

银杏叶斑病病叶中黄酮含量变化研究

朱森, 王绪英, 翁贵英, 张晓勇, 严凯* (六盘水师范学院生物科学与技术学院, 贵州六盘水 553004)

摘要 [目的]研究银杏叶斑病病叶中黄酮含量的变化。[方法]选择患不同程度银杏叶斑病的银杏病叶,采用乙醇浸提法提取叶中黄酮,同时用紫外分光光度法测定叶中黄酮含量,探讨黄酮在叶斑病致病过程中含量变化规律,确定患叶斑病叶片是否适合采摘再利用,同时也为阐明黄酮在叶斑病致病过程中是否可能起到抵抗病原菌感染作用提供初步研究。[结果]随着叶斑病患病程度的加深,叶片上感染面积的增大,叶中黄酮含量有所增加;但当损伤达到一定程度时,黄酮含量不再增加。[结论]患病程度轻的银杏叶片具有采摘再利用的价值,同时因为黄酮具有较强的抗菌活性,说明黄酮含量升高可能是银杏叶抵抗叶斑病病原菌感染机制之一。

关键词 银杏;叶斑病;黄酮;含量变化

中图分类号 R 284.1 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)13-0182-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.13.056



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Study on the Change of Flavonoids Content in Ginkgo Leaf with Leaf Spot Disease

ZHU Miao, WANG Xu-ying, WENG Gui-ying et al (School of Biological Sciences and Technology, Liupanshui Normal University, Liupanshui, Guizhou 553004)

Abstract [Objective] The research aimed to study the change of flavonoids content in ginkgo leaf with leaf spot disease. [Method] Total flavonoids from ginkgo leaves with different degrees of leaf spot disease were extracted by ethanol extraction method. And flavonoids contents were determined by ultraviolet spectrophotometry. The purpose of this study was to explore the variation regularity of flavonoids contents in the pathogenicity of leaf spot disease, and determine whether the ginkgo leaves with leaf spot disease were suitable for picking and reusing, and whether the flavonoids play a role in opposing the pathogen invasion. [Result] With progressively worse of leaf spot disease, the area of leaf infection increased and the content of flavonoids in leaves increased, but when the damage reached a certain extent, the flavonoids contents did not increase anymore. [Conclusion] The ginkgo leaves with mild illness had the value of harvesting. And as the flavonoids had strong antimicrobial activity, it also indicated that the flavonoids contents might be one of anti-bacterial mechanisms to leaf spot pathogens.

Key words Ginkgo; Leaf spot disease; Flavone; Content change

银杏(*Ginkgo biloba* L.)属于银杏科(Ginkgoaceae)银杏属(*Ginkgo*)落叶乔木,被誉为“植物界熊猫”和“植物活化石”,同时也是一味传统中药,始载于《日用本草》,在《本草品汇精要》和《本草纲目》中均有记载,尤其银杏叶,药用历史已达600余年^[1]。现代研究表明,银杏叶具有改善心脑血管循环^[2]、改善神经退行性疾病^[3]、抗菌^[4]、抗病毒^[5-6]、抗氧化^[7]等药理作用,具有较高的药用价值。

银杏叶斑病是银杏叶的一种常见疾病,主要是由真菌感染引起。病害始发于银杏叶片边缘,随病情发展逐步形成扇形或楔形的褐色病斑,病情严重时呈现灰褐色,且在叶片上形成黑色斑点。此病严重危害银杏叶片健康,损害银杏产业的经济利益。

黄酮是银杏叶中主要的生物活性成分,抗菌作用明确。Koskimäki等^[8]研究表明当越桔受到感染时,会激活某些基因合成黄酮;而Feucht等^[9]证明在病虫害感染时,细胞周围会出现黄酮的积累,这种积累会进一步对病虫害形成防御屏障。他们的研究说明,在植物受到病害感染时,黄酮含量的升高可能作为其抵抗病原菌感染的机制之一。同时,黄酮作为银杏叶中主要的生物有效成分,其在叶片中的含量是银杏叶采摘的重要指标。

笔者通过比较健康叶片、机械损伤叶片、患有不同程度叶斑病叶片及患病叶片中未被感染部分的黄酮含量,探讨银杏叶斑病发病过程中黄酮含量变化规律,确定患病叶片是否适合采摘再利用;同时鉴于黄酮的抗菌作用,也为探明黄酮是否是银杏叶抵抗叶斑病感染机制提供初步研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验仪器。自动脱帽离心机(型号TD5脱帽型,湖南赫西仪器装备有限公司);双孔水浴锅(型号HH-2,北京科伟永兴仪器有限公司);紫外可见分光光度计(型号UV-2100,北京东西分析仪器有限公司);电热恒温鼓风干燥箱(型号BGZ-30,上海博讯实业有限公司医疗仪器设备厂)。

1.1.2 研究对象及试剂。试验用银杏叶选取贵州省六盘水市明湖公园内银杏树的健康叶片及患有不同程度银杏叶斑病的叶片。将采集的叶片烘干后,分为6组,分别是健康组、损伤组、病叶组I、病叶组II、病叶组III和对照组。其中,健康组是指没有患病的银杏叶健康叶片;损伤组是指在叶片采摘前,将叶片人为进行物理损伤,2d后,再进行采摘,试验时取叶片损伤区域的1~2mm部分;病叶组是指患有银杏叶斑病的叶片,试验时取叶片被感染区域的1~2mm部分,其中病叶组I是指患病面积较小,刚形成病斑的叶片,病斑直径大约是1mm;病叶组II指患病面积稍大,形成病斑直径大约1cm;病叶组III是指患病面积较大,已经形成严重损伤的叶片(图1)。对照组是指取患有银杏叶斑病叶片中未被感染的部分,即患病叶片的健康部分。每组做3个重复。槲皮素购于中国食品药品检定研究院,其余试剂均为分析纯。

基金项目 贵州省科技厅联合基金项目(黔科合LH字[2014]7469号);贵州省科学技术基金项目(黔科合J字LKLS[2013]09号);六盘水市科技计划项目(52020-2015-02-03);六盘水师范学院科学研究计划项目(LPSSY201805)。

作者简介 朱森(1987—),女,辽宁本溪人,实验师,硕士,从事天然产物生物活性研究。*通信作者,硕士,从事植物保护学研究。

收稿日期 2018-12-21;修回日期 2019-01-10



图1 银杏叶斑病病叶组

Fig. 1 Groups of ginkgo leaf with different degrees of leaf spot disease

1.2 方法

1.2.1 叶斑病病原菌鉴定。在显微镜下,挑取病叶处菌落,取干净的载玻片,滴加一小滴蒸馏水,将显微镜下挑取的菌落放入蒸馏水中,再用盖玻片进行压片处理,进行菌落鉴定。

1.2.2 标准曲线绘制。称取槲皮素 0.020 8 g,用 70% 的乙醇溶液溶解,并定容至 100 mL,配成浓度为 208 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品。将标准品浓度分别稀释为 52.0、26.0、13.0、6.3、0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,在 360 nm 处用分光光度计测出吸光度,并绘制标准曲线。

1.2.3 黄酮提取。将采集的银杏叶健康叶片及叶斑病叶片等各组叶片在通风处放置 15 d,用 80 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱烘烤约 2 h 后取出备用。用剪刀将健康组、损伤组、病叶组 I、病叶组 II、病叶组 III 及对照组的叶片分别剪碎,用研钵研磨,并每组各称取 1 g 叶片,用 70% 的乙醇按液比 1:30 的比例浸泡,封好试剂瓶的瓶口,在 80 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中加热 2 h,期间并不断摇晃混匀。离心 5 000 r/min,20 min,收集上清。

1.2.4 黄酮含量检测。准确量取各组样品液 5 mL 放于试管中,用分光光度计分别测出样品液吸光度,并利用已绘制的标准曲线,将吸光度带入标准曲线,计算出样品黄酮含量。

1.3 统计学分析 试验数据用 Prism5 软件对各组样品中黄酮含量值进行配对 T 检验分析,若 P 值小于 0.05 则表示具有统计学差异。

2 结果与分析

2.1 主要病原菌 如图 2 所示,经过显微镜观察发现,银杏叶斑病主要病原菌是盘二孢,还发现部分蠕孢属菌落。

2.2 标准曲线绘制 依据槲皮素标准样品浓度对吸光度做图,绘制出如图 3 所示的标准曲线,同时建立黄酮吸光度 Y 和标准样品浓度 X 的线性回归方程: $Y=0.0439X-0.0684$ ($R^2=0.9948$)。通过标准曲线可以看出,标准品质量浓度与吸光度之间有良好的线性关系。

2.3 黄酮含量变化 该研究对健康组、损伤组、对照组和患不同程度叶斑病银杏叶片中黄酮含量进行测定,结果表明(图 4),所有组中病叶组与健康组之间有显著的统计学差异($P<0.05$),其中病叶组 II 的平均黄酮含量最高,为 31.85 mg/g;而损伤组、对照组与健康组之间没有显著的统

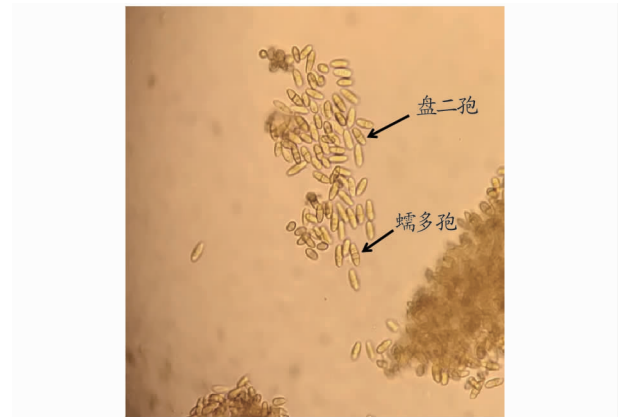


图2 银杏叶斑病主要病原菌鉴定

Fig. 2 Identification of the main pathogens of ginkgo leaf spot disease

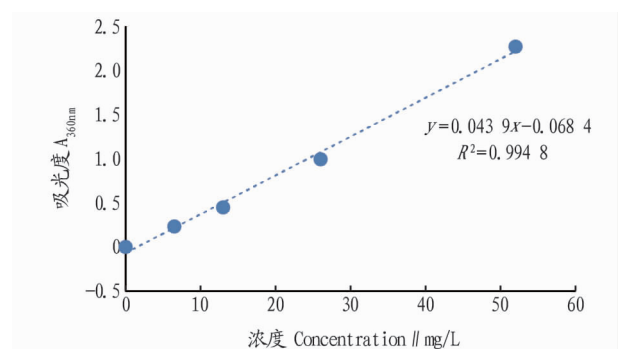


图3 槲皮素标准曲线

Fig. 3 Standard curve of quercetin

计学差异。通过试验发现,随着银杏叶受叶斑病感染程度的逐渐加重,黄酮含量有一定的升高,但当叶片达到一定的损伤程度时,黄酮含量不再升高,甚至有轻微降低。可能是当叶斑病刚感染叶片时,银杏叶细胞感受到外来菌类的攻击,便在感染部位的周围形成黄酮积累,抵抗菌类侵袭。随着感染程度加重,黄酮含量积累也有一定增加,但当损伤达到一定程度时,已经严重破坏叶片的组织细胞,黄酮含量不再增加。银杏叶愈伤组织中黄酮含量可能会有所增加^[10],因此,病叶组黄酮含量增加一方面可能是由于银杏叶抵抗叶斑病病原菌感染,而另外一个原因可能是由于叶片形成损伤而引

起的黄酮积累。

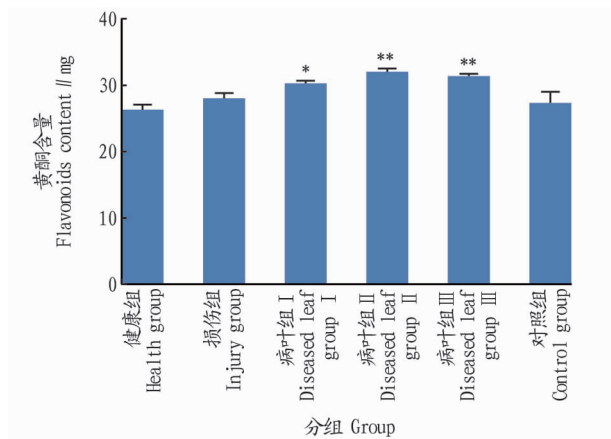


图4 银杏叶斑病黄酮含量的变化

Fig. 4 Change of flavonoids contents in ginkgo leaf spot disease

3 讨论与结论

黄酮是银杏叶中主要的生物活性物质,其在银杏叶中的含量是银杏叶采摘的重要指标。一般认为,患有病害的银杏叶不再具有采摘利用的价值。叶斑病是银杏常见病害,对银杏伤害较大。为探求患有叶斑病的银杏叶是否具有采摘再利用价值,该研究对患有银杏叶斑病的叶片中黄酮含量加以比较分析。

研究过程中,设置了未患病叶片的健康组和患不同程度叶斑病的叶片分组。鉴于曾有报道愈伤组织中黄酮含量会有所升高^[10],为了更加准确地分析叶斑病对银杏叶中黄酮含量的影响,又设置了进行人为机械损伤的损伤组;同时为了确定在叶斑病侵染银杏叶过程中,是否只有患病处黄酮含量受到影响,增设了患病但无侵染部分的对照分组。研究设立多个分组进行分析,对问题的认识较为全面,同时得到的试验结论也更为准确。

(上接第142页)

发现有饰边裂木虱危害,且该虫危害有专属嗜好性,喜好危害苹婆、假苹婆,但不危害周边其他植物。饰边裂木虱喜群聚吸食植物汁液危害,同时伴随着分泌大量白色棉絮状物质,覆盖在叶柄、叶片、嫩梢顶端和花序上使之不能进行光合作用,导致叶片枯黄脱落、嫩梢枯死、花序干枯脱落。因其发生覆盖广、繁殖快、危害大的原因,当前饰边裂木虱已成为危害苹婆的主要害虫,防治不当会给苹婆造成巨大损失。对该虫的防治,建议在3月中下旬,园中出现少量白色棉絮状虫体时,采用45%高氯毒死蜱EC加洗衣粉进行喷雾防治。桃蛀螟幼虫食量大,常在苹婆果荚内流窜啃食种子,造成空荚、烂荚、霉荚,对苹婆产量造成巨大损失。近3年来,该虫发生越来越严重,有成为主要害虫的趋势,在田间管理过程中应重视该害虫。在苹婆种子灌浆初期,5月上旬喷施一次5%氯虫苯甲酰胺微乳剂预防,20d后再喷施一次,可有效控制该虫危害。褐色象鼻虫以幼虫蛀食苹婆髓心危害,造成主枝枯死,侧芽丛生,该虫多发生在苗圃和大田新植小苗上,是一

研究表明,损伤组和对对照组相比健康组而言,黄酮含量并无显著统计学差异;而患病叶片中黄酮含量相比健康组叶片中黄酮含量有所增加,且具有显著统计学差异,说明在银杏叶斑病发病过程中被侵染细胞周围形成的黄酮含量会有所积累,而这种积累并不是由于机械损伤引起;同时研究结果还表明,在叶斑病发病过程中,叶片黄酮含量会有所增加,但病情严重时,黄酮含量则不会再继续增加。总之,患银杏叶斑病病情较轻的叶片仍具有采摘再利用的价值;同时因黄酮具有抗菌性,黄酮的这种积累也很可能是银杏叶抵御叶斑病原菌侵染的机制之一。

参考文献

- [1] 杨光.再论科研开发银杏资源的重要意义[J].北京中医药,2008,27(6):463-466.
- [2] 邹月.银杏叶提取物对心脑血管药理作用的研究[J].内蒙古中医药,2017,36(18):122-123.
- [3] 曾常明,赵薇,丁宁,等.银杏叶提取物对神经退行性疾病作用机制的研究进展[J].中国执业药师,2013(8):21-24.
- [4] WU Y, PARK K C, CHOI B G, et al. The antibiofilm effect of *Ginkgo biloba* extract against salmonella and listeria isolates from poultry [J]. Foodborne Pathog Dis, 2016, 13(5): 229-238.
- [5] HARUYAMA T, NAGATA K. Anti-influenza virus activity of *Ginkgo biloba* leaf extracts [J]. J Nat Med, 2013, 67(3): 636-642.
- [6] WANG C Z, LI W J, TAO R. Antiviral activity of a nanoemulsion of poly-prenols from ginkgo leaves against influenza A H3N2 and hepatitis B virus in vitro [J]. Molecules, 2015, 20(3): 5137-5151.
- [7] ZHAO L J, LIU W, XIONG S H, et al. Determination of total flavonoids contents and antioxidant activity of *Ginkgo biloba* leaf by near-infrared reflectance method [J]. Int J Anal Chem, 2018, 2018: 1-7.
- [8] KOSKIMÄKI J J, HOKKANEN J, JAAKOLA L, et al. Flavonoid biosynthesis and degradation play a role in early defence responses of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) against biotic stress [J]. European journal of plant pathology, 2009, 125: 629-640.
- [9] FEUCHT W, TREUTTER D, SCHWALB P. Principles of barrier formation of scab infected fruits [J]. Z Pflanzenkr Pflanzenpathol Pflanzenschutz, 1998, 105(4): 394-403.
- [10] 陈学森,邓秀新,章文才.银杏组织培养与黄酮生产的研究 I. 银杏愈伤组织的诱导与褐变调控的研究[J].中国农业科学,1997,30(6):55-60.

种新蛀梢害虫,其具体的种名尚不知,还需进一步鉴定。

参考文献

- [1] 任惠,周婧,李一伟,等.苹婆种子营养及抗氧化活性[J].植物科学学报,2013,31(2):203-208.
- [2] 黄丽君,卢艳春,徐冬英,等.苹婆的栽培现状及发展对策[J].中国热带农业,2014(3):36-37.
- [3] 黄丽君,徐健,杨志强,等.假苹婆砧木嫁接苹婆试验初报[J].中国南方果树,2017,46(2):124-126.
- [4] 杨志强,周婧,徐健,等.不同接穗材料对苹婆嫁接的影响[J].中国南方果树,2016,45(1):77-78,81.
- [5] 赵秀芳,赵彦杰.优良园林绿化树种苹婆的繁育及栽培管理[J].林业实用技术,2008(8):51-52.
- [6] 韦持章,杨志强,周婧,等.5种杀虫剂防治苹婆叶蝉的田间药效试验[J].中国园艺文摘,2016(1):44-45,53.
- [7] 王永芬,陈娟,张翠仙,等.云南干热河谷区潞江坝香蕉主要病虫害发生调查[J].热带农业科学,2018,38(3):87-92.
- [8] 吕佩柯.中国现代果树病虫害原色图鉴[M].北京:化学工业出版社,2013.
- [9] 张巍巍,李元胜.中国昆虫生态大图鉴[M].重庆:重庆大学出版社,2011.
- [10] 李法圣.中国木虱志:昆虫纲半翅目(上卷)[M].北京:科学出版社,2011.
- [11] 湖南省林业科学研究所.昆虫分类检索表[M].长沙:湖南省林业科学研究所,1981.