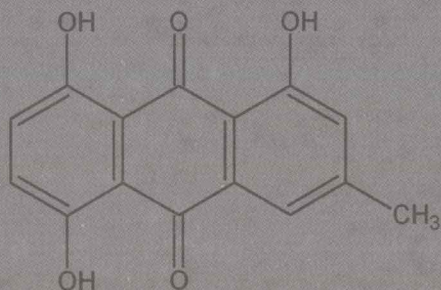
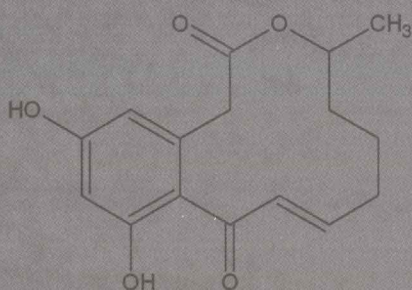




画眉草弯孢霉

除草活性次生代谢物的研究

姜述君 ◆ 著

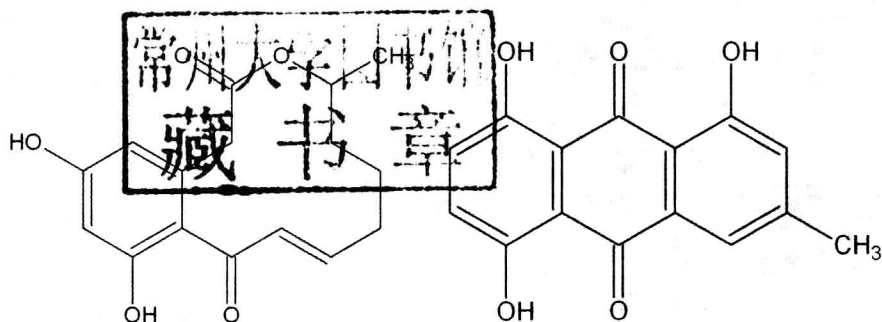


HUAMEICAO WANBAOMEI

CHUCAO HUOXING CISHENG DAIXIEWU DE YANJIU

画眉草弯孢霉 除草活性次生代谢物的研究

姜述君 ◆ 著



CHUCAO HUOXING CISHENG DAIXIEWU DE YANJIU

图书在版编目(CIP)数据

画眉草弯孢霉除草活性次生代谢物的研究 / 姜述君
著. -- 哈尔滨 : 黑龙江大学出版社, 2012.3
ISBN 978 - 7 - 81129 - 469 - 9

I. ①画… II. ①姜… III. ①微生物除草剂 - 次生物
质:代谢物 - 研究 IV. ①TQ457

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2012)第 003380 号

画眉草弯孢霉除草活性次生代谢物的研究
姜述君 著

责任编辑 李 丽 肖嘉慧
出版发行 黑龙江大学出版社
地 址 哈尔滨市南岗区学府路 74 号
印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司
开 本 880 × 1230 1/32
印 张 5
字 数 110 千
版 次 2012 年 3 月第 1 版
印 次 2012 年 3 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978 - 7 - 81129 - 469 - 9
定 价 18.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

前 言

杂草不仅危害各种农作物,造成减产,降低农产品品质,并且许多杂草还是作物病原菌和害虫的寄主和越冬场所。据调查,全球范围内每年因杂草危害造成的农作物减产高达 10% 左右。我国每年因杂草危害所造成的谷物损失大约为 200×10^8 kg。虽然化学除草剂在有效地控制农田杂草危害方面发挥了重要作用,但化学防治也带来一系列环境、食品安全等问题。随着全球环境保护呼声的日益提高以及发展无公害绿色食品的需要,开展高效、环保的生物源除草剂的研发,显示出其重要的社会意义和经济价值。

天然活性化合物通常不含人工合成除草剂中卤素类等重原子,易被土壤微生物降解,不污染环境。因此,以其为先导化合物研制新型除草剂表现出强大的生命力。微生物如放线菌、腐生微生物、植物病原菌是筛选天然除草剂活性化合物极好的资源。大量研究表明,许多微生物产生的次生代谢物对杂草有较强的除草活性,并且这些化合物常具有独特的结构和新颖的作用位点。因而,利用微生物次生代谢产物开发生物源除草剂或

新颖除草剂受到研究者的广泛关注。

本书总结了作者多年来在微生物除草剂开发和天然化合物杀草理论等方面的研究成果。书中的部分成果曾以不同形式公开发表过。作者在微生物除草剂研究的过程中,得到南京农业大学强胜教授的指导和帮助,在此表示衷心的感谢。

姜述君

2011 年 9 月

目 录

第一章 利用天然活性化合物开发除草剂的研究进展	1
1.1 植物源除草剂活性化合物的开发利用	1
1.2 微生物源除草剂活性化合物的研究	7
1.3 天然除草剂活性化合物作用靶标的研究	13
1.4 已商业化的生物源除草剂	20
1.5 展望	23
第二章 弯孢霉属真菌次生代谢物的研究	25
2.1 弯孢霉属真菌产生次生代谢物的种类	25
2.2 弯孢霉属真菌产生次生代谢物的生物活性	28
第三章 画眉草弯孢霉除草活性化合物的分离与纯化	31
3.1 画眉草弯孢霉试验材料	31
3.2 画眉草弯孢霉培养分离试验方法	32
3.3 除草活性化合物的柱层析分离	35
3.4 活性组分的 TLC 分析结果	35
第四章 画眉草弯孢霉除草活性化合物结构鉴定	38
4.1 画眉草弯孢霉除草活性化合物的结构 测定方法	39
4.2 活性组分 I 的结构鉴定	40

4.3	活性组分Ⅱ的结构鉴定	58
第五章 α,β -dehydrocurvularin 生物活性测定和除草剂潜力		
	研究	65
5.1	α,β -dehydrocurvularin 溶液的配制	66
5.2	α,β -dehydrocurvularin 对马唐除草活性的测定	67
5.3	α,β -dehydrocurvularin 的致病范围和作物 安全性	68
5.4	助剂对 α,β -dehydrocurvularin 的增效性评价 ...	68
5.5	α,β -dehydrocurvularin 对马唐除草活性的测定 结果分析	69
5.6	α,β -dehydrocurvularin 的杀草谱和作物安全性 评价	72
5.7	助剂对 α,β -dehydrocurvularin 的增效性评价	78
第六章 Helminthosporin 的生物活性测定		
6.1	Helminthosporin 溶液的配制	82
6.2	Helminthosporin 的生物活性测定	82
6.3	Helminthosporin 的杀草谱和作物安全性评价	82
6.4	Helminthosporin 对马唐的毒害作用	83
6.5	Helminthosporin 的杀草谱和作物安全性评价	84
第七章 α,β -dehydrocurvularin 对大蒜根尖有丝分裂的		
	影响	91
7.1	供试材料与方法	92
7.2	α,β -dehydrocurvularin 对大蒜根尖分生组织细胞 有丝分裂的影响	92

7.3	α, β - dehydrocurvularin 导致细胞的多核仁现象	93
第八章	α, β - dehydrocurvularin 对马唐叶绿体功能的影响	97
8.1	供试材料的培养	98
8.2	马唐叶片类囊体膜的分离	98
8.3	马唐叶绿素含量的测定	98
8.4	希尔反应的测定	99
8.5	叶绿体光合磷酸化活性的测定	99
8.6	类囊体膜 Mg^{2+} - ATP 酶和 Ca^{2+} - ATP 酶活性的测定	100
8.7	马唐叶绿体功能数据统计分析	101
8.8	α, β - dehydrocurvularin 对马唐叶片叶绿素的影响	101
8.9	α, β - dehydrocurvularin 对马唐叶片类囊体膜 Hill 反应的抑制	102
8.10	α, β - dehydrocurvularin 对马唐类囊体膜 Mg^{2+} - ATP 酶和 Ca^{2+} - ATP 酶活性影响	103
8.11	α, β - dehydrocurvularin 对马唐类囊体膜光合磷酸化的影响	104
第九章	α, β - dehydrocurvularin 对马唐叶片 PS II 功能的影响	108
9.1	供试材料马唐的培养	109
9.2	马唐叶片类囊体膜的分离	109
9.3	光合电子传递活性的测定	109

9.4	叶片荧光动力学参数的测定	110
9.5	马唐叶片 PS II 功能数据统计分析	111
9.6	α, β - dehydrocurvularin 对马唐类囊体膜的光合 电子传递速率的影响	111
9.7	α, β - dehydrocurvularin 对马唐叶片叶绿素荧光 动力学参数的影响	112
第十章	Helminthosporin 对马唐叶绿体功能的影响	117
10.1	Helminthosporin 供试材料的培养	117
10.2	Helminthosporin 对马唐叶绿体功能影响的试验 方法	118
10.3	Helminthosporin 对马唐叶片叶绿素的影响	119
10.4	Helminthosporin 对马唐叶片类囊体膜 Hill 反应的 抑制	120
10.5	Helminthosporin 对马唐类囊体膜 Mg^{2+} - ATP 酶 和 Ca^{2+} - ATP 酶活性的影响	121
10.6	Helminthosporin 对马唐类囊体膜光合磷酸化的 影响	122
10.7	Helminthosporin 对马唐叶绿荧光参数的 影响	123
参考文献		127

第一章 利用天然活性化合物开发除草剂的研究进展

由于在自然界中,人工合成的化学除草剂很少有相应的微生物降解途径,残留在土壤中的除草剂可通过物质循环进入生物链,并通过淋溶进入地下水,对环境和人类的健康产生威胁。因此,各国都制定了相应的法规限制化学农药的使用。在这一大环境的推动下,生物源除草剂在近年来也得到了较大的发展。由于天然产物除草剂具有资源丰富、易生物降解、低毒、低残留、对非靶标生物安全、环境兼容性好、开发费用少、化学结构新奇和作用靶标选择性高等合成除草剂无法比拟的优势,因此,利用天然产物开发新除草剂的研究日益受到人们的重视。

1.1 植物源除草剂活性化合物的开发利用

在自然界中,植物与植物间普遍存在着以次生代谢物质为媒介的化学作用关系,在植物的生命活动中起着重要的作用。如,防御病虫的侵袭,有序地调节植物同各种生物和非生物因子间的交互作用,增加植物繁殖的适合度。近 20 年来,植物化学

生态领域的长足进展,不仅使人们对植物与其他有机体间的化学作用关系及生物进化有了进一步的认识,而且也使人们发现,利用植物间的化学作用将可能发展为一个合理的可持续性杂草防治策略。大量的研究证明,许多植物都具有通过释放化学物质来抑制其他植物生长的能力,原因是这些化合物许多都有除草活性。这些具有杀草活性的化合物大概可分为醌酚类、萜烯类、生物碱、肉桂酸类、苯噁嗪酮类、香豆素类、噻吩类、氰类、类黄酮类和噁噻聚乙炔类等。其中,醌酚类和萜烯类有很好的开发前景。

1.1.1 具有潜力的植物源萜烯类化合物

植物源萜类化合物包括单萜、倍半萜和多萜,它们的杀草活性依结构不同,差异较大。单萜是芳香植物分泌的芳香油中最为常见的一类化合物,许多挥发性的单萜对植物具有毒害作用。如芳香植物灌木鼠尾草(*Salvia leucophylla* Greene.)和加利福尼亚艾蒿(*Artemisia californica* Less.),在其周围60~90 cm直径的范围内很少有其他植物生长。灌木鼠尾草产生的挥发性单萜对禾本科植物幼苗生长的抑制作用尤其显著。

在众多的单萜化合物中,1,8-桉树脑(1,8-cineole)是最有开发前景的化合物。Romagni等研究结果显示,1,8-桉树脑及其天然类似物1,4-桉树脑(1,4-cineole,图1-1)可以抑制稗草(*Echinochloa crus-galli*(L.) Beauv.)和决明(*Cassia obtusifolia* L.)的生长,后者严重抑制两种植物的根和茎的生长,而前者(1,8-cineole,图1-1)仅减少根的生长和萌发率。这两种物质虽在结构上相似,作用方式却明显不同,1,8-桉树脑对有丝

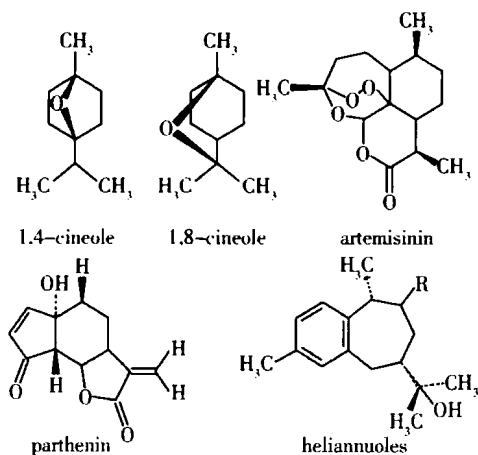


图 1-1 植物源萜烯类化合物

分裂的各个阶段有明显的抑制作用,而 1,4-桉树脑仅抑制有丝分裂的前期。Romagni 等的研究表明,1,8-桉树脑及其天然类似物 1,4-桉树脑是天冬氨酸合酶抑制剂。

倍半萜内酯在实验条件下具有较高的除草活性,一般在 $10^{-8} \sim 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下就表现出活性,但在田间的效果并不理想。在这一类化合物中,黄花蒿素 (artemisinin, 图 1-1) 和银胶菊素 (parthenin, 图 1-1) 是最有开发潜力的。

黄花蒿素是从黄花蒿 (*A. annua* L.) 中分离到的一种倍半萜内酯类抗疟疾物,同时也是一种有效的植物生长抑制剂。在 $33 \mu\text{mol}$ 浓度下,该化合物对藜 (*Chenopodium album* L.)、马齿苋 (*Portulaca oleracea* L.) 和苘麻 (*Abutilon theophrasti* Medik.) 根生长抑制率达 50%,但在田间浓度达到 $1 \text{ kg} \cdot (\text{hm}^2)^{-1}$ 时并不能达到理想的控草效果。Lydon 等研究结果表明,黄花蒿的叶片混入土壤中可以很好地控制杂草,但除草效果并不依赖于土壤

中 artemisinin 的浓度,这说明还有其他因子在起作用。

银胶菊素是由银胶菊 (*Parthenium hysterophorus* L.) 产生的,研究发现,该化合物选择性地抑制胜红蓟 (*Ageratum conyzoides* L.) 的种子萌发和幼苗的生长,并且在相同的浓度下对小麦生长没有影响。构效研究表明,银胶菊素经过结构修饰合成的一些类似物具有更好除草剂和杀虫剂特性,具有较好的开发潜力。Batish 等进一步研究了银胶菊素对杂草野燕麦 (*Avena fatua* L.) 的影响,发现不仅植物的生长被抑制,而且经该化合物处理后植物叶绿素含量大大降低。最近, Singh 等报道,银胶菊素是通过影响胜红蓟光合作用、呼吸作用、蛋白质合成,特别是抑制蛋白酶和淀粉酶活性来抑制胜红蓟的生长。另外,银胶菊素不仅可以用来控制陆生杂草,而且还可以控制水生杂草。

从向日葵中分离出的 heliannuoles (图 1-1) 也有较好的除草效果,而且对单子叶作物的萌发有刺激作用。尽管萜类化合物结构复杂,人工合成难度大,但 Macias 等在 1999 年成功地完成了这个化合物的半人工和人工合成,并且半人工和人工合成的化合物与天然物质有相同的生物活性,通过与除草剂去草净对照实验证明,可以很好地控制杂草。因此,有很好的开发前景。

Quassinoids 是一类由苦木科植物产生的有毒化合物, hail-anthone 是其中较为典型的有毒化合物,有广谱杀草活性,并且活性较高,在 $0.125 \text{ kg} \cdot (\text{hm}^2)^{-1}$ 下可以 100% 地控制狗尾草 (*Setaria viridis* (L.) Beauv.) 和决明的生长。

1.1.2 高效的植物源醌酚类除草剂活性化合物

核桃醌(juglone,图1-2)是胡桃科植物产生的一种具有强它感活性的化合物之一,是最早发现的有杀草活性的醌类化合物。在 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的低浓度下,核桃醌可抑制多种植物的生长。Hogland 研究表明 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 低浓度的核桃醌可抑制苘麻、反枝苋(*Amaranthus retroflexus* L.)和刺金午时花(*Sida spinosa* L.)种子的萌发。在 $1 \sim 3 \text{ mmol}$ 浓度范围,核桃醌对苘麻、反枝苋种子萌发和稗草根生长抑制率达90%。最近,Kocacaliskan 和 Terzi 的研究表明,胡桃(*Juglans regia* L.)叶片提取的核桃醌抑制家独行菜(*Lepidium sativum* L.)和紫花苜蓿种子萌发和幼苗生长。核桃醌对高等植物生长的抑制主要是通过干扰叶绿体和线粒体的功能来实现的。由于该化合物在极低浓度下可显著抑制线粒体呼吸。因此,对该化合物的进一步开发研究受到限制。

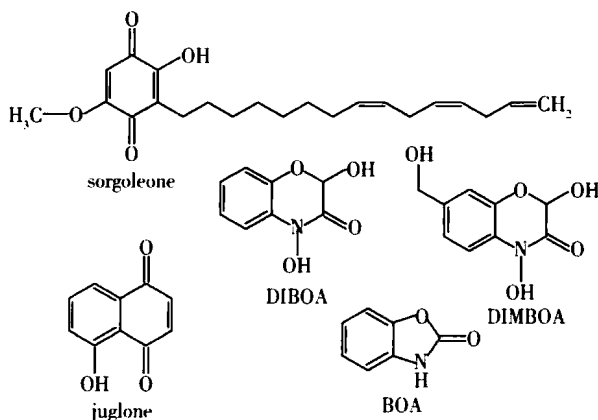


图1-2 植物源醌酚和苯并噁嗪类化合物

在醌类化合物中,高粱醌(sorgoleone,图1-2)可以算是佼佼者,它是高粱根分泌的含长链三烯的二氢醌降解而成的,最早是由 Netzley 和 Butler 在 1986 年首次从高粱根的分泌物中分离得到的。该化合物对多种杂草有强烈抑制作用,在 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下,可使苘麻、反枝苋、稗草、马唐(*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.)、狗尾草(*Setaria viridis* (L.) Beauv) 幼苗的生长量下降 50%。Einhellig 等进一步研究证明,高粱醌无论对阔叶杂草还是对禾草类杂草都有明显的抑制作用。在 $0.6 \text{ kg} \cdot (\text{hm}^2)^{-1}$ 的用量下,高粱醌可显著地抑制 14 d 大的杂草幼苗的生长和发育,特别是对阔叶杂草如龙葵(*Solanum nigrum* L.)、反枝苋、镰刀豆(*Cassia obtusifolia* L.)、马齿苋和豚草(*Ambrosia trifida* L.) 的抑制尤为显著。用该化合物处理 10 d 后,这些植物生长被显著抑制的同时还出现严重的黄萎甚至坏死症状,这些症状与化学合成除草剂阿特拉津和敌草隆非常相似。当向土壤中喷洒浓度为 $10 \times 10^{-6} \sim 80 \times 10^{-6}$ 的高粱醌溶液后,马齿苋、反枝苋和莠荳芽的生长明显受到抑制。因此,Weston 和 Czamota 认为,高粱醌可以用为苗前和苗后除草剂。其作用机制的研究结果是令人振奋的,因为其对植物生长的抑制作用是由于抑制光合系统 II 的电子传递造成的,并与光合系统 II 电子传递抑制剂敌草隆(diuron)有相同的抑制活性。高粱醌在光合系统 II 上的作用位点与三嗪类除草剂的作用位点是相似的。

1.1.3 苯并噁嗪类(Benzoxazinoids)除草剂活性化合物

谷类植物可产生一系列苯并噁嗪类化合物(环异羟肟酸, cyclic hydroxamic acids),这类天然产物具有多种生物活性,其中

也包括它感活性。Friebe 提出用这类化合物来控制谷物的病虫害可以减少农用化合物向农田的输入。一些重要的苯并噁嗪化合物如 DIBOA (2,4 - dihydroxy - 1,4 - benzoxazine - 3 - one, 图 1-2) 和 DIMBOA (2,4 - dihydroxy - 7 - methoxy - 1,4 - benzoxazine - 3 - one, 图 1-2) 普遍存在于小麦、玉米和黑麦中。除了禾本科外,在毛茛科 (Ranunculaceae)、玄参科 (Scrophulariaceae) 和爵床科 (Acanthaceae) 也含有苯并噁嗪化合物。在植物体中这些化合物以配糖 (glycosides) 形式存在,并通过糖苷酶 (glucosidase) 作用使其转化为糖苷配基形式 (aglycone) 释放到体外。DIBOA 主要分布于黑麦草中, DIMBOA 主要分布于小麦和玉米中。DIBOA 经酶水解后, 释放出对苘麻具有强毒性的 BOA (2 - (3H) - benzoxazolinone, 图 1-2)。Whitenack 等进一步研究表明, BOA 可转化为毒性为其 8 ~ 10 倍的 AZOB (diazoperoxide - 2,2' - oxo - 1,1' - azobenzene)。这些化合物对包括稗草和马唐在内的许多植物的幼苗生长具有抑制作用。

1.2 微生物源除草剂活性化合物的研究

1.2.1 放线菌产生的除草剂活性化合物

放线菌 (*Actinomycetes* sp.) 是土壤传播微生物, 可产生大量的各种生物活性化合物。目前, 从放线菌次生代谢物中发现了 500 多种有开发前景的生物活性化合物, 并且一些已开发作为抗细菌、抗真菌和抗癌药物, 如放线菌素 A - Z (actinomycins A - Z)、灰绿霉素 (griseoviridin)、9 - D - 阿拉伯呋喃糖苷 (9 - D - arabi-

nofuraosyl - adenine) 及脂类化合物。在除草剂开发方面,虽然有许多研究报道,但成功开发的并不多,双丙氨磷(bialaphos)和草丁膦(glufosinate)是两个最成功的例子,因此,也引起了人们对放线菌次生代谢物的除草剂活性的关注。

放线菌产生的一些低分子量的核苷衍生物也具有杀草活性,其中诺卡氏菌属(*Nocardia* sp.)产生的间型霉素(formycin, 图1-3)和谷氏链霉菌(*Streptomyces gougerotii* 21544 kanzaki)产生的谷氏菌素(gougerotin, 图1-3)以及由*Streptomyces saganonensis*产生除草啉(herbicidines)是大家较熟悉的一些种类。特别是除草啉对稻田中常见的稗草、甜茅(*Glyceria acutiflora* Torr.)以及一些黍属(*Panicum* sp.)杂草防治效果较好,而且对水稻无任何影响。Isaac等从一些放线菌和高温放线菌及链霉菌属(*Streptomyces* sp.)中分离到5个天然核苷化合物,deoxyguanosine在 $1\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下可以抑制水葫芦(*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms.)的生长。Coaristeromycin和Aristeromycin在田间 $6\text{ kg} \cdot (\text{hm}^2)^{-1}$ 浓度下可有效控制油莎草(*Cyperus esculentus* L.)、假高粱、稗草;deoxytoyocamycin在 $10\text{ }\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下可抑制水葫芦的光合作用;coformycin具有广谱性抑制杂草的能力,在 $6\text{ kg} \cdot (\text{hm}^2)^{-1}$ 浓度下可完全抑制稗草、马唐、假高粱和番薯属杂草幼苗的生长。

吸水链霉菌(*Streptomyces hygroscopicus* Jensen.)产生的次生代谢物hydantocidin(图1-3)也是很好具有除草剂活性的天然化合物,其在 $500\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下对杂草幼苗的抑制作用比草甘膦还要强,并且具有广谱的杀草活性。Nakajima等研究表明,在田间条件下hydantocidin可完全控制单子叶杂草稗草、马唐、