

黄连提取物对植物病原真菌抑制作用及机理初探

张驰翔, 王 周, 朱奇奇, 蒲 博, 焦士蓉*

西华大学生物工程学院, 成都 610039

摘要: 为研究黄连提取物对植物病原真菌抑制作用, 采用平板生长速率法初筛抑菌活性, 以二倍稀释平板生长速率法测定物质协同抑菌活性, 对五种常见植物病原真菌小麦赤霉、玉米小斑、水稻纹枯、番茄灰霉、油菜菌核的抑制率分别为: 93.39%、96.89%、70.92%、100%、91.22%。以孢子萌发的抑制作用、菌丝形态、细胞膜的通透性对抑菌机理进行了初步研究。

关键词: 黄连; 抑菌活性; 机理

中图分类号: Q939.96

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.07.020

Inhibitory Effects and Mechanism of *Coptis chinensis* Extract Against Plant Pathogenic Fungi

ZHANG Chi-xiang, WANG Zhou, ZHU Qi-qi, PU bo, JIAO Si-rong*

School of Bioengineering, Xihua University, Sichuan Chengdu 610039, China

Abstract: The antifungal activity of the extract of *Coptis chinensis* against *Gibberella zeae*, *Helminthosporium maydis*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis Cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum* was determined by the plate growth rate method. The synergistic effects of extracts were tested using double dilution plate method. The results showed that the inhibition rates of *C. chinensis* extract against *G. zeae*, *H. maydis*, *R. solani*, *B. Cinerea* and *S. sclerotiorum* were 93.39%, 96.89%, 70.92%, 100% and 91.22% respectively. Meanwhile, its action mechanism was studied by means of spore germination inhibition, mycelial morphology and cell membrane permeability.

Key words: *Coptis chinensis*; antifungal activity; mechanism

黄连 (*C. chinensis*) 是常见的抗菌消炎中药, 临床上长期用于抗肠道细菌感染、降热镇痛。现代医学证明, 其特殊的药理性质主要与其根茎中所含生物碱相关, 其中主要包括小檗碱、黄连碱、巴马汀、药根碱^[1], 其分子结构均属异喹啉生物碱。关于黄连提取物中主要成分生物碱的抑制细菌实验, 其中小檗碱的抑菌活性最大, 黄连碱和巴马汀次之, 药根碱最小^[2]。4种黄连生物碱对革兰氏阳性菌的抑制活性大于革兰氏阴性菌和酵母菌。为开发新型真菌抑制剂提供方向。

植物病原真菌是引起农作物病害的主要原因, 是农业生产中重大的问题, 因此选取五种常见的植物病原真菌小麦赤霉菌、水稻立枯丝病菌、玉米小斑病菌、番茄灰霉菌和油菜菌核病菌为实验对象。本

文主要对黄连提取物抑制真菌作用进行了测定, 并对其抑制机理进行了初步探究。

1 仪器与材料

DHG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱, HH-S 型数显恒温水浴锅, 旋转蒸发仪 RE-52B, SHZ-D(II) 循环水式真空泵, TB-214 型电子天平, FDU-1100 冷冻干燥机, 超低温冰箱 Heto Ultra Freeze MF 3410, DL-1 万能电炉, YJ-875 医用净化工作台, 自动台式灭菌器, SGSP-02 电热恒温隔水式培养箱, 万能视频成像装置(成都励扬精密机电有限公司), UV-2600 型紫外可见分光光度计等。

分析纯葡萄糖(成都市科龙化工试剂厂), 琼脂粉(成都市科龙化工试剂厂), 硫酸链霉素原药(Amresco. 0382)。

小麦赤霉菌(*Gibberella zeae*, 子囊菌亚门, ACCC 编号: 31053), 水稻立枯丝病菌(*Rhizoctonia solani*, 半知菌亚门, ACCC 编号: 30374), 玉米小斑病菌

收稿日期: 2014-11-24 接受日期: 2015-02-02

基金项目: 教育部春晖计划(12205543); 西华大学研究生创新基金(YCJJ2014100); 西华大学省级重点实验室开放研究基金(SZjj2014-009)

* 通讯作者 E-mail: jsrong2004@163.com

(*Helminthosporium maydis*, 半知菌亚门, ACCC 编号: 30138), 番茄灰霉菌 (*Botrytis cinerea*, 半知菌亚门, ACCC 编号: 30387), 油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*, 子囊菌亚门, ACCC 编号: 36169), 菌种均购自中国农业微生物菌种保藏。

西华大学生物工程学院提供黄连提取物成品 (小檗碱 $\geq 19.09\%$, 巴马汀 $\geq 4.90\%$, 药根碱 $\geq 2.79\%$)。

2 实验方法

2.1 平板生长速率法

将黄连提取物溶解于无菌水中 (浓度为 50 mg/mL 溶液), 采用平板生长速率法, 在无菌条件下接入含毒培养基和对照培养基的中心, 适宜温度下分别恒温培养一段时间后采用十字交叉法测量菌落直径取其平均值^[3,4]。通过以下公式计算其相对抑菌率:

$$\text{相对抑制率}(\%) = \frac{\text{对照菌落的平均直径} - \text{处理菌落的平均直径}}{\text{对照菌落的平均直径}} \times 100\%$$

2.2 二倍稀释平板生长速率法

初筛后抑菌活性达 90% 以上的菌株, 采用二倍稀释法, 重复处理 3 次, 按照 2.1 方法培养一段时间测量菌落直径取其平均值。通过以下公式计算其相对抑菌率, 再根据几率值分析法, 采用 SPSS 软件计算 EC_{50} 值及其置信区间并求出相关系数和回归方程。

$$\text{相对抑制率}(\%) = \frac{\text{对照菌落的平均直径} - \text{处理菌落的平均直径}}{\text{对照菌落的平均直径}} \times 100\%$$

2.3 孢子形成的抑制作用测定方法

将抑菌稳定性实验中培养 6 d 的各处理和对照组, 用 $\Phi = 6.0$ mm 打孔器于距菌落边缘 3~4 mm 处打取菌块, 用无菌水将菌块上的孢子洗下, 血球计数板在光学显微镜下直接计孢子数, 每块菌重复 3 次。用下列公式计算形成孢子数量及对孢子形成的抑制率^[5]:

$$\text{孢子数}(\text{个/块}) = \text{孢子平均数} \times 500 \quad \text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照孢子数} - \text{处理孢子数}}{\text{对照孢子数}} \times 100\%$$

2.4 孢子萌发的抑制作用测定方法

采用凹玻片培养法^[6], 室温下培养。孢子萌发

以芽管的长度超过孢子的直径长度的一半为准, 每两小时计数一次, 直至阴性对照萌发率达到 50% 以上, 每个片选 3 个视野计数, 最后 9 个观察数据平均作为试验数据。用下列公式计算孢子萌发抑制率, 计算出毒力回归方程式、 EC_{50} 及相关系数。

$$\text{孢子萌发率}(\%) = \frac{\text{萌发孢子数}}{\text{检查的孢子总数}} \times 100\%$$

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}} \times 100\%$$

2.5 对菌丝形态的影响

将培养的各处理和对照菌落, 在恒温培养 6 d 后, 用拨针挑取病原菌菌落边缘的菌丝体和正常菌丝体制成玻片标本, 在显微镜下观察病原菌菌丝形态^[7]。

2.6 对菌丝形态的影响

2.6.1 电导率的测定方法

将菌种接种在 PDA 培养基上培养 4 d, 用直径 6 mm 的打孔器沿菌落边缘打取菌饼, 移入 PDB 培养基内, 120 rpm 振荡培养 5 d。然后将培养液抽滤, 菌丝用生理盐水冲洗干净, 备用。称取 2 g 菌丝放入 50 mL 烧杯中, 使用无菌去离子水清洗 3 次。加入 20 mL 去离子水和供试提取液, 使药液呈浓度梯度。然后分别在 0、5、15、30、60、90 和 120 min 时测定电导率, 重复 3 次^[8]。

2.6.2 总多糖的测定

总多糖采用蒽酮比色法测定, 参考钟芳晓^[9]的实验方法。

2.6.3 总蛋白质的测定

蛋白质的测定采用考马斯亮蓝 G250 染色法^[10]。

3 结果与讨论

3.1 黄连提取物抑菌实验结果

3.1.1 提取物抑菌初筛

按照 2.1 实验方法, 以多菌灵为参考组进行抑菌实验, 结果见下表 1。

从上表可知, 黄连提取物对于小麦赤霉菌、玉米小斑菌、番茄灰霉菌、油菜菌核菌四种真菌具有较好的抑制率。

3.1.2 提取物抑菌稳定性

按照 2.2 实验方法进一步筛选, 测定其稳定性, 结果见下表 2。

表1 抑菌实验初筛

Table 1 Preliminary screening of antifungal activity

菌种 Fungus	提取物 Extract (%)	多菌灵 Carbendazim (%)
小麦赤霉菌 <i>G. zeae</i>	93.39	100
玉米小斑菌 <i>H. maydis</i>	96.89	70.8
水稻纹枯菌 <i>R. solani</i>	70.92	100
番茄灰霉菌 <i>B. cinerea</i>	100	75.6
油菜菌核菌 <i>S. sclerotiorum</i>	91.22	94.1

表2 抑菌实验稳定性

Table 2 Stability of antifungal experiments

菌种 Fungus	回归方程 Regression equation	EC ₅₀ (mg/mL)	95% CL	相关系数(r) Correlation coefficient	χ^2
小麦赤霉菌 <i>G. zeae</i>	$Y = 1.722 X + 3.726$	5.49	4.40 ~ 6.59	0.951	0.519
玉米小斑菌 <i>H. maydis</i>	$Y = 1.840 X + 3.489$	0.15	0.10 ~ 0.20	0.984	3.082
油菜菌核菌 <i>S. sclerotiorum</i>	$Y = 3.039 X + 7.761$	0.12	0.11 ~ 0.13	0.903	2.459
番茄灰霉菌 <i>B. cinerea</i>	$Y = 2.290 X + 5.339$	0.71	0.39 ~ 1.32	0.986	16.776

由上表可知,4种菌的稳定性实验结果经SPSS软件计算,分析可得其检验结果可靠,进一步说明黄连提取物对于4种菌具有较好的抑制作用。

3.2 黄连水提取物对真菌抑制机理初探

3.2.1 提取物对真菌孢子形成的影响

按照2.3的实验方法,将提取物配制成浓度为1.5、0.75、0.375、0.188、0.094 mg/mL的PDA培养基,接种油菜菌核菌28℃培养6d,测定其孢子数并计算孢子形成抑制率,实验结果如下。

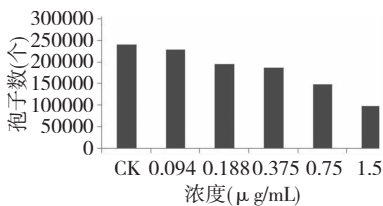


图1 提取物对油菜菌核菌孢子形成的影响

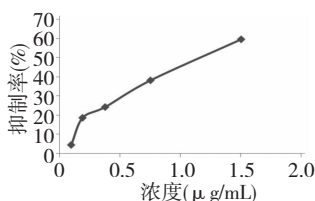
Fig. 1 Effects of extract on formation of *S. sclerotiorum* spores

图2 提取物对油菜菌核菌孢子形成的抑制作用

Fig. 2 Inhibition of extract against formation of *S. sclerotiorum* spores

从图1及图2可以看出,黄连提取物对油菜菌核菌孢子形成有一定的抑制作用。随着提取物浓度的增大抑制率也增加,当处理组浓度为1.5 mg/mL时抑制率达到59.54%。

3.2.2 提取物对真菌孢子萌发的影响

按照2.4的实验方法,提取物制成浓度为1.5、0.75、0.375、0.188、0.094 mg/mL的溶液,在凹面载玻片上进行孢子萌发率的测定,结果如图3和表3。

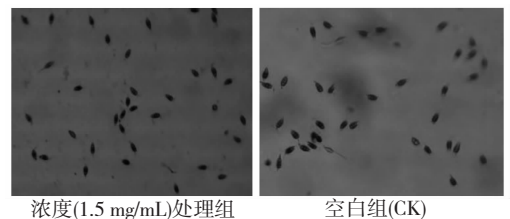


图3 提取物对油菜菌核菌孢子萌发影响

Fig. 3 Effects of extract on formation of *S. sclerotiorum* spores

从上表可以看出,黄连提取物对油菜菌核菌孢子萌发有较好地抑制作用。当提取物浓度达到1.5 mg/mL的时候,抑制率达到76.19%,具有较好的抑制效果,其EC₅₀为0.478 mg/mL。

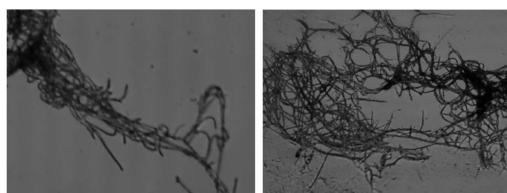
3.2.3 提取物对真菌菌丝形态的影响

按照2.5的实验方法,将黄连提取物配制成浓度为1.5 mg/mL的PDA培养基,接种油菜菌核菌培养6d,挑取菌丝进行显微镜测定,结果如下。

表3 提取物对油菜菌核菌孢子萌发毒力测定结果

Table 3 Toxicity of extract against formation of *S. sclerotiorum* spores

浓度(mg/mL) Concentration	孢子萌发率(%) Spore germination rate	孢子萌发抑制率(%) Inhibition rate of spore germination	回归方程 Correlation coefficient
1.500	19.80	76.19	$Y = 22.77 X + 39.11$
0.750	33.66	59.53	$R^2 = 0.970$
0.375	43.69	47.47	$EC_{50} = 0.478$
0.188	46.30	44.33	
0.094	50.94	38.75	
CK	83.17	-	



浓度(1.5 mg/mL)处理组

空白组(CK)

图4 提取物对油菜菌核菌菌丝形态的影响

Fig. 4 Effects of extract on mycelial shape of *S. sclerotiorum*

从上图可知,经黄连提取物处理后的油菜菌核菌菌丝形态与对照组菌丝形态没有较大差别。

3.2.4 提取物对真菌菌膜通透性的影响

3.2.4.1 电导率测定结果

按照2.6.1的实验方法,将黄连提取物配制成浓度为1.5、0.75、0.375、0.188、0.094 mg/mL的溶液,分别加入2 g油菜菌核菌菌丝,于5、15、30、60、90、120 min时测定电导率,实验结果如图5。

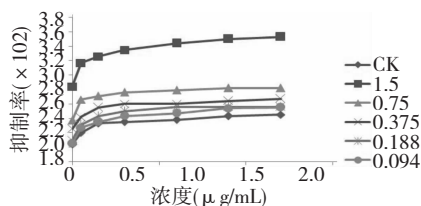


图5 提取物对油菜菌核菌菌体细胞膜通透性的影响

Fig. 5 Effect of extract on permeability of cell membranes of *S. sclerotiorum*

从上图可以看出,油菜菌核菌在加入药液后培养一段时间电导率有所增大,说明菌丝内电解质渗漏。在浓度为0.094、0.188、0.375 mg/mL时电导

率变化不大,浓度为1.5 mg/mL时电导率大大增加了,说明高浓度提取物对油菜菌核菌细胞体渗透性有明显效果。

3.2.4.2 膜外渗透总多糖测定结果

按照2.6.2的实验方法,将黄连提取物配制成浓度为1.5、0.75、0.375、0.188、0.094 mg/mL的溶液,分别加入2 g油菜菌核菌菌丝,28℃培养48 h,离心,上清液测定总多糖含量。

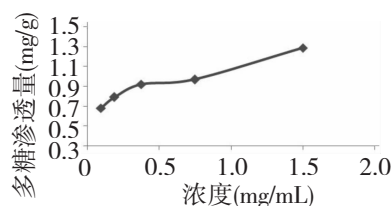


图6 提取物对油菜菌核菌膜外总多糖含量的影响

Fig. 6 Effect of extract on soluble polysaccharide content of *S. sclerotiorum*

从图6可知,加入黄连提取物处理后油菜菌核菌菌丝总多糖的渗透量随着加入浓度的增加而增大。阴性对照组的渗透量为0.45 mg/g,加入样液后渗透量增大。

3.2.4.3 膜外渗透总蛋白质测定结果

按照2.6.3的实验方法,将黄连提取物配制成浓度为1.5、0.75、0.375、0.188、0.094 mg/mL的溶液,分别加入2 g油菜菌核菌菌丝,28℃培养48 h,离心,上清液测定蛋白质含量。

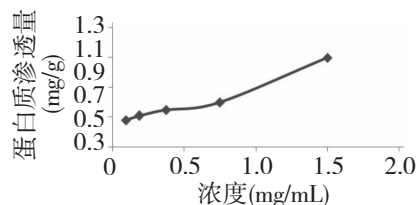


图7 提取物对油菜菌核菌膜外蛋白质含量的影响

Fig. 7 Effect of extract on soluble protein content of *S. sclerotiorum*

油菜菌核菌蛋白质渗透量随着加入提取物的浓度增大而增加。对照的渗透量为0.57 mg/g。加入提取物浓度为1.5 mg/mL时,蛋白质渗透量为1.1 mg/g,说明高浓度的提取物对油菜菌核菌细胞膜通透性有较大影响。

4 结论

抑菌实验结果显示,黄连提取物对于五种常见

植物病原真菌均具有一定的抑制,以市面上常用的多菌灵为参考,提取物对小麦赤霉菌、玉米小斑菌、番茄灰霉菌、油菜菌核菌四种真菌具有较好的抑制率,为新型真菌抑制剂开发做了基础。

抑菌实验机理初探显示,黄连水提取物对油菜菌核菌孢子的形成有一定的抑制作用,对孢子的萌发也有明显的作用。处理后的油菜菌核菌菌丝没有明显变化。电导率随着处理液浓度增加而增大,胞外多糖和蛋白质的渗透量也随之增大。表明提取物能抑制油菜菌核菌孢子的形成及萌发,增大了细胞膜通透性。

参考文献

- Ma HM(马红梅), Chen G(陈刚), Li W(李文), *et al.* Chemical composition the separation and identification of *Rhizoma coptidis*. *J Shenyang Pharm Univ*(沈阳药科大学学报), 2011, 9:695-699.
- Yang Y(杨勇), Ye XL(叶小利), Li XG(李学刚). Antimicrobial effect of four alkaloids from *Coptidis rhizome*. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2007, 18:3013-3014.
- Yin SW(殷帅文), Wang QX(王庆先), Li Q(李强), *et al.* Antifungal activity of twenty common plant extracts against two plant fungi: Flavonoids from *Lycoris aurea*. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发), 2009, 21:306-311.
- Feng H, Zhang CX, Liu J, *et al.* Synthesis and fungicidal activity of 2-(3-fluorophenylcarbamoyl) phenyl acetate. 3th ed *Asian J Chem*, 2013, 25:4541-4543.
- Fang ZD(方中达). *Plant disease research method*(植物研究方法, 第三版), 1998. 152.
- Zhang JY(张继英), Qi YC(戚元成), Wang LQ(王兰青). Some bactericide put miscellaneous comparison experiment. *Edible Fungi*(食用菌), 2009, 3:68-70.
- Zhang XH(张新虎), He J(何静), Shen HM(沈慧敏). Siberian cocklebur extract of tomato gray mold inhibitory effect and antibacterial mechanism. *Acta Pratacul Sin*(草业学报), 2008, 17(3):99-104.
- Li HS(李合生). *Biochemical experiment technology of plant physiology*. Beijing: Higher Education Press, 2000.
- Zhong FX(钟方晓), Ren HH(任海华), Li Y(李岩). Comparison of methods determination of polysaccharide content. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2007, 18:1916-1917.
- Li ZJ(李志江). Study on determination of protein content of beer by coomassie brilliant G-250 dyebinding. *Liquor Making*(酿酒), 2008, (35):70-72.
- Wang GQ(王桂清). *In vitro* antibacterial activity of Asarum essential oils on five kinds of cucumber disease pathogens. *J Changjiang Veget*(长江蔬菜), 2008, 8:44-47.
- Zhou BL(周宝利), Jiang CY(姜春云), Chen ZX(陈志霞), *et al.* Effects of *Herba Asari* extracts on eggplant *Verticillium dahliae*, its growth and resistance physiological indexes. *China Veget*(中国蔬菜), 2012, 24:86-91.
- Feng SF(逢世峰), Wu LJ(吴连举), Guang YM(关一鸣), *et al.* Inhibition effects of volatile oil of Asarum on 4 kinds of pathogens of Ginseng using in vitro tests. *Special Wild Econ Animal Plant Res*(特产研究), 2008, 5(3):37-39.
- Chen YL(陈燕銮), Liu QQ(刘秋琼), Wang JZ(王建壮), *et al.* Composition analysis of volatile oil of *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* extracted by three different methods. *J Chin Med Mater*(中草药材), 2013, 36:1447-1451.
- Li SH(李少华). Antifungal activities and active compounds of the extracts from *Asarum himalaicum* against *Alternaria solani*. *J China Agric Univ*(中国农业大学学报), 2011, 16(3):67-71.
- Li FH(李凡海), Wang GQ(王桂清). Antibacterial activity of Asarum essential oils and three chemical pesticides on the *Fusarium Oxysporum*. *Agric Sci Technol Equip*(农业科技与装备), 2014, 7:10-13.
- Wang B(王波), Jiang B(蒋斌), Shen XK(沈夕坤), *et al.* Analysis of essential oil components by gas chromatography. *Chin Arch Tradit Chin Med*(中华中医药学刊), 2014, 32:2726-2729.
- Liu DJ(刘东吉), Liu CS(刘春生). Chemical components of volatile oil of cultivated Asarum produced in different places. *Chin J Exp Tradit Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2010, 16(9):79-82.

(上接第 1231 页)