

张翠荣,李 明,李荣玉. 5 种植物粗提物对稻瘟病菌的抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):162-164.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.044

5 种植物粗提物对稻瘟病菌的抑菌活性

张翠荣¹, 李 明^{2,3}, 李荣玉^{2,3}

(1. 贵州大学精细化工研究开发中心, 贵州贵阳 550025; 2. 贵州大学作物保护研究所, 贵州贵阳 550025;
3. 贵州大学贵州省山地农业病虫害重点实验室, 贵州贵阳 550025)

摘要:以稻瘟病菌为供试靶标,采用生长速率和孢子萌发测定法,对鱼腥草、夹竹桃、马尾松、姜和香樟的乙醇粗提物进行了抑菌活性测定。结果显示,5 种植物粗提液对稻瘟病菌均有抑制作用,在浓度为 40 mg/mL 时,马尾松对该菌的菌丝生长及孢子萌发抑制率最高,分别为 62.23% 和 65.54%,其 EC₅₀ 为 21.75 mg/mL 和 19.38 mg/mL,其次是姜和夹竹桃,其中鱼腥草和香樟的抑菌活性相对较弱。

关键词:稻瘟病菌;乙醇粗提物;抑菌活性

中图分类号: S482.2⁺92;S435.111.4⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0162-02

21 世纪全球农业发展的一个重要趋势是更加注重农产品质量安全,从天然植物中提取杀虫杀菌活性物质防治病虫害,已成为研究热点,并对现代农药研究具有重要意义。

水稻是世界上最重要的粮食作物之一,全球约有 1/2 的人口以稻米作为主食,其中水稻稻瘟病是危害水稻的三大病害之一^[1-2],它是由水稻稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)引起的真菌性病害^[3]。目前稻瘟病主要依靠化学防治,虽然化学防治具有效果显著、广谱性强、易推广等优点,但在保障人类获得丰厚农产品的同时,也给环境带来了严重的污染^[4-5]。

植物源杀菌剂是从某些植物的叶、花、茎、根、果实等部位分离提取的具有杀菌作用的活性物,植物杀虫杀菌资源丰富,对环境、植物本身以及害虫天敌均无影响,也不易使有害生物产生抗药性,所以植物源杀菌剂成为目前农药研究开发的热点。例如大蒜中的大蒜素、蚕豆中的蚕豆酮等均可有效地抑制或杀死某些病原菌的生长发育^[6-10]。植物通过长期进化而产生种类繁多的活性次生代谢物是植物抵御病原菌的重要武器,这些类型多样的次生代谢物为开发新农药提供了无限的研究资源。

国内对于防治水稻稻瘟病的植物源药剂的开发也有初步研究,有研究表明山苍子植物中含有对水稻稻瘟病菌毒杀作用的物质等。本研究探索 5 种植物(鱼腥草、夹竹桃、马尾松、姜和香樟)的乙醇粗提物对水稻稻瘟病的生物活性作用,以期为基于植物源药剂防治水稻稻瘟病提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物均采摘于贵州大学农学院,植物名录见表 1。

收稿日期:2016-03-09
基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201503107);贵州大学引进人才科研项目[编号:贵大人基合字(2015)07 号]。
作者简介:张翠荣(1988—),女,硕士,研究方向为农药加工、分析、残留与环境毒理。E-mail:zhwazi@163.com。
通信作者:李 明,教授,博士生导师,研究方向为植物源农药的研究与应用。E-mail:lm21959@163.com。

表 1 供试植物

科名	种名	采集部位	来源
三白草科	鱼腥草	叶子	贵州大学农学院
夹竹桃科	夹竹桃	叶子	贵州大学农学院
松科	马尾松	针叶	贵州大学农学院
姜科	姜	叶子	贵州大学农学院
樟科	香樟	叶子	贵州大学农学院

供试菌种:水稻稻瘟病菌 ZB15(*Magnaporthe grisea*) 采自田间自然发病水稻植株上的病菌,经笔者实验室分离、纯化、鉴定后保存备用。

供试培养基:PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g,蒸馏水 1 000 mL);米糠培养基(米糠 20 g,蔗糖 10 g,琼脂粉 15 g,蒸馏水 1 000 mL)。

1.2 试验方法

1.2.1 植物的预处理及粗提物的制备 将 5 种植物洗净置于阴凉处晾干,然后放在恒温干燥箱中以 60 ℃ 的温度烘干,小心取出植物分别放入研钵中充分研磨,直至成细粉末状,将获得干粉称质量后置于密封瓶内保存备用。采用超声波提取法进行粗提物的制备,提取溶剂为无水乙醇。

分别称取 5 种植物干粉各 10 g 置于 250 mL 锥形瓶中,按照料液比 1 g:20 mL 加入无水乙醇中浸渍、振荡、低温静置,真空抽滤、弃废渣、减压浓缩获得浸膏状植物乙醇粗提物。用 60% 乙醇溶液溶解 5 种植物粗提物,适量添加 0.1% 的吐温-80,分别制成浓度为 10、20、40 mg/mL 的供试溶液。将试验分 5 组进行,分别为鱼腥草、夹竹桃、马尾松、生姜和香樟乙醇粗提物各浓度供试液,每个处理 3 次重复。

1.2.2 菌丝生长抑菌活性的测定 采用菌丝生长速率抑制法,分别取上述 5 种已经配制成系列浓度梯度的植物粗提物,加入到融化好的 PDA 培养基中,灭菌,制成系列浓度梯度的含药培养基平板。取供试的稻瘟病菌菌种,用直径为 6 mm 的打孔器在菌落边缘打取菌饼,然后将菌饼移到上述含药的培养基平板中央,以不加药的平板培养基为对照,每个处理 3 次重复,25 ℃ 全黑暗培养。“十”字交叉法测定各处理的菌落直径,并根据公式计算菌丝抑制生长率及 EC₅₀ 值^[11]。

抑制生长率 = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径) / (对照菌落直径 - 菌饼直径)] × 100%。

采用回归分析法对 5 种植物乙醇粗提物各处理浓度的对数值(*x*)和菌丝生长抑制率的概率值(*y*)进行分析处理,计算出 5 种植物乙醇粗提物对供试菌株的 EC₅₀ 值。

1.2.3 孢子萌发抑菌活性的测定 采用米糠培养基产孢的方法,取培养好的菌丝块,分多点接种到米糠培养基上,置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养,待菌丝长满,将少许无菌水倒入培养皿中,用毛笔轻轻刷洗过后,再置于 365 nm 黑光灯下培养,48 h 后,培养基表面即产生大量孢子,表现为 1 层青灰色的新鲜霉层,即为稻瘟病菌孢子。刷洗霉层,过滤、镜检,调配成所需浓度的孢子悬浮液,在显微镜下观察,以不加药剂的孢子悬浮液为对照,分别在处理的孢子悬浮液中加入不同浓度的不同药剂,每个浓度处理设 3 个重复^[12-15]。

将各处理的孢子悬浮液置于摇床中培养 24 h 后,镜检各处理的孢子萌发情况,记录 200 个孢子中萌发的孢子数。孢子萌发抑制率 = (对照萌发率 - 处理萌发率) / 对照萌发率 × 100%。计算抑制率,求出毒力回归方程、相关系数 *r* 和 EC₅₀ 值^[16]。

2 结果与分析

2.1 植物乙醇粗提物对菌丝的抑制作用

由表 2 可知,5 种植物乙醇粗提物对稻瘟病菌菌丝均有抑制作用,在测定的浓度下,随着各粗取物处理浓度的升高,稻瘟病菌菌落增长直径递减,抑制率升高,粗提物浓度与抑制率正相关。当浓度为 40 mg/mL 时,马尾松粗提物对稻瘟病菌菌丝的抑制率为 62.23%,姜粗提物抑制率也达到了 51.23%,其次是夹竹桃和香樟,在相同浓度下,鱼腥草对稻瘟病菌菌丝生长的抑制率最低。

表 2 5 种植物乙醇粗提物对稻瘟病菌菌丝的抑制率

乙醇粗提物种类	对稻瘟病菌菌丝的抑制率(%)		
	10 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL
鱼腥草	23.97	32.22	38.42
夹竹桃	27.24	34.98	43.19
马尾松	43.84	51.40	62.23
姜	33.99	44.17	51.23
香樟	25.29	33.17	40.89

在含不同浓度的 5 种植物乙醇粗提物的供试培养基上生长的稻瘟病菌菌丝均受到不同程度的抑制作用,直线回归分析结果见表 3,其粗提物处理浓度与对菌丝生长的抑制率呈线性关系,其中马尾松的 EC₅₀ 值均小于其余 4 种植物乙醇粗提物,其毒力回归方程是 $y = 4.43 + 0.42x$, EC₅₀ 值为 21.75 mg/mL。

2.2 植物乙醇粗提物对孢子萌发的抑制作用

从表 4 可以看出,5 种植物乙醇粗提物对稻瘟病菌孢子萌发均有抑制作用,其中马尾松对孢子萌发的抑制效果最明显,随着浓度升高,抑制率逐渐上升,当浓度为 10 mg/mL 时,抑制率达到了 42.56%;当浓度为 40 mg/mL 时,抑制率达到了 65.64%。夹竹桃、姜和香樟的粗提物在浓度是 40 mg/mL 时,其抑制率均超过 40%。其中鱼腥草的孢子萌发率相对较

表 3 5 种植物乙醇粗提物对稻瘟病菌菌丝生长的毒力回归分析

处理	线性方程	相关系数(<i>r</i>)	EC ₅₀ 值 (mg/mL)
鱼腥草	$y = 3.76 + 0.56x$	0.988 1	148.67
夹竹桃	$y = 3.94 + 0.51x$	0.987 6	117.72
马尾松	$y = 4.43 + 0.42x$	0.990 1	21.75
姜	$y = 4.14 + 0.51x$	0.989 7	46.72
香樟	$y = 3.81 + 0.56x$	0.990 1	128.75

表 4 5 种植物乙醇粗提物对稻瘟病菌孢子萌发的抑制率

乙醇粗提物种类	对稻瘟病菌孢子萌发的抑制率(%)		
	10 mg/mL	20 mg/mL	40 mg/mL
鱼腥草	24.10	27.69	34.36
夹竹桃	27.18	30.26	45.64
马尾松	42.56	55.89	65.64
姜	32.31	46.67	54.87
香樟	26.15	40.00	44.62

低,在浓度是 40 mg/mL 时,其抑制率为 34.36%,这与稻瘟病菌菌丝抑制活性结果分析一致。

不同浓度的 5 种植物乙醇粗提物的孢子悬浮液中的稻瘟病菌孢子萌发均受到不同程度的抑制作用,其粗提物处理浓度与对孢子萌发的抑制率呈线性关系,其中马尾松的 EC₅₀ 值为 19.38 mg/mL,毒力回归方程是 $y = 3.91 + 0.84x$,毒力回归分析结果如表 5 所示。

表 5 5 种植物乙醇粗提物对稻瘟病菌孢子萌发的毒力回归分析

处理	线性方程	相关系数(<i>r</i>)	EC ₅₀ 值 (mg/mL)
鱼腥草	$y = 3.63 + 0.62x$	0.992 6	154.20
夹竹桃	$y = 3.83 + 0.55x$	0.975 7	126.15
马尾松	$y = 3.91 + 0.84x$	0.996 8	19.38
姜	$y = 4.03 + 0.60x$	0.973 1	39.78
香樟	$y = 3.92 + 0.51x$	0.969 9	116.88

3 讨论

植物的抑菌杀菌作用是长期与昆虫和病原菌进化产生的结果,主要依赖于植物的次生代谢产物^[17-18]。该试验探究了 5 种植物乙醇粗提物对稻瘟病菌菌丝生长及孢子萌发的影响,结果表明 5 种植物粗提液对稻瘟病菌均有抑制作用,在浓度为 40 mg/mL 时,马尾松对该菌的菌丝生长及孢子萌发的抑制率最高,分别为 62.23% 和 65.64%,抑制效果显著优于其他 4 种植物粗提物;当浓度为 20 mg/mL 时,姜和夹竹桃对菌丝抑制率为 44.17% 和 34.98%;其中鱼腥草对该菌的抑制活性相对较弱。线性毒力方程结果分析,5 种植物粗提物处理浓度与对菌丝生长及孢子萌发的抑制率呈线性关系,其中马尾松的 EC₅₀ 值为 21.75 mg/mL 和 19.38 mg/mL。不同植物中存在不同的抗菌活性物质,它们的作用机制存在差异^[19]。

本试验只研究了 5 种植物的乙醇粗提物,其有效成分复杂,为了解对稻瘟病菌有生物活性的主要成分及相互间的作用效果,有必要对高活性物质分离、纯化、分析其活性及化学成分,且其具体抑菌机理有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] Skamnioti P, Gurr S J. Against the grain: safeguarding rice from rice

马军韬,张国民,辛爱华,等. 24个抗瘟基因与哈尔滨市稻瘟病菌互作分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):164-168.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.045

24个抗瘟基因与哈尔滨市稻瘟病菌互作分析

马军韬,张国民,辛爱华,张丽艳,邓凌韦,王永力,王英,肖佳雷,任洋,宫秀杰
(黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所,黑龙江哈尔滨 150086)

摘要:为明确24个抗瘟基因与哈尔滨市稻瘟病菌的互作情况,应用田间自然感病结合室内接种的方式完成试验,得出以下结论:(1)2012年有 $Pi-12(t)$ 、 $Pi-7(t)$ 、 $Pi-9(t)$ 、 $Pi-z^5$ 、 $Pi-20$ 、 $Pi-ta^2$ 和 $Pi-sh$ 7个基因对稻瘟病表现免疫,2014年又新增 $Pi-k^m$ 和 $Pi-5(t)$ 2个基因表现免疫;(2) $Pi-i$ 和 $Pi-k$ 是植株发病率和叶片发病率上升幅度最大的基因, $Pi-t$ 和 $Pi-z$ 是植株发病率和叶片发病率下降幅度最大的基因;(3)2012年病情指数最高的3个基因为 $Pi-z$ 、 $Pi-k^h$ 和 $Pi-k$,其病情指数分别为14.04、13.50和12.40,2014年病情指数最高的3个基因为 $Pi-k$ 、 $Pi-a$ 和 $Pi-i$,其病情指数分别为65.39、33.64、29.38,叶片发病率与病情指数相关度最高;(4)从室内接种结果看,24个抗瘟基因都存在被稻瘟病菌侵染的风险,其致病性相似系数介于0.20~0.75之间。综合分析,24个抗瘟基因对稻瘟病的抗性在年际间存在波动,稻瘟病菌的致病性呈集中化趋势。

关键词:水稻单基因系;抗瘟基因;稻瘟病菌;病情指数

中图分类号: S435.111.4⁺1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0164-05

哈尔滨市是北方粳稻主产市之一,年种植面积超过60万 hm^2 ,稻瘟病是该区域水稻生产上的主要病害,年均产量损失超过5.00%^[1-2]。目前,当地生产上主要通过化学药剂来进行病害的防控,成本高,污染环境^[3-4],不是病害的最佳解决途径。以往的研究表明,水稻抗性品种对稻瘟病具有

明显的抵抗能力,而水稻品种的抗性主要来源于其自身携带的抗瘟基因。因此,分析水稻抗瘟基因对稻瘟病的田间真实性,可以为抗性品种选育及品种合理布局奠定理论基础。

前人的相关研究主要集中在以抗瘟基因为鉴别体系,在分析稻瘟病菌致病性变化的同时,分析基因的抗性价值。马军韬等应用日本清泽鉴别体系对黑龙江省稻瘟病菌生理小种进行分析后认为,抗瘟基因 $Pi-ta^2$ 、 $Pi-z'$ 可在黑龙江省优势小种区利用, $Pi-k'$ 、 $Pi-t$ 不可大规模利用^[5]。刘文德等分析了24个抗瘟基因对福建省稻瘟病菌的抗性情况,结果显示, $Pi-k^h$ 抗性最强,抗性频率为98.15%,是优质抗源^[6]。兰波等分析了30个水稻抗瘟基因品系对江西省稻瘟病菌的抗性情况,结果显示, $Pi-z'$ 和 $Pi-k$ 抗性最强,抗性频率分别为85.11%和82.95%,是优质抗源^[7]。此外,李湘民等也

收稿日期:2015-07-07

基金项目:黑龙江省农业科技创新工程项目(编号:2013ZD019);黑龙江省杰出青年科学基金(编号:JC201214)。

作者简介:马军韬(1979—),男,吉林东丰人,硕士,助理研究员,主要从事稻瘟病及抗瘟育种研究。Tel:(0451)86660987;E-mail:mmmjjttt@sina.com。

通信作者:张国民,硕士,研究员,主要从事稻瘟病及抗瘟育种研究。Tel:(0451)86660987;E-mail:zgm_2290@163.com。

- blast disease[J]. Trends in Biotechnology,2009,27(3):141-150.
- [2] 廖乾生. 抗稻瘟病菌附着胞形成研究[D]. 杭州:浙江大学,2002.
- [3] 徐敬友,吴翠萍,童蕴慧. 江苏水稻旱育秧“黄枯”病原鉴定及致病力研究[J]. 植物病理学报,2001,31(3):230-235.
- [4] 张清丽. 浅谈黑龙江省水稻稻瘟病的发生与防治[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2007,27(3):115-116.
- [5] 卜元卿,孔源,智勇,等. 化学农药对环境的污染及其防控对策建议[J]. 中国农业科技导报,2014,16(2):19-25.
- [6] Durham S. Detectives search for antimicrobial-resistant organisms[J]. Agricultural Research,2005,53(3):18.
- [7] 费有春. 简明农药词典[M]. 北京:化学工业出版社,1985.
- [8] 中国科学院上海药物研究所. 中草药有效成分提取与分离[M]. 上海:上海科学技术出版社,1983.
- [9] 冯俊涛,祝木金,于平儒,等. 西北地区植物源杀菌剂初步筛选[J]. 西北农林科技大学学报,2002,30(6):129-133.
- [10] 黄建等. 三种药剂对烟草黑胫病防治效果研究[J]. 安徽农业科学,2014,42(6):1681-1682.

- [11] 张伟,廖静静,朱贵李,等. 8种植物挥发物和浸提液对三七根腐病菌的抑制活性研究[J]. 中国农学通报,2013,29(30):197-201.
- [12] 杨玉萍,李艾莲. 植物源杀菌剂研究进展[J]. 中国农业科技导报,2006,8(1):49-53.
- [13] 郑雯,张亚玲,辛惠普,等. 水稻稻瘟病菌孢子萌发的化学抑制[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2004,16(4):13-15.
- [14] 雷志清,杨雪梅. 水稻稻瘟病的发生及防治[J]. 现代农业科技,2009(3):56-58.
- [15] 张应焰,尹彩萍,冯骏涛,等. 植物源杀菌剂的研究进展[J]. 西南民族大学学报,2005,31(3):402-409.
- [16] 赵善欢. 植物化学保护[M]. 3版. 北京:中国农业出版社,2000.
- [17] 王法红,曹阳,骆焱平. 21种海南植物粗提物生物活性初步测定[J]. 湖北农业科学,2013,25(8):1829-1832.
- [18] 阎凤鸣. 化学生态学[M]. 北京:科学出版社,2003.
- [19] 邓业成,毕秀莲,杨林林,等. 红树植物苦郎树提取物及其活性成分对植物病原真菌的抑菌活性研究[J]. 湖北农业科学,2012,51(10):2010-2013.