

## 灰葡萄孢 BC7-3 菌株除草活性组分的纯化与结构鉴定

郑蒙, 徐扩, 董金泉\*

(河北农业大学真菌毒素实验室, 保定 071001)

**摘要:** 【目的】植物病原真菌毒素是一类重要的微生物源除草剂, 本研究旨在找到一个新的具有除草活性的化合物结构。【方法】在前期薄层层析法、柱层析法和高效液相色谱法分析的基础上对灰葡萄孢诱变菌株 BC7-3 的代谢产物中具有除草活性的 5 个不同组分分别进行了液相色谱制备。【结果】本研究得到了一个纯度达 99.38% 对单子叶杂草马唐具有较强杀除活性的纯组分, 通过对纯组分的物理性状测定并结合紫外-可见吸收光谱、红外光谱以及核磁共振波谱等分析方法鉴定化学结构为 10-顺-二氢化灰霉二醛。【结论】研究的结果为微生物除草剂的创新和开发奠定了理论基础。

**关键词:** 灰葡萄孢; 马唐; 10-顺-二氢化灰霉二醛

**中图分类号:** X172 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1362-05

灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea* Pers.) 是一种重要的植物病原真菌, 无性世代属于无性菌类的灰葡萄孢属, 有性世代属于富克尔核盘菌 (*Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel)。该真菌在植物体内或体外均可产生多种代谢产物, 主要包括酶类、多糖、植物激素、毒素、脂肪酸酯类等, 其中酶类、毒素和植物激素是重要的致病因子。灰葡萄孢毒素中研究和报道最多的是以灰霉二醛为骨架的一类低分子量的有机化合物<sup>[1-3]</sup>, 这类化合物既可以在被侵染的寄主组织中分离到, 也可以在离体的培养条件下产生<sup>[4]</sup>, 而且有的活性很高, 如灰霉二醛在 1.0 mg/L 的浓度下就具有生物活性, 但是这些化合物中的多数在黑暗条件下毒性较低或几乎没有活性, 表明这类化合物的作用是受光激活或光依赖性的<sup>[4]</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、细菌源和链霉菌源除草剂等, 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>[5]</sup>。

研究报道最多的产生除草活性毒素的植物病原

真菌主要来自链格孢菌属 (*Alternaria*)、镰刀菌属 (*Fusarium*)、刺盘孢菌属 (*Colletotrichum*) 等。据报道, 从百日草链格孢 (*Alternaria zinniae*) 内分离到的毒素 zinniol, 可抑制番茄、西瓜、柑桔和胡萝卜种子萌发, 引起西瓜、西葫芦、燕麦等植物幼苗的萎蔫<sup>[6]</sup>, 可以干扰细胞的钙素调节过程而使细胞致死<sup>[7]</sup>。*A. alternata* f. sp. *tenes* 和 *Alternaria* 的其它几个种产生的环四肽 (tentoxin) 是一种可造成绿色植物失绿或能较强抑制一些难防除杂草生长的毒素, 而对玉米、大豆等作物却十分安全<sup>[8]</sup>。由植物病原菌产生的倍半萜类抗生物质 prehelminthosporol 对难以防除的杂草白茅 (*Imperata cylindrica* L.) 十分有效<sup>[8]</sup>。

本实验室已对灰葡萄孢毒素的除草生物活性进行了初步研究。经紫外诱变野生菌株 BC4 得到了一株产毒力强, 除草生物活性高的菌株 (编号为 BC7-3), 对 BC7-3 的除草活性物质的产生条件和提取条件进行了优化, 并通过薄层层析 (Thin Layer Chromatogram, TLC)、柱层析 (Column Chromatography, CC) 及高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 等方法将有除草作

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA10A214); 河北省科技重大攻关项目 (03220142D)

\*通讯作者。Tel: +86-312-7528142; E-mail: shmdjg@hebau.edu.cn

作者简介: 郑蒙 (1983-), 女, 河北辛集人, 硕士研究生, 主要从事天然产物农药的研究。E-mail: zhengmenglx222@163.com

收稿日期: 2008-03-21; 修回日期: 2008-05-18

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

用的组分进一步分离,发现其中还至少含有 5 个不同的有紫外吸收的组分。本研究在此基础上,进一步对除草活性组分进行纯化和结构鉴定。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试材料:**灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* Pers. (编号 BC7-3,是野生菌株 BC4 经紫外诱变后性状稳定的菌株,由河北农业大学真菌毒素实验室保存)。马唐 *Digitaria sanguinalis* 播种于塑料杯中,自然条件下生长。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**无水乙醇等有机试剂均为国产分析纯;液相色谱仪(LC5500 和 LC5510 型,北京东西电子技术研究所),显微熔点测定仪(X-6 型,北京泰克仪器有限公司),紫外-可见分光光度计(UV-2082 型,上海龙尼科光谱仪器有限公司),傅立叶红外变换光谱仪(TENSOR37 型)和核磁共振仪(AVANCE 型 400MHz)为德国 Bruker 光谱仪器公司(河北保定乐凯胶片公司分析测试中心提供)。

### 1.2 菌株培养、培养滤液制备和毒素提取

将在 PDA 中培养好的菌株制备成菌盘接于改良 PD 培养液中,培养 21 d 后过滤,滤液用等体积的乙酸乙酯萃取 3 次,所得的有机相减压浓缩至干,甲醇定容,得到粗毒素。

### 1.3 柱层析法(CC)

用 GG-17-01 型玻璃层析柱,内径 2.5 cm,柱层析硅胶(GF<sub>254</sub>,试剂级,粗孔 ZCX-2 型,200~300 目),采用湿法装柱,使用淋洗液平衡柱子,待平衡后加提取的除草活性物质,选取活性强的组分 431 进行 LC 制备。

### 1.4 除草活性组分的液相色谱(LC)制备及活性测定

色谱柱为 YWC-ODS(C18)柱(300 mm×22 mm, 30 μm),进样定量管 5 mL。对不同组分进行制备,浓缩后进行除草活性测定,对除草活性高的组分再经 HPLC 分析纯度,纯度达 99% 以上的活性组分作为以下进行结构研究的样品。

### 1.5 除草活性组分常见物理性状的观察与测定

选定一个纯度达 99% 以上且有一定除草活性的组分进行结构研究。观察其自然条件下的状态及散发的气味;测定室温下在一些常用有机溶剂中的溶解特性;用显微熔点测定仪测定熔点和熔程。通过以上测定得出该除草活性组分的基本物理参数。

### 1.6 光谱分析

选定一种截止波长短且易溶解待测定样品的溶剂,将样品溶解,进行紫外-可见吸收光谱(Ultraviolet and Visible Spectroscopy, UV-VIS)测定,得出紫外-可见区的最大吸收波长,并与 HPLC 中的扫描结果比较;将样品制成 KBr 压片,进行红外光谱(Infrared Spectrum, IR)分析,测定基本结构基团。

### 1.7 核磁共振波谱(Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, NMR)分析

将样品用氘代氯仿(CDCl<sub>3</sub>)溶解,进行 NMR 分析,分别测定其 <sup>1</sup>H-NMR 和 <sup>13</sup>C-NMR,结合光谱分析结果解析出其基本化学结构。

## 2 结果和分析

### 2.1 灰葡萄孢代谢产物中除草活性物质的 HPLC 制备及活性测定

试验对灰葡萄孢的代谢产物中具有除草活性的

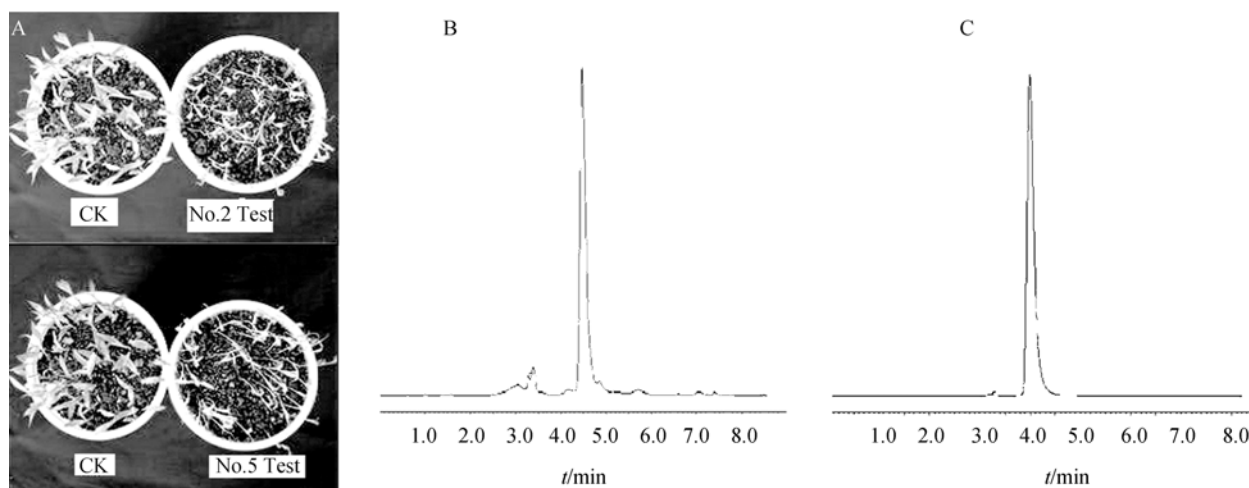


图 1 2 号峰和 5 号峰的生物测定及 HPLC 纯度检测结果

Fig. 1 Bioassay of herbicide activity and purity test of peak No.2 and No.5. A: Bioassay of herbicide activity; B: Purity test of peak No.2; C: Purity test of peak No.5.

组分进行了 HPLC 制备, 将制备的 2、3、4、5 号峰样品分别进行减压浓缩, 配制成 100 mg/L 乙醇溶液, 通过茎叶处理法对马唐进行除草活性测定。发现 4 个组分均有一定的除草活性, 尤其是 2 号和 5 号峰对马唐的杀死效果达到 90% 以上 (图 1-A), 将这 2 个组分在 HPLC 上进行纯度分析, 2 号峰对应的组分纯度较低, 仅有 87.22% (图 1-B, 以积分峰面积为标准, 检测波长: 271 nm), 而 5 号峰对应的组分纯度较高, 可达到 99.38% (图 1-C, 检测波长为 225 nm), 将 5 号峰对应的组分 (编号 432) 进行结构研究。

## 2.2 组分 432 的物理性状

将组分 432 中的溶剂完全挥发干后, 呈现为一种淡黄色有甘草气味的固体, 可燃。易溶于甲醇、乙醇、丙酮、四氢呋喃、乙酸乙酯、异丙醇、氯仿等; 能溶于二氯甲烷、乙醚、1,4-二氧六环等; 不溶于石油醚、苯、四氯化碳、正己烷等有机溶剂。熔点为 165°C~167°C。

## 2.3 组分 432 的光谱分析

将组分 432 溶解于色谱甲醇, 进行紫外-可见波谱区的全波长扫描, 发现组分 432 的最大吸收波长  $\lambda_{\max}=221$  nm, 无明显的次级吸收 (图 2), 证明结构中不含有较大的共轭体系, 与 HPLC 分析中 5 号峰的紫外扫描结果 ( $\lambda_{\max}=222$  nm) 基本一致, 说明组分 432 确实为灰葡萄孢的一个代谢产物。红外光谱分析 (图 3),  $\text{IR}_{\nu_{\max}}/\text{cm}^{-1}$ : 3407, 2960, 2929, 2874, 1731, 1473, 1363, 1253, 1184, 1113, 1085, 而在  $2500\text{ cm}^{-1}$  左右没有吸收, 可以判定组分 432 为一种含有羟基而不含苯环等较大的共轭体系的有机化合物。

## 2.4 组分 432 的 NMR 分析

组分 432 的  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$  图谱分别见图 4-A 和图 4-B, 结合红外光谱分析 (图 3) 结果, 解析其

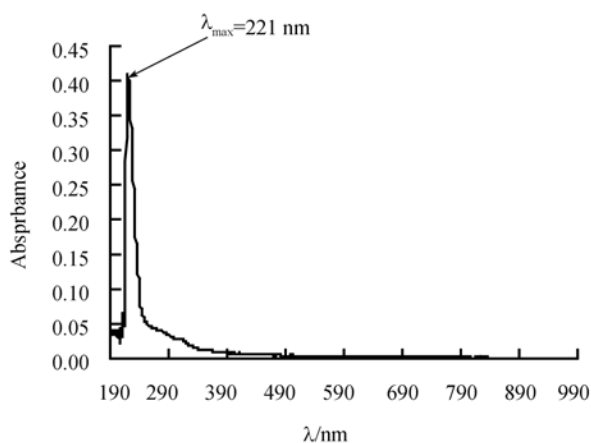


图 2 组分 432 的紫外-可见吸收光谱  
Fig. 2 The UV-VIS absorbent spectrum of fraction 432.

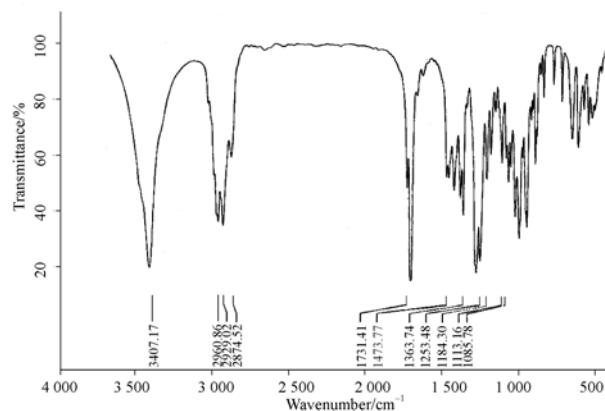


图 3 组分 432 的红外光谱图  
Fig. 3 The IR spectrum of fraction 432.

化学结构。从  $^1\text{H-NMR}$  的信号可知, 组分 432 分子中含有 4 个独立的  $-\text{CH}_3$  ( $\delta$ : 0.96, 1.29, 1.26, 1.09), 2 个独立的  $-\text{CH}_2-$  ( $\delta$ : 1.06, 2.06; 1.16, 1.86), 1 个  $-\text{CH}_2-\text{O}$ -结构 ( $\delta$ : 3.28, 4.18), 5 个  $-\text{CH}-$  ( $\delta$ : 1.64, 1.82, 5.07, 1.89, 5.34), 2 个  $-\text{OH}$  ( $\delta$ : 3.38, 3.61) 及 1 个  $\text{CH}_3\text{CO}$  结构 ( $\delta$ : 2.04); 从  $^{13}\text{C-NMR}$  的信号可知, 组分 432 分子中含有 17 个 C 原子 ( $\delta$ : 54.8, 28.6, 39.9, 72.8, 59.9, 38.8, 50.3, 45.4, 83.4, 92.4, 20.1, 35.9, 27.3, 25.3, 67.5, 21.5, 170.6), 这些信号与灰葡萄孢次生代谢产物 10-顺-二氢化灰霉二醛 (10-syn-dihydrobotrydial) 的  $^1\text{H-NMR}$  和  $^{13}\text{C-NMR}$  信号一一对应 (见二氢化灰霉二醛 NMR 的文献值<sup>[4]</sup>)。其分子式为  $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_5$ , 化学结构式见图 5。

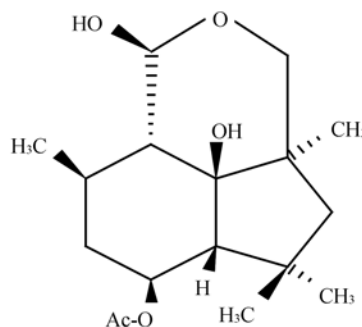


图 5 组分 432 的化学结构  
Fig. 5 Structure of fraction 432.

## 3 讨论

目前, 国外在微生物除草活性成分的分离、结构鉴定及活性研究方面有许多报道, 如: Ohra 等从盘长孢状刺盘孢 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 真菌中分离出的一种具有除草活性的毒素, 经对 7 种不同

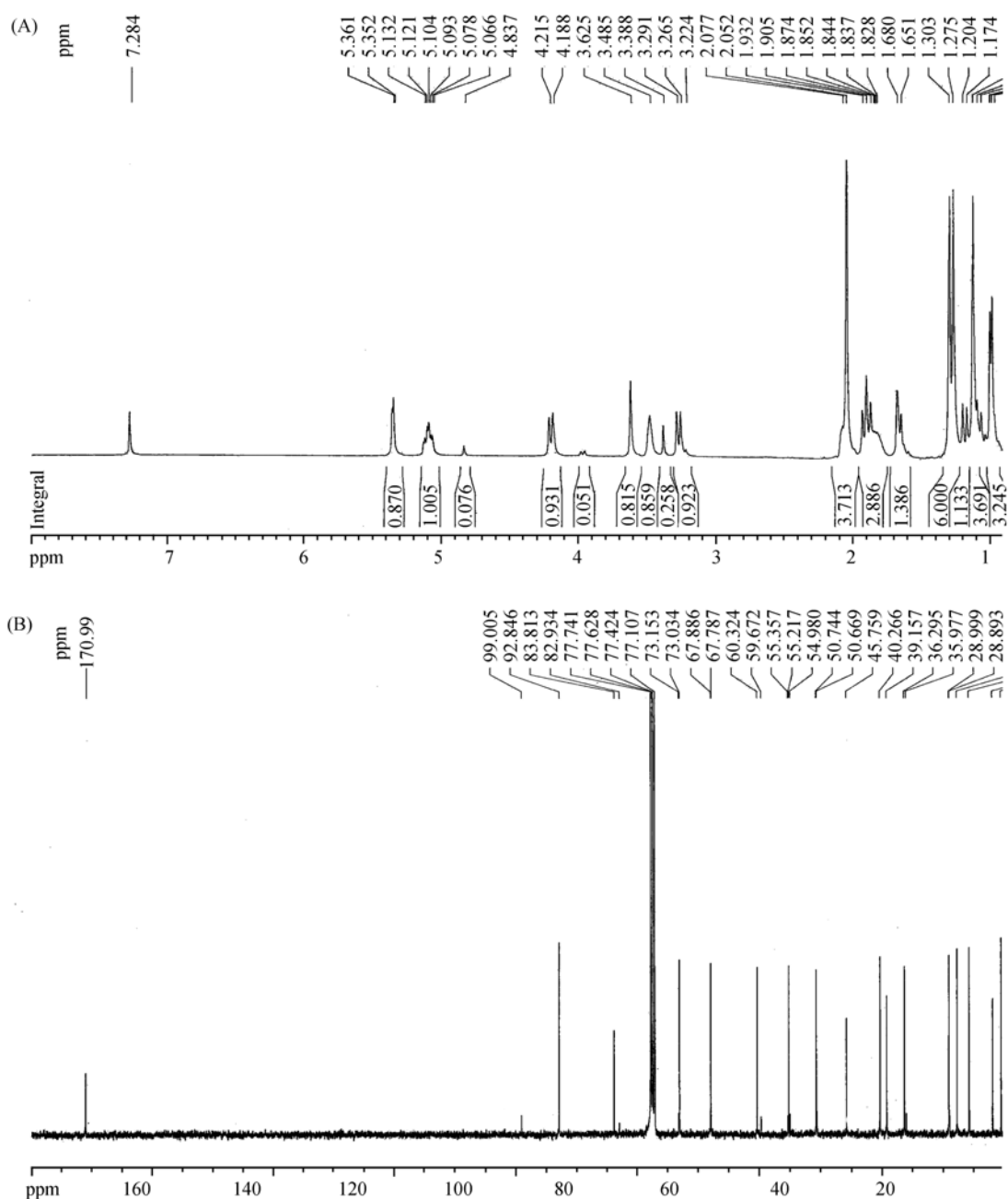


图 4 组分 432 的 NMR 分析

Fig. 4 Structural identification of fraction 432. A: <sup>1</sup>H-NMR spectrum; B: <sup>13</sup>C-NMR spectrum.

杂草的杀草谱试验发现 *jointvech* 受害最重, 黎和 *Florida beggarweed* 遭受严重的灼伤且生长受到抑制, 约翰逊草虽未被杀死, 但却严重矮化。该毒素经红外线光谱、核磁共振等分析证实为高铁藏红毒素, 是一种铁离子载体, 其作用机制可能与螯合物的形成有关<sup>[9]</sup>。Vurro 等<sup>[10]</sup>从引起 *Xanthium occidentale* 叶斑病害的百日草链格孢的培养滤液中也分离出了两种毒素(经过 NMR, HR, EIMS 和 X-射线分析鉴定)——brefeldin A 和  $\alpha, \beta$ -dehydrocurvularin, 其中 brefeldin A 对

苍耳属的植物毒力特别强, 是一种选择性的除草物质。Kim 从 *Drechslera portulacae* 培养滤液中用 X-射线衍射和 NMR 分析鉴定出 Zeaenol, 在  $10^{-6}$  mol/L 下抑制西来稗和苘麻根生长<sup>[11]</sup>。

目前, 对灰葡萄孢毒素报道较多的是以灰霉二醛为骨架的一类低分子量的有机化合物<sup>[12-15]</sup>。这类毒素能够造成霉菌感染的典型损伤, 而且有的活性很高, 如 Botrydial 在 1.0 mg/L 的浓度下就可以使植物叶片表现典型的症状, Botcinolide 在浓度为  $10^{-3}$  mol/L 下对

某些单子叶和双子叶植物就有很强的抑制或杀除作用,但对小鼠的毒性不高,因此有望开发成生物除草剂。

本研究在前期的基础上,对除草活性组分进行纯化和结构鉴定,得到一种除草活性组分—10-顺-二氢化灰霉二醛。这是灰葡萄孢产生的一种毒素组分,该组分在国外虽有报道<sup>[2]</sup>,但具有除草活性尚属首次报道,本研究发现该毒素组分对马唐的防除效果十分明显,有望开发成为除草剂的前体结构,从而为生物除草剂的化学合成奠定基础。

### 参 考 文 献

- [1] Collado IG, HernandezGalan R, Prieto V, *et al.* Biologically active sesquiterpenoid metabolites from the fungus *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 1996, 41(2): 513–517.
- [2] Collado IG, Aleu J, Hernández-Galán R, *et al.* *Botrytis* species: An intriguing source of metabolites with a wide range of biological activities. structure, chemistry and bioactivity of metabolites isolated from *Botrytis* species. *Current Organic Chemistry*, 2000, 4: 1261–1286.
- [3] Duran-Patron R, Hernandez-Galan R, Collado IG. Secobotrytriendiol and related sesquiterpenoids, new phytotoxic metabolites from *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products*, 2000, 63: 182–184.
- [4] Deighton N, Muckenschnabel I, Colmenares AJ, *et al.* Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 2001, 57(5): 689–692.
- [5] Strobel G, Kenfield D. Phytotoxins as potential herbicides. *Experientia*, 1991, 47: 819–826.
- [6] White GA, Starratt AW. The production of a phytotoxic substance by *Alternaria zinniae*. *Canadian Journal Botany*, 1967, 45: 2087–2090.
- [7] Thuleau P, Graziana A, Rossigo M, *et al.* Binding of the phytotoxin zinnol stimulates the entry of calcium into plant protoplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988, 85: 5932–5935.
- [8] 沈寅初, 张一宾编著. 生物农药. 北京: 化学工业出版社. 2001.
- [9] Ohra J, Morita K. Production of the phytotoxic metabolite, ferricrocin, by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1995, 59(1): 113–114.
- [10] Vurro M, Evidente A. Brefeldin and  $\alpha$ ,  $\beta$ -dehydrocurvularin, two phytotoxin from *Alternaria zinniae*, a biocontrol agent of xanthium occidental. *Plant Science*, 1998, 138: 67–69.
- [11] Kim KM. Identification of phytotoxins produced by *Drechslera portulacae*, a pathogen of purslane (*Portulaca oleracea*). 11. Isolation of zeanol and its herbicidal activity. *Korean Journal of Weed Science*. 1994, 14 (3): 192–198.
- [12] 周金燕, 吴凯宇, 雷宝良, 等. 灰葡萄孢代谢产物的分离与生物活性.应用与环境生物学报(*Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*), 1993, 8(5): 532–534.
- [13] Marumo S, Katayama M, Komori E, *et al.* Microbial production of abscisic acid by *Botrytis cinerea*. *Agriculture and Biological Chemistry*, 1982, 46: 1967.
- [14] Collado IG, Cantoral JM, Galan RH, *et al.* Metabolites from a shake culture of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry*, 1995, 3(3): 647–650.
- [15] Cooper LD, Oliver JE, Vilbiss ED, *et al.* Lipid composition of the extracellular matrix of *Botrytis cinerea* germlings. *Phytochemistry*, 2000, 53: 293–298.

## Purification and structural identification of herbicides from *Botrytis cinerea*

Meng Zheng, Kuo Xu, Jingao Dong\*

(Laboratory of Mycotoxin, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** [Objective] Toxin produced by phytopathogenic fungi is one of the important microbial herbicides. We found a new compound with herbicidal activity. [Methods] Five different ultraviolet absorption components were isolated from the filtrate of *Botrytis cinerea* isolate 7–3 culture. [Results] Of the five components, one showed strong inhibitory to *Digitaria sanguinalis*. The pure fraction with high herbicidal activity was obtained by HPLC purification. Its structure was identified as 10-syn-dihydrobotrydial by Ultraviolet and Visible Spectroscopy, Infrared Spectrum, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy analysis. [Conclusion] The findings are important for future preparation and application of the herbicide.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*; *Digitaria sanguinalis*; 10-syn-dihydrobotrydial