

大镰刀藓提取物对立枯丝核菌的抑菌性及理化性质研究

程辉彩¹, 赵建成²

(1. 河北省生物研究所, 河北 石家庄 050081; 2. 河北师范大学 生命科学院, 河北 石家庄 050016)

摘要: 以立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)为供试病原真菌, 对大镰刀藓(*Drepanocladus exannulatus*)醇提液进行抑菌活性研究, 结果表明, 提取液抑菌活性在 $-20 \sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 可以稳定存在, 中性或弱碱性条件下最强, 持效期随时间延长呈下降趋势; 低温($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)与室温条件下保存, 3 个月内活性稳定。经定性分析, 大镰刀藓提取液的主要有效成分为黄酮类化合物。

关键词: 大镰刀藓; 醇提液; 立枯丝核菌; 抑菌性

中图分类号: S432.4⁺4 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2007)12-0060-03

Physical and Chemical Characters of *Drepanocladus exannulatus* Extracts and Its Activity against *Rhizoctonia solani* of *Drepanocladus exannulatus*

CHENG Hui-cai¹, ZHAO Jian-cheng²

(1. Hebei Institute of Biology, Shijiazhuang 050081, China;

2. College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract: The alcohol extract of *Drepanocladus exannulatus* was tested on *Rhizoctonia solani* *in vitro* by growth rate method. Results showed that the extract of *Drepanocladus exannulatus* had the strongest inhibitory effect to *Rhizoctonia solani* and could maintain its antifungal activity steadily from -20 to $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Extracts remained the most activity in neutral or weak alkaline conditions. The increase or decrease of pH could cause the antifungal activity of extracts to drop down. Antifungal activity of the extract presented downward trend with the extension of time against *Rhizoctonia solani*. After kept at room temperature and low temperature ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), the antifungal activity was stable for 3 months. Qualitative analysis indicated that the main effective composition of *Drepanocladus exannulatus* extract might be flavonoids chemical compounds.

Key words: *Drepanocladus exannulatus*; Alcohol extract; *Rhizoctonia solani*; Antifungal activity

当前, 虽然有关植物提取物对植物病原菌抗菌活性的研究较杀虫活性少, 但是, 植物仍被认为是化学合成杀菌剂替代品最好的开发资源。苔藓植物化学活性成分研究结果表明, 苔藓植物可以产生丰富的次生代谢产物, 是潜在天然活性产物宝库^[1~4]。近年, 已有多数苔藓植物被证明有抗微生物活性, 但

多是针对医药研究领域, 不过在农业抑菌方面的研究也开始逐渐增多^[5]。通过大量试验, 确定大镰刀藓醇提液对立枯丝核菌有较好抑菌活性^[6, 7], 在此基础上, 对大镰刀藓醇提液的抑菌活性及理化特性进行了研究, 旨在为进一步开发苔藓植物资源提供科学依据。

收稿日期: 2007-07-10

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(301107)

作者简介: 程辉彩(1974-), 女, 河北栾城人, 助理研究员, 硕士, 主要从事微生物农药的研究。

1 材料和方法

1.1 供试样品

大镰刀藓[*Drepanocladus exannulatus* (B.S.G.) Warnst.] 采自北京密云自强路, 海拔 200m, 山涧沼泽地。

1.2 供试菌种及来源

立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*), 河北省生物研究所微生物研究室分离及保存。

1.3 PDA 培养基及成分

土豆 200g/L, 酵母膏 5g/L, 蔗糖 20g/L, KH_2PO_4 3g/L, MgSO_4 1.5g/L, 琼脂 20g/L, pH 自然。

1.4 试验方法

1.4.1 供试样品提取液的制备 将大镰刀藓样品用自来水与蒸馏水浸洗干净, 50℃电热恒温培养箱内烘干, 然后用电动粉碎机将其粉碎成粉末。称取 10g 粉末样品, 置于具塞三角瓶中, 加 50mL 95%乙醇, 在摇床上振荡提取 24h, 1500r/min 离心 10min, 收集上清, 将残渣再用 50mL 95%乙醇重复提取两次, 合并 3 次提取液, 浓度为 0.067g/mL(干样), 置 4℃冰箱保存备用。

1.4.2 生物测定法 采用菌丝生长速率法^[8]。

1.4.3 藓类植物提取液理化性质研究

1.4.3.1 温度对提取液活性的影响 把提取液分为 7 份, 分别在 -20℃, 4℃, 30℃, 50℃, 80℃, 100℃下处理 1h 及湿热灭菌(121℃)处理 30min, 用生长速率法进行生物测定。

1.4.3.2 不同 pH 对提取液活性的影响 将大镰刀藓提取液分别用 HCl, NaOH 溶液调 pH 为 2, 4, 6, 8, 10, 平衡 24h 后, 通过生长速率法进行生物测定, 比较其生物活性的差异。

1.4.3.3 提取液持效时间测定 平板上接种立枯丝核菌, 1d 后开始测量菌落直径, 每天定时测量记录, 直至空白处理菌落长满平皿, 用生长速率法比较不同时间抑菌活性的差异。

1.4.3.4 保存时间对提取液活性的影响 分别在室温和 4℃冰箱保存提取物, 每隔 15d 进行一次生物测定, 持续测定 3 个月, 以观察其生物活性随保存时间的变化。

1.4.4 大镰刀藓提取液初步定性分析

1.4.4.1 盐酸—锌粉反应 取大镰刀藓提取液 1mL, 加入少量锌粉, 再加浓盐酸 2~3 滴, 观察颜色变化。

1.4.4.2 铝盐反应 取大镰刀藓提取液滴于滤纸上, 重复滴几次, 干燥后, 喷 1%三氯化铝溶液, 在紫外光下观察颜色变化及是否有荧光。

1.4.4.3 镁盐反应 大镰刀藓提取液滴于滤纸上, 重复滴几次, 干燥后, 喷醋酸镁的甲醇溶液, 加热干燥, 在紫外灯光下观察。

1.4.4.4 铅盐反应 取大镰刀藓提取液 5mL, 加入 1%醋酸铅水溶液 5mL, 观察沉淀情况。

1.4.4.5 硼酸反应 于两支试管中加入大镰刀藓提取液各 5mL, 分别加入草酸和柠檬酸 5mL, 溶解后再加入少许硼酸, 观察颜色变化。

1.4.4.6 碱性试剂显色反应 取大镰刀藓提取液, 加适量 NaOH 或 Na_2CO_3 , 观察颜色变化。

1.4.5 数据记录与分析 试验结果中数据为 3 个平行样的平均值, 数据统计分析采用 SPSS 软件; 列表中同项数据后相同小写字母表示在 5%水平上无显著差异。

2 结果与分析

2.1 温度对大镰刀藓提取液抑菌活性的影响

由表 1 可知, 大镰刀藓提取液在 -20~80℃内活性稳定, 100℃及 121℃时, 提取液活性显著下降, 表明其活性成分在 80℃以下可以稳定存在。

表 1 不同温度处理的提取液对立枯丝核菌的抑制效果

处理温度 (℃)	抑菌率 (%)	处理温度 (℃)	抑菌率 (%)
对照(室温)	67.8±1.3a	50	67.5±1.4a
-20	66.9±2.1a	80	66.8±1.7a
4	67.0±1.8a	100	57.4±2.0b
30	66.5±1.5a	121	55.6±2.3b

注: 提取液在培养基中浓度为 1.2mg/mL(干样)

2.2 不同 pH 对大镰刀藓提取液抑菌活性的影响

图 1 表明, 提取液在强酸性(pH4 以下)和强碱性(pH10)条件下活性均显著下降, 在中性及弱碱性条件下活性最强。随酸性或碱性的增强, 提取液的

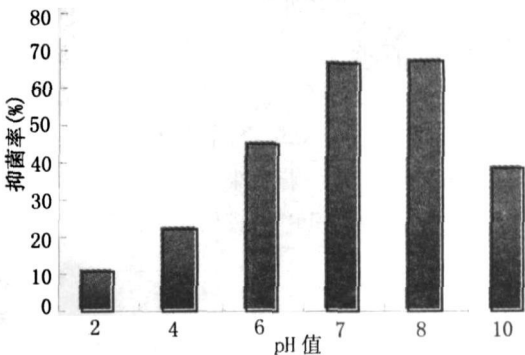


图 1 不同 pH 对大镰刀藓提取液抑菌活性的影响

抑菌活性均下降。

2.3 大镰刀霉提取液抑菌活性的持效时间

通过定时测定提取液对立枯丝核菌生长的影响,结果(图 2)表明,提取液对立枯丝核菌的抑菌活性随时间的延长而逐渐下降。

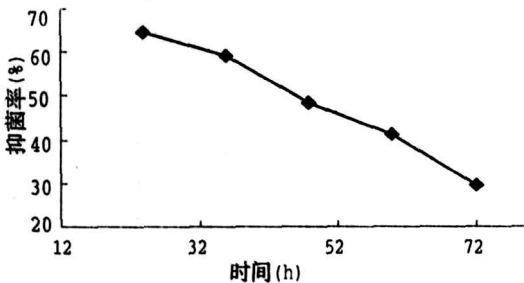


图 2 提取液的抑菌活性随时间的变化

2.4 保存时间对大镰刀霉提取液抑菌活性的影响

由图 3 可知,提取液在低温(4℃)与室温条件下

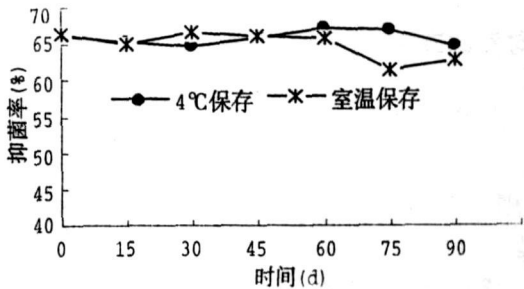


图 3 保存时间对大镰刀霉提取液抑菌活性的影响

保存,3 个月内活性均较稳定,相对而言,提取液活性在低温条件下比室温下保存要稳定一些,对于更长保存时间内提取液活性的变化有待进一步测试。

2.5 大镰刀霉提取液初步定性结果

通过对大镰刀霉提取液进行的一系列显色反应可知(表 2),提取液的主要有效成分为黄酮类化合物。至于大镰刀霉提取液内的具体成分有待进一步研究。

表 2 大镰刀霉提取液的定性检验结果

检验方法	试剂	现象	结论
还原反应	盐酸- 锌粉	红色泡沫	黄酮类化合物
与金属离子的络合反应	铝盐	黄色荧光	黄酮类、黄酮醇、查耳酮、异黄酮类等
	镁盐	黄色荧光	黄酮类、黄酮醇、查耳酮、异黄酮类等
	铅盐	红黄色沉淀	黄酮类
显色反应	硼酸	黄色	黄酮类
	氢氧化钠	黄色	黄酮类、异黄酮类等

3 讨论

试验结果表明,大镰刀霉提取液中有效成分的活性受温度、pH 值等环境因素影响。这可能是由于活性成分的化学结构只能在一定温度和 pH 条件下保持稳定。显然,不同化学结构对于环境条件的适应范围是不完全相同的,因此,提取液会有其独特的环境适应范围。另外,提取液中的有效化学成分也有一定的持效期,这也与化学物质的结构有关。如果提取液中的控制活性成分的活性基团是稳定的,则提取液活性就有可能保持较长的时间。相反,如果控制其活性的基团是不稳定的,则提取液的活性保持将是一个需要研究的问题。本研究中,大镰刀霉提取液在低温和室温条件下保存 3 个月,其抑菌活性相对稳定,暗示着控制活性的基团可能是稳定的,但由于试验时间相对较短,还需进一步研究。

参考文献:

[1] 朱瑞良,王幼芳,熊李虎. 苔藓植物研究进展 I . 我国苔

藓植物研究现状与展望[J] . 西北植物学报, 2002, 22 (2): 444— 451.

[2] 王风强, 娄红祥, 温学森. 苔藓植物化学成分及生物活性研究进展[J] . 国外医药· 植物药分册, 1997, 12(6): 243— 247.

[3] Zinsmeister H D, Becker H, Eicher T, *et al.* Bryophytes, a source of biologically active, naturally occurring material[J] . Angew Chem(Int Ed Engl), 1991, 30: 130 — 147.

[4] 周江煜. 苔藓植物的化学活性成分研究概况[J] . 广西中医学院学报, 2002, 5(4): 84— 87.

[5] 汪庆, 罗宣. 苔藓植物的主要次生代谢产物与有害生物防治[J] . 贵州科学, 2001, 19(4): 93— 100.

[6] 程辉彩, 赵建成, 张丽萍, 等. 三种苔藓植物提取物对植物病原菌的抑菌性研究[J] . 微生物学杂志, 2005, 25 (3): 82— 84.

[7] 程辉彩, 赵建成. 藓类提取物对植物病原真菌的抑菌性研究[J] . 天然产物研究与开发, 2006, 18(5): 728— 732.

[8] 方中达. 植病研究方法[M] . 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 151— 154.