

# 树脂吸附法分离瓜果腐霉毒素中的除草活性物质

张利辉 王毅靖 张金林 董金皋\*

(河北农业大学植物保护学院 保定 071001)

**摘要:** 本试验以对禾本科杂草具有除草活性的瓜果腐霉菌株 PAM1 为试验材料, 研究了 X-5、AB-8、H-103 和 S-8 等 4 种大孔吸附树脂对其除草活性物质的吸附性能, 结果表明 X-5 树脂能够较好地吸附该除草活性物质。选用 50%乙醇、95%乙醇、乙酸乙酯和丙酮 4 种溶剂为供试洗脱溶剂, 采用 2 种洗脱方案, 对其最佳洗脱溶剂进行了选择, 生长抑制作用和种子萌发试验结果表明, 以方案 1 洗脱为最佳。

**关键词:** 瓜果腐霉病菌, 除草活性, 树脂柱层析

## Colophony Adsorbing Isolating Herbicidal Substance from Mycotoxin Produced by *Pythium aphanidermatum*

ZHANG Li-Hui WANG Yi-Jing ZHANG Jin-Lin DONG Jin-Gao\*

(College of Plant Protection of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

**Abstract:** Four kinds of colophony were used to isolate the herbicidal substance from the toxin produced by isolate PAM1 of *Pythium aphanidermatum*, which had herbicidal activity to *Digitaria sanguinalis* L and the results showed X-5 was the best one for absorbing herbicidal substance among the four kinds of colophony used. Four solvents including 50% ethanol, 95% ethanol, ethyl acetate and acetone were used as eluting solvent and 2 procedures were tested, and the results of growth inhibition and seed germination indicated that the best eluting procedure was procedure 1.

**Keywords:** *Pythium aphanidermatum*, Herbicidal activity, Colophony

杂草是农田主要的有害生物之一, 每年造成的产量损失约为 10%~25%<sup>[1]</sup>, 而目前其防治仍然是以化学防治为主, 但是化学除草剂的大量应用引发了诸如杂草抗药性、环境污染等一系列问题, 随着人们环境意识的增强和农业可持续发展的需要, 开发生物活性高、选择性强、环境相容性好的生物农药或仿生农药已成为当代农药发展的必然趋势<sup>[2]</sup>。微生物源除草剂以其资源丰富、选择性好、易降解、环境兼容性好以及对非靶标生物和哺乳动物安全性

高等特点, 越来越引起杂草研究工作者的广泛兴趣和重视<sup>[3]</sup>。

微生物源除草剂是利用微生物产生的代谢产物进行杂草防除的一种新型生物除草剂。根据其来源不同可分为真菌源除草剂、细菌源除草剂等, 主要是指微生物在代谢过程中产生的毒素或抗生物质。已知的病原菌毒素和抗生物质都为有机化合物, 包括多肽类、萜类、大环脂类和酚醛树脂类等<sup>[4]</sup>。

瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum* (Eds) Fitzp)

属卵菌门卵菌,引起多种植物猝倒病和瓜果腐烂病<sup>[5]</sup>,但关于该菌用于生物除草方面的研究还很少报道。1999年,Atsumi等曾报道从患有红腐病的bentgrass草中分离纯化出瓜果腐霉病菌,并在其代谢产物中发现了吡啶乙酸<sup>[6]</sup>。国内,陈捷等(1998)报道发现玉米茎腐病菌在侵染玉米茎基部时可以产生细胞壁降解酶,能明显浸解胚根组织<sup>[7]</sup>。张金林(2005)从瓜果腐霉代谢产物中分离出了具有除草活性的邻苯二甲酸二甲酯<sup>[8]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌种:瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)菌株 PAM1 是由菌株 PA1 经过紫外诱变 27 min 所得。

1.1.2 供试培养基: PDA 培养基用于病菌的分离及保存和菌饼的制备; PD 培养基用于腐霉病菌的培养。

1.1.3 供试植物: 马唐(*Digitaria sanguinalis* L); 反枝苋(*Amaranthus retroflexus* L)

1.1.4 供试试剂: 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); 乙醇(分析纯,天津市天大化学试剂厂); 葡萄糖(分析纯,天津天大化工实验厂); 琼脂粉(生化试剂,天津市珠江卫生材料厂); 95%乙醇(分析纯,天津市天大化学试剂厂); 无水乙醇(分析纯;天津市天大化学试剂厂); 乳化剂 1601(邢台化学助剂厂); AB-8 树脂, X-5 树脂, S-8 树脂, H-103 树脂(南开大学化工厂)。

1.1.5 供试仪器设备: 旋转蒸发器(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); 超声波清洗器(SB-52000, 上海新生物技术研究所)

### 1.2 方法

1.2.1 供试植物的种植: 在口径 7 cm, 高 10 cm 的塑料杯中(杯底有 4 个直径为 0.2 cm 的孔)装入 8 cm 深的蛭石。每杯中均匀播种已催芽的马唐和反枝苋的种子 25 粒, 然后覆盖约 1 cm 厚的蛭石。将播种后的塑料杯转入瓷盘中, 同时保持瓷盘中 0.5 cm 厚的水层, 置于室外进行培养, 待供试禾本科杂草生长至 2 片叶、株高约 2 cm~3 cm, 阔叶草长至 4 片叶、株高约 3 cm~4 cm 时进行试验处理。

1.2.2 生长抑制作用测定: 用移液管定量量取粗毒素样品 2 mL, 置于表面皿上, 使其溶剂(甲醇)挥发至干后, 加 2 mL 水, 再加少量乳化剂 1601, 混匀。

用移液器移取定量毒素(400  $\mu$ L/杯)点涂在马唐、反枝苋的叶子上, 以草叶润湿为止, 记录毒素的用量, 设空白对照, 48 h 后目测结果。除草活性的分级标准参考文献[9]。

1.2.3 种子萌发抑制作用测定: 采用纸床法。在  $\Phi$ 50 mm 的培养皿中放入与皿底同等大小的滤纸, 在每皿中放入定量稀释液(为减少溶液对种子萌发的影响, 将粗毒素处理液均匀加到滤纸上, 放入通风橱中, 待滤纸完全干后再均匀滴加适量的水)在每个培养皿中播种适量种子, 以清水作对照。48 h 后测量根茎长, 计算抑制率<sup>[9]</sup>。

1.2.4 树脂的洗涤: 称取树脂 200 g, 按如下流程进行清洗: 树脂 $\rightarrow$ 蒸馏水 $\rightarrow$ 超纯水 $\rightarrow$ 95%乙醇 400 mL $\rightarrow$ 无水乙醇 100 mL $\rightarrow$ 乙酸乙酯 100 mL $\rightarrow$ 二甲苯(甲苯)100 mL $\rightarrow$ 乙酸乙酯 100 mL $\rightarrow$ 无水乙醇 100 mL $\rightarrow$ 95%乙醇 400 mL $\rightarrow$ 超纯水冲洗。

1.2.5 装柱: 树脂以乙醇湿法装柱, 装柱后继续用乙醇在柱上流动清洗, 不时检查流出液, 至与水混合不呈白色浑浊为止(乙醇:水=1:5, V/V)。然后以大量蒸馏水洗去乙醇至洗净为止。将样品直接加到已处理好的吸附树脂柱柱顶<sup>[10]</sup>。

1.2.6 树脂的选择: 将供试的吸附树脂分别按照上述方法洗涤、装柱后, 按照以下流程进行毒素样品的制备。

1.2.7 洗脱溶剂的选择: 洗脱方案 1: 用 50%乙醇、95%乙醇、丙酮、乙酸乙酯依次洗脱。于待洗脱的树脂柱顶端依次加入 50%乙醇、95%乙醇、丙酮和乙酸乙酯各 100 mL, 收集 50%洗脱液、95%洗脱液、丙酮洗脱液和乙酸乙酯洗脱液, 40 $^{\circ}$ C 旋转蒸发至溶剂挥发完全并用甲醇定容(甲醇用量为培养滤液总体积的 0.1%), 备用。

洗脱方案 2: 用 50%乙醇、95%乙醇、丙酮、乙酸乙酯分别洗脱。将 4 等份的培养滤液分别进行树脂吸附, 将待洗脱的树脂柱口分别加入 50%乙醇、95%乙醇、丙酮和乙酸乙酯 100 mL, 调整流速, 收集各洗脱液, 40 $^{\circ}$ C 旋转蒸发至溶剂挥发完全并用甲醇定容(甲醇用量为培养滤液总体积的 0.1%), 备用。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同树脂吸附后的除草活性分析

2.1.1 不同树脂吸附前后培养滤液颜色的变化: 各取 3000 mL 培养滤液, 用不同型号的树脂各 400 g 吸附, 然后分别用 100 mL 50%和 95%的乙醇依次洗脱, 将洗脱后乙醇相合并, 40 $^{\circ}$ C 下减压蒸发至干, 甲醇定容至 10 mL。吸附前后, 4 种树脂的颜色表现出明显的不同。

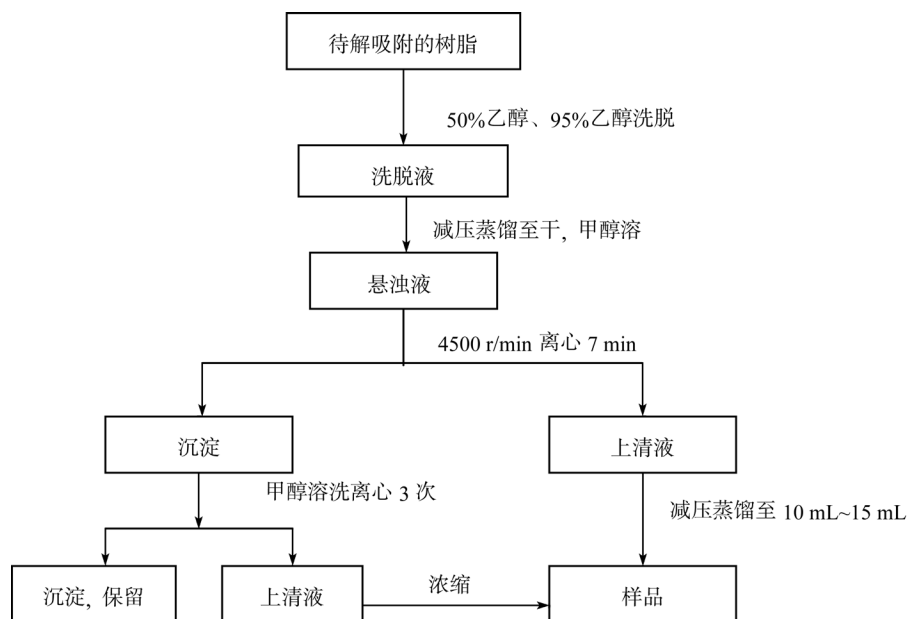


图 1 毒素样品的制备  
Fig. 1 Preparation of crude toxin

同, H-103 树脂颜色最深, 呈红褐色, 柱端流出的液体无色, 洗脱后所得液体为黑红色; AB-8 树脂颜色最浅, 呈白色, 柱端流出的液体为淡黄色, 洗脱后所得液体为深黄色; S-8 树脂呈黄色, 柱端流出的液体无色, 洗脱后所得液体为橙黄色; X-5 树脂颜色为淡黄色, 柱端流出的液体为淡黄色, 洗脱后所得的液体黑红色; 由此可见, 从色素被吸附和洗脱的角度来看, X-5 树脂的吸附性能最好, H-103 树脂次之。

2.1.2 不同树脂吸附后除草活性的变化: 各取 5 mL 上述甲醇定容后的样品置于表面皿上, 待甲醇挥发至干后, 加入 0.5%的乳化剂 1601, 对马唐和反枝苋进行茎叶处理(见表 2)。结果表明, 用 X-5、H-103 树脂吸附所得样品对马唐的抑制作用均为 5 级, 其次是 AB-8, 为 4 级, 各吸附样品对反枝苋的抑制作用较弱。但综合比较以上各树脂, 虽然 H-103 树脂具有较强的吸附性能, 但是其在吸附除草活性物质的同时可能会吸附一些其他的杂质, 故在以下的试验中选用 X-5 树脂对除草活性物质进行吸附分离。

2.2 洗脱方案 1 所得各洗脱液除草活性测定

选择晴天上午, 取已经制备好的 50%乙醇、95%乙醇、丙酮和乙酸乙酯洗脱液各 2 mL, 置于表面皿中挥发至干, 向其中加入 1.5 mL 的 1601(150×)助剂, 分别对马唐、反枝苋进行种子萌发(表 3)和生长抑制作用测定(表 4)。结果表明, 等量的各洗脱液对马唐和反枝苋的种子根、芽的伸长及茎的生长都有不同程度的抑制作用, 但各洗脱液对马唐的效果较反枝苋好, 其中抑制作用最强的是乙酸乙酯洗脱液, 对马唐种子根和芽的抑制率分别达到了 81%和 79%, 对马唐的生长抑制作用为 5 级。

2.3 洗脱方案 2 所得各洗脱液的除草活性测定

将方案 2 所得的 50%乙醇、95%乙醇、丙酮和乙酸乙酯洗脱液分别对马唐、反枝苋进行种子萌发和生长抑制作用测定, 处理方法同 2.2。试验结果表明等量洗脱液的处理下乙酸乙酯洗脱液的除草活性最强, 对马唐根和芽的抑制率分别为 87%和 80%, 对马唐的生长抑制作用达到了 5 级; 其次是丙酮洗脱

表 1 不同树脂吸附结果  
Table 1 Results of adsorbing with different colophony

类型 (Type of colophony)	树脂颜色 (Color of colophony)	流出的滤液颜色 (Color of effluent )	解吸附所得液体颜色 (Color of liquid obtained)
AB-8	白色	淡黄色	深黄色
X-5	淡黄色	淡黄色	黑红色
S-8	黄色	无色	橙黄色
H-103	褐色	无色	黑红色

表 2 不同树脂吸附后的洗脱液对马唐和反枝苋的生长抑制作用		
Table 2 The growth inhibition of crude toxin adsorbed by different colophony to <i>Digitaria sanguinalis</i> L and <i>Amaranthus retroflexus</i> L		
类型 (Type of colophony)	马唐 ( <i>Digitaria sanguinalis</i> L)	反枝苋 ( <i>Amaranthus retroflexus</i> L)
AB-8	4 级	2 级
X-5	5 级	4 级
S-8	1 级	1 级
H-103	5 级	2 级

液, 除草活性最弱的是 50%乙醇。并且各洗脱液总体对马唐具有较强的除草活性, 而对反枝苋则较弱。生测效果如表 5 和表 6 所示。

### 3 讨论与结论

微生物源除草剂是当今农药发展的趋势之一, 尤其是近几年来, 真菌毒素源除草剂的研制和开发为解决生产上化学除草剂抗药性问题提供了良好的基础, 国外 Junko Ohra 等研究发现, 从真菌(*Colletot richum gloeosporioides*)中分离出的一种毒素对 7

表 3 方案 1 所得洗脱液对马唐和反枝苋种子根和芽的抑制活性												
Table 3 The results of seed germination to roots and buds of eluting extracts obtained in procedure 1 to <i>Digitaria sanguinalis</i> L and <i>Amaranthus retroflexus</i> L												
	马唐 <i>Digitaria sanguinalis</i> L						反枝苋 <i>Amaranthus retroflexus</i> L					
	根 Root			芽 Bud			根 Root			芽 Bud		
	平均长 Average (cm)	抑制率 Inhibition rate (%)		平均长 Average (cm)	抑制率 Inhibition rate (%)		平均长 Aver- age(cm)	抑制率 Inhibition rate (%)		平均长 Average (cm)	抑制率 Inhibition rate (%)	
50%乙醇 50% Ethanol	0.86	56	B	0.33	0.74	A	0.48	0.56	B	0.55	0.40	B
95%乙醇 50% Ethanol	1.43	26	C	0.64	0.51	B	0.43	0.60	C	0.46	0.50	B
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.36	81	A	0.27	0.79	A	0.21	0.81	A	0.26	0.72	A
丙酮 Acetone	0.91	53	B	0.68	0.48	B	0.48	0.56	B	0.726	0.22	C
CK	1.94			1.29			1.09			0.92		

表 4 方案 1 所得洗脱液对马唐和反枝苋的生长抑制作用		
Table 4 The growth inhibition of eluting extracts obtained in procedure 1 to <i>Digitaria sanguinalis</i> L and <i>Amaranthus retroflexus</i> L		
处理 Treatment	马唐 ( <i>Digitaria sanguinalis</i> L)	反枝苋 ( <i>Amaranthus retroflexus</i> L)
50%乙醇 50% Ethanol	2 级	1 级
95%乙醇 95% Ethanol	4 级	1 级
乙酸乙酯 Ethyl acetate	5 级	2 级
丙酮 Acetone	4 级	1 级

种不同杂草具有除草活性, 提取纯化后经红外线光谱、核磁共振等实验分析发现, 该毒素为高铁藏红花素<sup>[11]</sup>; 国内李荣金等研究了百日草链格孢毒素的发酵及提取工艺<sup>[12]</sup>, 姜述君等报道了狭卵链格孢菌株AAEC05-3 及其毒素对稗草的毒性<sup>[13]</sup>。本课题组王惠、张金林分别报道了灰葡萄孢和瓜果腐霉毒素的除草活性<sup>[8,14]</sup>。

瓜果腐霉病菌寄主范围较广, 可引起多种植物猝倒病和瓜果腐烂病, 作者在前期研究中发现, 来自于不同寄主的瓜果腐霉有不同程度的除草活性, 本试验以对禾本科杂草有特殊效果的 PAM1 菌株为研究对象, 拟从其毒素中分离除草活性物质。

利用树脂柱层析对 PAM1 菌株毒素进行初分离, 代替了以往许多试验过程中用有机溶剂进行提取的方法, 相比之下, 树脂的吸附性好, 操作简便, 但从试验的过程及结果看来, 供试的 4 种树脂都在不同程度上对色素的吸附性较好, 但是色素与除草活性的关系有待于进一步的系统研究。

本研究利用两种洗脱方案对瓜果腐霉毒素进行洗脱, 旨在选择最佳的洗脱溶剂。方案 1 为 4 种有机溶剂按照极性由大到小的顺序进行依次洗脱, 方案 2 为 4 种有机溶剂进行分别洗脱即每次采用一种溶剂进行洗脱。结果显示, 各洗脱液均表现出了不同程度的除草活性, 但乙酸乙酯洗脱液的除草活性最强, 可见瓜果腐霉毒素中强除草活性组分均溶于供试的 4 种洗脱溶剂, 但是从除草活性强弱程度来看, 该物质在极性分子中的溶解度偏小, 而在弱极

表 5 方案 2 所得洗脱液对马唐和反枝苋种子根和芽的抑制活性												
Table 5 The results of seed germination to roots and buds of eluting extracts obtained in procedure 2 to <i>Digitaria sanguinalis</i> L and <i>Amaranthus retroflexus</i> L												
	马唐 <i>Digitaria sanguinalis</i> L						反枝苋 <i>Amaranthus retroflexus</i> L					
	根 Root			芽 Bud			根 Root			芽 Bud		
	平均长 Average (cm)	抑制率 Inhibition rate (%)		平均长 Average (cm)	抑制率 Inhibition rate (%)		平均长 Aver- age(cm)	抑制率 Inhibition rate (%)		平均长 Average (cm)	抑制率 Inhibition rate (%)	
50%乙醇 50% Ethanol	0.59	0.70	B	0.42	0.68	AB	0.50	0.54	A	0.40	0.56	B
95%乙醇 95% Ethanol	0.70	0.64	B	0.56	0.57	BC	0.47	0.57	B	0.57	0.39	B
乙酸乙酯 Ethyl acetate	0.260	0.87	A	0.26	0.80	A	0.33	0.70	A	0.26	0.72	A
丙酮 Acetone	0.94	0.52	C	0.72	0.45	C	0.66	0.39	C	0.60	0.35	C
CK	1.94			1.29			1.09			0.92		

表 6 方案 2 所得洗脱液对马唐和反枝苋的生长抑制作用		
Table 6 The growth inhibition of eluting extracts obtained in procedure 2 to <i>Digitaria sanguinalis</i> L and <i>Amaranthus retroflexus</i> L		
处理 Treatment	马唐 ( <i>Digitaria sanguinalis</i> L)	反枝苋 ( <i>Amaranthus retroflexus</i> L)
50%乙醇 50% Ethanol	2 级	1 级
95%乙醇 95% Ethanol	3 级	1 级
乙酸乙酯 Ethyl acetate	5 级	3 级
丙酮 Acetone	4 级	1 级

性溶剂乙酸乙酯中的溶解度较大，故推测该活性物质属于中等偏弱极性的物质。从相似相容的原理来看，在方案 1 中 4 种洗脱液应该都不同程度地含有该除草活性物质，只是在乙酸乙酯中浓度更大一些，而方案 2 中虽然乙酸乙酯液活性最强，但是洗脱过程自始至终只有乙酸乙酯一种有机溶剂，难免吸附的物质较杂，或者漏掉部分有活性的除草物质，导致分离效果差一些。所以，综合上述几种因素，笔者认为洗脱方案 1 为最佳。

参 考 文 献

[1] 苏少泉. 除草剂的发展及其前景. 农药译从, 1989, 11(1): 1-8.  
[2] 罗小勇. 微生物除草剂的发展现状与展望. 甘肃科学学报, 1995, 3(27): 54-60.

[3] 李 钊, 董锦艳, 向梅梅. 微生物源除草剂的研究、应用现状及展望. 杂草科学, 2004, 4: 1-7.  
[4] Strobel G, Kenfield D. Phytotoxins as potential herbicides. *Experientia*, 1991, 47: 819-826.  
[5] 刘大群, 董金皋. 植物病理学导论. 北京: 科学出版社, 2007, p.29.  
[6] Atsumi, sumiyo, Akira, *et al.* Phytotoxicity of indol-3-acetic acid produced by the fungus, *Pythium aphanidermatum*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(7): 187-189.  
[7] 陈 捷, 高洪敏, 纪明山, 等. 玉米茎基腐病菌产生的细胞壁降解酶的致病作用. 植物病理学报, 1998, 28(3): 221-226.  
[8] 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. 河北农业大学学报, 2005, 28(4): 85-88.  
[9] 陈年春. 农药生物测定技术. 北京: 北京农业大学出版社, 1991, pp.96-217.  
[10] 汪茂田, 谢培山, 王忠东, 等. 天然有机化合物提取分离与结构鉴定. 北京: 机械工业出版社, 2004, pp. 100-105.  
[11] Junko O, Kenji M. Production of the phytotoxic metabolite, ferricrocin, by the fungus *Colletot richum gloeosporioides*. *Biosci Biotech Biochem*, 1995, 59(1): 113-114.  
[12] 李荣金, 强 胜. 百日草链格孢菌粗毒素的生产、提取及稳定性的研究. 中国生物工程杂志, 2006, 26(8): 67-71.  
[13] 姜述君, 范文艳, 鞠世杰, 等. 狭卵链格孢菌株 AAEC05-3 及其毒素对稗草的致病性. 植物保护学报, 2007, 34 (3): 282-287.  
[14] 王 惠, 张凤云, 董金皋, 等. 灰葡萄孢及其毒素的生物活性测定. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2003, 31(4): 119-122.