

苦参提取物对茄子黄萎病菌的化感效应研究初报

贾利元¹ 张淑红^{2*} 张恩平² 周宝利²

(¹商丘职业技术学院, 河南商丘 476005; ²沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 辽宁沈阳 110866)

摘 要: 提取苦参主要活性成分黄酮类化合物和生物碱, 分别测定其抑菌活性; 并通过苦参提取物对茄子黄萎病菌菌丝干质量、菌丝毒素含量与胞外酶活性的影响来分析其化感抑制作用机理。结果表明: 经过抑菌活性测定, 对茄子黄萎病菌具有化感抑制作用的苦参活性成分主要是黄酮类化合物。在苦参黄酮类化合物浓度为 $4.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 7 d 时抑菌率达 100.00%, 培养 9 d 时抑菌率为 98.28%, 与其他处理差异均达显著水平; 培养 12 d 时, 苦参黄酮类化合物浓度大于 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的抑菌率还维持在 90% 左右。苦参生物碱处理的抑菌率均低于同浓度的黄酮类化合物处理的抑菌率。经过苦参提取物处理后, 茄子黄萎病菌菌丝干质量随着提取物浓度的增加呈下降的趋势, 菌丝毒素含量也随之下降, 同时胞外酶活性降低。在苦参提取物浓度大于 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 抑制作用均与对照差异达显著水平。苦参提取物通过降低茄子黄萎病菌胞外酶活性、菌丝毒素含量, 从而达到对菌丝生长的化感抑制作用, 主要表现为菌丝干质量的降低。

关键词: 苦参提取物; 茄子黄萎病菌; 化感效应

中图分类号: S436.411 文献标识码: A 文章编号: 1000-6346 (2012) 04-0043-05

Preliminary Studies about Allelopathic Effect of *Sophora flavescens* Extracts on *Verticillium dahliae* of Eggplant

JIA Li-yuan¹, ZHANG Shu-hong^{2*}, ZHANG En-ping², ZHOU Bao-li²

(¹Shangqiu Professional Technology College, Shangqiu 476005, Henan, China; ²Key Laboratory of Protected Horticulture Co-established by Liaoning Province and Ministry of Education, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, Liaoning, China)

Abstract: The main active substance extracted from *Sophora flavescens* is flavonoids and alkaloids, determine the inhibitory, study the effect of extracts on mycelium dry weight, toxin contents and the activities of extracellular enzymes, analyze allelopathic inhibition mechanism. Extracts of *S. flavescens* showed inhibitory effects on *Verticillium dahliae* allelopathically owing to its active substances flavonoids and alkaloids. The inhibitory rate is 100.00% 7 days and 98.28% 9 days after treatment with concentration $4.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ flavonoids, the inhibitory rate remained about 90% on the 12th day with the concentration $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ flavonoids. Lower inhibitory rate was found when treated with the same concentration of alkaloids. The mycelium dry weight, toxin contents and the activities of extracellular enzymes decreased

收稿日期: 2011-07-18; 接受日期: 2011-10-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (307714692), 沈阳农业大学校青年基金项目 (20070213), 辽宁省教育厅资助项目 (2008637)

作者简介: 贾利元, 副教授, 专业方向: 蔬菜栽培与生理, E-mail: sqzyjly@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 张淑红, 副教授, 专业方向: 蔬菜栽培与生理, E-mail: zhangsh024@163.com

with the increase of *S. flavescentis* extracts concentration. The inhibitory effects were significant compared to the CK with the extract concentration over $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. By reducing the activities of extracellular enzymes and the toxin content, the growth of mycelium was inhibited, mainly expressed as the reduced dry weight of mycelium.

Key words: *Sophora flavescens* extracts; *Verticillium dahliae*; Allelopathic effect

土壤致病菌是引起蔬菜减产的原因之一,连作导致土壤中茄子黄萎病菌的积累,从而引起茄子黄萎病的普遍发生。目前生产中尚无有效的方法来控制该病害的发生(Zhang et al., 2006; Zhou et al., 2007)。植物的化感作用在自然界普遍存在,近年来,国内外学者在植物化感作用方面做了大量研究工作(Muhsin et al., 2001; Chaudhary & Bhansali, 2006),植物对微生物的化感作用备受关注。有些植物的残体经微生物腐解释放的化感物质,能够抑制病原微生物的生长与繁殖(Aryaa et al., 1995; 宋卫国等, 2005; Chaudhary & Bhansali, 2006)。许多研究针对不同的病菌进行了植物材料的抑菌筛选,大量的研究表明,菊科、唇形科、百合科、葫芦科、豆科、十字花科等植物的提取物具有广泛的抑菌作用(李玉平等, 2003; 陆志科和谢碧霞, 2005; 李丽娜等, 2006)。沈阳农业大学园艺学院茄子嫁接栽培与生态防治课题组针对茄子黄萎病菌,对54种植物提取物进行了抑菌筛选,结果表明苦参提取物对茄子黄萎病菌菌丝生长和孢子萌发具有较强的化感抑制作用,并提取了苦参的主要活性成分苦参生物碱和苦参黄酮类化合物(Zhang et al., 2006)。

从天然植物中提取抗菌活性物质的研究目前已有报道,但有关它们的抗菌机理的研究却甚少。从现有的文献资料来看,有的是直接作用于病菌,如抑制孢子萌发、菌丝生长,有的则是间接干扰病菌的代谢过程,影响其结构和功能等(Eksteen et al., 2001; Bowers & Locke, 2002)。许多病菌在入侵植物细胞时产生各种降解多糖的胞外酶,通过酶分解植物细胞壁中的多糖物质,从而使完整的细胞崩溃,进而达到侵染的目的。近年来,国内外的研究主要集中在苦参提取物的抑菌活性上,而抑菌机理的研究甚为薄弱。为进一步探索苦参提取物对茄子黄萎病菌的抑制作用,本试验在已有研究结果的基础上,明确苦参提取物中起化感抑菌作用的主要活性成分是苦参生物碱和苦参黄酮类化合物,并通过这两种成分对茄子黄萎病菌菌丝干质量、菌丝毒素含量与胞外酶活性的影响来分析其化感抑制作用机理,旨在为茄子黄萎病的防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

苦参(*Sophora flavescens*, Ait)购于沈阳农业大学校医院。

茄子黄萎病菌(*Verticillium dahliae*)从沈阳农业大学园艺学院蔬菜试验基地病圃(日光温室)的茄子病株上分离获得,按照柯赫氏法则(Koch's postulate)对其进行分离鉴定。

1.2 苦参活性成分的分离提取

提取:称取苦参50 g,粉碎后按1 V:2 V加入蒸馏水,并加入5 g根际土以接种微生物,在25℃恒温培养箱中腐解15 d,加入80%乙醇(1 V:5 V),超声波(KQ-100DB型超声波数控清洗器)振荡30 min,4 000 r·min⁻¹离心20 min,过滤,滤渣再用60%乙醇提取2次,合并滤液,浓缩后浓缩液放4℃冰箱中保存备用。

黄酮类化合物的分离提取:取上述浓缩液20 mL,经石油醚脱酯后,加入等量乙酸乙酯萃取3次,合并萃取液,减压浓缩,冷冻干燥后得到的黄色粉末即为苦参黄酮类化合物(崔永明

等, 2006)。

苦参总生物碱的分离提取: 取上述浓缩液 20 mL, 减压蒸馏, 除尽乙醇, 膏状物用乙酸乙酯溶解后, 用 2% 盐酸调 pH 为 3, 冰箱放置过夜, 过滤, 取滤液用乙醚反复萃取, 弃去醚层, 合并水层, 用碳酸钠调 pH 为 9, 用等体积的三氯甲烷萃取至无生物碱反应 (用改良碘化铋钾试剂检测, 无桔黄色沉淀出现), 合并三氯甲烷萃取液, 旋转蒸发回收三氯甲烷得到褐色生物碱 (袁静等, 2005)。

1.3 苦参提取物生物活性的测定

1.3.1 抑菌活性的测定 抑菌试验: 将上述分离得到的生物碱和黄酮类化合物溶解, 分别配成母液, 浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。采用含毒介质法, 将生物碱和黄酮类化合物母液分别与 PDA 培养基混合, 配成含有不同浓度 (0.25 、 0.50 、 1.00 、 2.00 、 $4.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 生物碱和黄酮类化合物的培养基; 然后在无菌条件下, 每个培养皿接 1 个活化培养的茄子黄萎病菌菌丝圆片 (直径为 6 mm), 每处理 3 次重复, 以不含苦参提取物的 PDA 培养基作为对照 (CK)。24 °C 下暗培养, 8 d 后用十字交叉法测定菌落直径, 并计算抑菌率。

菌丝干质量测定: 将苦参提取物与马铃薯蔗糖液体培养基混合, 配成含有不同浓度 (1、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 苦参提取物的培养基, 取 80 mL 装入 150 mL 的三角瓶中, 高压灭菌。分别接入两片直径为 6 mm 的黄萎病菌菌盘, 每处理 3 次重复。在 24 °C 下恒温振荡 ($110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 10 d 后, 用无菌滤纸过滤, 半角滤纸上残渣 80 °C 烘干, 得菌丝干质量。

1.3.2 黄萎病菌菌丝毒素含量的测定 将苦参提取物与马铃薯蔗糖液体培养基混合, 配成含有不同浓度 (1、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 苦参提取物的培养基, 取 80 mL 装入 150 mL 的三角瓶中, 高压灭菌。分别接入两片直径为 6 mm 的黄萎病菌菌盘, 每处理 3 次重复。在 24 °C 下恒温振荡 ($110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 培养 10 d 后, 用无菌滤纸过滤, 滤液 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 取其上清液旋转蒸发浓缩至 4 mL, 于 OD=280 nm 处测光密度值 (赵明敏等, 2006)。

1.4 苦参提取物对黄萎病菌胞外酶活性的测定

酶液提取: 将苦参提取物与 PDA 液体培养基混合配成含不同浓度 (1、5、10、20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 苦参提取物的培养基, 取 30 mL 装入 150 mL 的三角瓶中, 高压灭菌。分别接入两片直径为 6 mm 的黄萎病菌菌盘, 每处理 3 次重复。在 24 °C 下恒温振荡培养 14 d 后, 用无菌滤纸过滤, 所得滤液离心 (常温, $110 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 其上清液为粗酶液。测定纤维素酶、半纤维素酶、果胶酶和蛋白酶活性的 OD 值 (沈寿国等, 2005)。

1.5 数据处理

所有数据均采用 SPSS11.5 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 苦参提取物对茄子黄萎病菌的抑菌作用

由表 1 可知, 苦参黄酮类化合物在浓度为 $4.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 7 d 时对茄子黄萎病菌的抑菌率达 100.00%, 浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 7 d 时抑菌率大于 95%; 而苦参生物碱浓度为 $4.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 7 d 时的抑菌率为 69.57%, 与苦参黄酮类化合物在浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 7 d 时的抑菌率相同, 苦参生物碱在浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 7 d 时的抑菌率仅为 8.70%。苦参黄酮类化合物浓度大于 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 9 d 时抑菌率在 93% 以上, 培养 12 d 时的抑菌率还维持在 90% 左右, 具有较强的抑菌效果。而苦参生物碱在浓度为 $4.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 12 d 时抑菌率达到了 73.06%, 但在低浓度 ($0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 条件下的抑菌率还是较低, 仅为 14.08%。

由表 2 可知, 不同浓度的苦参提取物对茄子黄萎病菌菌丝干质量产生不同的抑制作用, 并

且菌丝干质量随苦参提取物浓度增加而逐渐降低。苦参提取物浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 菌丝干质量较低, 为 0.138 g ; 苦参提取物浓度大于 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 菌丝干质量均与对照差异达显著水平, 提取物浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 菌丝干质量与对照差异不显著。

2.2 菌丝毒素含量

毒素是病原物的代谢产物, 对寄主组织有明显的损伤作用, 在植物病害发生、发展过程中具有明显的致病或致毒作用。苦参提取物处理后, 茄子黄萎病菌菌丝毒素含量随着提取物浓度的增加呈降低的趋势, 各浓度处理菌丝毒素含量均与对照差异显著。苦参提取物浓度为 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理的菌丝毒素含量差异不显著 (表 2)。

表 1 苦参提取物对茄子黄萎病菌的抑菌作用

苦参活性成分	浓度	菌丝生长抑制率/%		
	$\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	7 d	9 d	12 d
生物碱	0.25	8.70 e	6.90 d	14.08 e
	0.50	21.74 d	17.24 c	20.20 d
	1.00	26.09 c	24.14 b	40.41 c
	2.00	39.13 b	25.86 b	61.72 b
	4.00	69.57 a	51.72 a	73.06 a
黄酮类化合物	0.25	69.57 e	62.07 d	62.07 d
	0.50	78.26 d	75.86 c	81.63 c
	1.00	95.65 c	93.10 b	89.80 b
	2.00	97.83 b	94.83 b	91.84 b
	4.00	100.00 a	98.28 a	95.92 a

注: 表中同列数据后不同小写字母表示差异显著 ($\alpha=0.05$), 下表同。

表 2 苦参提取物对茄子黄萎病菌菌丝干质量及胞外酶活性的影响

浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	菌丝干质量/g	菌丝毒素 (OD 值)	果胶酶 (OD 值)	半纤维素酶 (OD 值)	纤维素酶 (OD 值)	蛋白酶 (OD 值)
0 (CK)	0.195 a	1.583 a	0.408 a	0.725 a	1.296 a	0.575 a
1	0.193 a	1.419 b	0.377 b	0.731 a	1.275 a	0.466 b
5	0.182 b	1.204 c	0.371 bc	0.725 a	1.264 a	0.458 b
10	0.177 c	1.177 c	0.365 cd	0.693 b	1.183 b	0.441 b
20	0.138 d	0.838 d	0.284 e	0.662 b	1.083 c	0.311 c

2.3 胞外酶活性

4 种胞外酶的活性均随着苦参提取物处理浓度的增加而降低 (表 2)。浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的处理果胶酶活性最低, 与对照差异达显著水平; 而苦参提取物浓度为 1 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 5 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理间的果胶酶 OD 值差异不显著。苦参提取物浓度为 1 、 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的处理半纤维素酶 OD 值与对照差异不显著, 浓度为 10 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的处理与对照差异达显著水平。当苦参提取物浓度低于 $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 纤维素酶 OD 值与对照差异不显著。苦参提取物浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时蛋白酶变化显著, OD 值最低, 与对照差异达显著水平, 1 、 5 、 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理间蛋白酶 OD 值差异不显著。

3 结论与讨论

植物与微生物之间存在着两种化感作用, 一种是促进作用, 连作和轮作条件下茄子根系分泌物对茄子黄萎病原菌有明显的化感促进作用 (Wang et al., 2005); 一种是化感抑制作用, 中国细香葱根系分泌物可抑制假单胞菌引起的番茄枯萎病菌繁殖 (Yu, 1999)。如何利用化感作用的抑制效应进行病虫害的生物防治已经成为研究热点。

本试验结果表明, 对茄子黄萎病菌起化感作用的苦参主要活性成分是黄酮类化合物, 浓度为 $4.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 7 d 对茄子黄萎病菌的抑菌率达 100.00%, 而苦参生物碱在浓度为 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 培养 7 d 的抑菌率仅为 8.70%。当其他条件固定不变时, 随着苦参提取物浓度的提高, 茄子黄萎病菌分泌的果胶酶活性随之越低, 纤维素酶和蛋白酶的活性均有降低趋势, 而半纤维素酶活性变化不明显。本试验仅针对苦参生物碱和黄酮类化合物进行了初步的抑菌试验及抑菌机理的研究, 在明确了起主要起抑菌作用的是黄酮类化合物的基础上, 后续的试验应集中在黄酮

类化合物的分离、田间抑菌效果及机理的研究。

参考文献

- 崔永明, 余龙江, 敖明章, 杨英, 胡菁. 2006. 甘草总黄酮的提取技术及其抑菌活性研究. 中药材, 29 (8): 838-840.
- 李丽娜, 纪明山, 李艳丽, 杨春喜, 宿宗艳. 2006. 4种植物提取物对植物病原菌的抑菌作用. 农药, 45 (1): 61-63.
- 李玉平, 冯俊涛, 邵红军, 祝木金, 慕小倩, 张兴. 2003. 25种菊科植物提取物对3种植物病原菌的药效试验. 西北农林科技大学学报, 31 (4): 123-126.
- 陆志科, 谢碧霞. 2005. 不同种竹叶的化学成分及其提取物抗菌活性的研究. 西北林学院学报, 20 (1): 49-52.
- 沈寿国, 石志琦, 徐朗莱, 范永坚. 2005. 蛇床子素对小麦赤霉病菌葡萄糖钙吸收和三磷酸腺酶活性的抑制. 农药学报, 7 (2): 135-139.
- 宋卫国, 李宝聚, 石延霞, 刘开启. 2005. 大蒜提取物抑制番茄灰霉病菌活性测定. 中国蔬菜, (8): 21-22.
- 袁静, 关丽杰, 丛斌, 张宗俭, 王力钟. 2005. 苦参生物碱抑菌生物活性测定. 农药, 44 (2): 86-89.
- 赵明敏, 刘正坪, 霍秀文. 2006. 利用病原真菌毒素离体筛选茄子抗黄萎病突变体的研究. 华北农学报, 21 (1): 92-95.
- Arya T, Chunhanr H, Arya S. 1995. Effect of allicin and extracts of garlic and bignonia on two fungi. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 25 (3): 316-318.
- Bowers J H, Locke J C. 2002. Effect of botanical extracts in combination with biocontrol organisms on control of Fusarium wilt of muskmelon. Phytopathology, 90: 1142-1150.
- Chaudhary B L, Bhansali E. 2006. Allelopathic effects of *Lantana camara* L. extract on spore germination of *Physcomitrium japonicum* (Hedw.) Mitt. Allelopathy Journal, 17: 265-272.
- Eksteen D, Pretorius J C, Nieuwoudt T D, Zietsman P C. 2001. Mycelial growth inhibition of plant pathogenic fungi by extracts of south African plant species. Annals of Applied Biology, 139: 243-249.
- Muhsin T M, Al-Zubaidy S R, Ali E T. 2001. Effect of garlic bulb extract on the growth and enzymatic activities of rhizosphere and rhizoplane fungi. Mycopathologia, 152: 143-146.
- Wang R H, Zhou B L, Zhang F L. 2005. Allelopathic effects of root extracts on Verticillium wilt. Allelopathy Journal, 15: 75-84.
- Zhou X, Zhou B L, Li Z W, Dong C F. 2007. Inhibitory and preventive effects of plants extracts against *Verticillium dahliae*. Allelopathy Journal, 20: 145-156.
- Zhang S H, Zhou B L, Zhang L, Fu Y W. 2006. Inhibitory effects of natural plant extracts on *Verticillium albo-atrum*. Chinese Journal of Applied Ecology, 17 (6): 1137-1140.
- Yu J Q. 1999. Allelopathic suppression of pseudomonas solanacearum infection of tomato (*Lycopersicon esculentum*) in a tomato-Chinese chive (*Allium tuberosum*) intercropping system. Journal of Chemical Ecology, 25: 2409-2417.

《中国蔬菜》参考文献著录格式

著录采用著者-出版年编码制, 按 GB/T 7714—2005 要求列出各项, 文献的作者全部著录, 一律姓在前, 名在后。西文或俄文等作者姓的首字母大写, 名可缩写为首字母(大写)。如为译文, 则作者处著录原作者姓名, 译者姓名置于题名或书名之后。专著的出版地不详时要注明“〔出版地不详〕”或“〔S. l.〕”; 出版者不详时应注明“〔出版者不详〕”或“〔s. n.〕”, 但不能同时出现。页码应著录引文所在的起止页码。

期刊的著录格式: 王玉峰. 2007. VA 菌根真菌在马铃薯上的应用效果. 中国蔬菜, (2): 30-31.

van Doorn W G. 2003. Flower opening and closure: a review. Journal of Experimental Botany, 54: 1801-1812.

专著的著录格式: Krumbein A, Schonhof I. 2001. Influence of temperature and irradiation on glucosinolates in broccoli heads//Pfannhauser W, Fenwick G R, Khokhar S. Biologically-active phytochemicals in food. Cambridge: Royal Society of Chemistry: 477-479.

论文集的著录格式: Restaino F, Perrone D, Correale A. 1998. New parthenocarpic genotypes of eggplant suitable for greenhouse cultivation//Palloix A, Daunay M C. Xth Meeting on Genetics and Breeding of Capsicum and Eggplant. Paris: INRA Paris: 273.

学位论文的著录格式: 陈新娟. 2006. 中国芸薹属蔬菜硫代葡萄糖苷及其影响因子研究〔博士论文〕. 杭州: 浙江大学.