

罗默碱对梨锈病菌抑制机理的初步研究

刘小红¹, 邓业成¹, 唐 煌², 骆海玉¹, 宁 蕾¹, 秦 卉¹

(1. 广西师范大学 生命科学院 珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室, 广西 桂林 541004;

2. 广西师范大学 药用资源化学与药物分子工程教育部重点实验室, 广西 桂林 541004)

摘 要:以生长速率法测定罗默碱对梨锈病菌菌丝生长的抑制作用,以倍比稀释法测定罗默碱最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MFC),以外渗电导法测出罗默碱对梨锈病菌菌丝体细胞膜渗透性的影响,并且测定了罗默碱对菌体可溶性蛋白含量的影响,探讨罗默碱对梨锈病菌的抑制活性及抑制机理。结果表明:罗默碱对梨锈病菌有较强的抑制活性,且浓度越高,抑制作用越强,其 MIC 为 0.25 g/L, MFC 为 0.5 g/L;用 0.2 g/L 的罗默碱处理梨锈病菌菌丝体,结果显示其细胞膜的相对渗透率为 53.49%,高出对照 21.82%;用 0.2 g/L 的罗默碱处理梨锈病菌菌丝体,其蛋白质含量为 2.5 mg/g,对蛋白质合成的抑制率为 60.06%。说明罗默碱对梨锈病菌具有较强的抗菌作用;可影响梨锈病菌菌丝体细胞膜的渗透性和可溶性蛋白的含量。

关键词:罗默碱;梨锈病菌;抑制活性;抑制机理

中图分类号:S 436.612.2⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)12-0122-03

梨锈病病原属担子菌亚门胶柄锈属真菌,又名赤星病,俗称“羊胡子”,是梨树重要病害之一,在我国南北果区均有发生。主要危害梨树的幼嫩绿色部分,如幼叶、叶柄、幼果及新梢。梨锈病的诊断要点可以概括为:“病部橙黄、肥厚肿胀、初生红点渐变黑、后长黄毛细又长”^[1]。目前该病的防治主要是消灭侵染来源和化学药剂防治等。消灭侵染来源主要是砍掉果园周围的桧柏等植物,这样既增加了生产成本,又对周边绿化造成迫害。化学药剂使用存在不安全、对环境污染大、对牲畜有毒害等缺点,并且由于化学药剂大量和长期使用,各地病原菌对一些药剂产生了不同程度的抗性,防效大幅度降低^[2]。因此,研究和开发对梨锈病有效的新型杀菌剂具有重要意义。

罗默碱(Roemerine)是阿朴菲类异喹啉生物碱,又叫莲碱、斑点亚洲罂粟碱、绕袂碱^[3-4],为一种新型植物源农药。目前,国内对罗默碱的研究主要集中在其抑菌活性方面,如邓业成等报道了广西地不容中 *l*-罗默碱对水稻褐飞虱的杀虫活性及对 4 种农作物病原菌的抑菌活性^[5-9],骆海玉等报道了罗默碱对水稻白叶枯病有较强的抑制作用^[7]。但其抑菌作用机理至今未见报

道。该试验在室内初步探测了罗默碱对梨锈病菌的抑菌活性及机理,以期罗默碱的开发和防治梨锈病提供新的植物源新农药理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试罗默碱 由广西师范大学教育部药用资源化学与药物分子工程重点实验室合成,包含 *l*型和 *d*型 2 种构型。

1.1.2 供试病原菌 梨锈病菌(*Gymnosporangium haraeum* Syd)通过从田间采集植物发病部位,在室内用马铃薯蔗糖琼脂培养基(PDA)分离纯化获得,并通过科赫法则检验。

1.2 试验方法

1.2.1 罗默碱对梨锈病菌的抑制作用 参考陈年春^[8]的菌丝生长速率法进行测定。将供试菌接种在 PDA 平板培养基上扩大培养,备用。用丙酮:无菌水=1:1 作为溶媒配制药液,备用。在超净工作台上,吸取 1 mL 药液(对照组用相应的溶媒代替)与热熔的 9 mL PDA 培养基混匀,倒入直径 9 cm 的玻璃培养皿中,制成厚薄均匀的含药培养基。用直径为 0.4 cm 的打孔器在已扩大培养的供试菌落边缘切取菌饼,将菌饼接入带药培养基上,使有菌丝的一面朝下,每皿接 3 个菌饼,呈正三角形分布,每个处理设 3 次重复。置(27±1)℃的恒温培养箱中培养。用十字交叉法测量培养 72 h(甘蔗凤梨病菌测量 48 h)后的菌落直径,根据下式求出抑制率:菌落直径(cm)=测量直径-0.4;抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100;测定有效中浓度时,用等体积丙酮和

第一作者简介:刘小红(1982-),女,湖北黄冈人,在读硕士,现主要从事天然产物化学的研究工作。E-mail: liuxh026@126.com。

责任作者:邓业成(1965-),男,广西桂林人,博士,教授,现主要从事植物化学和植物保护研究工作。E-mail: dyecheng@163.com。

基金项目:珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室研究基金资助项目(桂科能 1001Z014);广西自然科学基金资助项目(桂科自 0991097)。

收稿日期:2011-03-25

水的混合溶剂配制 5 个以上系列浓度的药液, 测定各个浓度的抑菌率, 用最小二乘法求出毒力回归方程、有效中浓度 EC_{50} 等。

1.2.2 罗默碱对梨锈病菌最小抑菌浓度(MIC)和最小杀菌浓度(MFC)的测定 采用倍比稀释法: 将罗默碱稀释液与 PDA 培养基混合均匀, 制成不同浓度梯度的含药平板, 接种 $100\ \mu\text{L}$ 含菌量约为 5×10^4 个/mL 的菌悬液, 用无菌涂棒涂布均匀。同时以纯的培养基接种真菌作对照, 置于 $28\ ^\circ\text{C}$ 恒温培养箱内培养, 每个处理设 3 次重复。48 h 后取出观察菌的生长情况, 以完全无菌生长的最低药物浓度 MIC。在 MIC 测定的基础上, 继续培养 7 d, 以完全无菌生长的最低药物浓度为 MFC^[9]。

1.2.3 罗默碱对梨锈病菌菌丝体细胞膜渗透性的影响 供试梨锈病菌的培养: 将梨锈病菌菌种在 PDA 培养基上培养 4 d, 用直径 4 mm 的打孔器沿菌落边缘打取一定数量的菌饼, 移入 PDB 培养基内, 每瓶 4 块, $27\ ^\circ\text{C}$, 110 r/min 振荡培养 5 d, 将菌丝团取出, 去掉菌柄上的 PDA 培养基于布氏漏斗中, 下垫 2 层滤纸, 稍加抽滤。用去离子水洗至中性, 抽滤, 收集菌丝体。电导率的测定^[10]: 称取 1 g 菌丝(湿重)放入 50 mL 小烧杯中, 用丙酮: 无菌水 = 1:1 将样品配成一定浓度的药液, 吸取 1 mL 药液(对照组用丙酮: 无菌水 = 1:1 代替)与 9 mL 无菌水混匀, 使药液的最终处理浓度为 $0.2\ \text{g/L}$ 。倒入离心管中, 测定各处理电导率的本底值 J_0 ; 然后在 $27\ ^\circ\text{C}$ 摇床中静置处理 6 h, 取出离心(4 000 r/min, 5 min), 用上清液测定其电导率 J_1 ; 再将上清液倒回离心管中, 煮沸处理 30 min, 冷却后, 离心(4 000 r/min, 5 min), 用上清液测定其电导率 J_2 ; 最后按下式计算相对渗透率: 相对渗透率(%) = $(J_1 - J_0) / (J_2 - J_0) \times 100$; 其中, J_0 为零时间电导率值, J_1 为某时间电导率值, J_2 为处理后电导率值。

1.2.4 罗默碱对菌体可溶性蛋白含量的影响 菌丝体的预处理: 准确量取 90 mL 液体培养基加到三角瓶中, 灭菌。用打孔器在已扩大培养的供试菌落边缘切取菌饼, 每个三角瓶接入 4 个菌饼, $27\ ^\circ\text{C}$ 摇床中震荡培养数天后, 往菌丝培养液中加入药液(对照用相应的溶媒), 使终浓度为设定处理浓度。继续培养 48 h, 过滤, 用蒸馏水冲洗菌丝体数遍后, 再用磷酸缓冲液($0.2\ \text{mol/L}$, pH 7.5)冲洗 3 次。菌丝体用滤纸吸干后, 称取 0.5 g, 加入 2 mL 磷酸缓冲液和 1 g 石英砂于研钵中在冰浴中研磨至糊状, 加磷酸缓冲液补足至 10 mL, 于 $4\ ^\circ\text{C}$ 离心(13 000 r/min, 15 min), 取上清液于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中保存备用。蛋白质含量测定: 采用考马斯亮蓝 G-250 比色法^[11]。

2 结果与分析

2.1 不同浓度罗默碱对梨锈病菌生长的抑制作用

由表 1 可知, 罗默碱对梨锈病菌表现出不同程度的生长抑制作用。随着罗默碱浓度的增加, 抑制作用

也随之增强。当浓度为 $0.25\ \text{g/L}$ 时, 抑菌率达到了 100%。从菌落大小和形态来看, CK 菌落均匀、平坦, 菌丝密集。而罗默碱作用后的菌落, 生长势较弱, 生长量稀少, 菌丝短, 且内圈颜色发黑。在显微镜下观察, 发现经罗默碱处理过的梨锈病菌菌丝相对稀少、纤细, 有的节膨大, 粗细不等, 出现分支。这可能是由于病原真菌外围的菌丝受到抑制所致。

表 1 不同浓度罗默碱对梨锈病菌的抑制作用

罗默碱浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%	毒力回归方程	EC_{50} / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$EC_{50}95\%$ 置信限 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
0.5	100			
0.25	100			
0.125	98.61			
0.062 5	62.5	$y=10.082\ 7+3.572\ 7x$	0.037 8	0.024 2~0.051 4
0.031 3	34.72			
0.015 6	12.5			
CK	0			

2.2 罗默碱对梨锈病菌的 MIC 和 MFC

从表 2 可看出, 随着罗默碱浓度的增加, 其抑菌作用越明显, 罗默碱对梨锈病菌的 MIC 和 MFC 分别为 $0.25\ \text{g/L}$ 和 $0.5\ \text{g/L}$ 。

表 2 MIC 和 MFC 的测定结果

抗菌活性	罗默碱/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$									
	2	1	0.5	0.25	0.125	0.062 5	0.031 25	0.015 63	CK	
MIC	—	—	—	—	+	+	+	+	+	
MFC	—	—	—	+	+	+	+	+	+	

注: +, 表示有菌生长; -, 表示无菌生长

2.3 罗默碱对梨锈病菌菌丝体细胞膜渗透性的影响

由表 3 可知, 以 $0.2\ \text{g/L}$ 的罗默碱处理后, 处理组浸出液的相对渗透率有明显提高。说明罗默碱对梨锈病菌的细胞膜有一定的破坏作用, 从而导致菌丝体细胞内的物质如 Na^+ 、 K^+ 、可溶性糖类、可溶性蛋白等外渗, 渗出液的电解质增加, 电导率上升。

表 3 罗默碱对梨锈病菌菌丝体细胞膜渗透性的影响

组别	电导率/ $\mu\text{S} \cdot \Omega^{-1}$			相对渗透率/%
	J_0	J_1	J_2	
处理组	500	280	27	53.49
对照组	500	190	46	31.67

注: 处理浓度为 $0.2\ \text{g/L}$ 。

2.4 罗默碱对菌体可溶性蛋白含量的影响

由表 4 可知, 以 $0.2\ \text{g/L}$ 的质量浓度处理菌丝体 48 h 后, 处理组菌丝体蛋白质含量均显著低于对照组, 对菌丝体蛋白质合成的抑制率分别 60.06%, 说明罗默碱能比较显著的抑制菌丝体蛋白质的合成。

表 4 罗默碱对梨锈病菌菌丝体蛋白质含量的影响

	OD 值	样品蛋白质含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	抑制率/%
处理组	0.31	2.5	60.06
对照组	0.43	6.26	—

注: 处理浓度 $0.2\ \text{g/L}$; 抑制率(%) = (对照组蛋白质含量 - 处理组蛋白质含量) / 对照组蛋白质含量 $\times 100$ 。

3 结论与讨论

试验表明, 罗默碱对梨锈病菌菌丝生长具有较强

的抑制作用, EC_{50} 为 0.037 8 g/L。通过显微镜观察发现罗默碱对梨锈病菌的抑制作用影响其菌丝形态和抑制外围菌丝的生长。

通过外渗电导法的测定发现, 加入罗默碱培养一定时间后, 培养基的电导率明显增加, 说明菌丝内有电解质渗漏, 并引起菌丝细胞膜透性的变化, 从而造成液体培养基电导率增加。

经过罗默碱处理一定时间后, 梨锈病菌菌丝体可溶性蛋白含量减少, 表明罗默碱可使梨锈病菌菌丝体蛋白质合成速度受到抑制。

该试验结果与玉艳珍^[12] 研究千金藤碱和克斑宁对梨锈病菌的机理, 张明^[13] 研究巴马亭和药根碱对梨锈病菌的机理是一致的。罗默碱及这 4 种物质都是阿朴菲类异喹啉生物碱, 它们具有相同的母核, 罗默碱是荷叶、地不容(广西地不容, 云南地不容等)、凹叶厚朴和黄藤等的活性成分^[14-18], 现亦用化学方法合成。关于罗默碱 2 种构型的分离工作正在进行中, 相关资料有待于进一步研究后公布。罗默碱对于梨锈病菌分子水平的抑菌机理以及对于活体的作用还有待进一步研究探讨。该试验为新农药的开发和先导化合物的发现提供了试验依据, 同时也为开发新的防治梨锈病的植物源农药奠定了一定的理论基础。

参考文献

- [1] 仇明华, 祖文琼, 王鹏林. 梨锈病的发生及防治[J]. 云南农业, 2000(10): 21.
- [2] Hollom D W, Brent K J. 杀菌剂的抗性能否克服[J]. 世界农药, 1990, 12(3): 26-31.

- [3] 陶冉, 潘扬. 莲非酚性生物碱的化学及药理研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2008, 22(3): 63-64.
- [4] 刘蜜新, 吴筑平, 杨成对, 等. 荷叶精油与生物碱的分析研究[J]. 清华大学学报, 1997, 37(6): 35-37.
- [5] 邓业成, 徐汉虹. 广西地不容的杀虫活性及有效成分研究[J]. 中国农业科学, 2005, 38(3): 523-527.
- [6] 邓业成, 李洁荣, 高成伟, 等. 广西地不容提取物及化合物的抑菌活性[J]. 植物保护, 2006, 32(4): 43-45.
- [7] 骆海玉, 邓业成, 秦卉, 等. 植物提取物及杀菌剂对水稻白叶枯病菌的抑菌活性[J]. 作物杂志, 2010(10): 87-90.
- [8] 陈年春. 农药生物测定技术[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1990: 66-68.
- [9] 吴振宇, 王燕, 艾启俊. 鹿蹄草素对桃褐腐病菌的抑制作用及其抑菌机理[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2784-2792.
- [10] 李淑菊, 吕淑珍, 马得华, 等. 黄瓜对黑星病的抗性机理[J]. 华北农学报, 1997, 12(2): 121-124.
- [11] 俞建瑛, 蒋宇, 王善利. 生物化学实验技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 177-179.
- [12] 玉艳珍. 3 种中药植物的抗菌活性及活性物质研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2009.
- [13] 张明. 中药植物金果榄抗菌活性及活性物质研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2010.
- [14] 王玲玲, 刘斌, 石任兵. 荷叶的化学成分研究[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21: 416-419.
- [15] 邓业成, 徐汉虹. 广西地不容块根生物碱成分研究[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2004, 22(4): 72-77.
- [16] 陈熾, 方圣鼎, 梁栋, 等. 云南地不容生物碱的研究[J]. 植物学报, 1989, 31(4): 296-299.
- [17] 瞿庆喜, 朱庆亚, 喻凯, 等. 凹叶厚朴中具有葡萄糖苷酶抑制活性的成分[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(6): 796-798.
- [18] 张慧颖, 李智敏, 张森, 等. 栽培黄藤药材的化学成分研究[J]. 云南中医学院学报, 2008, 31(5): 28-31.

Preliminary Studies on the Antifungal Mechanism of Roemerine Against *Gymnosporangium haraeaeum* Syd.

LIU Xiao-hong¹, DENG Ye-cheng¹, TANG Huang², LUO Hai-yu¹, NIN Lei¹, QIN Hui¹

(1. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004; 2. Key Laboratory for Chemistry and Molecular Engineering of Medicinal Resources, Ministry of Education of China, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract: Fungal inhibitory activity of roemerine against *G. haraeaeum* Syd was determined using a growth rate method. And doubling dilution method was used to determined the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal fungicide concentration (MFC), leakage conductivity method using roemerine mycelia of *G. haraeaeum* Syd cell membrane permeability, and determined roemerine on soluble protein content of cell. To explore the antifungal activity and potential mechanism of roemerine against *Gymnosporangium haraeaeum* Syd. The results showed that, Roemerine displayed strong antifungal activity to *G. haraeaeum* Syd and the activity was significantly increased when the applied concentration was higher, the MIC value of 0.25 g/L and MFC value of 0.5 g/L. The results showed that roemerine at a concentration of 0.2 g/L was the relative membrane permeability 53.49%, 21.82% higher than the control; *G. haraeaeum* Syd protein content of roemerine at a concentration of 0.2 g/L was 2.5 mg/g, protein synthesis inhibition rate of 60.06%. Roemerine had a strong antifungal activity and exerted a potent impact on the mycelial cell membrane permeability and soluble protein content of *G. haraeaeum* Syd.

Key words: roemerine; *Gymnosporangium haraeaeum* Syd; inhibition effect; inhibition mechanism