. The single compound CY1 was isolated from CY-H and identified as cytosporaphenones C. At the concentration of 100 µg/mL, CY1 had a good herbicidal activity against the *A. retroflexus*, with the inhibition rates of 57.1%, and it had a good safety against *Triticum aestivum* and *Brassica napus* with the inhibition rate of about 20%. [Conclusion] The tea pathogen CY-H could be potentially developed as a microbial herbicide.

Keywords: phytopathogenic fungi, herbicidal activity, *Diaporthe* sp., cytosporaphenones C, natural product

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770007)

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-551-65786129; E-mail: 247390386@qq.com

Received: 10 June 2019; Revised: 13 August 2019; Published online: 20 November 2019