

丹皮酚对植物病原真菌的体外抑制作用

康业斌^{1,2} 商鸿生² 成玉梅¹

(1. 河南科技大学林学院, 洛阳 471003; 2. 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为揭示丹皮酚在牡丹体内的抗菌机制, 采用生长速率法测定了丹皮酚对供试病菌菌丝生长的抑制作用; 用涂布平板法测定了丹皮酚对供试病菌孢子萌发及形成的影响。结果表明, 丹皮酚含量与病菌菌落直径线性增长及菌丝生物学产量的相对抑制率呈正相关, 在丹皮酚含量 0.08、0.4 mg/mL 培养液中培养禾谷丝核菌和茄病镰刀菌 5 天, 对菌丝干重的抑制率分别为 79.81% 和 55.08%。丹皮酚对供试病菌的孢子萌发无作用, 但孢子萌发后, 其芽管基部膨大、顶端膨大及中间局部膨大。丹皮酚推迟病菌分生孢子梗的形成时间, 降低分生孢子的形成数量, 在 0.20、0.24 mg/mL PSA 培养基上培养玉蜀黍赤霉和茄病镰刀菌 10 天, 对分生孢子形成的抑制率分别为 100% 和 33.33%。

关键词: 丹皮酚; 生物活性; 植物病原真菌; 菌丝体; 分生孢子

Inhibition activities of paeonol to plant pathogenic fungi *in vitro*

Kang Yebin^{1,2} Shang Hongsheng² Cheng Yumei¹

(1. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471003, Henan Province, China;
2. College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China)

Abstract: In order to reveal the antibacterial mechanism of paeonol in the peony, the inhibition of mycelium growth was measured by the growth rate and the effects of spore germination and formation were measured by coating plate in tests. The results showed that paeonol content to the relative inhibiting rate of the linear growth of fungal colony diameter and mycelia biomass yield was positively correlated, when *Rhizoctonia cerealis* and *Fusarium solani* were cultured for five days in paeonol content 0.08, 0.4 mg/mL medium culture, the inhibiting rates of dry weight of mycelium were 79.81% and 55.08%. Paeonol had no effects on germinating rate for the spores, but germ tubes became swollen at the apical, basal and middle. Paeonol delay the time of formation for conidiophores and reduce the number of the spores. *Gibberella zeae* and *Fusarium solani* were cultured for ten days in 0.20, 0.24 mg/mL PSA medium, the inhibiting rates of the spores were 100% and 33.33%.

Key words: paeonol; biological activity; plant pathogenic fungi; mycelium; conidium

酚类化合物是植物体内重要的次生代谢产物, 据报道酚类化合物中的简单酚、黄酮及醌类等, 在植物体外对植物病原真菌菌丝生长与孢子萌发具有抑制作用, 在植物体内对植物生长发育有一定的调节作用, 同时在植物抗病、基因的诱导表达、信号传导等方面也有重要作用^[1-8]。丹皮酚[2-羟基-4-

甲氧基苯乙酮(2-Hydroxy-4-methoxyacetophenone)] 是牡丹体内的重要次生代谢产物, 广泛存在于牡丹根、茎、叶等器官中, 在根皮内的质量分数一般为 1.0% ~ 3.0%^[9]。然而, 丹皮酚在牡丹体外的抑菌作用及体内的生物活性目前尚无研究。作者研究丹皮酚对禾谷丝核菌、茄病镰刀菌等 8 种植物病原真

基金项目: 河南科技大学博士启动基金 (200709001215)

作者简介: 康业斌, 男, 1964 年生, 教授, 主要从事植物免疫学研究, email: kangyb@mail.haust.edu.cn

收稿日期: 2007-09-19

菌的体外抑制作用,为进一步研究其在牡丹体内的抗病作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试培养基

PSA 培养基、PD 培养基、查氏培养基和 KDA 培养基。KDA 培养基:KH₂PO₄ 1.0 g、KNO₃ 1.0 g、KCl 0.5 g、MgSO₄ 0.5 g、淀粉 0.2 g、葡萄糖 0.2 g、蔗糖 0.2 g、琼脂 18~20 g、H₂O 1000mL。

1.2 供试菌株

玉蜀黍赤霉 *Gibberella zeae* (Schw.) Petch、禾顶囊壳 *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Walker、茄病镰刀菌 *Fusarium solani* (Mart.) Sacc.、禾草离蠕孢 *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoem.、牡丹枝孢霉 *Cladosporium paeoniae* Pass.、禾生炭疽菌 *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson、天门冬拟茎点霉 *Phomopsis asparagi* (Sacc.) Bubak、禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* Vander Hoeven,以上病菌均由河南科技大学植物保护研究所提供。病菌在 PSA 培养基上扩大繁殖备用。

1.3 供试药剂

98.5% 丹皮酚晶体:由水蒸汽蒸馏法提取获得^[10],加溶剂(丙酮与水 1:1)配成 5 mg/mL 的溶液备用。

1.4 试验方法

1.4.1 丹皮酚对菌落直径线性增长的抑制

用生长速率法^[11]测定。将分离纯化所得菌株在 PSA 平板上 25℃ 培养 3 天后,用打孔器在菌落边缘制成直径 0.6 cm 的菌饼,接入含系列浓度丹皮酚的 PSA 平板上,25℃ 下培养 5 天后量取菌落直径,每处理重复 3 次。计算菌落线性增长相对抑制率并进行方差分析。

相对抑制率(%) = [(对照组菌落直径 - 处理组菌落直径) / 对照组菌落直径] × 100。

根据相对抑制率的概率值和丹皮酚浓度对数值,按最小二乘法求毒力回归式,并计算抑制菌丝、菌落增长的有效中浓度 EC₅₀ 值。

1.4.2 丹皮酚对菌丝干重的抑制

取一定量的丹皮酚溶液加入查氏培养基中,配成丹皮酚浓度为 0.0、0.1、0.2、0.3、0.4 mg/mL 的培养液;加入 PD 培养基中,配成丹皮酚浓度为 0.0、0.02、0.04、0.06、0.08 mg/mL 的培养液。取等量的培养 7 天直径 10 mm 的供试茄病镰刀菌的菌饼转移

至 100 mL 查氏培养液中;取等量的培养 5 天直径 10 mm 的供试禾谷丝核菌的菌饼转移至 100 mL PD 培养液中;以不加丹皮酚为对照,25℃ 振荡培养 5 天,滤出菌丝,用去离子水冲洗 3~4 次,80℃ 鼓风干燥箱中烘至恒重。每处理重复 3 次,计算丹皮酚抑制菌丝生物学产量的百分率。

抑制率(%) = [(对照菌丝干重 - 处理菌丝干重) / 对照菌丝干重] × 100。

1.4.3 丹皮酚对真菌孢子萌发的抑制作用

用改良的涂布平板法^[11]测定。取灭菌载玻片竖着平铺一排于试验台上,其上、下端各放一排载玻片,使中间形成一槽,加入一薄层 KDA 培养基,冷却后每一块载玻片中间形成一方块平板培养基,在培养基上加 2 滴含一定浓度丹皮酚的分生孢子悬浮液,并均匀涂布。将载玻片平板反置于保湿器的玻棒上,在 25℃ 条件下培养,玉蜀黍赤霉 6 h,茄病镰刀菌、禾草离蠕孢 12 h,牡丹枝孢霉、天门冬拟茎点霉 24 h,在显微镜下直接检查孢子萌发数,计算萌发率,以芽管长度超过孢子最大直径长度一半作为萌发标准。

孢子萌发率(%) = [(处理孢子萌发数 - 对照孢子萌发数) / 对照孢子萌发数] × 100。

1.4.4 丹皮酚对真菌产孢结构的影响

丹皮酚对真菌分生孢子梗形成的影响:将在 PSA 培养基上培养 7 天的玉蜀黍赤霉和茄病镰刀菌分生孢子制成孢子悬浮液,分别涂布在 0.20、0.24 mg/mL 的 KDA 带毒平板上,每皿 1 mL,置 25℃ 恒温培养箱培养,24 h 后每天定时用手术刀切成正方形的菌块,置载玻片上,在显微镜下直接观察病菌分生孢子梗的分化形成,直到大型分生孢子出现。以第一次观察到小型分生孢子为小型分生孢子梗形成的时间;以第一次观察到大型分生孢子为大型分生孢子梗形成的时间,重复 3 皿。

丹皮酚对分生孢子器形成的影响:将在 PSA 培养基上培养 10 天的天门冬拟茎点霉分别接种在 0.00、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35 mg/mL 的带毒 PSA 平板上,每皿接一个菌饼,置 25℃ 恒温培养箱培养 20 天,统计每皿形成的分生孢子器数量,重复 3 皿。

1.4.5 丹皮酚对真菌产孢数量的影响

将在 PSA 培养基上培养 5 天的玉蜀黍赤霉和茄病镰刀菌菌落用直径 0.6 cm 的打孔器打成菌饼,分别接种在 0.20、0.24 mg/mL 的带毒平板上,每皿接一个菌饼,置 25℃ 恒温培养箱培养 5、10、15 天,

用直径 1.0 cm 的打孔器在接种点附近打成菌饼,用无菌水洗下孢子,用血球计数板统计孢子数量,重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 丹皮酚对供试植物病原真菌菌落直径线性增长的抑制

结果表明,丹皮酚对供试病菌菌落扩展均有抑制作用,且丹皮酚浓度与病菌抑制率成正相关。

禾顶囊壳、禾谷丝核菌、牡丹枝孢霉的 EC_{50} 分别为 0.0353、0.0630、0.0781 mg/mL,均小于 0.1 mg/mL,而其它病菌的 EC_{50} 均大于 0.1 mg/mL,说明不同病菌对丹皮酚的敏感性不同(表 1)。观察结果表明在含丹皮酚 0.10 mg/mL 的 PSA 培养基上,供试病菌菌落呈圆形向外扩展,与对照相比不同的是菌落边缘绒毛状,菌落背面显褐色,且随着丹皮酚浓度的增加,扩展速度逐渐降低,菌落边缘绒毛状明显,菌落背面褐色加深。

表 1 丹皮酚对植物病原真菌菌丝生长的毒力回归方程

Table 1 Toxicity regression equation of paeonol to colony growth of plant pathogenic fungi

病原真菌 Pathogenic fungus	毒力回归方程 Toxic regression equation	相关性 Relativity	有效中浓度(mg/mL) Median effective content
玉蜀黍赤霉 <i>Gibberella zeae</i>	$Y = 4.0195X - 0.2376$	0.9556	0.1994
茄病镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	$Y = 3.6771X + 0.3685$	0.9999	0.1818
牡丹枝孢霉 <i>Cladosporium paeoniae</i>	$Y = 2.5575X + 2.7361$	0.9849	0.0781
禾草离蠕孢 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	$Y = 3.4769X + 1.2560$	0.9982	0.1193
禾生炭疽菌 <i>Colletotrichum graminicola</i>	$Y = 2.3182X + 2.5297$	0.9624	0.1163
天门冬拟茎点霉 <i>Phomopsis asparagi</i>	$Y = 1.7199X + 3.2030$	0.9999	0.1109
禾谷丝核菌 <i>Rhizoctonia cerealis</i>	$Y = 2.6823X + 2.8562$	0.9994	0.0630
禾顶囊壳 <i>Gaeumannomyces graminis</i> var. <i>tritici</i>	$Y = 2.3289X + 3.7245$	0.9849	0.0353

2.2 丹皮酚对菌丝干重的抑制

在含不同浓度丹皮酚的培养液中生长的茄病镰刀菌与禾谷丝核菌菌丝重量受到不同程度的抑制(表 2),且丹皮酚处理浓度和菌丝重量抑制率呈正

相关,回归方程式为 $Y = 139.74X - 1.594$ 、 $Y = 1014.9X + 1.684$,相关系数分别为 $R^2 = 0.9859$ 、 $R^2 = 0.9867$,抑制 50% 菌丝生长的浓度分别为 0.3692、0.0476 mg/mL。

表 2 丹皮酚对植物病原真菌菌丝生物学产量的影响

Table 2 Effect of paeonol on mycellia biomass growth of plant pathogenic fungi

茄病镰刀菌 <i>F. solani</i>			禾谷丝核菌 <i>R. cerealis</i>		
丹皮酚浓度(mg/mL) Paeonol concentration	菌丝干重(g) Mycellia dry weight	抑制率(%) Inhibiting rate	丹皮酚浓度(mg/mL) Paeonol concentration	菌丝干重(g) Mycellia dry weight	抑制率(%) Inhibiting rate
0.0	0.4664	0.00	0.00	0.6607	0.00
0.1	0.4250	8.88	0.02	0.4988	24.50
0.2	0.3295	29.35	0.04	0.4015	39.23
0.3	0.2870	38.46	0.06	0.2124	67.85
0.4	0.2095	55.08	0.08	0.1334	79.81

2.3 丹皮酚对病原真菌孢子萌发的抑制

用 100 ~ 1600 倍液的丹皮酚处理供试病菌的分生孢子 6 ~ 24 h,其孢子萌发率均大于 75%,说明丹皮酚对植物病原菌孢子萌发的作用较小(表 3)。但

连续观察表明,分生孢子萌发后,其芽管或初生菌丝与对照相比出现畸形,常见的畸形现象为芽管不规则畸形、基部膨大、顶端膨大及中间局部膨大等畸形现象。

表 3 丹皮酚对植物病原真菌分生孢子萌发的抑制

Table 3 Inhibition of paeonol to conidia germinating of pathogenic fungi

丹皮酚浓度 Paeonol concentration	分生孢子萌发的抑制率 Inhibiting germination rate of conidia(%)				
	玉蜀黍赤霉(6 h) <i>Gibberella zeae</i>	茄病镰刀菌(12 h) <i>Fusarium solani</i>	牡丹枝孢霉(24 h) <i>Cladosporium paeoniae</i>	禾草离蠕孢(12 h) <i>Bipolaris sorokiniana</i>	天门冬拟茎点霉(24 h) <i>Phomopsis asparagi</i>
0	2.59	0.00	16.13	15.22	8.26
100	28.12	3.92	14.66	17.78	18.90
200	13.96	4.90	14.58	20.25	3.70
400	8.49	2.38	19.40	23.86	18.58
800	6.96	2.58	18.01	24.32	15.82
1600	9.22	1.27	18.52	24.77	10.50

2.4 丹皮酚对病原真菌产孢结构的影响

观察结构表明,玉蜀黍赤霉在不含丹皮酚的 KDA 平板培养基上,25℃培养 4 天即形成小型分生孢子梗和大型分生孢子梗,并产生小型分生孢子和大型分生孢子。在 0.20 mg/mL 丹皮酚的 KDA 平板培养基上,25℃培养 4 天分生孢子梗虽然出现,但 12 天方产生小型分生孢子,14 天产生大型分生孢子。

茄病镰刀菌在不含丹皮酚的 KDA 平板培养基上,25℃培养 2 天即形成小型分生孢子梗和大型分生孢子梗,并产生小型分生孢子和大型分生孢子。在 0.24 mg/mL 丹皮酚的 KDA 平板培养基上,25℃培养 3~4 天方形成小型分生孢子梗、产生小型分生孢子;4~5 天形成大型分生孢子梗、产生大型分生孢子。

在含毒 PSA 培养基上培养 20 天的天门冬拟茎点霉,丹皮酚浓度为 0.00~0.20 mg/mL 的平板平均分生孢子器均大于 100 个/皿、0.25 mg/mL 的平板平均 38 个/皿、0.30 mg/mL 的平板平均 2 个/皿、0.35 mg/mL 的平板无分生孢子器产生,说明丹皮酚对分生孢子器的形成有抑制作用。

2.5 丹皮酚对病原真菌产孢量的影响

研究结果表明,丹皮酚明显降低病原菌的产孢数量。在 0.20 mg/mL PSA 培养基上培养 10 天,对玉蜀黍赤霉无性孢子形成的抑制率达 100%。在 0.24 mg/mL PSA 培养基上培养 10 天,茄病镰刀菌分生孢子形成的抑制率为 33.33%。连续观察表明,丹皮酚对玉蜀黍赤霉无性型大型分生孢子的抑制效果尤为明显(表 4)。

表 4 玉蜀黍赤霉与茄病镰刀菌的产孢量

Table 4 The conidia quantity of *Gibberella zeae* and *Fusarium solani*

培养时间(d) Incubation period	玉蜀黍赤霉 <i>Gibberella zeae</i>			茄病镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>		
	对照(个/cm ²) CK	处理(个/cm ²) Treating	抑制率(%) Inhibiting rate	对照(个/cm ²) CK	处理(个/cm ²) Treating	抑制率(%) Inhibiting rate
5	0	0	100.00	2.6 × 10 ⁵	1.6 × 10 ⁵	38.46
10	0.3 × 10 ⁴	0	100.00	1.8 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁶	33.33
15	1.6 × 10 ⁴	0.5 × 10 ⁴	96.88	2.3 × 10 ⁶	1.7 × 10 ⁶	21.74

3 讨论

试验结果表明,丹皮酚含量与供试植物病原真菌菌落直径线性增长及菌丝生物学产量的相对抑制率呈正相关;丹皮酚对供试病菌分生孢子萌发无作用,但孢子萌发后,其芽管基部膨大、顶端膨大及中间局部膨大;丹皮酚推迟病菌分生孢子梗的形成时

间,降低分生孢子的形成数量。

酚类化合物在活体外对葱刺盘孢 *Colletotrichum circians*^[1]、多主枝孢 *Cladosporium herdarum*^[2]、链格孢 *Alternaria alternata*^[3]、玉米小斑病菌 *Bipolaris maydis*^[4] 等具有不同程度的作用。本研究结果表明,牡丹皮酚对活体外 8 种植物病原真菌菌落直径线性增长均有抑制作用,且在丹皮酚含量 0.08、

0.4 mg/mL 培养液中培养禾谷丝核菌和茄病镰刀菌 5 天,对菌丝干重的抑制率分别为 79.81% 和 55.08%。可为进一步研究丹皮酚在牡丹体内的抗病活性提供依据。

近年来,关于酚类物质与植物抗病性的研究侧重于三个方面,一是植物组织中酚类物质的含量及其染病后含量的增加与植物抗病能力大小之间的关系^[12-14];二是植物受侵染组织中酶促氧化的防御作用^[15];三是植物感病后新产生的植保素^[16]。本研究结果表明,丹皮酚使供试病原真菌孢子萌发后芽管基部膨大、顶端膨大及中间局部膨大;在 0.20、0.24 mg/mL PSA 培养基上培养玉蜀黍赤霉和茄病镰刀菌 10 天,对分生孢子形成的抑制率分别为 100% 和 33.33%。而丹皮酚对植物病原真菌体外抑制作用的机制及丹皮酚在植株体内的活性包括抗病作用还有待于进一步研究。

参 考 文 献(References)

- Osbourne A E. Antimicrobial phytoprotectants and fungal pathogens: A commentary. *Fungal Genetics and Biology*, 1999, 26(3): 163 - 168
- Grayer R J, Harborne J B. A survey of antifungal compounds from higher plants. *Phytochemistry*, 1994, 37(1): 19 - 42
- Cojocar M, Droby S, Glotter E, et al. 5-(12-heptadecenyl)-resorcinol, the major component of the antifungal activity in the peel of mango fruit. *Phytochemistry*, 1986, 25(5): 1093 - 1095
- 杨征敏, 吴文君, 钮绪燕. 卫矛科植物苦皮藤杀菌活性研究初报. *西北农林科技大学学报*, 2002, 30(5): 74 - 76
- Harborne J B. The comparative biochemistry of phytoalexin induction in plants. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1999, 27(4): 335 - 367
- Picman A K, Schneider E F, Picman J. Effect of flavonoids on mycelial growth of *Verticillium albo-atrum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1995, 23(7/8): 683 - 693
- Meazza G, Dayan F E, Wedge D E. Activity of quinones on *Colletotrichum* species. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2003, 51(13): 3824 - 3828
- 安银岭, 陈秀虹, 黄玉梅, 等. 几种蒽醌类衍生物对植物病原真菌抑制作用的研究. *西南林学院学报*, 1999, 19(2): 122 - 125
- 康业斌. 牡丹丹皮酚及其对植物病原真菌抑制作用的研究. 西北农林科技大学博士论文, 2006
- 康业斌, 商鸿生, 成玉梅. 水蒸汽蒸馏法提取丹皮酚工艺的研究. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2006, 34(11): 133 - 135
- 康业斌. 速克灵对烟草赤星病菌的室内毒力测定. *植物保护学报*, 1998, 25(1): 85 - 88
- Prusky D, Kobiler I, Jacoby B. Involvement of epicatechin in cultivar susceptibility of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides* after harvest. *Journal of Phytopathology*, 1988, 123(2): 140 - 146
- Ndubizu T O C. Relations of phenolic inhibitors to resistance of immature apple fruits to rot. *Journal of Horticultural Science*, 1976, 51(3): 311 - 319
- 周洁, 陈伟, 叶明志, 等. 水稻感染细菌性条斑病后叶片中酚类物质的变化. *福建农业大学学报*, 1997, 26(2): 250 - 255
- Macheix J J, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. Florida: CRC Press, 1990: 251 - 255
- 薛应龙, 欧阳光察. 植物抗病的物质代谢基础. 北京: 科学出版社, 1992: 417 - 430