

刘俊华,李玉玺,马海玲.多蒴曲尾藓提取液的抑真菌活性[J].江苏农业科学,2015,43(4):141-143.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.050

多蒴曲尾藓提取液的抑真菌活性

刘俊华¹,李玉玺²,马海玲²

(1. 山东省黄河三角洲野生植物资源开发利用工程技术研究中心,山东滨州 256603; 2. 滨州学院生命科学系,山东滨州 256603)

摘要:采用菌丝生长速率法和孢子萌发 2 种方法,分析比较了药用植物多蒴曲尾藓配子体提取液对植物病原真菌大茎点霉的抑菌活性。结果表明:在质量浓度为 120 g/L 时,无菌水和 80% 乙醇 2 种溶剂藓体提取液对大茎点霉菌丝生长的抑菌率均达 60% 以上,其中乙醇提取液的抑菌作用较强,抑菌率为 67.47%, EC_{50} 值为 27.28 g/L;乙醇提取液对大茎点霉菌孢子萌发的抑菌活性高于对其菌丝生长的抑菌活性, EC_{50} 值为 19.62 g/L,抑制作用优于水提液。多蒴曲尾藓对大茎点霉具有良好的抑菌效果,在冬枣轮纹病生物防治方面具有一定的开发潜力和应用价值。

关键词:多蒴曲尾藓提取物;抑菌活性;大茎点霉;抑菌中浓度

中图分类号: S482.2⁺92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0141-02

植物病原真菌对农作物的危害较严重,寻求环境兼容性好、安全、低毒、经济的植物源农药控制真菌引起的农作物病害已成为一种趋势^[1]。我国拥有十分丰富的植物资源,且相当多的物种具有药用价值。多蒴曲尾藓(*Dicranum majus* Turn.)为曲尾藓科(Dicranaceae)曲尾藓属(*Dicranum* Hedw.)植物^[2],是广泛分布于我国的一种常见药用藓类,其体内富含多种氨基酸^[3]。据中医古籍记载,该藓全草入药,气微,味淡,有清肺止咳功效,多用于治疗肺热咳嗽^[3],在我国民间多有使用,但有关其抑菌活性方面的研究尚未有文献报道。

本研究以山东省内山区采集的多蒴曲尾藓配子体为试材,以冬枣轮纹病致病菌大茎点霉菌^[4]为受试菌株,利用其配子体水提液、醇提液进行抑制菌丝生长和孢子萌发研究,旨在初步阐明多蒴曲尾藓抑制真菌活性,为开发以多蒴曲尾藓为植物源的杀菌剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用多蒴曲尾藓配子体,采自山东省境内鹤伴山区林下阴湿岩面。野外采集带回室内,用清水洗净后自然风干,研磨成粉,冷藏备用。供试菌株为大茎点霉菌(*Macrophoma kuwatsukaii*),系冬枣轮纹病的病原菌,由滨州学院生物学实验教学中心提供。

1.2 方法

1.2.1 提取液的制备 准确称取多蒴曲尾藓配子体干粉 12 g 放入 250 mL 锥形瓶中,加入 80% 乙醇作为提取溶剂,置于 50 ℃ 恒温水浴锅内浸提 24 h。以 4 000 r/min 离心 15 min,收集上清液即为浸提液,定容至 100 mL,得浓度为

120 g/L 的提取母液。然后依次稀释得到浓度为 60、30、15、7.5、3.75 g/L 的多蒴曲尾藓提取液;同样方法制备得到多蒴曲尾藓配子体水提液,均于 4 ℃ 冰箱内保存备用。

1.2.2 含药培养基的制备 将上述配制好的提取液分别加入到盛有 30 mL PDA 培养基的培养皿(直径 90 mm)中制成含药(藓体提取液)培养基;同时,以加入相同体积无菌水、80% 乙醇 PDA 培养基作为对照。

1.2.3 菌丝生长速率法测定提取液抑菌活性 按菌丝生长速率法计算抑菌率。待菌丝即将长满整个培养皿时,在菌丝生长旺盛处用打孔器打取直径为 6 mm 的菌饼,接种于带药液培养基中心位置,每皿接 1 个菌饼,每个浓度接种 3 皿(即每处理 3 个重复);置于 37 ℃ 的恒温培养箱中培养。48 h 后,观察大茎点霉菌的生长情况,用游标卡尺以“十”字交叉法测量菌落直径(精确至 0.1 mm)。抑菌率计算公式如下:

抑菌率 = $[(\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}) / (\text{对照菌落直径} - 6 \text{ mm})] \times 100\%$ 。

1.2.4 稀释平板计数法测定提取物对大茎点霉菌孢子萌发的抑制率 吸取前期活化并制备好的菌悬液,分别加入到上述不同质量浓度的培养基中,用涂菌棒涂布均匀后静置 20 min,再将培养基平板倒置,于 37 ℃ 生化培养箱培养 24 h;准确记测菌落数。对照组(分别以无菌水培养和 80% 乙醇培养)菌落数记为 C_0 ,涂布提取物平板菌落数记为 C ,按下式计算孢子萌发抑制率:抑制率 = $[(\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}) / (\text{对照萌发率})] \times 100\% = [(C_0 - C) / C_0] \times 100\%$ 。

1.3 数据的处理与分析

采用 Excel 2003 及 SPSS 18.0 进行数据整理与统计分析,采用 Duncan's 新复极差法进行组间差异显著性检验;运用提取物对大茎点霉菌菌丝生长及孢子萌发影响的回归方程,计算相应 EC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 多蒴曲尾藓提取物对大茎点霉菌菌丝生长的抑制作用

由表 1 可知,多蒴曲尾藓水提液和醇提液对大茎点霉菌菌丝生长均具有一定的抑制作用,在质量浓度为 3.75 g/L

收稿日期:2014-05-11

基金项目:国家级大学生创新创业训练计划(编号:201210449111);

滨州学院自然科学基金(编号:BZXYLG200701)。

作者简介:刘俊华(1980—),男,山东高唐人,硕士,讲师,主要从事植物生态学教学与研究。Tel:(0543)3191727;E-mail:liujh1980@126.com。

时,菌丝生长抑制率分别为 10.45% 和 13.85%,抑菌活性随提取液浓度提高而增强,质量浓度至 120 g/L 时,2 种提取液抑制率均达到 60% 以上,分别为 62.92% 和 67.47%。同时,

从菌丝生长情况来看,处理组与对照组相比,菌落直径明显减小,菌丝稀疏、纤细,且易老化。

表 1 多蒴曲尾藓提取物对大茎点霉菌菌丝生长的抑制作用

质量浓度 (g/L)	菌环直径(mm)		平均抑制率(%)	
	水提液	醇提液	水提液	醇提液
120	26.2 ± 3.37a	29.9 ± 4.10a	62.92 ± 5.08a	67.47 ± 4.17a
60	29.6 ± 3.60a	32.8 ± 5.00a	59.33 ± 6.19a	63.29 ± 4.47a
30	36.9 ± 2.90a	36.7 ± 4.55b	54.58 ± 5.64a	54.20 ± 3.60b
15	43.4 ± 3.97b	46.1 ± 3.56c	42.90 ± 4.41b	46.13 ± 4.93c
7.5	54.8 ± 3.76c	57.5 ± 4.29d	28.82 ± 5.31c	32.04 ± 4.66d
3.75	69.5 ± 3.48d	72.3 ± 5.10e	10.45 ± 6.32d	13.85 ± 4.32e
0(CK)	80.6 ± 2.74e	80.7 ± 3.06f	0e	0f

注:表中数据为平均值 ± 标准差,同列数据小写字母表示不同质量浓度处理间差异显著($P < 0.05$)。表 2 同。

由图 1 可知,提取液质量浓度与抑菌率间呈正相关关系,其中水提液抑菌力回归方程为 $y = 15.069\ln x - 2.8643$ ($r^2 = 0.9227$, $P = 0.077$),醇提液抑菌力回归方程为 $y = 15.248\ln x - 0.4137$ ($r^2 = 0.9510$, $P = 0.057$);进一步计算得到 2 种提取液对大茎点霉菌菌丝生长的 EC_{50} 值,分别为 27.61 g/L(水提液)、27.28 g/L(醇提液)。

2.2 多蒴曲尾藓提取物对大茎点霉菌孢子萌发的抑制作用
植物病原菌在萌发阶段对外来药剂较为敏感,且其孢子萌发率随药液浓度增大呈明显下降趋势。由表 2 可知,多蒴曲尾藓对大茎点霉菌孢子萌发具有较强的抑制作用,且随着提取液质量浓度的增高,抑制作用显著增强。

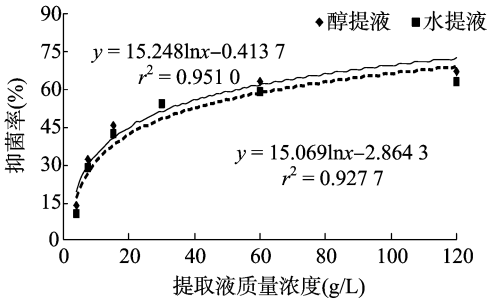


图 1 2 种提取液质量浓度与抑菌率的回归分析

表 2 多蒴曲尾藓提取液对大茎点霉菌孢子萌发的抑制作用

质量浓度 (g/L)	菌落数(个)		平均抑制率(%)	
	水提液	醇提液	水提液	醇提液
120	4.7 ± 2.08a	2.7 ± 1.53a	83.53 ± 2.08a	89.61 ± 1.53a
60	7.7 ± 2.52ab	6.3 ± 1.53b	72.94 ± 2.52ab	75.32 ± 1.53b
30	11.7 ± 2.08b	10.7 ± 2.08c	58.82 ± 2.08b	58.44 ± 2.08c
15	16.3 ± 2.52c	14.0 ± 2.00c	42.35 ± 2.52c	45.45 ± 2.0c
7.5	21.0 ± 2.65d	18.3 ± 1.53d	25.88 ± 2.65d	28.57 ± 1.53d
3.75	25.3 ± 2.08e	22.3 ± 2.52e	10.59 ± 2.08de	12.99 ± 2.52e
0(CK)	28.3 ± 3.51e	25.7 ± 2.52e	0e	0e

由图 2 可知,醇提液对大茎点霉菌孢子萌发的抑制作用略强于水提液。通过对提取液质量浓度与孢子萌发抑制率间进行回归分析,得到水提液和醇提液与孢子萌发抑制率间的回归方程,分别为: $y = 22.108\ln x - 15.801$ ($r^2 = 0.9954$, $P = 0.022$)、 $y = 21.531\ln x - 16.751$ ($r^2 = 0.9991$, $P = 0.014$),依方程计算得 2 种提取液抑制大茎点霉菌孢子萌发的 EC_{50} 值,分别为 22.20 g/L、19.62 g/L。

3 结论与讨论

本研究结果表明:多蒴曲尾藓提取液对冬枣轮纹病致病菌大茎点霉的生长具有较强的抑制作用,在供试质量浓度 120 g/L 时,多蒴曲尾藓提取液对大茎点霉菌的抑制率均在 60% 以上,对孢子萌发的抑制率达 80% 以上,其抑菌活性随质量浓度的增大而增强,且在中高浓度下(30 ~ 120 g/L)2 种提取液大茎点霉菌孢子萌发的抑制率高于对其菌丝生长的抑制率。无论对大茎点霉菌菌丝生长还是孢子萌发,相对于无菌水提取液,乙醇提取液均表现出更强的抑制作用(表 1、表 2)。

苔藓植物能够产生如萜类、黄酮类、脂肪酸等次生代谢产物及一些生物活性物质,是潜在的天然活性产物宝库^[5-9]。目前,已有多种苔藓植物被证明有抑制微生物活性的作用^[5-6,8-10],从苔藓植物中筛选抗菌、防腐、抗癌、防治心血管疾病、抗凝血和降血脂等药物将具有广阔的前景。

本研究初步阐明了多蒴曲尾藓对冬枣轮纹病致病菌的抑菌作用,但其抑菌机制尚不明。同时,由于本试验只测定了

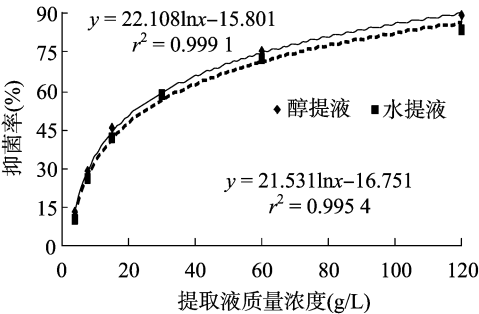


图 2 2 种提取液质量浓度与孢子萌发抑制率的回归分析

李萌萌,陈士华,吴兴泉. 马铃薯块茎坏死环斑病研究进展[J]. 江苏农业科学,2015,43(4):143-146.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.04.051

马铃薯块茎坏死环斑病研究进展

李萌萌,陈士华,吴兴泉

(河南工业大学生物工程学院,河南郑州 450001)

摘要:马铃薯块茎坏死环斑病(potato tuber necrotic ringspot disease,PTNRD)是新发现的一种马铃薯病毒病,可引致马铃薯块茎坏死环斑,不但降低马铃薯产量,而且影响马铃薯品质,造成严重的经济损失。近年来该病害在中国虽有报道,但相关研究仍处于起步阶段。对 PTNRD 的症状、分布、病原及其分子特征、鉴定方法、病毒与寄主互作关系及病害防治等方面的新进展进行了综述,以期为我国深入开展相关研究提供理论依据。

关键词:马铃薯块茎坏死环斑病;分布;PVY 株系;病毒-寄主互作

中图分类号: S435.32 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)04-0143-04

马铃薯块茎坏死环斑病(potato tuber necrotic ringspot disease,PTNRD)是由马铃薯 Y 病毒(Potato virus Y,PVY)新变异株系引起的一种马铃薯病害。PTNRD 可在马铃薯块茎的内部或外部引起弧状或环状坏死斑,严重影响马铃薯的品质和经济价值。PTNRD 的发现使得 PVY 被认为是当前马铃薯上危害最重的病毒^[1],有关 PTNRD 的相关研究也成为 PVY 研究中的热点问题。在过去的 20~30 年间,PTNRD 几乎席卷整个欧美,危害严重。在中国 PTNRD 虽然已有报道,但仍非常少^[2-3],说明该病害仍处于低水平发生阶段。现在应该下大力气研究建立快速准确的病害检测技术,并应用于马铃薯种薯的检测检疫中,以确保对该病害实施有效预防和控制。一旦对病害的防控不力、导致病害大范围扩散流行,将会严重影响我国马铃薯产业的健康发展,到时再进行防治将会变得非常困难。然而我国关于 PTNRD 的研究还非常缺乏,很多问题须开展深入研究。

收稿日期:2014-10-26

基金项目:河南省高校科技创新人才支持计划(编号:2012HASTIT016)。

作者简介:李萌萌(1988—),女,河南偃师人,硕士研究生,主要从事植物病毒学研究。E-mail:linmm882013@126.com。

通信作者:吴兴泉,博士,教授,主要从事植物病毒学与分子生物学研究。E-mail:wuxq70@126.com。

其粗提液的抑菌活性和 EC_{50} ,对其抑菌主效成分尚不清楚,仍需围绕上述问题开展深入研究,为开发能有效应用于冬枣轮纹病生物防治的植物源杀菌剂提供理论基础与技术支持。

参考文献:

- [1] 赵成爱,杨琳琳,余梅燕,等. 八宝景天叶乙醇提取物的抑真菌活性[J]. 农药,2012,51(7):536-538.
- [2] 赵遵田,曹同. 山东苔藓植物志[M]. 济南:山东科学技术出版社,1998:90-107.
- [3] 国家中医药管理局中华本草编委会. 中华本草:第四卷[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999.
- [4] 靳雅君,张泽勇. 冬枣轮纹病的发生与防治[J]. 北京农业,2006

1 PTNRD 的症状、分布与危害

1.1 PTNRD 的症状

PTNRD 是危害马铃薯的一种病害,在马铃薯块茎表面引起难看的坏死环斑。感染 PTNRD 的马铃薯块茎形成坏死环斑的整个过程是最初在表面出现向外凸起的浅浅的环或半环,然后环向内凹陷并且逐渐形成坏死斑。块茎坏死环斑的表皮先坏死,然后邻近环斑的表皮开始坏死,表皮坏死严重时块茎表面开始裂开,进而块茎表面深深地裂开,块茎的坏死症状可逐渐延伸至整个马铃薯块茎。由于马铃薯块茎埋于地下,因此只有到收获后,块茎上的症状才能被发现,一般随着储藏时间的延长病害症状会逐渐加重。

马铃薯 Igor 品种是对 PVY^{NTN}(PVY 块茎坏死株系)最易感病的品种,症状也最明显。Igor 品种的马铃薯在感病后所有块茎均可产生坏死症状,叶片在接种数天后也可产生坏死斑(局部斑);随着病毒在体内的移动,非接种叶也会出现皱缩、褪绿花叶症状。发病叶片上可出现类似棕榈树状的叶片下垂症状^[4]。叶片发病部位细胞中的叶绿体膨胀,类囊体的结构变松弛,而在坏死斑周围细胞中的叶绿体体积变小^[5]。

马铃薯感染 PTNRD 后的症状表现具有多变性,一般在田间约 30%~50% 的带毒块茎不表现 PTNRD 症状,在马铃薯叶片上的症状表现也比较轻,大多数难以识别。有时将田间

(9):31.

- [5] 娄红祥. 苔藓植物化学与生物学[M]. 北京:北京科学技术出版社,2006:1-363.
- [6] 周江煜. 苔藓植物的化学活性成分研究概况[J]. 广西中医学院学报,2002,5(4):84-87.
- [7] 吴鹏程. 苔藓植物生物学[M]. 北京:科学出版社,1998:148-203.
- [8] Asakawa Y. Biologically active compounds from bryophytes[J]. Pure and Applied Chemistry,2007,79(4):557-580.
- [9] 汪庆,罗宣. 苔藓植物的主要次生代谢产物与有害生物防治[J]. 贵州科学,2001,19(4):93-100.
- [10] 刘俊华,王书平. 黄牛毛藓(*Ditrichum pallidum*)抑菌效果的生物测定[J]. 湖北农业科学,2010,49(2):361-362.