

DOI: 10.3969/j.issn.2095-3704.2012.04.007

两种中草药水浸液对小麦条锈病菌的抑制作用研究

叶文斌¹, 樊亮^{2*}

(1. 陇南师范高等专科学校 生化系, 甘肃 成县 742500; 2. 陇南师范高等专科学校 数学系, 甘肃 成县 742500)

摘要: 采用生物测定方法, 研究了中草药苍耳、黄瑞香提取液对小麦条锈病菌的抑制作用。结果表明, 小麦条锈病降低小麦种子的生活力, 影响小麦幼苗的生长发育。不同浓度苍耳、黄瑞香提取液对小麦条锈病孢子萌发有抑制作用, 其中 0.50 g/mL 苍耳、黄瑞香提取液其抑制率分别为 69.29%和 64.44%; 不同浓度的中草药苍耳、黄瑞香提取液对小麦条锈病菌丝生长均有抑制, 0.50 g/mL 苍耳、黄瑞香提取液效果最好, 抑制率分别为 55.44%和 44.77%, 与对照相比差异都达显著性水平。

关键词: 黄瑞香; 苍耳; 提取液; 小麦条锈病菌; 抑制作用

中图分类号: S435.121.4⁺2 文献标志码: A 文章编号: 2095-3704 (2012) 04-0373-05

Inhibition Effect on Wheat Stripe Rust with Extract of *Daphne Giraldii* Nitsche and *Xanthium Sibiricum* Patrin

YE Wen-bin¹, FAN Liang^{2*}

(1. Department of Life Science and Chemistry, Longnan Normal College, Chenxian 742500, China;
2. Department of mathematics, Longnan Normal College, Chenxian 742500, China)

Abstract: This paper studied the inhibition effects on wheat stripe rust with extract of *Daphne giraldii* Nitsche and *Xanthium sibiricum* Patrin. The results showed that, wheat stripe rust would reduce the seed ability and seedling growth. Different concentration gradients of two kinds of aqueous extracts have inhibition effects on spore germination of wheat stripe rust. The inhibiting rates of the aqueous extracts at 0.50 g/mL can reached by 64.44% to 69.29%, different concentration gradients of two kinds of aqueous extract have inhibition effect on germination of sporangium. The best effects appeared in the concentration of 0.50 g/mL for the two kinds of aqueous extract. The inhibiting rates from *Daphne giraldii* and *Xanthium sibiricum* reached by 55.44% and 44.77%, respectively which were significantly higher than that of the control.

Key words: *Daphne giraldii* Nitsche; *Xanthium sibiricum* Patrin; extract; wheat stripe rust; inhibition effect

甘肃省陇南市徽成盆地地处北秦岭与南秦岭之间, 面积约 1 500 km², 盆地气候温润, 雨量充沛。盆地内的土壤类型以黏土为主, 徽成两地耕地面积 170 万 667 m², 占陇南市总耕地面积的 37.8%, 是陇南市重要的农业生产地^[1], 而两地主要以种植小

麦为主。小麦条锈病, 俗称黄疸病, 是担子菌纲, 锈菌目, 柄锈科, 条形柄锈菌(*Puccinia striiformis* West. f. sp. *tritici* Eriks et Henn), 是我国西北、华北、西南等小麦种植区的主要病害之一。小麦条形柄锈菌主要危害叶片、叶鞘茎秆及穗部, 叶片受害后初

收稿日期: 2012-10-20

基金项目: 甘肃省教育厅资助项目(0928B-1)和陇南师范高等专科学校重点项目(2012LSZK01001)

作者简介: 叶文斌, 男, 甘肃西和人, 硕士, 讲师, 主要从事天然产物化学、果蔬保鲜及植物生理生态研究, E-mail: yewenbinbest@sohu.com; * 通信作者: 樊亮, 硕士, 讲师, E-mail: lnszfl@163.com。

期表现出褪绿斑,随后产生椭圆形黄色夏孢子堆,后期产生黑色的孢状冬孢子堆^[2]。条锈病一般在小麦抽穗、灌浆期发病较重,文家富等^[3]人发现,小麦扬花至灌浆期,小麦条锈病的病情指数与千粒重及产量损失率有显著的相关性。

王阳等^[4]研究结果表明,地蚕提取液处理叶片能明显提高小麦的抗锈性,这可能由于是低聚糖起到了诱导小麦抗性的作用,马林等^[5]研究了瑞香狼毒提取物浸种对小麦条锈病的抑制效果,结果表明通过药剂浸种可有效减轻小麦条锈病发病程度,降低菌源积累,减少病菌反复侵染的次数,从而减轻后期药剂防治压力。徐国锋等^[6]研究表明丁布对小麦条锈病菌具有良好抑制作用,胡定慧等^[7]报道用苦参药液喷施小麦叶面施药 3 次对条锈病的最高防效可达 95%。黄瑞香(*Daphne giraldii* Nitsche)主要含有瑞香素、香豆素类、二萜类、木质素类、黄酮类、木犀草素等成分^[8-13],苍耳(*Xanthium sibiricum* Patr.)富含具有抗肿瘤和细胞毒活性的倍半萜内酯化合物。生产上防治小麦条锈病主要采用化学药剂如三唑酮粉唑醇和丙环唑^[14-16],然而大量使用化学药剂不仅造成环境污染也容易引起病菌产生抗药性。而黄瑞香、苍耳对条锈病的抑菌研究未见报道,所以本试验选用这两种中药浸提液对徽成盆地的小麦条锈病的抑制作用进行研究,为开发植物源杀菌剂和陇南地区的小麦抗病生产提供科学依据和理论支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与仪器

供试材料:黄瑞香、苍耳两种中草药,均购自甘肃成县中药店。小麦条锈菌菌种田间收集,用 PDA 培养基进行无菌培养,分离纯化。供试抗条锈病小麦品种成良 1 号由成县农技中心提供。

SW-CJ-2D 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);SPX-250B-II 型生化培养箱(上海跃进医疗器械厂);LDZX-40AL 型高压灭菌锅(上海申安医疗器械厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 中草药浸提液的配制 将黄瑞香、苍耳用清水洗净,用 0.10% HgCl₂ 消毒 15 min 并漂洗干净后用流水冲洗 5 次,再用蒸馏水冲洗 5 次凉干备用。将干燥的黄瑞香全株剪成长约 1.0 cm 左右的小段,

苍耳用研钵研破,两种中药分别称取 500 g 用 1 000 mL 蒸馏水在室温下浸提 24 h,抽滤,得到浓度为 0.50 g/mL 浸提液。采用倍稀释法将各物质母液稀释成质量浓度为 0.50 g/mL, 0.25 g/mL, 0.125 g/mL 和 0.062 5 g/mL 的浸提液,在 4 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 小麦条锈菌菌种的培养 用灭菌的剪刀将患病叶片剪成小块放入烧杯中,用清水清洗 5~6 次,用 0.10% HgCl₂ 消毒 8 min 后将叶片分离出,再用无菌水浸泡 15 min,放入超净工作台备用。将灭菌的 PDA 培养基倒入培养皿内,然后在无菌条件下将浸泡患病叶所得溶液吸入移液管,再滴入培养基中放入 25 °C 光照培养箱中培养,然后挑离培养的孢子纯化菌种,培养备用。

1.2.3 小麦条锈病菌对种子萌发和幼苗生长影响的测定 选取饱满无虫害小麦种子分别用纯化的小麦条形柄锈菌悬浮液,浓度调整为每视野(10×40 倍下)约为 25~30 个, 50~60 个, 100~120 个, 200~240 个孢子的菌悬浮液 4 个浓度 200 mL 浸种 24 h,以清水为对照(CK),种子处理后自然晾干,取小麦种子各 50 粒放入垫有滤纸直径为 9 cm 的培养皿中加入等量无菌水保持滤纸湿润,置于 25 °C、相对湿度 75% 黑暗条件下的恒温培养 3 d,每处理重复 5 次,继续培养 7d 后测定种子萌发率、种子萌发指数:

$$\text{种子萌发率: } GR = \frac{\sum Gt}{T} \times 100\%$$

$$\text{种子萌发指数: } I = 2 \times (7 \times X_1 + 6 \times X_2 + \dots + 3 \times X_3 + 2 \times X_6 + X_7)$$

式中 Gt 为在 t 日内的发芽数, T 为种子总数。 X 表示每隔 24 h 的发芽数, $X_1=24$ h 时记录的发芽数, $X_2=48$ h 时记录的发芽数依次类推,第 15 d 测定受体作物幼苗的根长、苗高和 30 株杀青后的干重。

1.2.4 中草药浸提液对孢子萌发的抑制作用测定 采用悬滴法^[17]测定:在 PDA 培养基上培养 7 d 的病原菌用无菌水洗下分生孢子,制成孢子悬浮液,孢子浓度调整为每毫升 10¹², 10⁸, 10⁴, 10² 个孢子,以水为对照(CK)。取凹面载玻片,滴入 15 μL 不同质量浓度的两种中草药浸提液,加入 100 μL 制备好的孢子悬浮液,对照物加入等量的无菌蒸馏水溶液,混匀后盖上盖玻片。每个浓度处理设 3 个重复。将处理好的凹面载玻片置于放有无菌滤纸的培养皿中,滤纸用无菌水浸湿,置于 25 °C 培养箱中培养。12~16 h 后观察孢子萌发情况。以孢子芽管长度超过孢子长径视为萌发,按下式计算抑制孢子萌

发百分率:

孢子萌发率(%)=(孢子萌发数/孢子总数)×100%;

抑制孢子萌发百分率(%)=(对照组孢子萌发率-处理组孢子萌发率)/对照组孢子萌发率×100%。

1.2.5 中草药浸提液对菌丝生长的抑制作用测定
采用菌丝生长率法^[17]:将供试菌种先进行活化,试验前以打孔器在供试菌 PDA 平板打出若干直径 4 mm 的菌饼待用。分别取不同质量浓度的两种中草药浸提液,融化并冷却至 45 °C 左右的 PDA 培养基混合均匀,然后倒入直径 12 mm 的培养皿中,制成含药平板,以无菌水为对照,凝固后,挑取制备好的菌饼,菌丝面朝下置于平板中央,每个浓度处理设 5 次重复,于 25 °C 培养箱中培养。以十字交叉法测定各菌落生长直径,测定数据为 3 次重复的平均值。各处理组对菌丝生长的相对抑制率按下述公式计算:

菌落直径(mm)=菌落直径平均值-4.0(mm)

相对抑制率(%)=(对照组菌落生长直径-处理组菌落生长直径)/对照组菌落生长直径 ×100%。

将上述各实验浓度值(g/mL)转换为对数值,相应抑菌率转换为机率值,以对数值为横坐标、机率值为纵坐标作回归直线,求出毒力回归方程,计算各处理组溶液抑制病原菌菌丝生长的有效浓度 EC₅₀。

1.2.6 中草药浸提液对菌丝生长的最低抑菌质量浓度(MIC) 采用试管稀释法^[18]:取无菌试管(15×100 mm),每管加入 4 mL 真菌液体培养基,在第 1 管分别加入配好的两种中草药浸提液原液(0.50

g/mL)4 mL,然后吸取 4 mL 至第 2 管,混匀后再吸取 2 mL 至第 3 管,如此连续倍比稀释至第 7 管,依次类推,并从倒数第 2 管中吸取 2 mL 弃去,最后一管为无菌蒸馏水以及真菌液体培养基 4 mL 对照。使各管溶液浓度依次为原液浓度的 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 等。在每管内加入制备好的孢子悬浮液 0.10 mL。接种完毕后,各试管加塞,置 37 °C 恒温培养箱中,培养 18~24 h。用肉眼观察,不发生浑浊、沉淀、表面生长任一现象的最高溶液稀释倍数为该溶液的最低抑菌质量浓度(MIC)。如含中草药浸提液的培养液肉眼不易辨明菌体的生长情况,可以从各管中各吸取一环接种于固体平板上,经 37 °C 培养后观察有无菌落生长加以判断。

1.2.7 数据统计 试验数据均为 3 次重复的平均值,一律以平均数±标准差表示,数据间的差异性采用 SPSS 17.0 中的 LSD 多重比较法进行显著性检验,同一列数据后不同小写字母表示差异达 0.05 显著水平性和不同大写字母表示差异达 0.01 极显著性水平。

2 结果与分析

2.1 小麦条锈病菌对种子萌发和幼苗生长的影响

小麦条锈病菌对小麦种子萌发和幼苗生长的影响见表 1,随着处理孢子浓度的提高,小麦种子的萌发指数和萌发率都有不同程度的降低。而且小麦幼苗的根长、苗高、根干重和苗干重也有不同程度的降低。结果表明小麦条锈病菌对小麦种子浸种后具有强烈的萌发与幼苗生长抑制作用,其具体机理还有待于进一步的研究。

表 1 小麦条锈病菌对小麦种子萌发和幼苗生长的影响

孢子浓度/ (个·mL ⁻¹)	萌发率/ %	萌发 指数	根长/ cm	苗高/ cm	根干重/ g	苗干重/ g
10 ¹²	73±3.52aA	298±6.50aA	9.81±0.15aA	5.01±0.12aA	0.032±0.001 5aA	0.016±0.000 5aA
10 ⁸	79±3.57aA	311±3.57aA	13.18±0.25bB	8.02±0.14aA	0.065±0.000 5bB	0.018±0.000 7aA
10 ⁴	89±1.52bB	463±5.59bB	15.70±0.23bB	12.99±0.29bB	0.072±0.000 7cB	0.022±0.001 3bB
10 ²	92±1.25bB	603±8.51cC	19.61±0.18cB	19.12±1.52cB	0.075±0.000 9cB	0.033±0.001 2cB
0(CK)	96±0.45cB	632±8.10dC	24.46±1.97dC	21.86±2.5cB	0.077±0.001 2dC	0.038±0.001 9dC

注:同行数字肩标小写字母相同者表示差异不显著($P>0.05$),小写字母不同者表示差异显著($P<0.05$);同行数字肩标大写字母相同者表示差异不显著($P>0.01$),大写字母不同者表示差异显著($P<0.01$)。下表同。

2.1 不同中草药浸提液对病原菌孢子萌发的抑制

由表 2 和表 3 可知,不同中草药浸提液对病原

菌孢子萌发的抑制活性均有明显差异,在质量浓度为 0.50 g/mL 下,苍耳浸提液对孢子萌发抑制率在

69.29%左右, 而黄瑞香浸提液对孢子萌发抑制率在 64.44%。苍耳浸提液在对孢子萌发的抑制作用中, 提取液浓度在 0.062 5~0.25 g/mL 3 个处理与对照 CK(0)之间差异极显著($P<0.01$), 在 0.25~0.50 g/mL 浓度范围处理与对照 CK(0) 之间均差异显著

($P<0.05$)。黄瑞香浸提液浓度在 0.062 5~0.50 g/mL 的相对抑制率与对照 CK(0) 之间均差异极显著 ($P<0.01$)。可知两种中草药浸提液对致病菌孢子萌发的抑制作用都存在明显的浓度效应, 质量浓度越低, 抑制率越小。

表 2 苍耳浸提液对孢子萌发抑制作用

提取物浓度/ (g·mL ⁻¹)	孢子萌发率/ %	孢子萌发相对抑制率/ %
0.50	29.16eD	69.29
0.25	34.20dD	63.98
0.125	59.13cC	37.73
0.062 5	72.03bB	24.14
CK(0)	94.95aA	—

表 3 黄瑞香浸提液对孢子萌发抑制作用

提取物浓度/ (g·mL ⁻¹)	孢子萌发率/ %	孢子萌发相对抑制率/ %
0.50	33.76eE	64.44
0.25	44.12dD	53.53
0.125	63.33cC	33.30
0.062 5	78.93bB	16.87
CK(0)	94.95aA	—

表 4 苍耳浸提液对病原菌菌丝生长的抑制作用

提取物浓度/ (g·mL ⁻¹)	菌落直径/ mm	相对抑制率/ %	毒力回归方程	R ²	EC ₅₀ / (g·mL ⁻¹)	MIC/ (g·mL ⁻¹)
0.50	22.16dD	55.44	y=0.348x+0.683 9	0.949	0.298	0.007 812 5
0.25	24.20dD	53.98				
0.125	55.83cC	31.30				
0.062 5	60.03bB	28.08				
CK(0)	99.95aA	—	—	—	—	—

表 5 黄瑞香浸提液对病原菌菌丝生长的抑制作用

提取物浓度/ (g·mL ⁻¹)	菌落直径/ mm	相对抑制率/ %	毒力回归方程	R ²	EC ₅₀ / (g·mL ⁻¹)	MIC/ (g·mL ⁻¹)
0.50	34.17dC	44.77	y=0.281x+0.545 4	0.978	0.668	0.015 625
0.25	38.83cC	42.08				
0.125	63.17bB	24.20				
0.062 5	65.43bB	22.53				
CK(0)	96.09aA	—	—	—	—	—

2.2 不同中草药浸提液对病原菌菌丝生长的抑制作用

不同中草药浸提液对病原菌菌丝生长的抑制结果见表 3 和表 4, 从表中可以看出随着各中草药浸提液质量浓度的升高, 抑菌作用逐渐增强。当水溶

液质量浓度为 0.50 g/mL 时, 苍耳浸提液对菌丝生长的抑制效果最好, 菌落直径为 22.16 mm, 相对抑制率为 55.44%, 而苍耳浸提液菌落直径在 0.062 5~0.25 g/mL 之间与对照 CK(0)成极显著差异 ($P<0.01$), 0.25~0.50 g/mL 与对照 CK(0) 之间无显

著性差异($P>0.05$), 其 EC_{50} 为 0.298 g/mL。黄瑞香浸提液对菌丝生长的抑制作用在 0.50 g/mL 处理作用下, 菌落直径为 34.17 mm, 相对抑制率为 44.77%, 而黄瑞香浸提液各浓度间的菌落直径在 0.062 5~0.125 g/mL 之间与对照 CK(0)成极显著差异($P<0.01$), 0.25~0.50 g/mL 与对照 CK(0) 之间成显著性差异($P<0.05$), 其 EC_{50} 为 0.668 g/mL。

3 结论与讨论

小麦条锈病菌孢子液对小麦种子浸种处理后, 小麦种子萌发和幼苗生长都受到了不同的抑制影响, 不同中草药浸提液对病原菌菌丝生长的抑制作用随着浓度的升高逐渐增强。在 0.50 g/mL 中草药苍耳浸提液处理时, 试管已出现菌丝生长情况, 随着苍耳浸提液浓度的依次减小, 菌丝逐渐大量生长, 在 1/32 原浓度时, 菌丝生长情况均明显好于对照组无菌水。相比水溶液, 中草药苍耳浸提液在质量浓度为 0.007 812 5 g/mL 时试管中无菌丝生长, 在 0.015 625 g/mL 时出现菌丝生长, 表明中草药苍耳浸提液对致病菌具有较显著的抑菌作用, 最低抑菌质量浓度为 0.007 812 5 g/mL。中草药黄瑞香浸提液在各质量浓度也有较好的抑菌作用, 最低抑菌浓度为 0.015 625 g/mL, 而且两种中草药浸提液都随着浓度的依次减小, 菌丝逐渐大量生长。

本试验中两种中草药浸提液对小麦条锈致病菌具有明显的抑制作用, 在开发植物源杀菌剂的同时还可替代化学药剂, 避免烈性化学药品对致病菌的变异筛选而产生抗药性, 这对陇南地区的小麦抗病生产和中药资源的开发都具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 伏巨鹏. 徽成盆地土壤含水量变化规律分析[J]. 甘肃水利水电技术, 2009, 45(9): 16-17.
- [2] 何海旗. 小麦条锈病的发生与防治[J]. 农业科技与信息, 2012, 5: 29-30.
- [3] 文家富, 成光华, 王刚云, 等. 小麦条锈病危害损失估计研究[J]. 陕西农业科学, 2012(1): 51-52.
- [4] 王阳, 尹晓飞, 徐智斌, 等. 地蚕提取物诱导小麦抗条锈病的研究[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版, 2004, 32(11): 45-47.
- [5] 马林, 康晓慧, 黄毅, 等. 瑞香狼毒提取物浸种对小麦条锈病的抑制效果[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(5): 946-948.
- [6] 徐国锋, 郑永权, 纪明山. 丁布对小麦条锈病菌的抑制作用[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 324-326.
- [7] 胡定慧, 徐兴全, 王小松, 等. 苦参提取液对小麦条锈病菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2008, 6: 120-122.
- [8] 李书慧, 吴立军, 殷红英. 祖师麻化学和药理活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(6): 401.
- [9] 周光雄, 杨永春, 石建功, 等. 祖师麻中的双黄酮类成分研究[J]. 中草药, 2002, 33(12): 1061-1063.
- [10] 康阿龙, 汤迎爽, 张苏衢, 等. HPLC 测定祖师麻药材及不同炮制品中祖师麻甲素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(16): 39-41.
- [11] 杨武亮, 陈海芳, 杨世林, 等. HPLC 测定不同基源、不同产地祖师麻中祖师麻甲素的含量[J]. 中草药, 2008, 39(7): 523-526.
- [12] 廖时余, 蒋建勤. 黄瑞香茎皮的化学成分研究[J]. 中草药, 2012, 43(7): 1623-1626.
- [13] 苏娟, 吴志军, 沈云亨, 等. 黄瑞香的化学成分研究[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1781-1783.
- [14] Collins E J, Robertus J D, LoProsti M B, et al. Primaryamino acid sequence of Atrihosanth in and molecular models for abrinA-2chain And Atrihosanthin [J]. J. Bio. Chem, 1990, 265: 8665-8669.
- [15] CHING H C, WANG J J, WU R T. Immunomodulating effects of the hydrolysis Products of Formosanin C and beta-ecdysone from Paris formosana Hayata[J]. Anticancer Res, 1992, 12(5): 1475-1478.
- [16] 王新茹, 赵建昌, 白伟, 等. 几种三唑类杀菌剂对小麦条锈病的防治效果[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(4): 705-708.
- [17] 方中达. 植病研究方法[M]. 第3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [18] 吴文君. 植物化学保护实验技术导论[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1988.