

· 研究论文 ·

蛇床子素对植物病原真菌抑制机制的初步研究

石志琦¹, 沈寿国², 徐朗莱², 范永坚^{1*}

(1. 江苏省农业科学院 植物保护研究所, 江苏 南京 210014;

2. 南京农业大学 生命科学学院, 江苏 南京 210095)

摘要:天然化合物蛇床子素(osthol)对草坪纹枯病菌*Rhizoctonia solani*、芒果炭疽病菌*Colletotrichum musae*、苹果叶枯病菌*Rhizoctonia solani*、辣椒疫霉病菌*Phytophthora capsici*、辣椒炭疽(红)病菌*Collectotrum gloesporioides*、番茄灰霉病菌*Botrytis cinerea* Pers.、油菜菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*、小麦赤霉病菌*Fusarium graminearum*、苹果轮纹病菌*Macrophoma kawatsukai*、水稻稻瘟病菌*Pyricularia grisea*、西瓜枯萎病菌*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*、棉花枯萎病菌*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*、棉花黄萎病菌*Verticillium dahliae*等有不同的抑制活性,对大多数病菌其抑制中浓度(EC₅₀值)在21.15~61.62 μg/mL之间。以小麦赤霉病菌为研究对象,结果表明50 μg/mL蛇床子素对其孢子萌发有显著的抑制作用;100 μg/mL蛇床子素处理24 h后,菌丝大量断裂,可溶性蛋白含量增加,菌体葡萄糖含量呈“V”型变化,几丁质水解酶活性和几丁糖含量均高于对照。

关键词:蛇床子素;植物病原真菌;抑菌机制

中图分类号: S432; S482.292

文献标识码: A

文章编号: 1008-7303(2004)04-0028-05

Inhibition Mechanism of Osthol to Plant Fungus Pathogens

SHI Zhì-qí¹, SHEN Shou-guo², XU Lang-lai², FAN Yong-jian^{1*}

(1. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China;

2. Department of Biology Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Natural compound osthol has been proved to have a wide spectrum of fungi inhibition including *Rhizoctonia solani*, *Colletotrichum musae*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Collectotrum gloesporioides*, *Botrytis cinerea* Pers., *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium graminearum*, *Macrophoma kawatsukai*, with the value of EC₅₀ ranged from 21.15 μg/mL to 61.62 μg/mL to some fungi. *F. graminearum* was used to research the inhibition mechanism of osthol, the results showed 50 μg/mL osthol could inhibit the germination of its spores evidently. After treatment of osthol for 24 h, the hyphae of this fungus growing in aliquous culture came into large mounts of fragments. Glucose content decreased firstly and then increased to the level of control. Soluble proteins, chitin content and chitinase activity were higher than that of control.

Key words: osthol; plant fungus pathogen; inhibition mechanism

天然化合物蛇床子素是从伞形花科植物蛇床子、欧前胡等中提取,其化学名称为8-(3-甲基-2-丁

烯基)甲醚噁形酮,属于香豆素类化合物。该类化合物目前主要在医学上研究较多^[1]。Stadler等曾经报

收稿日期: 2003-09-08; 修回日期: 2004-07-10

作者简介: 范永坚(1956-),男,江苏无锡人,博士,研究员,主要从事植物病理学和生物农药研究

*通讯作者: 联系电话: 025-84391999; E-mail: fanyj3239@yahoo.com

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(BK2002-128);江苏省“十五”科技攻关项目(BE2001-328)。

道过蛇床子素对细菌和真菌具有强烈的抑制作用^[2]。Shukla 等报道该化合物对 *Alternaria alternata*、*Aspergillus* sp. 和 *Cryptococcus neoformans* 具有抑制作用^[3]。Beier 和 Oertli 报道这类化合物可作为植物毒素来减轻植物受感染程度, 甚至可以阻止病原物在植物体内繁殖^[4]。笔者在离体条件下研究了蛇床子素对植物病原真菌的抑制作用, 对其抑菌机制进行了初步探讨, 旨在为其作为生物农药应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及试剂

供试菌株: 草坪纹枯病菌 *Rhizoctonia solani*、芒果炭疽病菌 *Colletotrichum musae*、苹果叶枯病菌 *Rhizoctonia solani*、辣椒疫霉病菌 *Phytophthora capsici*、辣椒炭疽(红)病菌 *Collectotrum gloesporioides*、番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* Pers.、油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum*、小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*、苹果轮纹病菌 *Macrophoma kawatsukai*、烟草赤星病菌 *Alternaria alternata*、西瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*、棉花枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *vesinfectum*、棉花黄萎病菌 *Verticillium dahliae*、水稻稻瘟病菌 *Pyricularia grisea*, 均由江苏省农科院植物保护研究所保存。

菌碟: 生长在 PDA 平板上的小麦赤霉病菌于 25 °C 培养 3 d 后, 打取直径 5 mm 的菌碟。

试剂: 蛇床子素 (osthol) (中国药品生物制品检定所产品), 纯度为 99.5%; 考马斯亮蓝 G-250 (南京生物技术有限公司产品); 对-N,N-二甲基氨基苯甲醛 (DMAB) (上海三爱思有限公司产品); 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) (南京农业大学生物化学教研组胡琼英老师赠送); 几丁质和三羟甲基氨基甲烷 (Tris) [中国医药(集团)上海化学试剂公司产品]。

1.2 抑菌谱测定

采用菌落直径离体测定法^[5]。将菌株活化, 在接近边缘生长一致处打取直径为 6 mm 的菌碟, 分别接入含蛇床子素浓度为 0.6、2.5、12.5、25、50、100 μg/mL 的 PDA 平板中央, 培养观察, 量取菌落直径, 计算抑制中浓度和毒力方程。

1.3 蛇床子素对小麦赤霉病菌生长的影响

取菌碟分别接入浓度为 0.6、2.5、12.5、25、50、100 μg/mL 蛇床子素的 PDA 平板, 25 °C 培养观察。

每处理重复 3 次。

1.4 蛇床子素对小麦赤霉病菌孢子萌发的影响

取菌碟接入 6% 的绿豆汤培养基中, 在 25 °C、140 r/min 条件下培养 5 d 产孢, 纱布过滤, 4 000 r/min 离心, 取其沉淀用适量的水悬浮得到孢子。分别加入蛇床子素, 使其终浓度为 0.6、2.5、12.5、25、50、100 μg/mL, 分别于 1、3、6、12、24 h 用水稀释观察, 每视野孢子数达 30~40 个。

1.5 蛇床子素处理后小麦赤霉病菌生理指标的测定

1.5.1 菌丝粗提液制备 取一块直径为 5 mm 的菌碟接入 50 mL 查氏培养基中, 140 r/min、25 °C 培养 72 h, 加入蛇床子素至终浓度为 100 μg/mL 处理, 每个处理重复 3 次。在处理 1、3、6、12、24 h 观察菌丝形态并过滤收集菌丝, 用滤纸吸干, 于 -20 °C 贮存备用。称取 0.4 g 菌丝, 加入 2 mL Tris-HCl (0.05 mol/L, pH=7.5), 冰浴研磨, 15 000 g、4 °C 离心, 取上清液于 -20 °C 贮存备用。

1.5.2 可溶性蛋白含量的测定^[6] 取 1.5.1 中制备的菌体上清液 0.1 mL, 稀释 10 倍, 取稀释液 0.1 mL, 加入 3 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液, 静置 5 min, 于波长 595 nm 处测定其 OD 值。

1.5.3 还原性糖含量测定^[7] 取 1.5.1 制备的上清液 0.1 mL, 加 2 mL DNS, 沸水浴 5 min, 冷却, 以蒸馏水定容至 25 mL, 于波长 540 nm 处测定其 OD 值。

1.5.4 几丁糖含量的测定^[8] 取 1.5.1 制备的菌体上清液 0.2 mL, 加 0.1 mL 硼酸钾 (0.8 mol/L), 沸水浴 3 min, 冷却, 加 3 mL 质量分数为 1% 的 DMAB, 36 °C 保温 20 min, 冷却, 于波长 544 nm 处测定其 OD 值。

1.5.5 酶活性的测定^[8] 取 1.5.1 制备的菌体上清液 0.2 mL, 加胶状几丁质 0.2 mL, 37 °C 保温 1 h, 煮沸 5 min 灭活。对照先煮沸 5 min 灭活。5 000 r/min 离心 10 min, 取上清液 0.2 mL, 加 0.1 mL 硼酸钾 (0.8 mol/L), 沸水浴中加热 3 min, 冷却, 加 3 mL 1% 的 DMAB, 36 °C 保温 20 min, 冷却, 于波长 544 nm 测定其 OD 值。以反应前后灭活吸光度之差表示几丁质酶活性。

2 结果与分析

2.1 蛇床子素对几种植物病原真菌的离体抑制效果 蛇床子素对真菌的抑制结果见表 1。其对草坪纹

Table 1 Inhibition of osthol to plant pathogens

Pathogens(Chinese name)	Toxic regression equation	Median effective content EC ₅₀ (95% CL) / μg · mL ⁻¹
<i>R. solani</i> (草坪纹枯病菌)	$Y = 17.53x - 3.499$	21.15 ± 9.32
<i>C. m usae</i> (芒果炭疽病菌)	$Y = 12.38x + 10.84$	23.63 ± 10.47
<i>R. solani</i> (苹果叶枯病菌)	$Y = 6.85x + 27.49$	26.84 ± 14.33
<i>P. capsici</i> (辣椒疫霉病菌)	$Y = 10.11x + 13.06$	39.94 ± 13.47
<i>C. gloesporioides</i> [辣椒炭疽(红)病菌]	$Y = 10.37x + 11.64$	41.34 ± 7.69
<i>B. cinerea</i> Pers (番茄灰霉病菌)	$Y = 12.61x + 2.95$	41.76 ± 9.32
<i>S. sclerotiorum</i> (油菜菌核病菌)	$Y = 13.43x + 11.61$	43.33 ± 10.24
<i>F. graminearum</i> (小麦赤霉病菌)	$Y = 17.80x - 21.96$	56.94 ± 8.21
<i>M. karatsukai</i> (苹果轮纹病菌)	$Y = 14.09x - 8.63$	61.61 ± 7.63
<i>A. alternata</i> (烟草赤星病菌)	$Y = 5.77x + 15.01$	428.4 ± 35.6
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> (西瓜枯萎病菌)	$Y = 11.06x + 9.24$	39.82 ± 12.41
<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>vasinfectum</i> (棉花枯萎病菌)	$Y = 5.90x + 27.04$	46.59 ± 13.67
<i>Verticillium dahliae</i> (棉花黄萎病菌)	$Y = 7.79x + 8.06$	218.00 ± 31.69
<i>Pyricularia grisea</i> (水稻稻瘟病菌)	$Y = 10.07x + 11.58$	453.09 ± 47.32

枯病菌、芒果炭疽病菌、苹果叶枯病菌的离体抑菌活性较高, EC₅₀值为20 μg/mL 左右; 对辣椒疫霉病菌、辣椒炭疽(红)病菌、番茄灰霉病菌、油菜菌核病菌等的抑制效果也较好, 其EC₅₀值为40 μg/mL 左右; 而对烟草赤星病菌和水稻稻瘟病菌活性很低。

2.2 蛇床子素对小麦赤霉病菌生长的抑制

蛇床子素对小麦赤霉病菌菌丝径向生长有抑制作用, 减少菌丝对平板的附着(图1), 且抑制小麦赤霉病菌菌丝顶端生长, 分枝增加(图2)。液体培养下以100 μg/mL 蛇床子素处理24 h 时, 菌丝大量断裂(图3), 表明蛇床子素可能影响到其细胞壁的生长。

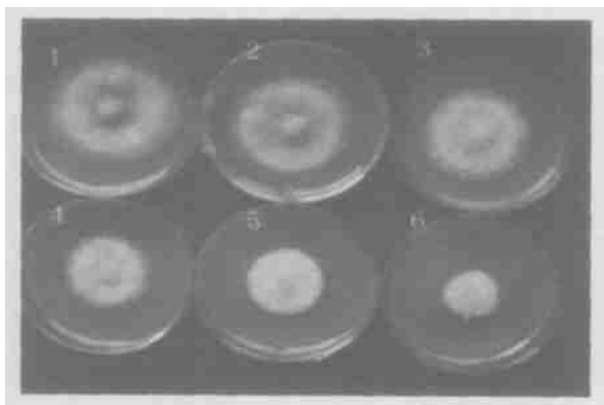


Fig 1 Inhibition of osthol to growth of hyphae of *F. graminearum*

Note: 1~ 6 were 0, 6, 25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL, respectively

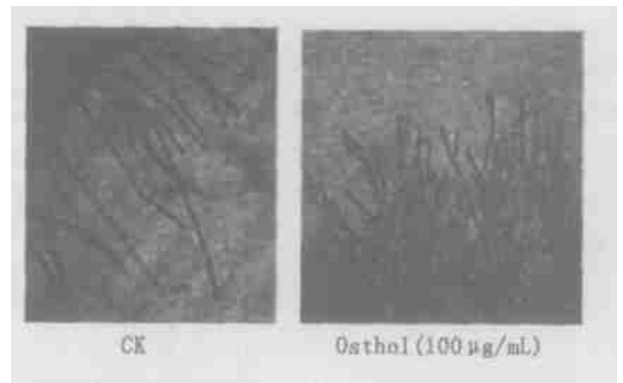


Fig 2 Inhibition of osthol to hyphae morphology of *F. graminearum*

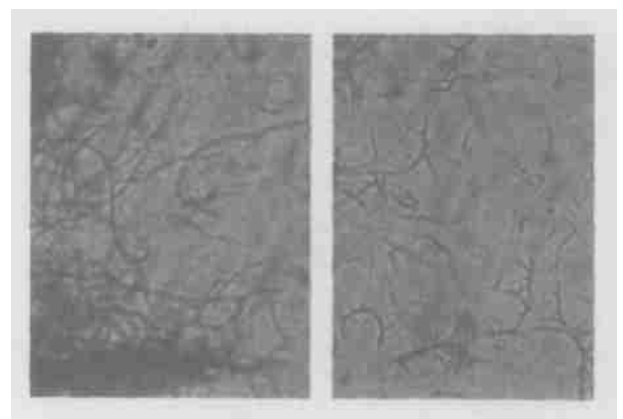


Fig 3 Inhibition of osthol to morphology of fate of *F. graminearum* hyphae

2.3 蛇床子素对小麦赤霉病菌孢子萌发的影响

蛇床子素对小麦赤霉病菌孢子萌发有显著抑制作用, 抑制芽管伸长。抑制率与浓度成正比, 当蛇床子素浓度达到 50 $\mu\text{g/mL}$ 时, 孢子不萌发(图4)。

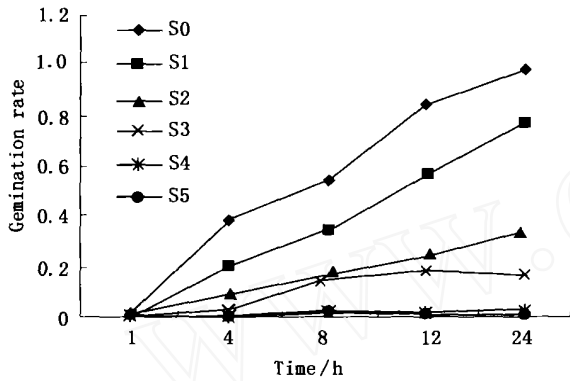


Fig 4 Inhibition of osthol to gemination of Fusarium spores

S0~ S5 were 0, 6, 25, 12, 5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$, respectively

2.4 蛇床子素对小麦赤霉病菌可溶性蛋白含量、还原糖含量、几丁糖含量及几丁质酶活性的影响

蛇床子素处理后小麦赤霉病菌可溶性蛋白含量高于对照(图5), 可能是蛇床子素提高了蛋白质水解酶活性的原因。

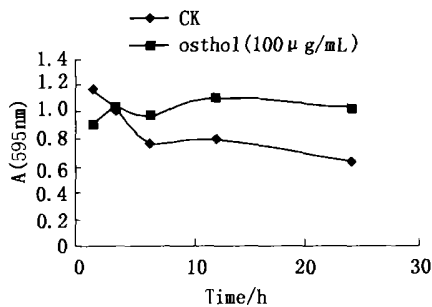


Fig 5 Change of soluble protein content by treatment of osthol to *F. graminearum*

还原糖(胞质中主要为葡萄糖)含量在蛇床子素处理的前3 h 内急剧下降, 在 3 h 时达到最低, 然后逐渐上升至对照水平(图6)。

处理后菌体内几丁质酶活性、几丁糖含量均高于对照(图7, 图8), 表明蛇床子素可能有抑制病菌吸收葡萄糖的功能。此时, 菌体几丁质水解酶活性开始升高, 可能此时开始利用自身细胞壁水解所产生的葡萄糖供其生长, 表现为处理前期菌体葡萄糖含量降低, 而后升高的变化趋势。

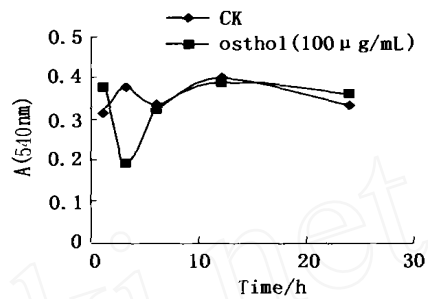


Fig 6 The change of glucose content by treatment of osthol to *F. graminearum*

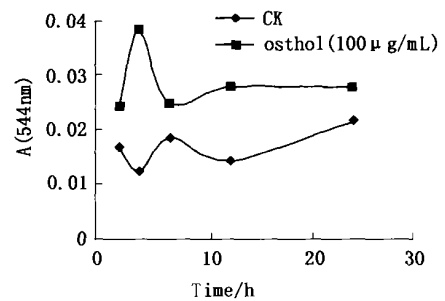


Fig 7 The change of chitinase activity by treatment of osthol to *F. graminearum*

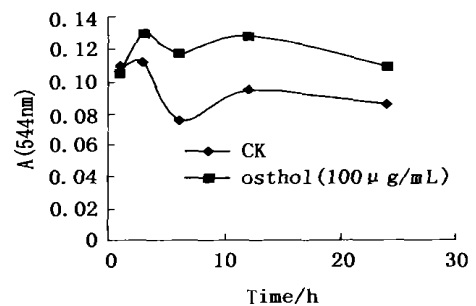


Fig 8 The change of chitin content after treatment osthol to *F. graminearum*

3 讨论

蛇床子作为中国传统中草药, 具有广泛的药理活性。中药活性成分研究表明, 蛇床子素具有消炎、抗菌、杀虫的作用, 对人体具有抗心率失调、扩张血管、降血压作用^[1]。笔者研究了离体条件下蛇床子素对植物病原真菌的抑制作用, 并对其抑菌机制作了初步探讨。结果表明, 蛇床子素有着较广谱的抑菌活性, 且对辣椒疫霉病菌(细胞壁主要成分为纤维素)和小麦赤霉病菌(细胞壁主要成分为几丁质)均有显著的抑制作用。与其相比, 一般杀菌剂对卵菌纲真菌

不表现活性,表明蛇床子素可能有着更广泛的应用前景。

研究表明蛇床子素具有阻断 Na^+ 、 Ca^{2+} 内流的作用^[1],而 Na^+ 和葡萄糖在人体内吸收为共转运关系^[9]。1996年,Moniello等报道香豆素能减少真菌对纤维素的附着能力,同时能抑制 $N. f. frontalis$ 对葡萄糖的吸收^[10]。本研究结果显示,用蛇床子素处理小麦赤霉病菌初期其葡萄糖含量下降,可能是由于蛇床子素阻断了 Na^+ 内流,从而阻止了对葡萄糖的吸收。

Bruno等研究表明,墨绿霉 $Trichodema atroviride$ 在葡萄糖饥饿时引起了细胞壁水解酶活性的升高,并引起了相关细胞壁水解酶基因的表达^[11]。本研究用蛇床子素处理小麦赤霉病菌,处理前期菌体内葡萄糖的含量下降而几丁质酶活性升高,3h后其葡萄糖含量又逐渐升高至对照,几丁质酶活性和几丁糖含量也均高于对照。由此认为,蛇床子素处理造成了真菌菌体糖饥饿,引起相关细胞壁水解酶的表达,如几丁质酶活性和蛋白质水解酶活性的升高,而几丁质酶活性升高导致处理后期葡萄糖含量升高,蛋白质水解酶活性增强的结果则使得可溶性蛋白含量升高。

参考文献:

- [1] LI Le (李乐), ZHUANG Fei'er (庄斐尔), ZHAO Geng-sheng (赵更生). 蛇床子素对大鼠离体子宫平滑肌收缩性能的影响[J], *J Xi'an Medical University* (西安医科大学学报), 1994, 15(2): 108-112
- [2] Stadler E, Buser H R. Defense chemicals in leaf surface wax synergistically stimulate oviposition by a phytophagous insect[J] *Experientia*, 1984, 40(10): 1157-1159
- [3] Shukla Y N, Srivastava A. Phytotoxic and antimicrobial

constituents of *A. rgyreia speciosa* and *Oenothera biennes* [J] *Ethnopharm*, 1986, 67: 241-245

- [4] Beier R C, Oertli E H. Psoralen and other linear furanocoumarins as phytoalexins in celery (*Apium graveolens*) [J] *Phytochemistry*, 1983, 22: 2595-2597.
- [5] FANG Zhong-da (方中达). Plant Pathogen Method (Third edition) [植病研究方法(第三版)] [M] Beijing (北京): China Agriculture Press (中国农业出版社), 1998 404-407.
- [6] ZHANG Long-xiang (张龙翔), ZHANG Ting-fang (张庭芳), LI Ling-yuan (李令媛). Biochemistry Techniques and Methods (生物化学研究技术, 第二版) [M] Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社), 1997. 1-2
- [7] LIU De-hai (刘德海), YANG Yu-hua (杨玉华). 纤维素酶酶活的测定方法[J] *China Feed* (中国饲料), 2002, 17: 27-28
- [8] GU Xiang-yang (顾向阳), HU Zheng-jia (胡正嘉). 一种测定土壤几丁质酶活性的方法[J] *Chin J Soil Sci* (土壤通报), 1994, 25(6): 284-285
- [9] SHEN Tong (沈同), WANG Jing-yan (王镜岩). Basic Biochemistry (Second edition) [基础生物化学(第二版)] [M] Beijing (北京): Higher Education Press (高等教育出版社), 1991 29-30
- [10] Moniello G, Richardson A J. Effect of coumarin and sparteine on attachment to cellulose and cellulolysis by *neocallimastix frontalis* [J] *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62: 4666-4668
- [11] Bruno G B, Donzelli G. Interaction of ammonium, glucose, and chitin regulates the expression of cell wall-degrading enzymes in *Trichodema atroviride* strain P1 [J] *Appl and Environ*, 2001, 67 (12): 5643-5647.

(责任编辑: 金淑惠)