

鲁海菊, 张晓永, 全舒舟, 等. 从 93 株土壤真菌中筛选抑制石榴干腐病菌的活性菌株[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 108-110.

从 93 株土壤真菌中筛选抑制石榴干腐病菌的活性菌株

鲁海菊¹, 张晓永¹, 全舒舟¹, 陈霞¹, 郑肖兰²

(1. 红河学院生命科学与技术学院农学系, 云南蒙自 661199; 2. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南儋州 571737)

摘要:采用对峙培养法, 从 93 株果园土壤真菌中筛选对石榴干腐病菌有拮抗活性的菌株。结果表明, 93 株真菌对石榴干腐病菌均有一定抑制效果, 抑制率 $\geq 70\%$ 的菌株有 26 个, 在 60%~69% 之间的菌株共 27 个, 在 50%~59% 之间的菌株共 19 个, 其余 21 个菌株抑菌率在 24%~49% 之间。抑菌率在 50% 以上的菌株有 72 株, 占总数的 77.4%, 其中 PGT9、PGT13、PGT35、PGT36、PGT100、PGT110、PGT111 等 7 个菌株的抑制率均 $\geq 80\%$, 表现出良好的开发应用前景。

关键词:石榴干腐病; 土壤真菌; 抑菌活性

中图分类号: S436.67; Q939.9

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2013)07-0108-02

石榴(*Punica granatum*)为石榴科落叶灌木或小乔木, 是滇南主要果树之一。云南省蒙自县由于北回归线穿境而过, 独特的气候条件适宜于石榴种植, 曾获“中国石榴之乡”的美誉。目前蒙自县石榴栽种面积已近 3.5 万 hm^2 , 跃居全国首位。然而, 随着栽种面积的不断扩大, 石榴受到各种真菌病害不同程度危害, 严重影响其品质和产量。据刘大瑛报道, 截至 2011 年, 常见的石榴病害有 12 种, 其中石榴干腐病是发生最普遍, 产量损失严重的病害之一^[1]。陕西、安徽、河南、云南等省都陆续报道有石榴干腐病发生, 损失率高达 40% 以上^[2-6]。云南蒙自石榴干腐病在《中国真菌总汇》中早有记载^[7], 1999 年周又生等对该病害的生物生态学及发生流行规律和治理等方面开展了较全面的研究^[6]。此后, 该病害在当地得到了较好的控制, 随后石榴枯萎病上升为首要病害^[8]。直到 2011 年, 云南省蒙自地区石榴干腐病再次大发生, 造成严重经济损失。目前石榴干腐病防治主要采用农业防治和化学防治相结合的措施, 刘大瑛报道用 4% 啞啉核苷类抗菌素水剂结合化学农药交替喷施可防治该病害^[1]。由此可见, 用生物防治措施控制石榴干腐病实属可能。土壤是微生物的基因库, 有望筛选到更多生防菌。潘争艳等曾从五味子根际土壤中获得 3 株具抗五味子茎基腐病菌病原菌的活性菌株^[9]。从土壤中寻找植物病原生防菌株, 已成为一种趋势。本试验从云南省蒙自县石榴园种植区采集干腐病果实, 采用组织分离法、柯赫法则对其进行分离鉴定、验证其致病性, 常规分离获得 93 株果园土壤真菌, 并用平板对峙法, 从中筛选具有抑制石榴干腐病菌的活性菌株, 为该病的有效、可持续防控提供

了理论依据及生防菌种资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 土壤真菌及石榴干腐病菌 本实验室在云南省蒙自县采集石榴果实病样及其果园土壤, 经常规分离^[10]、柯赫法则^[10]验证获得供试菌株。

1.1.2 供试培养基 PDA 培养基: 马铃薯 200 g、葡萄糖 16 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 对峙培养 将已分离纯化的病原菌和供试菌株在 PDA 平板培养基中 28℃ 恒温扩大培养 4 d, 采用对峙培养法^[11], 在培养基同一半径周围用打孔器取直径为 5 mm 的菌丝块, 分别接种于无菌 PDA 平板(直径 90 mm)中, 2 个接种点相距 40 mm, 以不接种供试菌株为对照, 设 3 次重复, 在 28℃ 下恒温培养 7 d 后测定病原菌的菌落直径, 并计算其生长抑制率:

$$\text{抑制率} = [(d_{\text{CK}} - d_{\text{B}}) / d_{\text{CK}}] \times 100\%$$

式中: d_{CK} 为对照病原菌菌落直径, d_{B} 为处理病原菌菌落直径。

1.2.2 数据统计 所有试验数据均采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计, 并计算处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 抑制率在 $\geq 70\%$ 的菌株数量及其抑制效果

抑制率 $\geq 70\%$ 的菌株共 26 个菌株, 其中抑制率 $\geq 80\%$ 的菌株共 7 个。由表 1 可见, PGT2、PGT7、PGT9 等 26 个菌株与病原菌对峙培养 7 d 后, 病原菌菌落生长直径与对照差异极显著, 表明这 26 个菌株对病原菌有极强的抑制效果, 其中 PGT9、PGT13、PGT35、PGT36、PGT100、PGT110、PGT111 等 7 个菌株抑制效果最好, 抑制率 $\geq 80\%$ 。

2.2 抑制率在 60%~69% 之间的菌株数量及其抑制效果

抑制率在 60%~69% 之间的菌株共 27 个, 表 2 显示这 27 个菌株与病原菌对峙培养 7 d 后, 病原菌菌落生长直径与对照差异极显著, 表明这 27 个菌株对病原菌有很强的抑制

收稿日期: 2013-01-06

基金项目: 国家科技部基础性工作专项(编号: 2006FY120100); 红河学院博研项目(编号: XJ1B0912); 云南省高校“农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室”建设经费资助项目; 红河学院硕士点植物保护一级学科建设项目。

作者简介: 鲁海菊(1978—), 女, 云南大理人, 博士研究生, 副教授, 主要从事亚热带植物真菌分类和真菌病害研究。E-mail: luhaiju2011@126.com。

通信作者: 郑肖兰, 硕士, 助理研究员, 主要从事亚热带植物真菌病害研究。E-mail: orchidzh@163.com。

表 1 抑制率≥70%的菌株抑制效果

菌株编号	病原菌菌落 直径(mm)	抑制率 (%)	菌株编号	病原菌菌落 直径(mm)	抑制率 (%)
PGT2	26bB	71	PGT69	21eE	77
PGT7	24cC	73	PGT100	16hH	82
PGT9	18fG	80	PGT101	27bB	70
PGT13	17gG	81	PGT104	24cC	73
PGT25	24cC	73	PGT105	23c	74
PGT30	24cC	73	PGT107	26bB	71
PGT31	26bB	71	PGT108	23cD	74
PGT35	13kK	85	PGT110	15iI	84
PGT36	14jJ	84	PGT111	18fG	80
PGT38	19fF	79	PGT112	22dD	76
PGT39	19fF	79	PGT113	23cD	74
PGT62	23cD	74	PGT118	22dD	76
PGT64	23cD	74	PGT119	26bB	71
CK(对照)	90aA				

注:表中同列数据后不同小写字母表示在 0.05 水平差异显著,不同大写字母表示在 0.01 水平差异显著。下同。

表 2 抑制率在 60%~69%之间的菌株抑制效果

菌株编号	病原菌菌落 直径(mm)	抑制率 (%)	菌株编号	病原菌菌落 直径(mm)	抑制率 (%)
PGT6	30eE	67	PGT78	29fE	68
PGT17	35bB	61	PGT82	30eE	67
PGT18	32cC	64	PGT84	28gF	69
PGT26	36bB	60	PGT85	30eE	67
PGT28	35bB	61	PGT86	29fE	68
PGT33	36bB	60	PGT89	28gF	69
PGT45	29fE	68	PGT96	30eE	67
PGT50*	32cC	64	PGT97	31dD	66
PGT54	33cC	63	PGT99	36bB	60
PGT57	29fE	68	PGT102	31dD	66
PGT66	32cC	64	PGT103	31dD	66
PGT71	30eE	67	PGT106	30eE	67
PGT74	29fE	68	PGT114	29fE	68
CK(对照)	90aA		PGT117	29fE	68

效果。

2.3 抑制率在 50%~59%之间的菌株数量及其抑制效果

抑制率在 50%~59%之间的菌株共 19 个,表 3 显示这 19 个菌株与病原菌对峙培养 7 d 后,病原菌菌落生长直径与对照差异极显著,表明这 19 个菌株对病原菌有很好的抑制效果。

表 3 抑制率在 50%~59%之间的菌株抑制效果

菌株编号	病原菌菌落 直径(mm)	抑制率 (%)	菌株编号	病原菌菌落 直径(mm)	抑制率 (%)
PGT20	42cC	53	PGT72	44bB	51
PGT32	42cC	53	PGT73	37gG	59
PGT34	42cC	53	PGT76	41dD	54
PGT29	39fF	57	PGT81	42cC	53
PGT49	41dD	54	PGT93	40eE	56
PGT50	41dD	54	PGT93*	43bB	52
PGT53	44bB	51	PGT94	39fF	57
PGT56	39fF	57	PGT98	42cC	53
PGT58	43bB	52	PGT115	42cC	53
CK(对照)	90aA		PGT116	43bB	52

2.4 抑制率在 50%以下的菌株数量及其抑制效果

抑制率在 50%以下的菌株共 21 个,表 4 显示这 21 个菌株与病原菌对峙培养 7 d 后,病原菌菌落生长直径与对照差异极显著,表明这 21 个菌株对病原菌有较好的抑制效果。

表 4 抑制率在 50%以下的菌株抑制效果

菌株编号	病原菌菌落 直径(mm)	抑制率 (%)	菌株编号	病原菌菌落 直径(mm)	抑制率 (%)
PGT14	55eE	39	PGT61	59dD	34
PGT21	52gG	42	PGT65	48kK	47
PGT41	49jJ	45	PGT68	51hH	43
PGT42	68bB	24	PGT70	54eE	40
PGT44	53fF	41	PGT77	48kK	47
PGT46	50iI	44	PGT79	51hH	43
PGT47	50iI	44	PGT83	64cC	29
PGT51	50iI	44	PGT87	53fF	41
PGT59	51hH	43	PGT88	52gG	42
PGT60	54eE	40	PGT91	48kK	47
CK(对照)	90aA		PGT92	46iI	49

3 讨论

本研究土样中存在丰富的土壤真菌,杨若鹏等研究表明该土样中存在 11 个属的真菌,其中青霉属是优势属^[12]。从中分离获得的 93 株真菌对石榴干腐病菌均有一定抑制效果,抑制率在 24%~85%之间,其中抑制率≥80%的菌株均为青霉属(*Penicillium*),即 PGT9、PGT13、PGT35、PGT36、PGT100、PGT110、PGT111 等 7 个菌株抑制率在 80%~85%之间,其中 PGT35 菌株的抑制率为 85%。袁秀英等曾经报道青霉属的菌株对杨树烂皮病菌具有很好的拮抗效果^[13]。据文献记载,四川省几种道地药材根际土壤^[14]、东北地区药用植物根际土壤^[15]、贵州省高海拔地区土壤^[16]、长白山自然保护区北坡森林土壤^[17]、横断山北部高山区土壤^[18]等地区土壤真菌的优势属都是青霉属,说明青霉属真菌在土壤中含量丰富。该属真菌可以产生丰富的具有抑菌活性的次生代谢产物,进一步说明从土壤中寻找抗菌活性菌株是可行的。

本研究表明,PGT35 菌株的抑制率高达 85%,表现出良好的开发应用前景。本试验下一步将对该菌的生物学特性进行研究,寻求最佳的发酵条件组合;此外,据刘大瑛报道青霉会引起石榴果腐病^[1],因此还得研究该菌株对石榴果实是否具有致病性,寻找该菌株的有效使用方法。

参考文献:

[1] 刘大瑛. 十二种石榴病害识别与无公害防治[J]. 西北园艺, 2011(6):34-35.

[2] 宋晓贺,孙德茂,王明刚,等. 陕西石榴干腐病发生及病原菌鉴定[J]. 植物保护学报,2011,38(1):93-94.

[3] 戴丽玲. 石榴干腐病的防治措施[J]. 农村经济与科技,2005(2):33.

[4] 汤玉,温铁汉,刘素玲. 石榴干腐病发生规律及防治研究[J]. 中国果树,1998(3):36.

[5] 孙国山. 豫南地区石榴干腐病的发生与防治[J]. 北方果树, 2012(1):42.

[6] 周又生,陆进,朱天贵,等. 石榴干腐病生物生态学及发生流行规律和治理研究[J]. 西南农业大学学报,1999,21(6):551-555.

李公春, 孙 婷, 鞠志宇, 等. 1-甲基-6-三氟甲基-3-取代脲嘧啶类化合物的合成及除草活性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(7): 110-111.

1-甲基-6-三氟甲基-3-取代脲嘧啶类化合物的合成及除草活性

李公春, 孙 婷, 鞠志宇, 杨凤岭

(许昌学院化学化工学院, 河南许昌 461000)

摘要:以 6-三氟甲基-3-取代脲嘧啶为原料, 在无水碳酸钾条件下, 以 *N,N*-二甲基甲酰胺为溶剂, 使用硫酸二甲酯进行甲基化, 合成了 4 个 1-甲基-6-三氟甲基-3-取代脲嘧啶类化合物, 所合成的目标化合物均通过 ^1H NMR 确认。初步的生物活性测试表明, 部分该类化合物具有较好的除草活性, 在浓度 100 mg/L 时, 化合物 b 对稗草株高的抑制率为 97%。

关键词:三氟甲基; 脲嘧啶; 除草活性

中图分类号: O626.41; S482.4

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2013)07-0110-02

嘧啶类衍生物是一类非常重要的具有较高生物活性的化合物, 因其低毒、高效和作用方式独特而受到农药界的广泛重视和深入研究。在除草剂领域, 按化学结构可分为嘧啶醚、嘧啶胺、含嘧啶的磺酰脲、二苯基嘧啶、嘧啶磺酰胺、嘧啶酰胺、脲嘧啶和嘧啶酮等多种类型, 其中一些脲嘧啶类化合物表现出较好的除草活性^[1-10]。光合作用电子传递抑制剂异草定、特草定和除草定^[1]及原卟啉原氧化酶(PPO 酶)抑制剂氟丙嘧草酯^[2]和双苯嘧草酮^[3]等是重要的商品化品种。构效关系研究表明, 在脲嘧啶结构的 6-位引入三氟甲基后, 化合物的除草活性得到极大提高; 在 6-三氟甲基脲嘧啶的 1-、3-位分别引入甲基/氨基、取代苯基/取代苄基, 相应化合物均表现出良好除草活性^[1]。为了进一步研究该类化合物结构与活性的关系, 笔者拟将 3-位苄基中的苯环修饰为芳杂环或在亚甲基位置引入手性中心, 并以 6-三氟甲基-3-取代脲嘧啶为原料, 使用硫酸二甲酯进行甲基化, 结果合成了 4 个

1-甲基-6-三氟甲基-3-取代脲嘧啶类化合物。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Bruker AV300 型核磁共振仪 (300 MHz, 以 CDCl_3 为溶剂, TMS 为内标); XT-4A 显微熔点测定仪。6-三氟甲基-3-取代脲嘧啶类化合物 (自制); 无水碳酸钾 (国产分析纯); 硫酸二甲酯 (国产分析纯)。

1.2 化合物的合成

向盛有 3 mL *N,N*-二甲基甲酰胺的 10 mL 圆底烧瓶中分别加入 0.5 mmol 6-三氟甲基-3-取代脲嘧啶、0.14 g 无水碳酸钾 (1.0 mmol)、0.07 g 硫酸二甲酯 (0.55 mmol), 在室温下搅拌, TLC 检测反应完全时停止反应。将反应液倒入盛有 40 mL 水的烧杯中, 静置, 待析出白色沉淀后过滤, 干燥即得目标化合物, 相关数据如下所示。

1-甲基-3-(1-苯基乙基)-6-三氟甲基嘧啶-2,4-(1H,3H)-二酮 (化合物 a): 白色固体, 收率为 83%, m. p. 105~106 °C。 ^1H NMR δ : 1.87 (d, $J=7.5$ Hz, 3H, CH_3), 3.41 (s, 3H, CH_3), 6.22 (s, 1H, pyrimidinyl-H), 6.29 (q, 1H, CH), 7.21~7.44 (m, 5H, Ar-H)。

1-甲基-3-[(6-氯吡啶基-3-基)甲基]-6-三氟甲基嘧啶-2,4-(1H,3H)-二酮 (化合物 b): 白色固体, 收率

收稿日期: 2012-12-15

基金项目: 河南省自然科学基金 (编号: 082300420110); 河南省教育厅自然科学研究项目 (编号: 2011A150025); 河南省科技计划 (编号: 122102210426)。

作者简介: 李公春 (1971—), 男, 河南淮阳人, 硕士, 讲师, 从事有机合成研究工作。E-mail: ligongchun@yahoo.cn。

[7] 戴芳澜. 中国真菌总汇[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 1102.

[8] 刘云龙, 何永宏, 王新志. 国内一种果树新病害——石榴枯萎病[J]. 植物检疫, 2003, 17(4): 206-208.

[9] 潘争艳, 傅俊范, 周如军, 等. 五味子园根际真菌多样性初探及拮抗菌株筛选[J]. 吉林农业大学学报, 2007, 29(6): 636-639.

[10] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 124.

[11] 刘治刚. 玉米苗期根腐病生防木霉菌的筛选[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(9): 114-115.

[12] 杨若鹏, 郑肖兰, 田学军, 等. 云南蒙自枇杷根腐病植株根际土壤真菌多样性研究[J]. 热带农业科学, 2012, 32(12): 70-74.

[13] 袁秀英, 白红霞, 白玉明, 等. 杨树内生真菌的分离和拮抗生防

菌的筛选[J]. 林业科学研究, 2006, 19(6): 713-717.

[14] 杨 皓. 四川几种道地药材根际土壤真菌的初步研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2008.

[15] 陈 曦. 东北地区药用植物根际土壤真菌多样性的研究[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2010.

[16] 金义兰, 桑维钧, 张秀伟. 贵州高海拔地区土壤真菌种类初步鉴定[J]. 贵州农业科学, 2009, 37(5): 88-90.

[17] 杨 红. 长白山自然保护区北坡森林土壤真菌种群及其多样性研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2009.

[18] 邵宝林. 横断山北部高山区土壤真菌的初步研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2006.