

瓜果腐霉菌丝中除草活性物质的初步研究

高松梅¹ 张利辉¹ 张中东² 翟广谦² 董金皋^{1*}

(1. 河北农业大学 植物分子病理学实验室 河北 保定 071001)

(2. 山西农科院玉米研究所 山西 忻州 034000)

摘要: 将瓜果腐霉进行液体发酵, 其菌丝用等体积乙酸乙酯和甲醇进行依次萃取, 甲醇萃取液旋转蒸发去溶剂后进行硅胶柱层析, 以乙酸乙酯和石油醚(V/V=3:1 和 V/V=2:1)的混合液进行梯度洗脱, 每 50 mL 收集为一个馏分, 共收集到 40 个馏分。生物测定结果表明, 以乙酸乙酯和石油醚(V/V=2:1)洗脱得到的馏分 21–24 对供试杂草马唐表现出了较强的活性, 其对马唐的生长抑制作用均为 4 级。合并馏分 21–24, 以乙酸乙酯和石油醚(V/V=2:1)的混合液为展开剂进行等度洗脱, 每 50 mL 收集为一个馏分, 共收集到 20 个馏分。生物测定结果表明, 馏分 3 对马唐有较强的抑制活性。HPLC 分析发现, 该馏分主要含有 3 个组分, 其保留时间分别为 12.7、14.0 和 30.5 min。

关键词: 瓜果腐霉, 除草活性, HPLC

Primary study of herbicidal substance in mycelia of *Pythium aphanidermatum*

GAO Song-Mei¹ ZHANG Li-Hui¹ ZHANG Zhong-Dong² ZHAI Guang-Qian²
DONG Jin-Gao^{1*}

(1. Laboratory of Molecular Plant Pathology, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

(2. Institute of Maize Research, Shanxi Academy of Agricultural Science, Xinzhou, Shanxi 034000, China)

Abstract: *Pythium aphanidermatum* was cultured in PD medium and the mycelia were extracted with ethyl acetate and methanol, and the methanol extracts were separated gradually by silica gel column using ethyl acetate mixture and petroleum ether (V/V=3:1 and V/V=2:1) as the developers. Eluents were collected and each 50 mL were considered as a fraction and bioassayed. The results revealed that fraction 21–24 showed strong activity against *Digitaria sanguinalis* with the inhibition level of 4. The combined fractions of 21–24 were eluted with the mixture of ethyl acetate and petroleum ether (V/V=2:1) as the developer and 20 fractions were collected. Bioassay results showed that fraction 3 had the stronger inhibitory activity against *Digitaria sanguinalis*. HPLC analysis suggested that this fraction mainly contained 3 components, the retention time of which was 12.7, 14.0 and 30.5 min respectively.

基金项目: 国家 863 项目子课题项目(No. 2006AA10A214)

* 通讯作者: Tel: 86-312-7528266; E-mail: dongjingao@126.com

收稿日期: 2011-01-11; 接受日期: 2011-04-01

Keywords: *Pythium aphanidermatum*, Herbicidal activity, HPLC

农田杂草一直被认为是严重影响现代农业与人类生存环境的生物灾害之一, 目前仍以化学防治为主, 但随着化学除草剂的广泛应用其弊端也日趋突出, 如环境污染和农药残留问题已经引起了农药科技工作者的高度关注。因此, 开发研制无污染、安全的新型除草剂已成为当务之急^[1]。生物除草剂具有对目标杂草以外的植物影响小、环境负效应小、安全性高的特点而备受人们的青睐, 尤其是利用植物病原真菌毒素开发微生物除草剂越来越显示出独特的优势。

瓜果腐霉[*Pythium aphanidermatum* (Eds) Fitzp]属于卵菌门卵菌, 引起多种植物猝倒病和瓜果腐烂病^[2-3], 在高温、高湿条件下对禾本科坪草有较强的致病性, 可造成坪草的大面积病害甚至死亡。Shimada 等从 bentgrass 红腐病中分离的瓜果腐霉的代谢产物中发现了吡啶乙酸^[4], 本实验室张金林等从瓜果腐霉的液体发酵产物中成功分离出邻苯二甲酸二甲酯^[5], 张利辉等从瓜果腐霉的固体发酵产物中分离出阿魏酸及其衍生物^[6], 这些物质均表现出一定程度的除草活性。本试验以分离自黄瓜的瓜果腐霉 PAC 菌株为研究对象, 对其菌丝中的除草活性物质进行了初步的分离纯化。

1 材料与方法

1.1 菌株

瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*) PAC 菌株。

1.2 杂草

马唐(*Digtaria sanguinalis*)。

1.3 培养基

PDA 培养基用于病菌的保存和菌饼的制备; PD 培养基用于 PAC 菌株的液体培养。

1.4 试剂

乙酸乙酯(分析纯), 天津市天大化学试剂厂; 甲醇(色谱纯), 北京市华准化学试剂科学开发部; 甲醇(分析纯), 天津市天大化学试剂厂; 石油醚(分析纯), 天津化学试剂厂; 柱层析硅胶(300-400 目), 青岛海立信化工有限公司。

1.5 仪器设备

旋转蒸发仪 RE52-98, 上海亚荣生化仪器厂; 真空泵 SHD-52000, 保定市高开区阳光科教仪器厂; 高效液相色谱仪, Agilent Technologies 1200 series 分析型。

1.6 菌丝活性物质的提取

将病菌培养液用纱布过滤, 得到菌丝和培养滤液; 菌丝在 40 °C 条件下烘干, 并研磨成细小的碎片, 用乙酸乙酯浸提 24 h, 超声波处理 30 min, 过滤, 残渣用等体积甲醇超声波处理 30 min, 过滤, 合并滤液。旋转蒸发去溶剂后用甲醇定容, 得到的样品用于活性测定和进一步分离纯化。

1.7 硅胶柱层析和 HPLC 分析

对菌丝提取物进行硅胶柱层析, 以乙酸乙酯和石油醚(V/V=3:1 和 V/V=2:1)的混合液对其进行梯度洗脱(一级柱层析), 每 50 mL 收集为一个馏分; 合并活性较强的馏分进行二级柱层析, 按馏分流出的顺序编号, 将除草活性较强的馏分进行 HPLC 分析^[7]。

色谱条件: Agilent Technologies 1200 series, Agilent C₁₈ 分析型柱, 检测波长 220 nm, 四元梯度泵, 每次进样量 20 μL, 流动相为 65%的甲醇, 总流速 $v=1.00$ mL/min。

1.8 除草活性测定

采用茎叶处理法^[8]: 先将粗毒素置于表面皿内, 自然晾干, 用 1 mL 甲醇溶解, 再用细毛笔均匀涂布于待测杂草上, 120 h 观察结果。除草抑制作用分级标准如表 1 所示^[6]。

表 1 除草抑制作用分级标准 ^[6] Table 1 The grade standard of inhibition ^[6]		
等级 Grade	生长抑制率 G Growth inhibited rate (%)	记号 Marker
0	同对照	—
1	G<25	+
2	25≤G<50	++
3	50≤G<75	+++
4	75≤G<95	++++
5	G≥95	+++++

2 结果与分析

2.1 硅胶柱层析

将菌丝粗提物进行硅胶柱层析,以乙酸乙酯和石油醚(V/V=3:1 和 V/V=2:1)的混合液对其进行梯度洗脱,每 50 mL 收集为一个馏分,共收集到了 40 个馏分。将所收集到的馏分分别用甲醇稀释,利用茎叶处理法对马唐进行除草活性测定,结果表明柱层析后所得到的馏分都对马唐表现出了不同程度的活性,其中馏分 21-24 对马唐的抑制作用达到了 4 级,其余馏分活性较弱,如馏分 5、馏分 6 等对马唐的

抑制作用为 3 级,馏分 4、馏分 31 等对马唐的抑制作用为 2 级,馏分 1、馏分 35 等对马唐的抑制作用为 1 级(表 2)。合并馏分 21-24,以乙酸乙酯和石油醚(V/V=2:1)的混合液为展开剂进行等度洗脱,每 50 mL 收集为一个馏分,共收集到 20 个馏分。生物测定结果表明,馏分 3 有较强的除草活性,其对马唐的抑制作用达到了为 4 级(图 1 为处理后 120 h 的症状),馏分 4、馏分 7 和馏分 17 的活性次之,对马唐的抑制作用为 3 级,而其他馏分的活性均表现为 2 级和 1 级,活性较弱(表 3)。

表 2 一级柱层析所得各馏分的除草活性							
Table 2 Herbicidal activity of the fractions obtained from the first column chromatography							
编号 Number	抑制等级 Inhibition level	编号 Number	抑制等级 Inhibition level	编号 Number	抑制等级 Inhibition level	编号 Number	抑制等级 Inhibition level
馏分 1 Fraction 1	+	馏分 11 Fraction 11	++	馏分 21 Fraction 21	++++	馏分 31 Fraction 31	+
馏分 2 Fraction 2	++	馏分 12 Fraction 12	++	馏分 22 Fraction 22	++++	馏分 32 Fraction 32	+++
馏分 3 Fraction 3	+	馏分 13 Fraction 13	+	馏分 23 Fraction 23	++++	馏分 33 Fraction 33	+
馏分 4 Fraction 4	+	馏分 14 Fraction 14	+++	馏分 24 Fraction 24	++++	馏分 34 Fraction 34	+++
馏分 5 Fraction 5	+++	馏分 15 Fraction 15	++	馏分 25 Fraction 25	++	馏分 35 Fraction 35	++
馏分 6 Fraction 6	+++	馏分 16 Fraction 16	+++	馏分 26 Fraction 26	+++	馏分 36 Fraction 36	+++
馏分 7 Fraction 7	+++	馏分 17 Fraction 17	+++	馏分 27 Fraction 27	+++	馏分 37 Fraction 37	+++
馏分 8 Fraction 8	+++	馏分 18 Fraction 18	+++	馏分 28 Fraction 28	+++	馏分 38 Fraction 38	+++
馏分 9 Fraction 9	+++	馏分 19 Fraction 19	+++	馏分 29 Fraction 29	+++	馏分 39 Fraction 39	+++
馏分 10 Fraction 10	+++	馏分 20 Fraction 20	+++	馏分 30 Fraction 30	+++	馏分 40 Fraction 40	+++

表 3 二级柱层析所得各馏分的除草活性							
Table 3 Herbicidal activity of the fractions obtained from the second column chromatography							
编号 Number	抑制等级 Inhibition level	编号 Number	抑制等级 Inhibition level	编号 Number	抑制等级 Inhibition level	编号 Number	抑制等级 Inhibition level
馏分 1 Fraction 1	+	馏分 6 Fraction 6	+	馏分 11 Fraction 11	++	馏分 16 Fraction 16	++
馏分 2 Fraction 2	+	馏分 7 Fraction 7	+++	馏分 12 Fraction 12	+	馏分 17 Fraction 17	+++
馏分 3 Fraction 3	++++	馏分 8 Fraction 8	++	馏分 13 Fraction 13	++	馏分 18 Fraction 18	++
馏分 4 Fraction 4	+++	馏分 9 Fraction 9	++	馏分 14 Fraction 14	++	馏分 19 Fraction 19	++
馏分 5 Fraction 5	++	馏分 10 Fraction 10	++	馏分 15 Fraction 15	++	馏分 20 Fraction 20	++

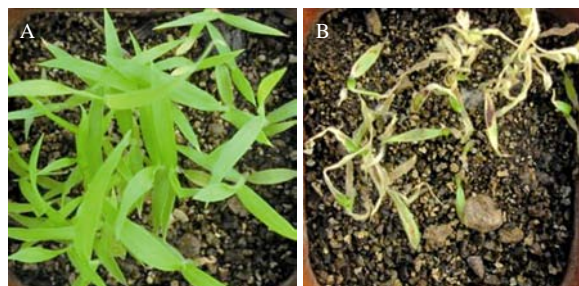


图 1 馏分 3 除草活性测定结果

Fig. 1 Herbicidal activity of fraction 3

注: A: 对照; B: 馏分 3.

Note: A: Control; B: Fraction 3.

2.2 活性馏分的 HPLC 分析

将硅胶柱层析中得到的具有较强除草活性的馏分 3 转溶于甲醇进行 HPLC 分析。图 2 为馏分 3 的 HPLC 分析图, 可见该馏分主要包含 3 个组分, 其保留时间分别为 12.7、14.0 和 30.5 min, 分别标记为组分 1、组分 2 和组分 3。分别将 3 个组分进行收集制备, 利用茎叶处理法测定其对马唐的活性(图 3 为 3 个组分处理 120 h 的症状), 可见 3 个组分都表现出了不同程度的除草活性, 其中组分 3 的活性最强, 叶片表现明显的黄化、萎蔫和失绿。

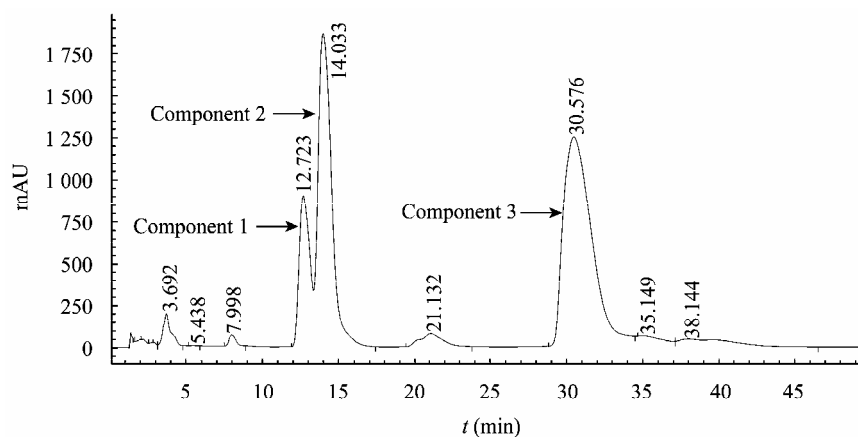


图 2 馏分 3 的 HPLC 分析

Fig. 2 HPLC analysis of fraction 3

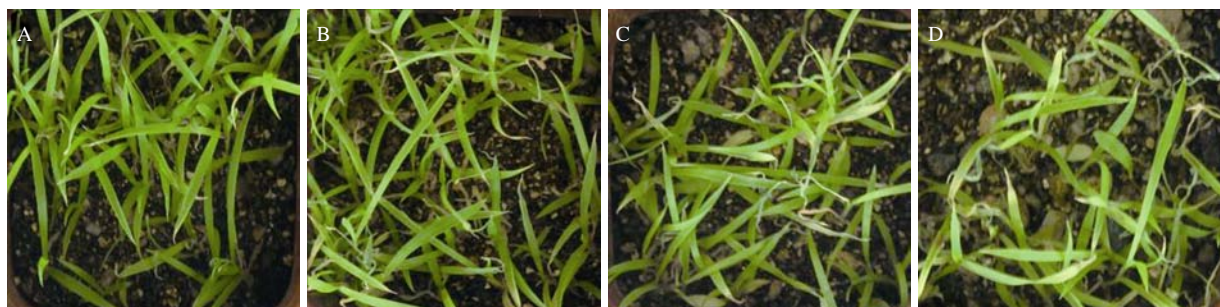


图 3 馏分 3 各组分对马唐的活性

Fig. 3 The herbicidal activity of 3 components against *Digitaria sanguinalis*

注: A: 对照; B: 组分 1; C: 组分 2; D: 组分 3.

Note: A: Control; B: Component 1; C: Component 2; D: Component 3.

3 讨论

利用微生物及其代谢产物来防治杂草是生物防治研究中一个较活跃的领域^[9],尤其是微生物代谢产物除草更凸显优势,因其能够弥补制约活体微生物的外部因素,如天气、温度、时间等。对于那些稳定性差、储存期短、除草效果不够明显的微生物代谢产物可以通过合成先导化合物来实现其除草的目的^[10]。目前对具有除草活性的微生物代谢产物的报道很多,如王再强等从放线菌(*Actinomyces*) p-03-1 代谢产物中分离到具有除草活性的组分^[11];张金林等从葱紫斑病菌(*Alternaria porri*)的代谢产物中分离到对稗草有较强抑制作用的除草活性组分^[12];付洁等从禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的代谢产物中分离到对反枝苋和黑麦草种子的幼根幼芽生长表现出明显抑制作用的组分^[13]。

瓜果腐霉病菌常在高温高湿条件下发病,通过侵染植物幼苗引起腐烂,但是关于其产生除草活性物质的报道很少^[14]。本实验室从其代谢产物中分离到了邻苯二甲酸二甲酯^[15],同时也报道了其菌丝提取物具有除草活性,并从菌丝中分离到了除草活性较强的脂肪酸类化合物,但其详细的化学结构尚需进一步确认^[5],故本试验对其菌丝提取物中除草活性成分做了系统的分离和纯化,以期得到除草活性较强的新化合物,为先导化合物的发现奠定基础。

硅胶柱层析技术具有分离速度快、效率高、分离效果明显等特点,被广泛应用于生物活性物质的分离研究^[16]。本试验通过两次硅胶柱层析分离得到了活性较强的馏分,并进一步利用 HPLC 的方法得到了 3 个组分的单体,结果表明,此方法分离效果较好,目前正在对其单体化合物进行大量制备并进行质谱和核磁鉴定。

参 考 文 献

- [1] White GA, Starratt AN. The production of a phytotoxic substance by *Alternaria zinniae*[J]. Canadian Journal of Botany, 1967, 45(11): 2087-2090.
- [2] 宗兆锋, 康振生. 植物病理学原理[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 46.
- [3] 刘大群, 董金皋. 植物病理学导论[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 30.
- [4] Shimada A, Takeuchi S, Nakajima A, et al. Phytotoxicity of indole-3-acetic acid produced by the fungus, *Pythium aphanidermatum*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63(7): 187-189.
- [5] 张金林, 庞民好, 刘颖超, 等. 坪草腐霉病菌毒素产生除草活性物质的条件优化[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 84-88.
- [6] 张利辉. 瓜果腐霉代谢产物中除草活性物质的分离与鉴定[D]. 保定: 河北农业大学博士毕业论文, 2009.
- [7] Ohra J, Morita K, Tsujino Y, et al. Production of the phytotoxic metabolite, ferrirocinn, by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1995, 59(1): 113-114.
- [8] Zhang LH, Dong JG, Wang CH, et al. Purification and structural analysis of a selective toxin fraction produced by the plant pathogen *Setosphaeria turcica*[J]. Agricultural Sciences in China, 2007, 6(4): 452-457.
- [9] 叶非, 冯理. 微生物除草剂的研究与应用进展[J]. 东北农业大学学报, 2010, 4(4): 139-143.
- [10] 张剑, 董晔欣, 张金林, 等. 一株具有高除草活性的真菌菌株[J]. 菌物学报, 2008, 27(5): 645-651.
- [11] 张利辉, 张洋, 司贺龙, 等. 瓜果腐霉毒素除草活性物质的初步分离[J]. 河北农业大学学报, 2008, 30(5): 71-74.
- [12] 王再强, 周天雄. 放线菌 p-03-1 代谢产物除草活性初步研究[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(2): 253-254.
- [13] 张金林, 董金皋, 樊慕贞, 等. 葱紫斑病菌毒素的纯化及除草活性[J]. 植物保护学报, 2000, 27(3): 285-286.
- [14] 付洁, 侯军, 郝双红. 禾谷镰刀菌毒素的抑菌除草活性测定[J]. 陕西农业科学, 2006(1): 3-4.
- [15] Zhang LH, Kang ZH, Xu J, et al. Isolation and structural identification of herbicidal toxin fractions produced by *Pythium aphanidermatum*[J]. Agricultural Sciences in China, 2010, 9(7): 995-1000.
- [16] Lapisardi G, Chiker F, Launay F, et al. Preparation, characterisation and catalytic activity of new bifunctional Ti-AISBA15 materials. Application to a "one-pot" green synthesis of adipic acid from cyclohexene and organic hydroperoxides[J]. Microporous and Mesoporous Materials, 2005, 78(2/3): 289-295.