

以 *Colletotrichum acutatum* BCRC34607 次級代謝物進行植物生長抑制及組成分析

余明翰¹、顏瑞泓^{1*}

摘要

余明翰、顏瑞泓。2022。以 *Colletotrichum acutatum* BCRC34607 次級代謝物進行植物生長抑制及組成分析。臺灣農藥科學 12 : 27-42。

本研究探討植物病原菌 *Colletotrichum acutatum* BCRC34607 之次級代謝物的植物毒性。在培養條件的篩選過程中，發現將 *C. acutatum* BCRC34607 置於察氏培養基 (Czapek-Dox broth) 中搖瓶培養並以乙酸乙酯萃取，可取得具有植物毒性之粗萃取物。使用粗萃取物進行生物試驗，發現其可抑制綠豆幼苗的下胚軸及胚根之生長且具有劑量效應。粗萃取物亦可抑制菊科植物大花咸豐草種子的發芽，但對禾本科植物芒稷種子卻無抑制效果，表示粗萃取物的植物毒性具有種間選擇性。將粗萃取物以 SepBox 系統純化，並以氣相層析質譜儀 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 初步探討次級代謝物之組成分，發現其內含 cyclo(Phe-Pro)、tyrosol 及 bis(2-ethylhexyl) phthalate (BEHP) 等數種物質，然而因本研究所選擇之分析方法的限制，故無法得知所有次級代謝物的結構和特性，此部分仍有待未來持續的探討和研究。

關鍵詞： *Colletotrichum acutatum*、次級代謝物、天然物、植物毒性

接受日期：2022年4月13日

* 通訊作者。E-mail: sonny@ntu.edu.tw

¹ 臺北市 國立臺灣大學農業化學系

緒言

天然物是生物產生並具備特定生物化學活性之物質，由於其分子結構多樣，且不易與傳統有機合成的化合物重疊^(15, 19, 20)，因此在農業藥劑的開發上占有重要的地位。依研究顯示炭疽菌屬 (*Colletotrichum*) 可分泌多種次級代謝物^(17, 26)，且這些次級代謝物往往具有植物毒性，對炭疽菌的致病力有一定程度的貢獻^(11, 13, 14)，這樣的特性使炭疽菌之次級代謝物成為除草劑先導化合物 (lead compound) 的重要來源之一。

炭疽菌 *C. acutatum* BCRC34607 被發現於臺灣芽菜栽培的綠豆幼苗上，會導致綠豆幼苗下胚軸的壞死⁽²⁸⁾。有關 *C. acutatum* 之次級代謝物的結構^(7, 9, 23) 和植物毒性的研究⁽¹⁶⁾，多使用自果腐病或感病成熟植株篩選之菌株，較少針對感染植株幼苗的 *C. acutatum* 進行探討，且若能了解哪些次級代謝物可影響植株幼苗的生長，亦可對除草劑的研發提供有益的訊息，故本研究以感染綠豆幼苗之炭疽菌 *C. acutatum* BCRC34607 作為研究對象，在過程中會先篩選適合分泌次級代謝物的生長條件，並探討其菌液之粗萃取物對植物生長的抑制效果，再以管柱層析 (column chromatography) 和質譜儀 (mass spectrometer, MS) 進行粗萃取物之純化和分析，以初步確認次級代謝物之可能組成分，其能進一步了解與植物毒素之相關性。

材料與方法

一、菌株來源及繼代培養條件

C. acutatum BCRC34607 購買自生物資源保存及研究中心 (Bioresource Collection and Research Center, BCRC, Hsinchu, Taiwan)，其生資中心編號為 34607。菌株以馬鈴薯葡萄糖瓊脂 (Potato dextrose agar, PDA, Difco, NJ, U.S.A.) 在 25°C 黑暗的環境下培養，並每 14 天進行繼代。

二、菌株分泌次級代謝物之生長條件篩選與植物生長抑制物質的萃取方式

本研究初步以溫度 25°C 小量培養 14 天，先針對培養基及萃取溶劑進行測試，再根據小量培養結果進行放大培養，並對培養溫度及培養時間進行調整。

(一) 培養基及萃取溶劑的選擇

取 2 塊 ($\Phi = 0.4$ cm) 培養於 PDA 7 天之 *C. acutatum* BCRC34607 菌絲塊置入 250-mL 錐形瓶中，瓶中含有 100 mL 的「馬鈴薯葡萄糖培養基 (Potato dextrose broth, PDB, Difco, NJ, U.S.A.)」或「察氏培養基 (Czapek-Dox broth, Sigma-Aldrich, MO, U.S.A.)」，將其放於 25°C 生長箱中，以每分鐘轉速 (revolution per minute,

RPM) 為 145 下不照光搖瓶培養 14 天，將菌液離心及過濾後取得上清液，再以「乙酸乙酯」或「正己烷：乙酸乙酯 = 85 : 15」進行萃取，最後去除溶劑後得油狀粗萃取物。將粗萃取物以 0.5% 二甲基亞砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 回溶至所需濃度並保存於 -20°C 冰箱中，以作為後續測試用物質。

(二) 培養溫度和培養時間的篩選

依據小量培養結果，將 *C. acutatum* BCRC34607 菌絲塊置於 1-L 錐形瓶進行培養，瓶中含有 600 mL 的察氏培養基，並測試不同培養溫度和時間對 *C. acutatum* BCRC34607 分泌植物生長抑制物質之影響，試驗條件分別為：(1) 培養溫度：30°C，搖瓶時間：14 天 (2) 培養溫度：25°C，搖瓶時間：14 天 (3) 培養溫度：25°C，搖瓶時間：28 天，萃取溶劑為乙酸乙酯，其餘試驗步驟與「材料與方法二、(一)」相同。

三、生物試驗

(一) 粗萃取物對綠豆幼苗之影響

綠豆 (*Vigna radiata*) 購買自臺北水源市場。將綠豆以 0.6~1.4% 次氯酸鈉水溶液消毒後，置於底部鋪有濕潤濾紙的培養皿中並於 25°C 黑暗的生長箱內催芽，待綠豆胚根生長至 0.5~1.0 cm 時，放入

15-mL 離心管中，管內鋪有約 4 cm 高之 1.5% 洋菜膠 (American bacteriological agar, Conda, Madrid, Spain)。每管皆含一顆綠豆並添加 200 μ L 之處理液，試驗的處理液為溶於 0.5% DMSO 的 1,500 mg L^{-1} 粗萃取物，並以水及 0.5% DMSO 分別做空白對照組及溶劑對照組，每個處理重複 7 次。添加處理後，將綠豆放於 25°C 的植物生長箱，光週期為 12 小時光照/12 小時黑暗，濕度 60%，3 天後觀察綠豆幼苗根及下胚軸生長情形。

(二) 不同濃度下的粗萃取物對綠豆幼苗生長之影響

試驗過程同前述「材料與方法三、(一)」。試驗的處理液為溶於 0.5% DMSO 之不同濃度的粗萃取物，濃度分別為：150, 600 及 2,400 mg L^{-1} ；對照組為 0 mg L^{-1} ，即是 0.5% DMSO。試驗結束後，量測根及下胚軸長並計算其生長抑制率，公式如下：

$$\text{抑制率 (\%)} = \frac{\text{根及下胚軸長}_{\text{treat}} - \text{根及下胚軸長}_{\text{control (0 mg L}^{-1}\text{)}}}{\text{根及下胚軸長}_{\text{control (0 mg L}^{-1}\text{)}}} \times 100$$

(三) 粗萃取物的專一性試驗及選擇性試驗

1. 粗萃取物對大花咸豐草種子發芽率之影響

大花咸豐草 (*Bidens pilosa* var. *radiata*) 種子採集自臺灣大學農場。將大花咸豐草種子以 0.6~1.4% 次氯酸鈉水溶液消毒後，置於底部鋪有濾紙的培養皿中。試驗的處理液為溶於 0.5% DMSO 的 1,500 mg L⁻¹ 粗萃取物，並以水及 0.5% DMSO 分別做空白對照組及溶劑對照組，每處理重複 3 次，每重複中置入 10 顆種子。施加 1.5 mL 之處理液後，放於 20°C 的植物生長箱，光週期為 12 小時光照／12 小時黑暗，濕度 60%，每日觀察種子發芽情形並計算種子累積發芽率 (cumulative germination) (%)。

2. 粗萃取物對芒稷種子發芽率之影響

芒稷 (*Echinochloa colona*) 種子採集自臺灣大學農場。試驗過程同前述「材料與方法三、(三) 1」。施加處理液後，放於 25°C 的植物生長箱，光週期為 12 小時光照／12 小時黑暗，濕度 60%，每日觀察種子發芽情形並計算種子累積發芽率 (%)。

四、粗萃取物的二維層析分離

本試驗委託中央研究院基因體研究中心 (Genomics Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwan) 協助操作，並採用 SepBox 2D-2000 的非極性天然物純化模式對粗萃取物進行分離。

(一) 第一道分離管柱分離

以 C4 管柱進行分離，溶劑為水—甲醇，採用高壓梯度沖提系統 (表一)，由於純化模式的限制，前 16 分鐘的高親水性物質及 60 分鐘後才洗脫的低極性成分無法被吸附管柱 (trap column) 捕捉而損失，剩餘之分液則分別收集進 15 根吸附管柱中，再以甲醇將其全部洗脫以進行第二道分離。

表一、第一道分離管柱分離條件

Table 1. The separate method program of the first dimension separation

Time	Duration	Water (%)	Methanol (%)	Flow (mL)
0.00	0.10	95	5	40
0.10	9.60	95	5	28
9.70	0.10	95	5	28
9.80	10.00	95	5	40
19.80	20.20	95	5	40
40.00	15.00	25	75	40
55.00	14.60	0	100	40
69.60	0.00	0	100	40

(二) 第二道分離管柱分離

將自吸附管柱洗脫之分液以 C18 管柱進行第二次分離，使用的管柱分別有：「Column 4: C18 Aqueous RP HPLC column (250 mm × 16 mm)」, 「Column 5: C18 RP HPLC column (250 mm × 16 mm)」及「Column 6: C18 RP HPLC column (125 mm × 16 mm)」, 沖提系統為不同梯度之水—甲醇—乙腈，並以 UV-Vis 及 ELSD (evaporative light scattering detector) 雙檢測器監測分離情形。將分離後之分液以自動分液收集器依時間收集到樣品瓶中，15 根吸附管柱經分離後共得 352 個樣品。

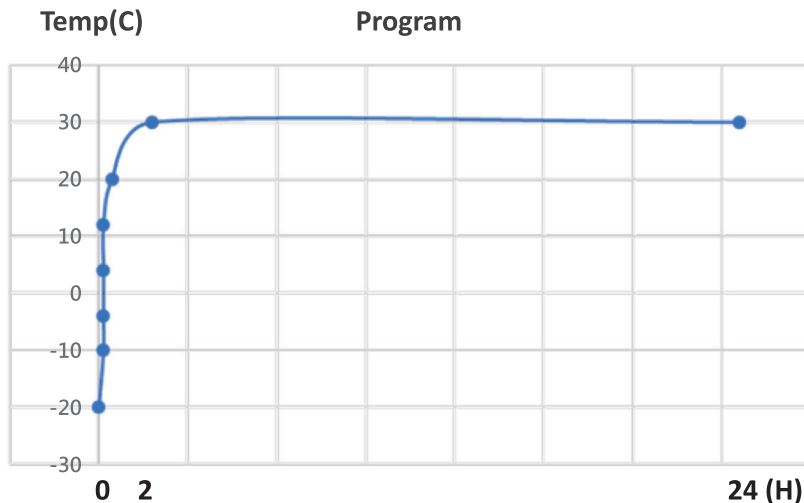
(三) 樣品的乾燥

所收集之分液以中央研究院內部所設

計的蒸發和凍乾系統進行乾燥。乾燥過程中的條件設定 (圖一)。

五、以氣相層析質譜儀對次級代謝物成分初步的探討

將「材料與方法四」所取得之樣品以丙酮回溶，依樣品含量的多寡，個別配置成 1,000, 500 或 100 mg L⁻¹ 並以氣相層析質譜儀 (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) 進行分析，使用的管柱及儀器型號為裝有 HP-5ms Ultra Inert (30 m × 250 μm × 0.25 μm) 之 Agilent GC-MS 6890/5975。動相氣體為氦氣，注射端溫度為 300°C，樣品進樣量為 1 μL 並設定分流比為 10 : 1。管柱起始溫度為 60°C，以每分鐘 15°C 升溫至 300°C 並維持 2 分鐘，動相流速為 1.0 mL min⁻¹。輔助加



圖一、本研究中蒸發和凍乾系統的運作條件。

Fig. 1. Vaporization and lyophilization parameters.

熱器溫度維持在 300°C，質譜儀溫度設定於 250°C，採全質譜掃描模式，掃描範圍為 50~1,000 m/z。質譜分析結果以美國國家標準技術局 (National Institute of Standards and Technology, NIST) 資料庫進行比對。

六、統計分析

試驗數據以 SAS (Version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.) 統計軟體進行單因子變異數分析 (one-way ANOVA)，並以最小顯著差異性 (least significant difference, LSD) 測驗進行兩兩比較，檢定在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 時，各組間是否具有顯著差異。

結果與討論

一、菌株分泌次級代謝物之生長條件篩選與植物生長抑制物質的萃取方式

(一) 培養基和萃取溶劑的選擇

參考文獻報告所使用之培養基，本研究選用 PDB⁽²³⁾ 和察氏培養基⁽³¹⁾ 進行測試。於培養的過程中發現兩者培養瓶內的外觀有明顯的區別，以 PDB 培養的 *C. acutatum* BCRC34607 較無明顯的孢子產生；以察氏培養基培養的 *C. acutatum* BCRC34607 卻有一圈明顯的橘紅色孢子

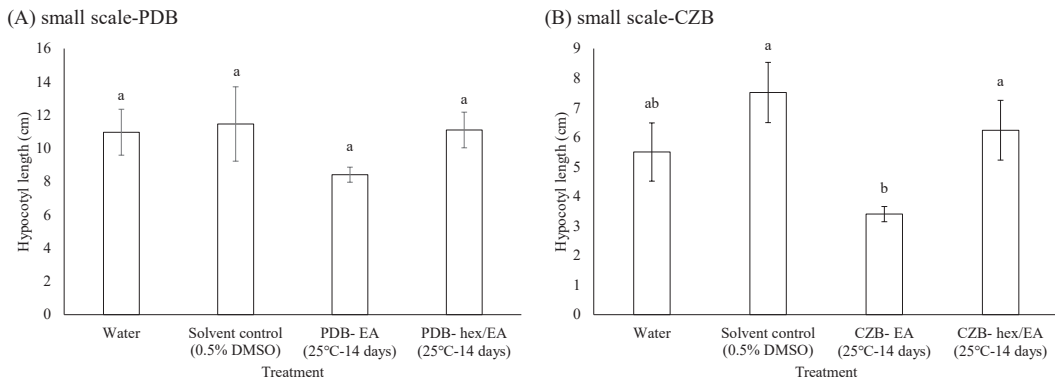
形成。

將菌液離心取得上清液後，使用不同溶劑萃取並進行生物試驗，試驗結果 (圖二 A、B) 顯示，以乙酸乙酯萃取所得之粗萃取物對綠豆幼苗的生長抑制情形都較其他處理佳，說明乙酸乙酯為較適合的萃取溶劑，唯 PDB 的乙酸乙酯粗萃取物對綠豆幼苗的生長影響，在 95% 信心水準下與其他處理無顯著差異 (圖二 A)；然而察氏培養基的乙酸乙酯粗萃取物在 5% 顯著水準下則有顯著差異 (圖二 B)，表明察氏培養基較 PDB 更能促進 *C. acutatum* BCRC34607 分泌具有植物毒性之次級代謝物。

文獻報告指出，氮源和碳源的不同會影響炭疽菌孢子的生成⁽¹⁰⁾，而毒素的分泌又與真菌的孢子形成具有正相關^(27, 29)，故推測為察氏培養基中作為氮源和碳源的硝酸鈉 (sodium nitrate) 和蔗糖 (sucrose) 有助於 *C. acutatum* BCRC34607 孢子的產生⁽¹⁰⁾，可能造成具有植物毒性之次級代謝物的分泌增加。

(二) 培養溫度及培養時間的篩選

根據「結果與討論一、(一)」，決定選用察氏培養基和乙酸乙酯作為培養基和萃取溶劑，並將培養環境由原先的「250-mL 錐形瓶，100 mL 培養基」放大至「1-L 錐形瓶，600 mL 培養基」。由於微生物之次級代謝物的生成在進入生產相 (idiophase) 階段後達到高峰⁽⁸⁾，因此為



圖二、不同小量培養條件下所取得之 *C. acutatum* BCRC34607 粗萃取物對綠豆幼苗生長的影響。粗萃取物施用濃度為 $1,500 \text{ mg L}^{-1}$ 。PDB 為馬鈴薯葡萄糖培養基；CZB 為察氏培養基；EA 表示以乙酸乙酯萃取；hex/EA 表示以正己烷：乙酸乙酯 = 85：15 萃取。溫度和天數分別表示培養溫度及培養時間。誤差線為平均值標準誤 (n = 7)。各平均值上示以相同字母者表示在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 下經 LSD 檢定未達顯著差異。

Fig. 2. Effects of crude extracts from *C. acutatum* BCRC34607 on mung beans grown under different culture conditions in a small-scale culture system. The crude extract concentration was $1,500 \text{ mg L}^{-1}$. PDB = potato dextrose broth; CZB = Czapek-Dox broth; EA = extract obtained using ethyl acetate; hex/EA = extract obtained using a solvent comprised of 85% hexane and 15% ethyl acetate. On the x-axis, temperature and number of days denote the culture temperature and culture time, respectively. All error bars represent the standard error of the mean (n = 7). Means with the same letter were not significantly different at a significance level of alpha = 0.05 according to Fisher's protected LSD test.

加速 *C. acutatum* BCRC34607 進入生產相或延長其在生產相的時間，故嘗試以增加培養溫度或拉長培養時間來進行測試；然而生物試驗的結果說明培養溫度的提高 ($25^\circ\text{C} \rightarrow 30^\circ\text{C}$) (圖三 A) 和培養時間的延長 (14 天 \rightarrow 28 天) (圖三 B) 無助於具植物毒性之次級代謝物的取得。文獻報告指

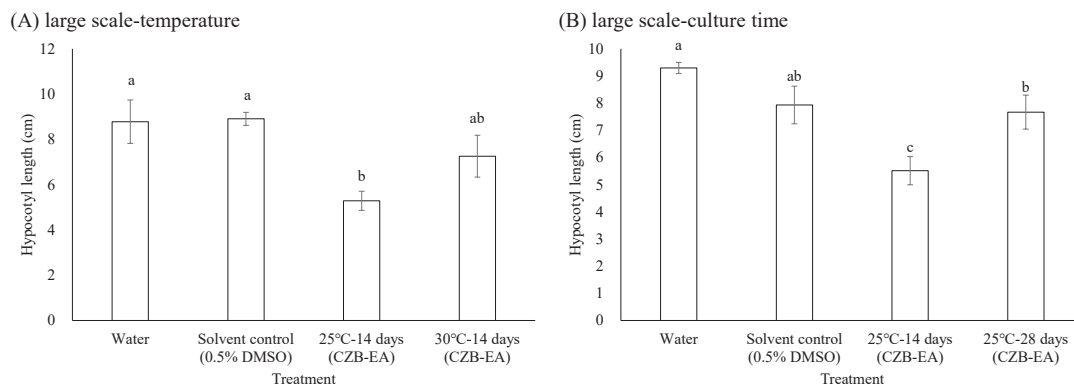
出，炭疽菌孢子形成的合適溫度介於 $15^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ ，當溫度超過或達 30°C 時，孢子形成的數量便會開始減少⁽¹⁸⁾，由於孢子的生成與毒素的分泌具正相關^(27, 29)，因此可能導致具植物毒性之次級代謝物的分泌下降；另外培養時間的增加並沒有伴隨粗萃取物抑制活性的增加，原因推測為

粗萃取物中植物毒素的含量已過高峰，開始被利用或被降解，故 *C. acutatum* BCRC34607 較佳的培養溫度和時間仍為「25°C-14 天」之初始培養條件。

二、*C. acutatum* BCRC34607 之粗萃取物的植物毒性

(一) 不同濃度下的粗萃取物對綠豆幼苗生長的影響

為了初步評估粗萃取物的抑制效果並計算其對綠豆幼苗生長的半抑制濃度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50})，故將粗萃取物之最大濃度設為 $2,400 \text{ mg L}^{-1}$ 以確保生長抑制率可大於 50%，並每 4 倍濃度做一級距，最後共



圖三、不同大量培養條件下所取得之 *C. acutatum* BCRC34607 粗萃取物對綠豆幼苗生長的影響。粗萃取物施用濃度為 $1,500 \text{ mg L}^{-1}$ 。(A) 為不同培養溫度；(B) 為不同培養時間。CZB 為察氏培養基；EA 表示以乙酸乙酯萃取。溫度和天數分別表示培養溫度及培養時間。誤差線為平均值標準誤 (n = 7)。各平均值上示以相同字母者表示在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 下經 LSD 檢定未達顯著差異。

Fig. 3. Effects of the crude extracts from *C. acutatum* BCRC34607 on mung beans grown under different culture conditions in a large-scale culture system. The crude extract concentration was $1,500 \text{ mg L}^{-1}$. (A) = Effects under different culture temperatures; (B) = Effects under different culture times. CZB = Czapek-Dox broth; EA = extract obtained using ethyl acetate. On the x-axis, temperature and the number of days denote the culture temperature and culture time, respectively. All error bars represent the standard error of the mean (n = 7). Means with the same letter were not significantly different at a significance level of $\alpha = 0.05$ according to Fisher's protected LSD test.

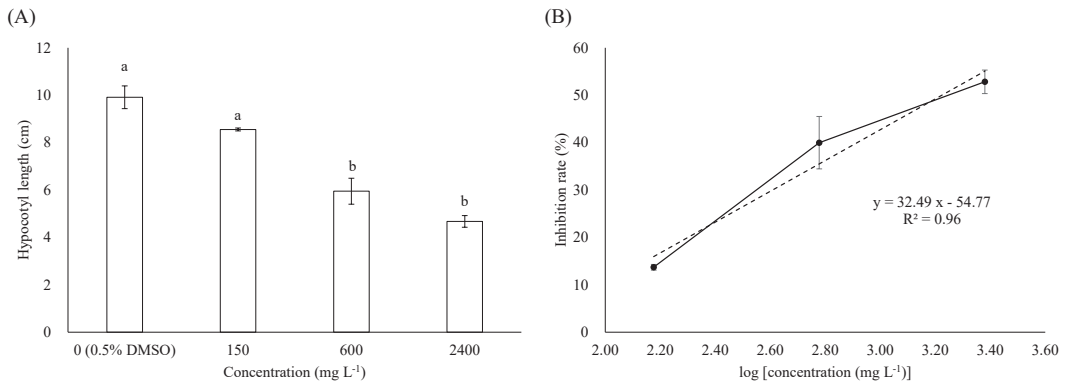
取 3 個濃度：150, 600 及 2,400 mg L⁻¹ 進行試驗，並以不含粗萃取物之 0.5% DMSO 做為對照組 (0 mg L⁻¹)。

試驗結果 (圖四 A) 顯示出綠豆幼苗的生長隨粗萃取物濃度的提高而有縮短的趨勢，在 5% 顯著水準下，高濃度粗萃取物 (600 mg L⁻¹ 與 2,400 mg L⁻¹) 處理下之綠豆幼苗的生長情形與低濃度 (0 mg L⁻¹ 與 150 mg L⁻¹) 處理下之綠豆幼苗具有顯著差異，說明具有劑量效應 (dose-response relationship) 存在。將粗萃取物濃度取對數後與抑制率作圖 (圖四 B)，算出其線性回歸直線為 $y = 32.49x - 54.77$ ，

並內插求得 IC₅₀ 為 1676.22 mg L⁻¹。

(二) 粗萃取物的專一性及選擇性試驗

本試驗分別以雙子葉植物及單子葉植物進行種子發芽率抑制試驗，以了解粗萃取物對原宿主綠豆 (豆科 (Fabaceae)) 之外的科別是否能造成抑制的現象，並判斷其是否具有選擇性。試驗植物分別為菊科 (Asteraceae) 的大花咸豐草及禾本科 (Poaceae) 的芒稷，前者為極具入侵性的野化植物⁽¹⁾；後者在高溫的雨季期間對旱田的危害嚴重，亦經常出現於保水力差之



圖四、(A) 綠豆幼苗在不同 *C. acutatum* BCRC34607 粗萃取物濃度處理下的生長情形；(B) *C. acutatum* BCRC34607 粗萃取物濃度與綠豆幼苗生長抑制率之關係，IC₅₀ 為 1676.22 mg L⁻¹。誤差線皆為平均值標準誤 (n = 7)。各平均值上示以相同字母者表示在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 下經 LSD 檢定未達顯著差異。

Fig. 4. (A) Hypocotyl lengths of mung beans exposed to different concentrations of *C. acutatum* BCRC34607 crude extract. (B) Correlation between the concentration of *C. acutatum* BCRC34607 crude extract and the growth inhibition of mung bean. IC₅₀ = 1676.22 mg L⁻¹. All error bars represent the standard error of the mean (n = 7). Means with the same letter were not significantly different at a significance level of $\alpha = 0.05$ according to Fisher's protected LSD test.

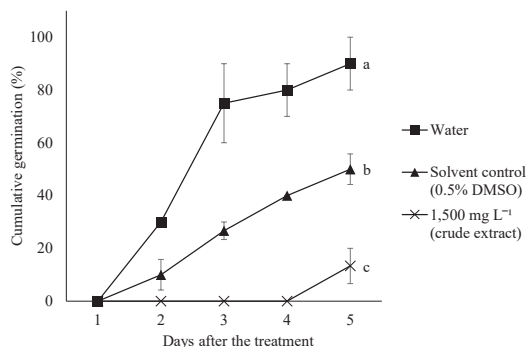
二期水稻田中⁽⁵⁾。兩種植物種子進行照光處理後，發芽率皆可達 80% 以上^(3,4)。

大花咸豐草種子在不同處理下之發芽率 (圖五 A)，結果顯示大花咸豐草種子以 0.5% DMSO (溶劑對照組) 處理下之發芽率，在 5% 顯著水準下，與空白對照組具有顯著差異，說明大花咸豐草種子發芽率會受 0.5% DMSO 干擾，儘管如此，在 5% 顯著水準下，施加 1,500 mg L⁻¹ 粗萃取物的大花咸豐草種子發芽率與溶劑對照組仍具有顯著差異，發芽率從溶劑對照組的 50.0% 下降至 13.3%，且直到處理後的第五天才有發芽的情形，此表示粗萃取物具有抑制大花咸豐草種子發芽的作用。芒

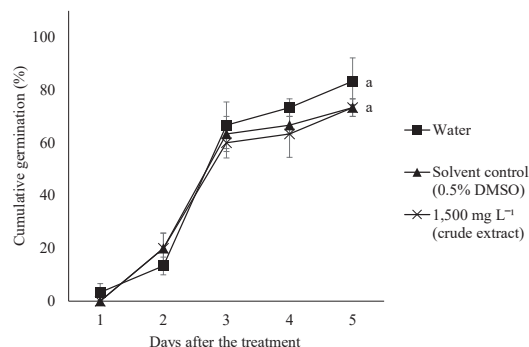
稷種子不同處理下之發芽率 (圖五 B)，可明顯看出空白對照組、溶劑對照組及 1,500 mg L⁻¹ 粗萃取物處理組之發芽率曲線皆極為相似，各組於第五天的發芽率，在 95% 信心水準下，不具有顯著差異，說明粗萃取物無法對芒稷種子的發芽造成抑制作用。

上述實驗結果說明 *C. acutatum* BRRC34607 所分泌之粗萃取物可對原宿主之外的科別造成抑制之現象，因此不具有專一性，但由於粗萃取物無法有效抑制屬於禾本科植物之芒稷種子的發芽，表明粗萃取物的植物生長抑制行為可能具有種間選擇性之特性，造成此現象的原因可能

(A) *Bidens pilosa*



(B) *Echinochloa colona*



圖五、*C. acutatum* BCRC34607 之粗萃取物對種子發芽的影響。(A) 大花咸豐草；(B) 芒稷。誤差線皆為平均值標準誤 (n = 3)。處理後第五天之各平均值上示以相同字母者表示在顯著水準 $\alpha = 0.05$ 下經 LSD 檢定未達顯著差異。

Fig. 5. Effects of crude extract from *C. acutatum* BCRC34607 on the cumulative germination of (A) *Bidens pilosa* and (B) *Echinochloa colona*. All error bars represent the standard error of the mean (n = 3). Means with the same letter were not significantly different at a significance level of $\alpha = 0.05$ according to Fisher's protected LSD test at 5 days post-treatment.

與 *C. acutatum* BCRC34607 是自雙子葉綠豆幼苗病害中所分離出的菌株有關，導致同為雙子葉植物之大花咸豐草種子對 *C. acutatum* BCRC34607 所分泌之粗萃取物較為敏感。另外粗萃取物可減緩未長出子葉之綠豆幼苗的生長並抑制大花咸豐草種子的發芽，符合萌前除草劑主要的防治對象—萌發中或小於 3 葉以下之植物⁽⁶⁾，故具有作為萌前除草劑使用之潛能。

三、次級代謝物成分的初步探討

將粗萃取物以 SepBox 2D-2000 進行分離，最後共取得 352 個樣品。根據第二道分離管柱之圖譜及 ELSD 所預估之樣品含量，將可觀察出峰值且含量達 0.1 mg 以上的樣品以 GC-MS 做進一步的分析，最後共選出 42 個樣品。

樣品的質譜圖與 NIST 資料庫比對時，可藉由 4 個係數來判斷資料庫所預測之結構的準確性⁽²⁵⁾，分別為：Match Factor (MF)、Reverse Match Factor (RMF)、Probability (Prob.) 及 InLib。MF 及 RMF 為未知物的質譜圖與資料庫圖譜直接比對後所得之數值，數值介於 0 至 1,000，用於表示圖譜間的相似性，數值越大相似性則越高，唯後者在比對過程中會忽略未知物圖譜上不存在於資料庫圖譜中的峰值；Prob.則是藉由取得一系列與未知物具有相似性之圖譜後，以彼此間 MF 值的差異來評估未知物正確屬於資料庫中某個已知化合物的機率；InLib 則表示具有相似性之

圖譜的數量，數值越大，說明未知物的圖譜具有較高的獨特性，不易與其他化合物的圖譜混淆。

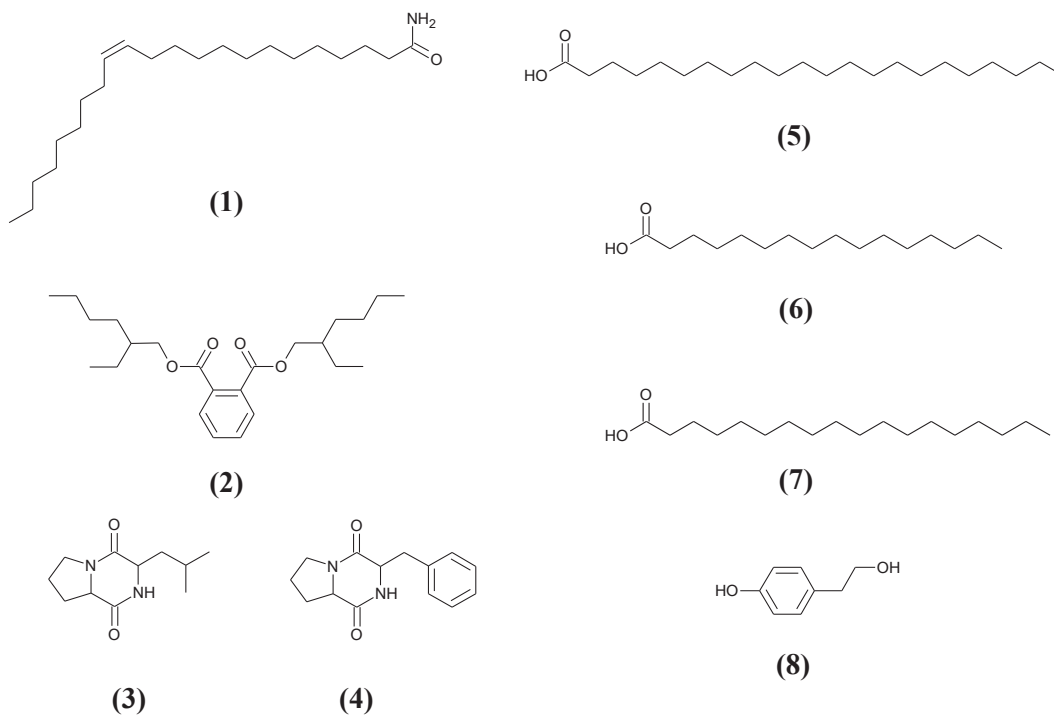
NIST 在指引中表示 MF 大於 700、InLib 大於 0 便是可被接受的⁽²⁵⁾。在這 42 個樣品的成分中，MF 及 RMF 皆大於 700 且 InLib 大於 0 的化合物共有 8 個 (表二、圖六)，其中包含 bis(2-ethylhexyl) phthalate (BEHP)、cyclo(Phe-Pro) 及 tyrosol。文獻指出 BEHP 對小白菜 (*Brassica chinensis* L.) 根初期生長的發育具有抑制效果，IC₅₀ 為 1,426 mg kg⁻¹，且會減少植物體中葉綠素 a 和葉綠素 b 的含量，對植物光合作用系統具有潛在的危險^(21, 22)；cyclo(Phe-Pro) 在濃度 10⁻⁴ M 下可誘使斑點矢車菊 (*Centaurea maculosa*) 的葉片產生壞死的症狀⁽³⁰⁾；tyrosol 在濃度 10⁻³ M 下對水芹根之生長抑制率達 31%⁽²⁴⁾ 並會對金盞花的葉產生壞死的症狀⁽¹²⁾，故三者可能貢獻部分粗萃取物的植物毒性，然而其對綠豆幼苗生長、大花咸豐草及芒稷種子發芽率的實質影響仍待後續實驗中確認。

由於 GC-MS 對於樣品的限制 (須能氣化) 以及資料庫所涵蓋之資料的有限性，在 42 個樣品中許多成分是無法被氣化或是被資料庫所辨認，因此本節前述的二次代謝物的分類並沒辦法完整呈現粗萃取物中非極性二次代謝物分布的情形，另外因純化模式的限制而損失的親水性物質亦可能具有其他潛在的植物毒素，待未來對其進一步的探討。

表二、42 個樣品中的成分與 NIST 資料庫比對後 MF、RMF > 700 且 InLib > 0 之結果

Table 2. Compounds for which both MF and RMF were larger than 700 and InLib was larger than 0 from 42 compounds aligned to NIST database

Item	Group	Compound	Probability (Prob.)
1	Fatty amide	(Z)-13-Docosenamide	76.3%
2	Phthalate	Bis(2-ethylhexyl) phthalate	38.0%
3	Cyclopeptide	Cyclo(Leu-Pro)	80.9%
4	Cyclopeptide	Cyclo(Phe-Pro)	91.8%
5	Fatty acid	Docosanoic acid	90.4%
6	Fatty acid	n-Hexadecanoic acid	83.1%
7	Fatty acid	Octadecanoic acid	73.3%
8	Phenol	Tyrosol	70.4%



圖六、8 種化合物之結構。

Fig. 6. Molecular structures of the eight compounds identified in *C. acutatum* BCRC34607 crude extract.

結論

本研究結果顯示在察氏培養基培養下 *Colletotrichum acutatum* BCRC34607 之菌液，經乙酸乙酯萃取後，可取得具有植物毒性之粗萃取物，其可抑制綠豆幼苗的生長及大花咸豐草種子的發芽，卻無法抑制芒稷種子的發芽，說明粗萃取物的植物毒性不具有專一性，但具有種間選擇性抑制之特性。以 SepBox 系統純化粗萃取物，並以 GC-MS 對次級代謝物成分進行初步的探討，發現次級代謝物中含有 cyclo(Phe-Pro), tyrosol 及 BEHP，可能貢獻部分粗萃取物的植物毒性。由於 SepBox 純化模式及 GC-MS 的限制，對於高親水性、無法被氣化或無質譜圖可比對之次級代謝物仍有待未來持續的探討。

謝辭

感謝中央研究院基因體研究中心在樣品的分析上提供協助，也謝謝顏老師及實驗室同學在實驗的規劃給予不少建議與幫忙，謹致謝忱。

引用文獻

1. 行政院農委會特有生物研究保育中心。2019。台灣野生植物資料庫。檢自 <https://plant.tesri.gov.tw/plant106/WebPlantDetail.aspx?tno=539015033> (Jul. 14, 2021)
2. 余明翰。2021。以感染綠豆之炭疽菌 *Colletotrichum acutatum* 的二次代謝物作為潛力除草劑之研究。國立臺灣大學農業化學系研究所碩士論文。臺北。84 頁。
3. 徐玲明、林訓仕。2005。三種鬼針草植株、種子外觀形態及發芽率之比較。中華民國雜草學會會刊 26: 33-42。
4. 徐玲明、蔣慕琰。2003。草坪中六種一年生禾草發芽特性及其防治。中華民國雜草學會會刊 24: 9-23。
5. 蔣永正、蔣慕琰。2007。雜草。植物保護圖鑑系列 8 水稻保護，第 209-234 頁。鄭清煥編。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局印。臺北。
6. 蔣永正。2014。草坪農藥安全使用介紹。檢自 [http://wssroc.agron.ntu.edu.tw/2014data/草坪農藥安全使用介紹\(講義\)20140828.pdf](http://wssroc.agron.ntu.edu.tw/2014data/草坪農藥安全使用介紹(講義)20140828.pdf) (Jul. 14, 2021)
7. Amby, D. B., Manczak, T., Petersen, M. A., Sundelin, T., Weitzel, C., Grajewski, M., Simonsen, H. T., and Jensen, B. 2016. Role of the *Colletotrichum acutatum* sesquiterpene synthase *CaTPS* in the biosynthesis of sesquiterpenoids. *Microbiol.* 162: 1773-1783.
8. Cannell, R. J. P., Sarker, S. D., and Nahar, L. 2012. Follow-up of natural products isolation, pp. 473-514. *In*: S. D. Sarker & L. Nahar [eds.], *Natural Products Isolation*. Humana Press, New Jersey, U.S.A. 552 pp.

9. Chung, K. R., Shilts, T., Erturk, U., Timmer, L. W., and Ueng, P. P. 2003. Indole derivatives produced by the fungus *Colletotrichum acutatum* causing lime anthracnose and postbloom fruit drop of citrus. *FEMS Microbiol. Lett.* 226: 23-30.
10. Deshmukh, A. J., Mehta, B. P., Sabalpara, A. N., and Patil, V. A. 2012. In vitro effect of various nitrogen, carbon sources and pH regimes on the growth and sporulation of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. and Sacc causing anthracnose of Indian bean. *J. Biopestic.* 5: 46-49.
11. Duke, S. O., Gohbara, M., Paul, R. N., and Duke, M. V. 1992. Colletotrichin causes rapid membrane damage to plant cells. *J. Phytopathol.* 134: 289-305.
12. Gamboa-Angulo, M. M., García-Sosa, K., Alejos-González, F., Escalante-Erosa, F., Delgado-Lamas, G., and Peña-Rodríguez, L. M. 2001. Tagetolone and tagetenolone: Two phytotoxic polyketides from *Alternaria tagetica*. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1228-1232.
13. Garcia-Pajon, C. M., and Collado, I. G. 2003. Secondary metabolites isolated from *Colletotrichum* species. *Nat. Prod. Rep.* 20: 426-431.
14. Gohbara, M., Kosuge, Y., Yamasaki, S., Kimura, Y., Suzuki, A., and Tamura, S. 1978. Isolation, structures and biological activities of colletotrichins, phytotoxic substances from *Colletotrichum nicotianae*. *Agr. Biol. Chem.* 42: 1037-1043.
15. Harvey, A. L. 2007. Natural products as a screening resource. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 11: 480-484.
16. Jayasinghe, C. K., and Fernando, T. H. P. S. 2001. Toxic activity from liquid culture of *Colletotrichum acutatum*. *Mycopathologia*, 152: 97-101.
17. Kim, J. W., and Shim, S. H. 2019. The fungus *Colletotrichum* as a source for bioactive secondary metabolites. *Arch. Pharm. Res.* 42: 735-753.
18. King, W. T., Madden, L. V., Ellis, M. A., and Wilson, L. L. 1997. Effects of temperature on sporulation and latent period of *Colletotrichum* Spp. infecting strawberry fruit. *Plant Dis.* 81: 77-84.
19. Koch, M. A., Schuffenhauer, A., Scheck, M., Wetzel, S., Casaulta, M., Odermatt, A., Ertl, P., and Waldmann, H. 2005. Charting biologically relevant chemical space: a structural classification of natural products (SCONP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102: 17272-17277.
20. Lipkus, A. H., Yuan, Q., Lucas, K. A., Funk, S. A., Bartelt, W. F., Schenck, R. J., and Trippe, A. J. 2008. Structural diversity of organic chemistry. A scaffold analysis of the CAS Registry. *J. Org. Chem.* 73: 4443-4451.
21. Ma, T., Christie, P., Teng, Y., and Luo, Y.

2013. Rape (*Brassica chinensis* L.) seed germination, seedling growth, and physiology in soil polluted with di-n-butyl phthalate and bis(2-ethylhexyl) phthalate. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20: 5289-5298.
22. Ma, T., Teng, Y., Christie, P., and Luo, Y. 2015. Phytotoxicity in seven higher plant species exposed to di-n-butyl phthalate or bis (2-ethylhexyl) phthalate. *Front. Environ. Sci. Eng.* 9: 259-268.
23. Mancilla, G., Jiménez-Teja, D., Femenía-Ríos, M., Macías-Sánchez, A. J., Collado, I. G., and Hernández-Galán, R. 2009. Novel macrolide from wild strains of the phytopathogen fungus *Colletotrichum acutatum*. *Nat. Prod. Commun.* 4: 395-398.
24. Masi, M., Nocera, P., Boari, A., Zonno, M. C., Pescitelli, G., Sarrocco, S., Baroncelli, R., Vannacci, G., Vurro, M., and Evidente, A. 2020. Secondary metabolites produced by *Colletotrichum lupini*, the causal agent of anthracnose of lupin (*Lupinus* spp.). *Mycologia.* 112: 533-542.
25. Mikaia, A., White, E., Zaikin, V., Zhu, D., Sparkman, O. D., Neta, P., Zenkevich, I., Linstrom, P., Mirokhin, Y., Tchekhovskoi, D. and Yang, X. 2014. NIST standard reference database 1A. NIST, Maryland, U.S.A. 49 pp.
26. Moraga, J., Gomes, W., Pinedo, C., Cantoral, J. M., Hanson, J. R., Carbú, M., Garrido, C., Durán-Patrón, R., and Collado, I. G. 2018. The current status on secondary metabolites produced by plant pathogenic *Colletotrichum* species. *Phytochem. Rev.* 18: 215-239.
27. Reiß, J. 1982. Development of *Aspergillus parasiticus* and formation of aflatoxin B1 under the influence of conidiogenesis affecting compounds. *Arch. Microbiol.* 133: 236-238
28. Shen, Y. M., Liu, H. L., Chang, S. T., and Chao, C. H. 2010. First report of anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* on mung bean sprouts in Taiwan. *Plant Dis.* 94: 131.
29. Shim, W. B., and Woloshuk, C. P. 2001. Regulation of fumonisin B(1) biosynthesis and conidiation in *Fusarium verticillioides* by a cyclin-like (C-type) gene, *FCCI*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1607-1612.
30. Stierle, A. C., Cardellina, J. H., and Strobel, G. A. 1988. Maculosin, a host-specific phytotoxin for spotted knapweed from *Alternaria alternata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 8008-8011.
31. Xu, Z., Shi, M., Tian, Y., Zhao, P., Niu, Y., and Liao, M. 2019. Dirhamnolipid produced by the pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* BWH-1 and its herbicidal activity. *Molecules* 24: Article 2969.

Phytotoxicity and Characteristics of Secondary Metabolites Produced by *Colletotrichum acutatum* BCRC34607

Ming-Han Yu¹, Jui-Hung Yen^{1*}

Abstract

Yu, M. H., and Yen, J. H. 2022. Phytotoxicity and characteristics of secondary metabolites produced by *Colletotrichum acutatum* BCRC34607. Taiwan Pestic. Sci. 12: 27-42.

This study investigated the phytotoxicity of secondary metabolites produced by *Colletotrichum acutatum* BCRC34607. In the process of screening for culture conditions, we found that *C. acutatum* BCRC34607 cultured with shaking in Czapek-Dox broth and extracted by ethyl acetate yielded crude extract with phytotoxicity. Results of a bioassay revealed that this crude extract had dose-dependent inhibition effects on hypocotyl and radicle growth in mung bean seedlings. The crude extract also inhibited the germination of beggartick (*Bidens pilosa*) seeds, but had no inhibitory effects on junglerice (*Echinochloa colona*) seeds. These findings indicated that the phytotoxicity of the crude extract produced by *Colletotrichum acutatum* BCRC34607 was selective. To elucidate the composition of the crude extract, we performed separation using the SepBox system and then analyzed the separated components via gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). Results revealed that the crude extract contained cyclo(Phe-Pro), tyrosol, and bis(2-ethylhexyl) phthalate (BEHP). However, some of the secondary metabolites could not be identified with the analytic method used in this study. Future research should seek to characterize these additional secondary metabolites.

Key words: *Colletotrichum acutatum*, secondary metabolite, natural product, phytotoxicity

Accepted: April 13, 2022.

* Corresponding author, E-mail: sonny@ntu.edu.tw

¹ Department of Agricultural Chemistry, National Taiwan University, Taipei