

6种高等真菌醇提物对植物病原菌的抗菌活性研究

袁小红, 张春杰, 刘霞, 朱谱, 蒋晓兰, 王梓, 马林, 贺新生 (西南科技大学生命科学与工程学院, 四川绵阳 621000)

摘要 [目的]研究海绵胶煤炱菌、条纹炭角菌、瑞克纤孔菌、木蹄层孔菌、红缘拟层孔菌和高木蹄层孔菌的乙醇提取物对植物病原菌的抗菌活性。[方法]采用牛津杯法测试6种高等真菌乙醇提取物对姜瘟病菌、水稻白叶枯病菌、白菜软腐菌及柑橘溃疡病菌的抗菌活性;采用生长速率法测试6种高等真菌乙醇提取物对油菜菌核病菌、小麦赤霉病菌、苹果腐烂病菌、葡萄黑痘病菌、苹果斑点落叶病菌、棉花枯萎病菌和番茄棉腐病菌的抗真菌活性。[结果]6种高等真菌的乙醇提取物对植物病原菌具有较好的抑制活性;除海绵胶煤炱菌外,其他5种高等真菌的乙醇提取物均对植物病原菌具有较好的抑制活性。[结论]6种高等真菌对植物病原菌具有较好的活性,可进一步用于抗菌活性成分分离和生物农药开发研究。

关键词 高等真菌;抗细菌活性;抗真菌活性;牛津杯法;生长速率法

中图分类号 S48 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)12-05289-02

Antimicrobial Activities of Ethanol Extracts from Six Species of Higher Fungi against Plant Pathogens

YUAN Xiao-hong et al (School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang, Sichuan 621000)

Abstract [Objective] To study on the antimicrobial activities of the ethanol extracts from *Scorias spongiosa*, *Xylaria grammica* Pat., *Inonotus rickii*, *Fomes fomentarius*, *Fomitopsis pinicola* and *Fomes robustus* against plant pathogens. [Method] The antibacterial activities against *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas oryzae*, *Erwinia carotovora* and *Xanthomonas citri* were tested by the Oxford cup method, and the antifungal activities against *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium graminearum* Seh., *Valsa mali* Miyabe et Yamade, *Sphaceloma ampelinum*, *Alternaria alternaria* f. sp. mali, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Handson, *Pythium ultimum* Trow were tested by the mycelium growth rate method. [Result] The ethanol extracts from six species of higher fungi showed strong antibacterial activities and antifungal activities except for *Scorias spongiosa*. [Conclusion] The ethanol extracts from six species of higher fungi were found to have strong antibacterial and antifungal activities, and this could be used for further investigation on antimicrobial compounds and biopesticide.

Key words Higher fungi; Antibacterial activity; Antifungal activity; Oxford cup method; Growth rate method

高等真菌次生代谢产物具有结构多样、作用机制独特以及对环境的适应性和兼容性强等特点,因此,从高等真菌中寻找结构新颖、活性显著的先导化合物已成为国际上新一代农药研发的热点^[1]。四川盆地是世界高等真菌物种多样性最丰富的地区之一,据估计有3 000~5 000种高等真菌^[2]。贺新生等通过长期对四川盆地高等真菌多样性的研究发现了海绵胶煤炱菌^[3]和瑞克纤孔菌^[4]等多种高等真菌,但对它们的次生代谢产物及其活性尚未进行系统研究,其活性物质基础尚不明确。为此,笔者以常见的植物病原细菌姜瘟病菌、水稻白叶枯病菌、白菜软腐菌及柑橘溃疡病菌和病原真菌油菜菌核病菌、小麦赤霉病菌、苹果腐烂病菌、葡萄黑痘病菌、苹果斑点落叶病菌、棉花枯萎病菌和番茄棉腐病菌为供试菌株,分别采用牛津杯法和生长速率法对采集自四川的海绵胶煤炱菌、条纹炭角菌、瑞克纤孔菌、木蹄层孔菌、红缘拟层孔菌、高木蹄层孔菌的乙醇提取物进行了抗细菌和抗真菌活性筛选,旨在为抗细菌和抗真菌活性先导化合物的发现及新农药的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 高等真菌。海绵胶煤炱菌(*Scorias spongiosa*)野生标本采自四川省宜宾市宜宾县竹林;条纹炭角菌(*Xylaria grammica* Pat.)采自四川省绵阳市涪城区腐木树桩;瑞克纤孔菌(*Inonotus rickii*)采自四川省简阳市1棵皂荚树上;木蹄层孔

菌(*Fomes fomentarius*)、红缘拟层孔菌(*Fomitopsis pinicola*)、高木蹄层孔菌(*Fomes robustus*)均采自四川省卧龙大熊猫自然保护区。通过组织分离得到纯菌种,标本和菌种保存于西南科技大学生命科学与工程学院菌物标本室。

1.1.2 植物病原菌株。姜瘟病菌(*Ralstonia solanacearum*)、水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae*)、白菜软腐菌(*Erwinia carotovora*)、柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas citri*)、油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)、小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum* Seh.)、苹果腐烂病菌(*Valsa mali* Miyabe et Yamade)、葡萄黑痘病菌(*Sphaceloma ampelinum*)、苹果斑点落叶病菌(*Alternaria alternaria* f. sp. mali)、棉花枯萎病菌[*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Handson]、番茄棉腐病菌(*Pythium ultimum* Trow)均由四川大学生命科学院提供。

1.2 方法

1.2.1 高等真菌乙醇提取物的制备。取海绵胶煤炱菌、条纹炭角菌、瑞克纤孔菌、木蹄层孔菌、红缘拟层孔菌和高木蹄层孔菌阴干子实体,粉碎。分别称取10 g,用50 ml 95%乙醇在室温下浸泡3次,每次2 d。合并提取液,采用旋转蒸发仪减压回收溶剂,得各高等真菌的乙醇提取物。用二甲基亚砜(DMSO)将上述高等真菌的乙醇提取物配制成浓度为1 mg/ml的溶液,用于体外抗菌活性测定。青霉素钠配成浓度为500 μg/ml的溶液,作为阳性对照。

1.2.2 抗细菌活性的测定。

1.2.2.1 培养基的制备^[5-6]。牛肉膏琼脂培养基:蛋白胨10 g,牛肉膏3 g,氯化钠5 g,琼脂15~20 g,水1 000 ml,灭菌前调pH至7.2~7.4,121℃灭菌30 min。将培养基趁热倒入预先灭

基金项目 国家自然科学基金项目(21272189)。

作者简介 袁小红(1974-),男,四川彭州人,副教授,博士,从事天然药物化学研究,E-mail:ymhpz@126.com。

收稿日期 2013-04-06

菌过的培养皿内,平放,冷却后即成琼脂平板培养基。

1.2.2.2 菌悬液的制备^[7]。将已活化的细菌菌种用接种环挑取一环菌体放入装有已灭菌的 20 ml 液体牛肉膏琼脂培养基中,置于摇床中,37 °C 恒温振荡 18~24 h 备用。

1.2.2.3 体外抗细菌活性的测定。采用牛津杯法^[7-8]。将已灭菌的琼脂培养基加热到完全融化,按每板 25.0 ml 倒入无菌培养皿中,待平板冷却后,吸取 0.2 ml 供试植物病原细菌悬液,涂满整个平板,加盖放置 5 min。待平板稍干后,用无菌镊子将牛津杯直接垂直放在培养基表面,稍微加压,以便其与培养基接触无空隙。静置 5 min 后于牛津杯中无菌加入待测样品 200 μ l,分别用青霉素钠和 0.5% DMSO 作阳性对照和阴性对照,重复 3 次。测试样品加入后再静置 15 min,37 °C 恒温培养 48 h。用游标卡尺测量抑菌圈的直径 d (mm),取平均值。抑菌效果判断标准:抑菌圈直径小于 6 mm 为耐药;抑菌圈直径在 6~10 mm 为轻度敏感;抑菌圈直径在 10~14 mm 为中度敏感;抑菌圈直径在 15~20 mm 为高度敏感;抑菌圈直径大于 20 mm 为极度敏感^[5,9]。

1.2.3 抗真菌活性的测定。

1.2.3.1 培养基的制备。PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15~20 g,自来水 1 000 ml,自然 pH,121 °C 灭菌 20 min 左右,冷却后储存备用。

1.2.3.2 体外抗真菌活性的测定。采用生长速率法^[10]。取配好的高等真菌提取液 1 ml 加入到 19 ml 已灭菌且冷却至 40 °C 左右的 PDA 培养基中,充分摇匀,无菌操作倒入平板,静置 5 min 使其冷却。用灭菌打孔器(直径 6 mm)从预先活化好的 7 种植物病原真菌平板中按照同心圆打孔,用接种针打出菌丝圆片接入到制备好的培养基平板中心,使菌片带菌丝的一面向下,贴在培养基表面。每种测试样品液 3 次重复,以不加测试样品液的培养基平板作为空白对照。接种后的培养皿于 28 °C 恒温培养。每 24 h 观察一次,根据空白对照培养皿中菌丝的生长情况调查病原菌菌丝生长情况,待对照组的菌丝长满平皿时,用十字交叉法垂直测量供试菌菌落生长直径各 1 次,取平均值。用下述公式计算抑制率:

纯生长量 = 菌落平均直径 - 菌丝圆片直径

抑制率(%) = (空白对照菌落纯生长量 - 处理菌落纯生长量) / 空白对照菌落纯生长量 \times 100

2 结果与分析

2.1 6 种高等真菌乙醇提取物的抗菌活性 由表 1 可知,海绵胶煤炱菌乙醇提取物和木蹄层孔菌乙醇提取物对 4 种

供试菌株都有抗菌活性,且抑菌圈直径都大于 10 mm,敏感性较强,其中木蹄层孔菌对白菜软腐病菌的抑菌圈直径为 17.2 mm,与作为阳性对照的青霉素钠抑菌圈直径很接近,表现出高度敏感。条纹炭角菌、瑞克纤孔菌和红缘拟层孔菌的乙醇提取物除了对柑橘溃疡病菌无抗菌活性外,对其他 3 种供试菌株均有活性,其中瑞克纤孔菌乙醇提取物对姜瘟病菌的抑菌直径为 20.2 mm,对白菜软腐病菌的抑菌圈直径为 19.0 mm,这与作为阳性对照的青霉素钠的抑菌圈直径极为接近,说明瑞克纤孔菌对姜瘟病菌和白菜软腐病菌的抗菌活性为高度敏感;红缘拟层孔菌乙醇提取物对姜瘟病菌、水稻白叶枯病菌和白菜软腐病菌的抗菌活性也表现出高度敏感,抑菌圈直径分别为 18.5、16.9 和 17.4 mm。高木蹄层孔菌乙醇提取物对水稻白叶枯病菌、白菜软腐病菌和柑橘溃疡病菌也表现出抗菌活性。

表 1 6 种高等真菌乙醇提取物的抗菌活性 mm

醇提物来源	抑菌圈直径			
	姜瘟病菌	水稻白叶枯病菌	白菜软腐病菌	柑橘溃疡病菌
海绵胶煤炱菌	11.8	11.5	10.6	10.0
条纹炭角菌	12.1	12.1	12.0	0
瑞克纤孔菌	20.2	12.2	19.0	0
木蹄层孔菌	11.8	11.8	17.2	12.8
红缘拟层孔菌	18.5	16.9	17.4	0
高木蹄层孔菌	0	11.0	12.6	11.2
青霉素钠	26.2	24.7	20.0	23.2
0.5% DMSO	0	0	0	0

2.2 6 种高等真菌乙醇提取物的抗真菌活性 由表 2 可知,瑞克纤孔菌和条纹炭角菌的乙醇提取物对 7 种病原真菌都有抑制活性,且抑制率较高,瑞克纤孔菌乙醇提取物对油菜菌核病菌的抑制率达 80.6%,对苹果腐烂病菌的抑制率达 78.4%;条纹炭角菌乙醇提取物对苹果腐烂病菌的抑制率达 84.9%,对油菜菌核病菌的抑制率达 76.8%。木蹄层孔菌乙醇提取物除了对油菜菌核病菌和小麦赤霉病菌的抑菌活性未测试外,对其余 5 种病原真菌都有一定的抑制活性,对番茄棉腐病菌的抑制率达 70.3%。高木蹄层孔菌乙醇提取物对葡萄黑痘病菌无抑制作用,但对苹果斑点落叶病菌的抑制率达 70.6%。红缘拟层孔菌乙醇提取物对小麦赤霉病菌、苹果腐烂病菌、葡萄黑痘病菌、棉花枯萎病菌和番茄绵腐病菌表现出不同程度的抑制效应。海绵胶煤炱菌乙醇提取物对测试的 5 种病原真菌均无抑制活性。

表 2 6 种高等真菌乙醇提取物的抗真菌活性 %

醇提物来源	抑制率						
	油菜菌核病菌	小麦赤霉病菌	苹果腐烂病菌	葡萄黑痘病菌	苹果斑点落叶病菌	棉花枯萎病菌	番茄棉腐病菌
海绵胶煤炱菌	NT	NT	0	0	0	0	0
条纹炭角菌	76.8	51.0	84.9	48.0	45.5	41.9	50.9
瑞克纤孔菌	80.6	50.3	78.4	53.4	47.0	45.6	40.9
木蹄层孔菌	NT	NT	50.5	48.9	42.3	40.4	70.3
红缘拟层孔菌	NT	57.6	22.1	33.7	0	30.1	12.1
高木蹄层孔菌	NT	NT	56.4	0	70.6	10.5	55.6

注:NT 表示未测试。

- [21] EDWARDS R, OWEN W J. Comparison of glutathione S-transferases of *Zea mays* responsible for herbicide detoxification in plants and suspension-cultured cells[J]. *Planta*, 1986, 169(2): 208-215.
- [22] ROSS R A, BIEDLER J L. Expression of a melanocyte phenotype in human neuroblastoma cells *in vitro*[J]. *Prog Clin Biol Res*, 1985, 175: 249-259.
- [23] MARINOVICH M, VIVIANI B, CAPRA V, et al. Facilitation of acetylcholine signaling by the dithiocarbamate fungicide propineb[J]. *Chem Res Toxicol*, 2002, 15: 26-32.
- [24] LIU H G, XU L H. Garlic oil prevents tributyltin-induced oxidative damage *in vivo* and *in vitro*[J]. *Food Protect*, 2007, 70: 716-721.
- [25] FU W Y, XU L H, YU Y N. Proteomic analysis of cellular response to microcystin in human amnion FL cells[J]. *Proteome Res*, 2005, 4: 2207-2215.
- [26] 王昕, 施媳萍, 朱雪涛. MqT 法评价医用高分子材料的细胞毒性[J]. *山东生物医学工程*, 2003, 22(1): 46.
- [27] BORDENAVE L, BAREILLE R, LEFEBVRE F, et al. A comparison between 51 chromium release and LDH release to measure cell membrane integrity; interest for cytocompatibility studies with biomaterials[J]. *Appl Biomater*, 1993, 4: 309-315.
- [28] HE H Q, SUN F. Studies on the characteristics of acid and alkaline phosphatase in Chinese shrip[J]. *Penaeus Chinese. Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 1992, 23(5): 555-560.
- [29] GOTZ M E, KUNIG G, RIEDERER P, et al. Oxidative stress; free radical production in neural degeneration[J]. *Pharmacol Ther*, 1994, 63: 37-122.
- [30] ZHANG Y, DAWSON V L, DAWSON T M. Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease[J]. *Neurobiol Dis*, 2000, 7: 240-250.
- [31] OWEN A D, SCHAPIRA A H, JENNER P, et al. Oxidative stress and Parkinson's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1996, 786: 217-223.
- [32] CHRISTEN Y. Oxidative stress and Alzheimer disease[J]. *Am J Clin Nutr*, 2000, 71: 621-629.
- [33] MARNETT L J. Chemistry and biology of DNA damage by malondialdehyde[J]. *IARC Sci Publ*, 1999, 150: 17-27.
- [34] MARNETT L J. Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde[J]. *Mutat Res*, 1999, 424: 83-95.
- [35] MUTLU-TURKOGLU U, ILHAN E, OZTEZCAN S, et al. Age-related increases in plasma malondialdehyde and protein carbonyl levels and lymphocyte DNA damage in elderly subjects[J]. *Clin Biochem*, 2003, 36: 397-400.
- [36] WOON-GYE C, CRISTOBAL L M, CLAUDIA S M. Epigallocatechin gallate(EGCG) potentiates the cytotoxicity of rotenone in neuroblastoma SH-SY5Y cells[J]. *Brain Research*, 2007, 1176: 133-142.
- [37] 吴波, 马捷, 孟奎. 肝细胞凋亡的超微结构观察[J]. *电子显微学报*, 2000, 19(6): 791-797.
- [38] MASHIMA T, NAITO M, TSURUO T. Caspase-mediated cleavage of cytoskeletal actin plays a positive role in the process of morphological apoptosis[J]. *Oncogene*, 1999, 18(15): 2423-2430.
- [39] PRENDERGAST M A, SELF R L, SMITH K J, et al. Microtubule-associated targets in chlorpyrifos oxon hippocampal neurotoxicity[J]. *Neuroscience*, 2007, 146: 330-339.
- [40] KITAZAWA M, ANANTHARAM V, KANTHASAMY A G. Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2001, 31: 1473-1485.
- [41] KITAZAWA M, ANANTHARAM V, KANTHASAMY A G. Dieldrin induces apoptosis by promoting caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cdelta in dopaminergic cells; relevance to oxidative stress and dopaminergic degeneration[J]. *Neuroscience*, 2003, 119: 945-964.
- [42] SHIMOHAMA S, TANINO H, FUJIMOTO S. Differential expression of rat brain caspase family proteins during development and aging[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289: 1063-1066.
- [43] YAKOVLEV A G, OTA K, WANG G, et al. Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase-3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury[J]. *Neuroscience*, 2001, 21: 7439-7446.
- [44] DAS A, BANIK N L, RAY S K. Mechanism of apoptosis with the involvement of calpain and caspase cascades in human malignant neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to flavonoids[J]. *Cancer*, 2006, 119: 2575-2585.
- [45] CAHILL M A, PETER M E, KISCHKEL F C, et al. CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases[J]. *Oncogene*, 1996, 13: 2087-2096.
- [46] JOHNSON N L, GARDNER A M, DIENER K M, et al. Signal transduction pathways regulated by mitogen-activated/extracellular response kinase kinase induce cell death[J]. *Biol Chem*, 1996, 271: 3229-3237.
- [47] XIA Z, DICKENS M, RAINGEAUD J, et al. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis[J]. *Science*, 1995, 270: 1326-1331.

(上接第 5290 页)

3 讨论

本研究选用常见的 4 种植物病原细菌和 7 种植物病原真菌作为测试对象,研究了海绵胶煤炱菌、条纹炭角菌、瑞克纤孔菌、木蹄层孔菌、红缘拟层孔菌和高木蹄层孔菌的乙醇提取物的抗菌活性,结果表明该 6 种高等真菌均表现出一定的抗菌活性。但对于不同的病原细菌和病原真菌,不同高等真菌乙醇提取物的抗菌活性表现出一定的差异和选择性。6 种高等真菌对水稻白叶枯病菌和白菜软腐病菌都有抑制活性;除了高木蹄层孔菌外,其他 5 种真菌对姜瘟病菌都有抗菌活性;海绵胶煤炱菌、木蹄层孔菌和高木蹄层孔菌对柑橘溃疡病菌都有抗菌活性;瑞克纤孔菌和条纹炭角菌乙醇提取物对 7 种病原真菌都有抑制活性,木蹄层孔菌、高木蹄层孔菌和红缘拟层孔菌乙醇提取物对 5 种病原真菌有抑制作用。后期可在抗菌活性追踪的基础上,通过萃取、柱层析和重结晶等方法分离纯化出抗菌活性成分,并通过质谱、红外光谱、紫外光谱、核磁共振和 X-射线单晶衍射等波谱学技术确定其

结构,进而可分析高等真菌醇提取物产生抑菌活性的化学基础,有助于阐明不同病原菌抑制作用存在较大差异的原因,并为新型抗菌活性成分的和生物农药的研发奠定基础。

参考文献

- [1] 刘吉开. 高等真菌化学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2004.
- [2] 贺新生. 四川盆地蕈菌图志[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- [3] 贺新生, 刘超洋, 林琦, 等. 竹类煤烟病大型病原菌——海绵胶煤炱菌的分子鉴定[J]. *福建林学院学报*, 2011, 31(4): 363-367.
- [4] 郑俊娟, 林琦, 刘伟, 等. 瑞克纤孔菌在皂荚上的首次发现[J]. *菌物学报*, 2011, 30(1): 128-132.
- [5] 黄晓冬. 4 种龙眼核提取物的总黄酮含量、体外抗菌活性与抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2011, 32(11): 43-47.
- [6] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 1063-1068.
- [7] WANG Y, LU Z X, LV F X. Study on the antibiotic activity of microcapsule curcumin against foodborne pathogens[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 13(6): 71-74.
- [8] 王金亭. 紫金花红色素抑菌和体内抗氧化活性的研究[J]. *食品科技*, 2011, 36(9): 238-250.
- [9] 戴自英. 临床抗菌药理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 219-223.
- [10] 陈利军, 尹健, 熊建伟, 等. 7 种药用植物提取物抑菌活性测定[J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(21): 5562-5571.