

抗稻瘟病菌活性多植物提取物组方研究

霍光华, 严伟, 符金华, 陈明辉, 叶亚建

(江西农业大学 生物科学与工程学院, 江西 南昌 330045)

摘要: 为了强化植物天然产物抗稻瘟活性和减少使用剂量, 进行了菌丝生长和孢子萌发抑制活性测定、配伍药效模型多植物提取物活性级分组方, 结果显示: 木荷叶、无患子果皮、广玉兰叶、油茶叶、苦楮叶、雪松叶等材料醇级分抑制稻瘟病菌活性较强, 抑制菌丝生长的中有效浓度 (EC_{50}) / 最小抑菌浓度 (MIC) 分别为: 0.08 / 0.60、0.08 / 0.80、0.17 / 1.00、0.22 / 0.60、0.35 / 1.50、0.16 / 1.00 mg/mL, 抑制孢子萌发的最小浓度 (MIC) 分别为: 1.6、1.7、2.9、3.1、2.9、4.6 mg/mL。70%乙醇提取物组方抑菌效果表明: 对菌丝生长抑制, 两两组合时无患子和广玉兰的协同作用最强, 木荷和雪松的拮抗作用最强; 多组合时木荷、无患子、广玉兰取高剂量时可以获得最大的抑制效果。对孢子的抑制情况, 两两组合时均能加强抑制稻瘟病菌孢子的萌发, 多组合时木荷、无患子、广玉兰、油茶、苦楮组方时可以获得最好的抑制效果。本文所选用的组方药效模型具有预测值与实测值相关性好, 可预测性强的特点, 适用于开发植物源杀菌剂的多组分组方优选。

关键词: 多植物提取物; 组方; 抗稻瘟病菌活性; 配伍药效模型

中图分类号: S432.2, S794.4

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 01-0027-10

A Study on Combination of Multi-plant-extract with Activity Resisting *Magnaporthe oryzae*

HUO Guang-hua, YAN Wei, FU Jin-hua, CHEN Ming-hui, YE Ya-jian

(College of Life Sciences and Engineering, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

Abstract: To strengthen the activity resisting the rice blast of natural products from plants and lessen their use doses, inhibition of the mycelium growth and pore Germination were determined and a prescription pharmacodynamic model was adopted for the combination of fractions from the multi-plant-extract with the activity. Results showed the ethanol extracts of *Schima superba* leaves, *Sapindus mukorossi* mesocarp, *Magnolia grandiflora* leaves, *Camellia oleifera* leaves, *Castanopsis sclerophylla* leaves, and *Cedrus deodara* leaves were of strong activities resisting *Magnaporthe oryzae*. 50% effective concentration (EC_{50}) / minimum inhibiting concentration (MIC) of inhibiting mycelium growth were 0.08 / 0.60, 0.08 / 0.80, 0.17 / 1.00, 0.22 / 0.60, 0.35 / 1.50, and 0.16 / 1.00 mg/mL respectively. MIC of the inhibiting spore germination were 1.6, 1.7, 2.9, 3.1, 2.9, and 4.6 mg/mL respectively. Antifungal effects of 70% ethanol extract combination showed there were strong synergic effects of the combination between *Sapindus mukorossi* and *Magnolia grandiflora*, antagonistic effects of the combination between *Schima superba* and *Cedrus deodara*, but the maximum inhibiting effect of higher doses combination was among *Schima superba*, *Sapindus mukorossi* and *Magnolia grandiflora* on Mycelial growth inhibition. Any combination of two plant materials could strengthen the inhibition effects on the spore germination of *Magnaporthe oryzae*, and the multiple combination of *Schima superba*, *Sapindus mukorossi*, *Magnolia grandiflora*, *Camellia oleifera*, *Castanopsis sclerophylla* could get the best effects. The prescription pharmacodynamic model selected was of good correlation between measured values and forecast values, with

收稿日期: 2012-02-07

基金项目: 江西省科技支撑项目(2010BNA08800)

作者简介: 霍光华, 男, 教授, 博士, 主要从事植物资源和天然产物研究, E-mail: hgh3813899@sohu.com.

strong predictable features, which was suitable for screening the multi-component groups in the development of botanical fungicides.

Key words: multi-plant-extract; combination; the activity resisting *Magnaporthe oryzae*; the prescription pharmacodynamic model

植物活性天然产物因对人畜安全、与生态环境相容、且开发成本相对较低等特点,已成为本世纪农药开发的方向之一。如英国 BCG 公司(伦敦)与英国学院和在 Costa Rica 的商业组织合作开发了一种植物中天然化合物作为杀线虫农药;以色列的 Minrav 已将两个生物杀线虫剂 BioSafe 和 BioNem 投放市场;KHHBioWPi 公司已从 BASF 公司获得了取自巨豕草中的天然产物杀虫剂的商标权;美国在印度拥有全球最大的植物源农药印楝素生产基地,年产原药 120 万 t;我国的植物源农药苦参碱也出口日本、韩国等国家,以牛蒡叶活性物质为主要成分的具有抗病毒功能的植物细胞膜保护剂已经登记,新产品推广应用面积超 6 700 hm²[1]。

20 世纪 80 年代以来,植物源杀虫剂的研究已比较深入,植物源杀菌剂研究却较为迟缓,杀菌剂的研究开发任重道远。如何增强植物天然产物抗菌活性,降低其使用剂量,是开发植物源杀菌剂的重要研究内容。

水稻 (*Oryza sativa*) 是世界(包括我国)主要的粮食作物之一,稻瘟病 (Rice blast) 是由稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 引起的水稻灾难性的病害。该病潜伏期长,发病部位多,分布广泛,危害严重。在世界范围内约导致水稻年减产 1.57 亿 t 左右。为防治稻瘟病,人类付出了不懈的努力,主要工作集中在选育水稻抗性品种和开发杀瘟剂上。迄今,人类已发现 73 个抗稻瘟病基因,其中的 8 个基因即 pib, pita, pikh, pi9, pi2/pidt, pid2, pi36 和 pi37 已被克隆[2]。这些抗病基因虽然能在所有抗性水稻品种中编码着相应的与稻瘟病原相关的抗性蛋白,但这些抗性品种并不能获得对高度变异的稻瘟病菌的持续抗性,仅能维持 2~3 个季节,或者 2 年[3],可因环境的改变,肥、水管理等使品种丧失抑病性,甚至变抑病为感病,同时携带抗稻瘟病基因的水稻还存在所产稻米品质低下的问题[4]。更不可忽视的潜在风险:如果转基因抗病普及有可能导致病原产生对抗酶或脱毒而选择成为超级病菌,其他野生植物因此受害或要依赖相应植物抗毒素来防御,同时,生

产用作物也都要成为遗传修饰的植物等问题。因此,世界较多国家禁用转基因作物生产,化学防治成为水稻生产上防治稻瘟病的一种不可缺少的手段。目前大面积用于防治稻瘟病的化学杀菌剂三环唑已存在环境残留[5]和富士一号已发现抗药性稻瘟病菌变异株[6]。人们期望获得结构新颖、作用方式独特的活性天然产物,从而开发出扼制稻瘟病高度变异适应的杀稻瘟剂。

本研究在前期对抗作物病原真菌植物资源普筛的基础上,针对性地选取了强抗稻瘟病菌的六种活性植物,进行了级分活性和组方等研究,意在为开发植物源杀稻瘟剂奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 植物提取液的制备

采用索氏抽提法,按极性由低到高分别用石油醚、氯仿、乙酸乙酯、无水乙醇、水对一定量的木荷叶、无患子果皮、油茶叶、广玉兰叶、雪松叶、苦楮叶进行提取制得各级分溶液。70%乙醇水溶液对上述各植物材料分别进行回流提取获得醇级分提取物溶液。然而将各溶液真空浓缩至干备用。

1.2 供试菌株

稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 菌株 132, 由江西省农科院植保所提供。

1.3 培养基

PDA 培养基、水琼脂培养基(1%琼脂+1%葡萄糖),稻秆玉米培养基(40 g 稻秆、20 g 玉米、20 g 琼脂、1 000 mL 蒸馏水)

1.4 孢子悬浮液制备

取培养了 10 d 的产孢平板(稻秆玉米培养基),用无菌水洗下孢子,四层纱布过滤,调节孢子悬液浓度至 1×10^5 个/mL。

1.5 菌丝生长速率法测定各个级分提取物抗菌活性[7-8]。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{CK菌块直径} - \text{处理菌块直径}}{\text{CK菌块直径} - \text{接入菌块直径}} \times 100\%$$

1.6 抑制孢子萌发活性测定

将系列浓度的提取物溶液与等体积孢子悬液混匀,平铺于水琼脂培养基上,设空白对照。置于26℃下保湿培养24h后镜检孢子萌发情况,以孢子芽管长度大于孢子短半径为萌发^[9-10]。

$$\text{孢子萌发率} = \frac{\text{孢子萌发数}}{\text{孢子总数}} \times 100\%$$

$$\text{校正孢子萌发率} = \frac{\text{处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100\%$$

$$\text{相对孢子萌发率}(\%) = 100 - \text{校正孢子萌发率}$$

1.7 组方药效模型^[11]

1.7.1 基本模型 以 ABCDEF 六个组分复方 (i=1,2,3,4,5,6),每个组分设有高剂量(1水平,j=1)和低剂量(2水平,j=2),且假设数值越大,药效越强,复方不含相互作用的期望效应 E_{exp} :

$$E_{\text{exp}} = E_0 + EA_{ij} + EB_{ij} + EC_{ij} \quad (1)$$

$$E_{ij} = M_{ij} - M_{\text{total}} \quad (2)$$

式中 E_0 为基线效应,即所有配伍组的均数 (M_{total}); E_{ij} (A、B、C、D、E、F) 第 i 个组分第 j 个剂量水平对基线效应的影响,即对复方的期望贡献值。

1.7.2 组分重要程度判别模型

$$E_i = M_{i1} - M_{i2} \quad (3)$$

$$S_e = \sqrt{MS_e \cdot (1/n_1 + 1/n_2)}$$

$$t = E_i / S_e$$

第 i 个组分的 E_i (E_a 、 E_b 、 E_c 、 E_d 、 E_e 、 E_f) 可反映各组分从2剂量水平升至1剂量水平时,对复方效应的贡献值,反映其在复方中的重要程度(如君药、臣药等),可由多元回归求出,或通过1水平效应均值 M_{i1} 和2水平效应均值 M_{i2} 之差求得。

1.7.3 交互效应模型 式1不包括相互作用项,如存在相互作用效应 (E_{int}) 时,实验中配伍组的相互作用分析用式4,组分间相互作用由式5求算。

$$E_{\text{int}} = E_{\text{obs}} - E_{\text{exp}} \quad (4)$$

($E_{\text{int}} > 0$ 协同, $E_{\text{int}} < 0$ 拮抗, $E_{\text{int}} = 0$ 相加)

$$E_{\text{int}} = \{EA_{ij}B_{ij}, EA_{ij}C_{ij}, EB_{ij}C_{ij}\} \quad (5)$$

E_{obs} 为配伍组的实测效应(均值), E_{int} 既是各组相互作用定性(协同或拮抗)表达,也为定量结果,需结合专业要求判别其意义。式5可通过方差分析或多元回归模型为遴选具有统计学意义的交互项。

1.7.4 随机效应模型 由于个体间变异 (η) 和个体内变异 (ϵ) 的存在,复方药效个体值与典型值(均值等)相比,表现为随机波动 E_{rand} :

$$E_{\text{rand}} = \eta + \epsilon \quad (6)$$

在统计学上, η 服从 $N(0, \omega^2)$ 分布, ω 为标准差,较大时应寻找个体间差异的原因(如基因型); ϵ 服从 $N(0, \sigma^2)$, σ 为标准差,其值大时需寻找实验的误差。

1.7.5 复方药效预测模型 本模型为最终模型 (final model) 或全量模型 (full model), 计算复方预测药效 (E_{pred}):

$$E_{\text{pred}} = E_{\text{exp}} + E_{\text{int}} + E_{\text{rand}}$$

2 结果

2.1 分级提取率和最小抑制菌丝生长和孢子萌发浓度

对木荷叶、无患子果皮、广玉兰叶、油茶叶、苦楮叶、雪松六种植物材料,按溶剂极性从低到高索氏提取,提取率差异明显,在石油醚、氯仿、乙酸乙酯、无水乙醇和水等五种溶剂中总的提取率分别为:45.3%,41%,33.7%,40.5%,36.3%,38.4%,其中木荷叶在乙酸乙酯中有较多的溶出物(占总溶出物的35.98%),油茶叶在氯仿中有较多的溶出物(占39.51%),广玉兰叶在无水乙醇中有较多的溶出物(占26.71%),而无患子果皮、苦楮叶、雪松叶在石油醚中有较多的溶出物(分别占26.83%、24.79%、33.85%)。除苦楮叶乙醇级分抑菌浓度略高外,其它五种均以无水乙醇提取物抑菌活性浓度最低,木荷叶、无患子果皮、广玉兰叶、油茶叶、苦楮叶、雪松六种植物材料无水乙醇提取物抑制菌丝生长/孢子萌发的最小浓度分别为:0.6/2.3,0.8/1.9,1.0/3.3,0.6/2.7,1.5/3.4,1.0/2.1 mg/mL,其提取物占五种溶剂总溶出物的百分率分别为:

2.2 70%乙醇提取物抑制稻瘟病菌菌丝生长中有效浓度和孢子萌发最小浓度的确定

表2,以浓度的对数为自变量,抑菌率为函数值,求两者之间的相关关系,可以得出木荷叶、无患子果皮、广玉兰叶、油茶叶、苦楮叶、雪松毒力方程分别为: $y = 34.489x + 87.021$ ($r=0.9978$), $y = 27.991x + 81.382$ ($r=0.9945$), $y = 40.565x + 81.772$ ($r=0.9839$), $y = 47.866x + 81.589$ ($r=0.9681$), $y = 52.705x + 74.409$ ($r=0.9971$), $y = 40.383x + 82.155$ ($r=0.9957$)。通过各自毒力方程计算出的抑制稻瘟病菌的中有效浓度 EC_{50} 分别为:0.08,0.08,0.17,0.22,0.35,0.16 mg/mL。

表1 分级提取率及各级分抑制菌丝生长和孢子萌发的最小浓度(mg/mL)

植物材料	石油醚级分		氯仿级分		乙酸乙酯级分		无水乙醇级分		水级分	
	提取率 %	菌丝/孢子	提取率 %	菌丝/孢子	提取率 %	菌丝/孢子	提取率 %	菌丝/孢子	提取率 %	菌丝/孢子
木荷	13.6	4.7/5.5	3.3	2.7/3.2	16.3	2.2/2.7	4.3	0.6/2.3	7.8	0.8/2.5
无患子	11.0	1.8/3.7	7.1	3.4/3.4	8.0	3.2/3.8	8.2	0.8/1.9	6.7	1.0/3.2
广玉兰	8.0	4.2/5.2	7.4	3.8/3.6	2.0	3.5/4.7	9.0	1.0/3.3	7.3	1.2/2.7
油茶	8.0	5.2/4.8	16.0	1.7/2.5	4.3	4.6/5.3	5.0	0.6/2.7	7.2	0.8/2.5
苦楮	9.0	2.7/3.1	7.2	3.7/3.7	6.3	4.3/4.7	6.8	1.5/3.4	7.0	1.2/4.7
雪松	13.0	1.8/3.9	7.3	4.1/4.3	5.1	3.8/3.8	6.2	1.0/2.1	6.8	1.6/1.8

表2 不同浓度提取物对菌丝生长抑制率(%)和抑制孢子萌发最小浓度(MIC)

木荷		无患子		广玉兰		油茶		苦楮		雪松	
浓度 mg/mL	抑菌率 %	浓度 mg/mL	抑菌率 %	浓度 mg/mL	抑菌率 %	浓度 mg/mL	抑菌率 %	浓度 mg/mL	抑菌率 %	浓度 mg/mL	抑菌率 %
2	97	2	90	3	100	3	100	3	100	3	100
1	87	1	80	2	92	2	97	2	93	2	97
0.5	75	0.5	75	1	82	1	87	1	75	1	83
0.25	67	0.25	65	0.5	75	0.5	70	0.5	55	0.5	70
0.1	52	0.1	52	0.25	55	0.25	45	0.25	40	0.25	60
0.05	42	0.05	45	0.1	40	0.1	35	0.1	20	0.1	40
1.6	MIC	3.1	MIC	2.8	MIC	4.6	MIC	1.7	MIC	2.9	MIC

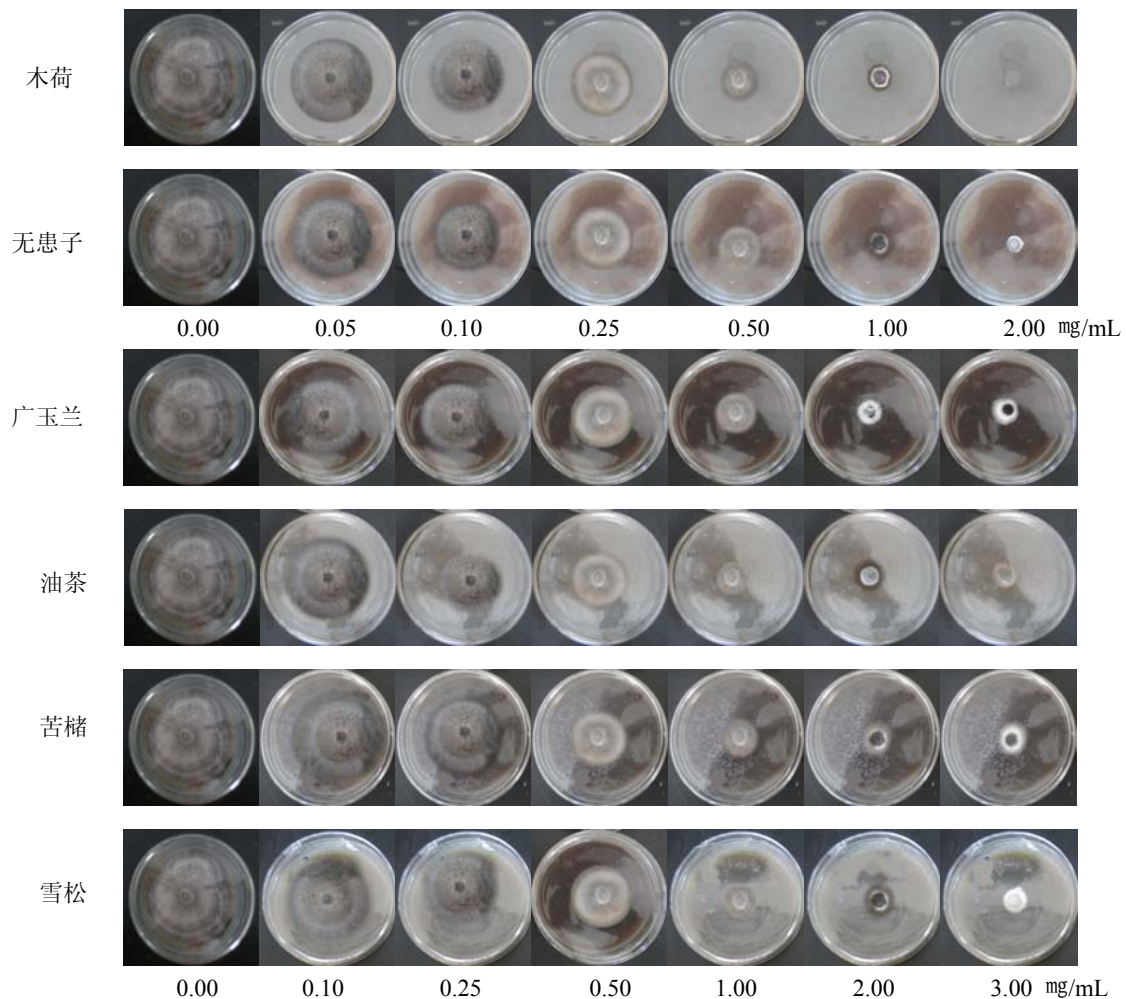


图1 各植物 70%乙醇提取物不同浓度对稻瘟病菌丝生长的抑制作用

2.3 组方设计及其实验结果

根据 2.2 中抑制稻瘟病菌菌丝生长的中有效浓度和抑制孢子萌发的最小浓度进行试验设计如表 3, 然后按照表 4 进行各植物 70%乙醇水溶液提取

物进行高低水平组方, 并测定各组方对菌丝生长和孢子萌发的抑制作用, 每组方重复实验 12 次。结果如表 4 中实测值。

表 3 抑制稻瘟病菌菌丝生长和孢子萌发各提取物 (mg/mL) 两水平设置

因素	木荷 (A)	无患子 (B)	广玉兰 (C)	油茶 (D)	苦楮 (E)	雪松 (F)
1 水平 (菌丝/孢子)	0.1/0.4	0.1/0.5	0.2/0.8	0.3/0.6	0.5/0.5	0.3/0.4
2 水平 (菌丝/孢子)	0.05/0.0	0.05/0.0	0.1/0.0	0.1/0.0	0.2/0.0	0.1/0.0

表 4 各组方药效实测值

配伍组	ABCDEF	菌体	实测值 (抑制率%, n=12)
1	111111	菌丝	85, 83, 80, 88, 85, 85, 84, 82, 82, 83, 82, 84
		孢子	82, 78, 76, 72, 73, 73, 77, 78, 78, 72, 72, 78
2	111222	菌丝	83, 80, 78, 83, 80, 78, 79, 78, 79, 74, 74, 74
		孢子	70, 70, 68, 67, 62, 62, 69, 65, 63, 63, 63, 64
3	112212	菌丝	80, 78, 76, 78, 76, 73, 72, 71, 72, 71, 73, 74
		孢子	65, 68, 67, 68, 66, 63, 62, 61, 60, 61, 63, 60
4	122121	菌丝	16, 14, 11, 9, 7, 14, 14, 13, 14, 15, 14, 8
		孢子	46, 43, 41, 43, 41, 49, 41, 41, 43, 41, 44, 46
5	122211	菌丝	19, 19, 16, 14, 19, 18, 14, 14, 15, 15, 17, 17
		孢子	19, 19, 16, 14, 19, 18, 20, 14, 15, 15, 17, 17
6	121122	菌丝	76, 73, 71, 73, 71, 69, 71, 71, 73, 71, 74, 75
		孢子	46, 50, 51, 53, 51, 49, 51, 51, 53, 51, 54, 46
7	211221	菌丝	85, 83, 83, 83, 80, 78, 80, 80, 82, 84, 80, 81
		孢子	45, 43, 50, 48, 50, 58, 57, 52, 52, 56, 50, 54
8	212121	菌丝	66, 64, 61, 61, 59, 52, 61, 63, 63, 62, 61, 61
		孢子	46, 44, 41, 41, 39, 32, 41, 43, 43, 42, 41, 41
9	212112	菌丝	83, 78, 73, 76, 73, 78, 73, 72, 73, 73, 73, 75
		孢子	63, 58, 53, 56, 53, 58, 53, 52, 53, 53, 53, 55
10	221112	菌丝	76, 73, 71, 73, 69, 66, 71, 73, 73, 71, 73, 72
		孢子	52, 53, 51, 53, 47, 46, 51, 51, 53, 51, 53, 52
11	221211	菌丝	69, 64, 66, 63, 62, 62, 61, 65, 65, 64, 62, 61
		孢子	48, 44, 46, 43, 42, 42, 41, 45, 45, 44, 42, 41
12	222222	菌丝	14, 11, 9, 9, 7, 4, 8, 8, 7, 7, 5, 5
		孢子	5, 3, 6, 7, 5, 4, 5, 8, 6, 7, 5, 5

3 组方模型分析、预测和验证

3.1 组方药效学参数分析

3.1.1 抑制菌丝生长组方药效学参数分析 药效学参数根据表 4 的抑制菌丝生长实测值进行计算获得表 5。以基线效应为标准, E 为各组方对复方药效的贡献值, 大小顺序为 BCEDAF, 即无患子>广玉兰>苦楮>油茶>木荷>雪松。理论上各个组合中最大抑制率 E_{max} 为 110.146, 最小的抑制率 E_{min} 为 6.285。

3.1.2 抑制孢子组方药效学参数分析 复方药效学参数根据表 4 抑制孢子萌发实测值进行计算获得表 6。同样以基线效应为标准, E 为各组方对复方药效的贡献值, 大小顺序为 BCDAEF, 即无患子>广玉兰>油茶>木荷>苦楮>雪松。理论上各个组合中最大抑制率 E_{max} 为 78.972, 最小的抑制率 E_{min} 为 2.278。

3.2 相互作用分析

3.2.1 抑制菌丝相互作用分析 不同组合相互作用性质不同, 由此引起的交互效应也不同。BCF 间协

同作用最强（即无患子、广玉兰、雪松间协同作用 最强，部分组别 E_{int} 较小，无实际意义。

表 5 抑制菌丝药效学参数

参数项	参数值	RSE	T 值	P 值	备注
E0	58.215	0.039			基线效应(平均效应)
E(A)	-3.903	0.373	2.679	0.008	期望贡献值
E(B)	34.958	0.042	24.000	0.000	期望贡献值
E(C)	33.986	0.043	23.332	0.000	期望贡献值
E(D)	8.986	0.162	6.169	0.000	期望贡献值
E(E)	11.875	0.123	8.152	0.000	期望贡献值
E(F)	-10.153	0.143	6.970	0.000	期望贡献值
E _{max}	110.146	1.927			最大效应
E _{min}	6.285	1.927			最低效应
σ	5.633				SD, 个体内
ω	14.137				SD, 个体间
OFV	550.489				目标函数值(-2LL)

表 6 抑制孢子药效学参数

参数项	参数值	RSE	T 值	P 值	备注
E0	5.5	0.073			基线效应(平均效应)
E(A)	11.333	0.106	9.428	0.000	期望贡献值
E(B)	23.583	0.051	19.619	0.000	期望贡献值
E(C)	18.694	0.064	15.552	0.000	期望贡献值
E(D)	11.722	0.103	9.752	0.000	期望贡献值
E(E)	8.139	0.148	6.771	0.000	期望贡献值
E(F)	-3.222	0.373	2.681	0.008	期望贡献值
E _{max}	78.972	1.505			最大效应
E _{min}	2.278	2.248			最低效应
σ	5.212				SD, 个体内
ω	12.173				SD, 个体间
OFV	559.12				目标函数值(-2LL)

表 7 配伍组抑制菌丝生长实测药效 E_{obs}、期望药效 E_{exp} 和交互效应 E_{int}

ABCDEF	E _{obs}	E _{exp}	E _{int}	备注
111111	84.58	96.09	-12.51	拮抗
111222	78.33	85.38	-7.05	拮抗
112212	74.50	63.27	11.23	协同
122121	12.42	15.27	-2.85	拮抗
122211	16.42	18.16	-1.74	拮抗
121122	72.33	59.41	12.92	协同
211221	81.58	79.13	2.45	协同
212121	61.17	54.13	7.04	协同
212112	75.00	76.16	-1.16	拮抗
221112	71.75	75.19	-3.44	拮抗
221211	63.67	56.05	7.62	协同
222222	7.83	20.34	-12.51	拮抗

3.2.2 抑制孢子相互作用分析 如表 8, AEF 间拮抗作用最强（即木荷、苦楮、雪松提取物对稻瘟病孢子间拮抗作用最强），部分组别 E_{int} 较小，无实

际意义。

3.3 复方药效模拟和验证

3.3.1 抑制菌丝单组份和两两组合的药效期望变化

值 将个单组分及两两组合对复方药效的贡献值进行了排列, 贡献值为使用后效应变化值 E , 即复方药效的增加或减弱的大小, 表中已扣除基线值(E_0), 贡献值越大越重要。表 9 可知 BC 即: 无患子、广玉兰协同作用最强, 而 AF 即: 木荷、雪松拮抗作用最强。无患子和其植物两两组方都有较好的协同作用。

3.3.2 抑制菌丝多组方模拟预测和验证 模拟多个组方结果见表 10。其中最大效应 (E_{max}) 组合为 A2B1C1D1E1F2 即: 木荷、雪松用低剂量, 其他几种植物用高剂量, 最小组合 (E_{min}) 为 A1B2C2D2E2F1 即: 与最大效应用量相反。综合实验选取的组方为 A1B1C1 即: 木荷、无患子、广玉兰选取高剂量。

表 8 配伍组抑制孢子萌发实测药效 E_{obs} 、期望药效 E_{exp} 和交互效应 E_{int}

ABCDEF	E_{obs}	E_{exp}	E_{int}	备注
111111	75.75	75.75	0.00	相加
111222	65.50	59.11	6.39	协同
112212	63.67	48.56	15.11	协同
122121	43.25	25.33	17.92	协同
122211	16.92	21.75	-4.38	拮抗
121122	50.50	47.25	3.25	协同
211221	51.25	44.56	6.69	协同
212121	41.17	37.58	3.58	协同
212112	55.00	48.94	6.06	协同
221112	51.08	44.06	7.03	协同
221211	43.58	29.11	14.47	协同
222222	5.50	5.50	0.00	相加

表 9 两两组合抑制菌丝的药效期望变化值

	A1	B1	C1	D1	E1	F1
A1	-1.951	15.53	15.04	2.54	3.99	-7.03
B1	15.53	17.48	34.47	21.97	23.42	12.40
C1	15.04	34.47	16.99	21.49	22.93	11.92
D1	2.54	21.97	21.49	4.49	10.43	-0.58
E1	3.99	23.42	22.93	10.43	5.94	0.86
F1	-7.03	12.40	11.92	-0.58	0.86	-5.08

表 10 多组方抑制菌丝模拟预测

组方方案	E_{pred}	95%CI(L)	95%CI(H)	CI	备注
A2B1C1D1E1F2	110.15	106.34	113.96	3.81	E_{max}
A1B2C2D2E2F1	6.29	2.47	10.10	3.81	E_{min}
A1B1C1	90.74	86.59	94.88	4.15	自定义组方
A1D1E2	54.82	46.02	63.62	8.80	
A1C2D1	43.76	36.76	50.77	7.00	
A1B2D2	34.29	27.42	41.16	6.87	
A1B2C1D1F2	65.35	61.06	69.63	4.28	
D2E1F1	54.58	45.93	63.24	8.66	
B1C2D2E1F1	55.07	51.46	58.68	3.61	
B2C1F1	52.65	48.81	56.49	3.84	
A1C1E2F1	62.24	54.76	69.73	7.49	
B2C1	57.73	54.11	61.35	3.62	
A1C1D2F1	63.69	56.06	71.31	7.63	

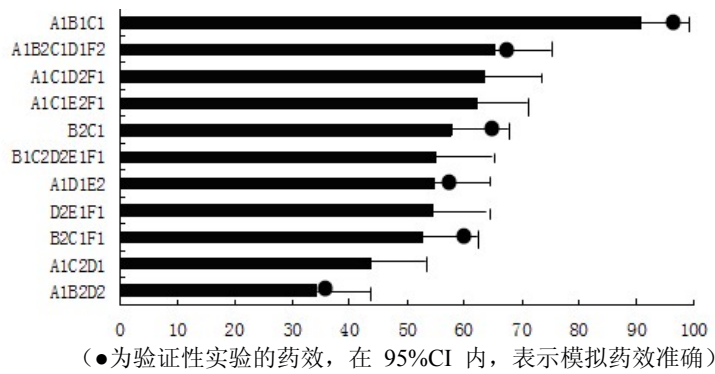


图 2 组分 A-F 随机组方的模拟药效与验证

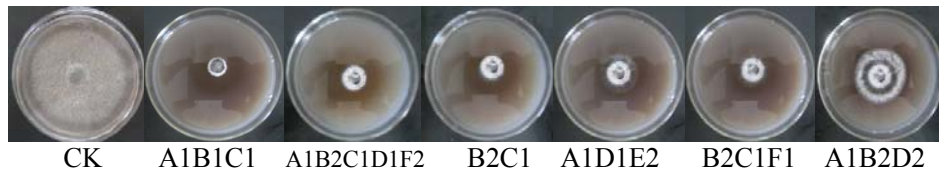


图 3 几种代表性预测组方的抑制稻瘟病菌菌丝生长效果

3.3.3 抑制孢子单组份和两两组合的药效期望变化值 同样,表 11 可知 BC 即:无患子、广玉兰协同作用最强,两两之间的组合都可以加强对稻瘟病的孢子的抑制。

组方结果见表 12,其中最大效应 (Emax) 组合为 A1B1C1D1E1 即:木荷、无患子、广玉兰、油茶、苦楮组方,最小组合 (Emin) 为 F 即:雪松的单方。综合实验选取的组方为 A1B1C1D1E1 即:木荷、无患子、广玉兰、油茶、苦楮组方。

3.3.4 抑制孢子多组方模拟预测和验证 模拟多个

表 11 两两组合的药效期望变化值

	A1	B1	C1	D1	E1	F1
A1	11.33	34.92	30.03	23.06	19.47	8.11
B1	34.92	23.58	42.28	35.31	31.72	20.36
C1	30.03	42.28	18.69	30.42	26.83	15.47
D1	23.06	35.32	30.42	11.72	19.86	8.50
E1	19.47	31.72	26.83	19.86	8.14	4.92
F1	8.11	20.36	15.47	8.50	4.92	-3.22

表 12 多组方模拟结果

组方方案	Epred	95%CI(L)	95%CI(H)	CI	备注
A1B1C1D1E1	78.97	75.99	81.95	2.98	Emax (自定义组方)
F1	2.28	-2.17	6.72	4.45	Emin
B1C1D1E1	67.64	64.19	71.08	3.44	
A2B2C2D2E2F2	5.50	2.36	8.64	3.14	
A1B1C1D1F1	67.61	64.26	70.96	3.35	
A1B1C1E1	67.25	63.76	70.74	3.49	
B1C1D1E1F1	64.42	60.69	68.14	3.72	
B1C1D1	59.50	56.16	62.85	3.35	
A1B1D1E1F1	57.06	52.23	61.88	4.82	
A1B1C1F1	55.89	52.13	59.65	3.76	
B1C1E1F1	52.69	48.66	56.73	4.04	
A1C1D1E1F1	52.17	46.51	57.83	5.66	
A1B1D1	52.14	47.97	56.31	4.17	
B1D1E1	48.94	44.57	53.32	4.34	
A1B1D1F1	48.92	44.27	53.56	4.65	

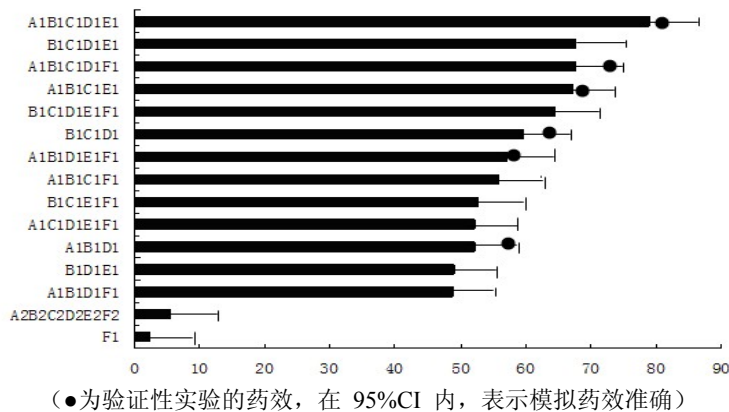


图4 组分 A-F 随机组方的模拟药效与验证

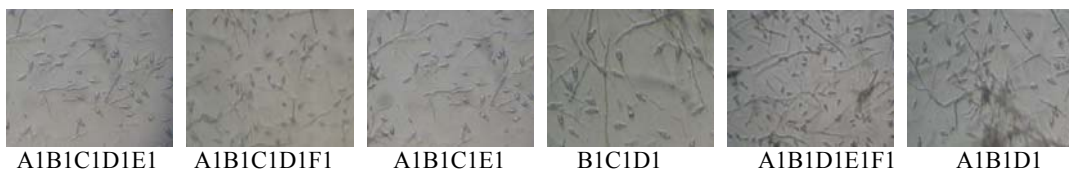
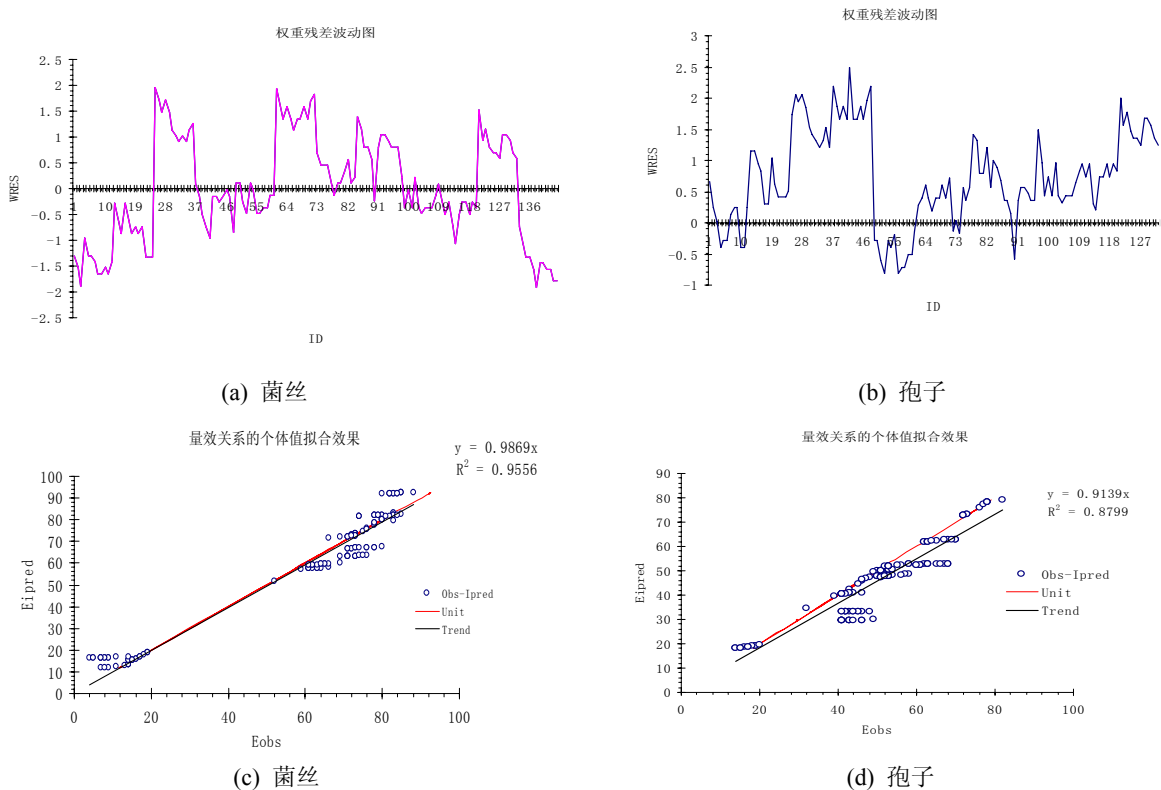


图5 几种代表性预测组方的抑制稻瘟病菌孢子萌发效果

3.3.5 4 组方抑制稻瘟病菌丝生长和孢子萌发预测模型评价 通过权重残差(WRES)图对复方预测模型进行评价, 将各组合对稻瘟病菌丝生长和孢子萌发抑制的 WRES 散点紧挨 0 点横坐标轴上下分布在 ± 4 内, 表示实验数据离散度较小, 具有可预测性,

见图 6(a)和(b)

图6(c)和(d)说明抑制稻瘟病菌丝生长和孢子萌发各配伍组药效均值(Egroup)与预测值(Epred)的相关性, 抑制菌丝的趋势线与标准线(unit)吻合较好; 抑制孢子的趋势线与标准线(unit)吻合相对差一点。



(a、b 为权重残差波动图, c、d 为个体实测值 Eobs 与个体预测值 Eipred 间关系图)

图6 组方抑制稻瘟病菌丝生长和孢子萌发预测模型评价

4 小结和讨论

(1) 木荷等六种植物的分级提取物对稻瘟病菌丝生长和孢子萌发都有较好的抑制作用,不同植物不同级分的抑制效果有很大的差异,木荷叶、无患子果皮抑制稻瘟病菌菌丝生长和孢子萌发均以无水乙醇级分为最强;广玉兰叶、油茶叶、雪松叶抑制稻瘟病菌菌丝生长以无水乙醇级分为最强,而抑制孢子萌发均以水级分为最强,无水乙醇级分活性次之;苦楮叶抑制稻瘟病菌菌丝生长以水级分为最强,抑制孢子萌发以石油醚级分为最强,无水乙醇级分活性次之。70%乙醇水溶液提取物组方抑制稻瘟病菌菌丝生长和孢子萌发活性显示:无患子和广玉兰的协同抑制菌丝作用最强,木荷、无患子、广玉兰取高剂量组方时可以获得最大的抑制菌丝生长效果,木荷、无患子、广玉兰、油茶、苦楮组方时可以获得最好的抑制孢子萌发效果。

(2) 不同植物溶剂级分所表现出的抗稻瘟病菌活性差异与其所含活性物质类型有关。木荷叶、无患子果皮、油茶叶等材料主要含有皂甙类抗真菌活性物质^[12-13],广玉兰叶主要含有烯类物质,苦楮叶主要抑菌活性物质为多酚单宁。各级分抑制菌丝生长和抑制孢子萌发表现出的差异,可能稻瘟病菌不同发育阶段的菌体对外源药物胁迫的耐受力差异有关。

(3) 组方研究引入了中医的配伍理论,植物材料中活性物质种类繁多、含量差异悬殊,配伍理论可以有效地估计各种成分对目标活性的独自贡献、相互作用、多组分模拟效果等。实验证明,此方法预测值与实测值相关性好,模型可预测性强。这为植物源多组分组方杀瘟剂的研制提供了一种思路。

参考文献:

[1] 刘海燕,高微微,樊瑛.植物源杀菌剂的研究进展[J].

中国农学通报,2005,21(4):254-257,328.

- [2] Shi B J, Wang G L. Comparative study of genes expressed from rice fungus-resistant and susceptible lines during interactions with *Magnaporthe oryzae*[J]. Gene, 2008, 427:80-85.
- [3] Normile D. New strategy promises lasting resistance to a rice plague[J]. Science, 2009, 325:925.
- [4] Fukuoka S, Saka N, Koga H, et al. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice[J]. Science, 2009, 325: 998-1001.
- [5] Padovani L, Capri E, Padovani C, et al. Monitoring tricyclazole residues in rice paddy watersheds[J]. Chemosphere, 2006, 62: 303-314.
- [6] 袁洁,杨学辉.贵州省稻瘟病菌对三环唑和富士一号的敏感性研究[J].贵州农业科学,2003,31(6):37-38.
- [7] 张素华.抗菌剂生物测定方法的研究[J].南开大学学报:自然科学,2000,33(4):37-40.
- [8] 深见顺一(李树正等译).农药试验法-抗菌剂篇[M].北京:农业出版社,1991.33-38.
- [9] Huang SM, Lesko LJ, Williams RL. Assessment of the quality and quantity of dug-drug interaction studies in recent NDA submissions: Study design and data analysis issues[J]. J Clin pharmacol, 1999, 39(10): 1006-1014.
- [10] 郑雯,张亚玲,辛惠普,等.水稻稻瘟病菌孢子萌发的化学抑制[J].黑龙江八一农垦学报,2004,16(4):13-15.
- [11] 郑青山,何迎春.药物相互作用分析与复方药效预测:正交模拟法[J].中国药理学通报,2007,23(8):1106-1112.
- [12] 霍光华,詹五根,陈明辉.两种茶科植物木荷和油茶抗稻瘟病等病菌的活性[J].江西农业大学学报,2008,30(11):48-52,72.
- [13] Huo Guang-hua, Zhan Wu-gen, Fu Ri-hui, et al. In vitro antifungal activity of saponin extracts from *Schima superba* in combination with *Sapindus mukorossi* against *Piricularia oryzae*[J]. Nat Prod Res Dev, 2010, 22: 755-760.