

地肤子提取物对苹果树腐烂病菌的抑制作用 及其菌体结构和功能的影响

鄧晓燕 李睿 杨春 曹挥*

(山西农业大学农学院, 太谷 030801)

摘要: 为开发新型安全高效的植物源苹果树腐烂病防治剂, 采用菌丝生长速率法测定中草药地肤子乙醇提取物及各层析流分 L1~L9 对苹果树腐烂病菌 *Valsa mali* 的抑制作用, 同时通过室内常规分析方法观测流分 L7 对该菌菌丝形态结构、细胞膜通透性及物质吸收和代谢的影响。结果表明, 地肤子乙醇粗提物浓度为 2 mg/mL 时对苹果树腐烂病菌具有较强的离体抑制活性, 处理后 96 h 的抑菌率达到 92.16%。分别用石油醚、氯仿、正丁醇萃取醇提物, 石油醚萃取物对苹果树腐烂病菌的抑制效果最为明显, 其 EC_{50} 为 0.07 mg/mL; 在石油醚萃取物通过硅胶柱层析分离得到的 9 种流分中, 流分 L7 对苹果树腐烂病菌的抑制作用显著, 离体抑菌率高达 96.73%; 且在流分 L7 处理下, 病菌菌丝体出现肿胀、膨大或畸形等现象, 细胞膜通透性增大, 可溶性蛋白、还原糖以及丙酮酸的含量随流分 L7 浓度的升高而持续降低, 当浓度为 100 μ g/mL 时, 菌丝体可溶性蛋白、还原糖及丙酮酸的含量分别降低 70.78%、71.74% 和 78.68%。表明在离体培养条件下地肤子乙醇提取物能明显抑制苹果树腐烂病菌的生长, 并对菌丝体细胞膜结构和功能稳定性产生显著影响, 具有进一步开发为新型植物源苹果树腐烂病防治剂的潜力。

关键词: 地肤子; 苹果树腐烂病菌; 抑菌活性; 植物源杀菌剂

Antifungal activity of the extracts from fructus kochiae against apple canker pathogen *Valsa mali* and their impacts on the cell structure and function

Zhi Xiaoyan Li Rui Yang Chun Cao Hui*

(College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, Shanxi Province, China)

Abstract: To develop novel botanical fungicides against apple canker pathogen, *Valsa mali*, the inhibitory activity of both the crude ethanol extract and sub-fractions (L1–L9) of fructus kochiae was tested against *V. mali* with measuring mycelium growth rate. The mechanism of L7, the most effective sub-fraction, was preliminarily studied by using conventional analysis methods, and the effect of L7 on mycelial morphology, cell membrane permeability, and rate of essential substance absorption and metabolism was determined. The results showed that the ethanol extracts of fructus kochiae strongly inhibited the growth of *V. mali* at the concentration of 2 mg/mL, with an *in vitro* inhibitory rate of 92.16% after 96 h. Crude extraction was performed with petroleum ether, chloroform and *n*-butanol, followed by inhibition assay with each extract fraction. Petroleum ether extract displayed significantly higher inhibition activity against *V. mali* with the EC_{50} at 0.07 mg/mL. Silica gel column chromatography was used to further purify petroleum ether extract and a total of nine sub-fractions (L1–L9) were obtained. The most

基金项目: 国家自然科学基金 (21702129), 山西农业大学科技创新基金 (2016YJ09), 山西功能农业共性关键技术研究示范项目 (201703D211001-01-04)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: liusq71@163.com

收稿日期: 2018-01-12

pronounced antifungal activity was detected in L7 fraction with an inhibitory rate of 96.73%. Morphological alterations of *V. mali* such as swelling, deformity induced by L7 were observed. Cell membrane permeability was positively reacted to the increase of L7 fraction concentration, while the content of soluble protein, reducing sugar, and pyruvate in mycelia were decreased with the increase of the concentration of L7, which were reduced by 70.78%, 71.74%, and 78.68%, respectively, at the concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The study indicated that the ethanol extracts of fructus kochiae significantly inhibited the growth of *V. mali* *in vitro*, and negatively impacted cell membrane structure and functional stability of the mycelium. These extracts from plants could be developed as potential fungicides against apple canker.

Key words: fructus kochiae; *Valsa mali*; antifungal activity; botanical fungicide

苹果树腐烂病俗称烂皮病、臭皮病等,是由苹果黑腐皮壳菌 *Valsa mali* Miyabe et Yamada 引起的一种毁灭性病害。该病主要侵害苹果树的主干、主枝和较大的侧枝等多个部位,常导致树势衰弱、产量下降,甚至毁园,已成为我国北方苹果主产区危害较严重的病害(高克祥和刘晓光,1995)。现阶段,在防治苹果树腐烂病时用药混乱,而且如福美肿等一些高残留、重污染的禁用传统化学药剂仍然在使用(曹克强等,2009)。这些传统化学农药的长期使用带来的残留毒性以及环境污染问题使得科研人员将目光投向了绿色农药的开发。

近年来,国内针对苹果树腐烂病的防治进行了大量研究,尤其是生物防治方面的研究工作开展广泛。如袁忠林等(2006)利用仿生杀菌剂防治苹果树腐烂病,获得了较好的田间防治效果;郜佐鹏等(2009)发现植物内生放线菌在发酵过程中能产生抑制苹果树腐烂病菌分生孢子萌发和菌丝生长的活性物质;徐涛等(2012)研究还发现苹果树皮中的拮抗性内生真菌能有效抑制苹果树腐烂病菌的侵入和病斑的扩展。虽然生物防治苹果树腐烂病取得了一定的进展,但是依然未找到一种能有效控制苹果树腐烂病的途径。因此,筛选开发新型、安全、高效的苹果树腐烂病防治剂依然刻不容缓。另一方面,长期研究发现大多数植物在其生命过程中产生的一些次生代谢物质,往往具有抵御外界有害生物(害虫、病原菌等)入侵的作用(Cantrell et al., 2012; 张兴等, 2015)。因此,近年来以常见的药用植物来筛选新型病虫害防治剂因其较高的成功率而成为绿色植物源农药开发的一条重要途径。

地肤 *Kochia scoparia* (L.) Schrad., 俗称扫帚苗、地麦等,属藜科一年生草本植物,其生命力顽强,在我国大部分地区均有分布,资源丰富。地肤子为地肤干燥成熟的果实,是一种常用的传统中药,其性

寒、味苦,具有清热利湿,祛风止痒的功效,临床上主治小便涩痛,阴痒带下,风疹、湿疹、皮肤瘙痒等病症(邵荣杰和邵世宏,2015)。近年来,关于地肤子在农用生物活性方面的研究也越来越多,如吴静等(2008)发现地肤子水提物对6种植物病原真菌表现出较强的抑制作用,抑菌率均高于74.34%;魏艳等(2009)研究了地肤各器官对苹果腐烂病菌和葡萄黑痘病菌 *Elsinoe ampelina* 的抑制作用,最终发现其种子乙醇提取物对供试病原菌的抑制作用较强;此外,曹挥等(2007)报道了地肤子氯仿提取物对山楂叶螨 *Tetranychus viennensis* Zacher 具有较强的触杀活性;赵磊等(2008)研究发现地肤子氯仿提取物对小菜蛾 *Plutella xylostella* (Linnaeus) 的2~3龄幼虫表现出较强的拒食活性。基于此,本试验以危害较大的苹果树腐烂病菌为防治对象,筛选不同溶剂地肤子提取物对供试病菌的室内离体抑制活性,并对活性组分进行初步分离,同时研究活性流分对该病菌菌体结构和功能的影响,以期开发苹果树腐烂病的新型植物源杀菌剂提供原材料。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物及菌种:2015年9—10月于山西省太谷县境内采集地肤的成熟果实,自然阴干后低温保存待用。苹果树腐烂病菌由山西农业大学植物病理学实验室分离并提供。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉15 g、蒸馏水1 000 mL;马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)液体培养基, PDA培养基中不添加琼脂粉。

试剂:聚山梨酯-80,金山化学试剂有限公司;牛血清蛋白,美国Sigma公司;200~300目柱层析硅胶,

青岛海洋化工有限公司;其余试剂如无特殊说明均为市售分析纯。

仪器:FDV型气引式粉碎机,台湾佑崎有限公司;IKA RV 10 digital V型旋转蒸发仪,艾卡(广州)仪器设备有限公司;GTOP型智能光照培养箱,浙江托普仪器有限公司;BX51TF光学显微镜,日本Olympus公司;752型紫外可见分光光度计,上海光谱仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 地肤子乙醇粗提物制备及抑菌活性测定

将植物材料地肤子用粉碎机粉碎,过60目筛,加入3~5倍体积的无水乙醇,超声波辅助提取30 min,之后浸提过夜,抽滤,重复3次,合并滤液后减压浓缩,得到相应的乙醇提取液浓缩物。用二倍稀释法将制备的粗提物和PDA培养基混合,分别配制成浓度为2、1、0.5、0.25、0.125 mg/mL的含药PDA培养基,采用菌丝生长速率法测定地肤子乙醇提取物对苹果树腐烂病菌的抑制作用。用打孔器在活化后生长旺盛的菌落外缘打取直径为4 mm的菌饼,分别接种于不同浓度的含药PDA平板中央,以接种于不含药PDA平板处理作为空白对照,每个处理3次重复,置于25℃恒温培养箱中培养96 h,待空白对照的菌落接近长满平板时,采用十字交叉法测量菌落直径,取其平均值,计算抑菌率,用SPSS 20.0软件进行回归分析,计算抑制中浓度 EC_{50} 。抑菌率=(对照组平均菌落直径-处理组平均菌落直径)/(对照组平均菌落直径-4)×100%。

1.2.2 地肤子不同溶剂萃取物制备及抑菌活性测定

称取地肤子乙醇粗提物5 g,用双层滤纸包好置于三角瓶中,加入200 mL石油醚,放入超声波中辅助萃取30 min,将萃取液倒出,重新加入石油醚,重复3次,合并萃取液减压浓缩,得到石油醚萃取物。再分别用氯仿和正丁醇各萃取3次,操作同上,合并有机相,减压浓缩得到相应的氯仿和正丁醇萃取物。用二倍稀释法将制备的3种萃取浓缩物分别配制成2.00、1.00、0.50、0.25、0.125 mg/mL共5个梯度浓度,石油醚、氯仿和正丁醇萃取物对苹果树腐烂病菌的抑制活性测定方法同1.2.1。

1.2.3 地肤子石油醚萃取物的分离及抑菌活性测定

通过硅胶柱层析对石油醚萃取物进行初步分离。采用石油醚和乙酸乙酯体系梯度洗脱,石油醚:乙酸乙酯的体积比依次分别100:0、80:20、70:30、60:40、50:50、40:60、30:70、20:80和0:100,各比例下洗脱剂用量为1 000 mL,每1 000 mL为1个梯度,

薄层层析跟踪检测,碘蒸汽显色,合并相同成分的流分,各洗脱比例下的流分依次命名为L1~L9。各流分L1~L9在浓度为1 mg/mL时对苹果树腐烂病的抑制活性测定方法同1.2.1。

1.2.4 流分L7对苹果树腐烂病菌结构及功能的影响

流分L7对菌丝形态的影响:参考Yang et al. (2010)方法,在PD液体培养基中加入流分L7,配制成含药浓度为0.1 mg/mL的PD液体培养基,在生长旺盛的苹果树腐烂病菌菌落边缘打取直径为4 mm的菌饼,用接种针将菌饼接入含药PD液体培养基中,以加等量无菌水的PD液体培养基为对照,在25℃下以150 r/min振荡培养。72 h后分别挑取处理组和对照组菌丝,用0.1 mol/L磷酸缓冲液冲洗菌丝,显微镜下观察苹果树腐烂病菌菌丝的形态变化。

流分L7对菌丝膜通透性的影响:参考Lee et al. (1998)方法,采用电导率法进行测定。将苹果树腐烂病菌接种于PD液体培养基中,于25℃、150 r/min条件下振荡培养5 d后,将菌丝用蒸馏水冲洗3次并去除菌丝表面培养基及水分;分别称取0.1 g菌丝体加入到浓度分别为100、50、25、12.5、6.25 μg/mL的流分L7水溶液中,以不含流分L7的蒸馏水作为空白对照。在20℃条件下分别测定0、15、30、60、120、240、480 min时处理组和对照组溶液的电导率,每个处理重复3次。根据公式计算溶液电导率的增幅。电导率增幅=(不同时刻电导率-初始电导率)/初始电导率×100%。

流分L7对菌丝内可溶性蛋白含量的影响:参考史晓晶等(2017)方法,在PDA平板上培养苹果树腐烂病菌,2 d后在菌落边缘打取直径4 mm菌饼接入含流分L7浓度分别为100、50、25、12.5、6.25 μg/mL的PD液体培养基中振荡培养5 d,以不含流分L7的PD液体培养基作为对照。除去菌丝表面培养基,称取0.5 g菌丝置于研钵中并加入pH 7.0的磷酸缓冲液2 mL和适量石英砂,冰浴中研磨成匀浆,4℃下以10 000 r/min冷冻离心20 min,取上清液即为待测液,用于测定可溶性蛋白、还原糖和丙酮酸的含量。参考Candiano et al. (2004)方法精确配制1 mg/mL的牛血清蛋白溶液和0.1 mg/mL的考马斯亮蓝工作液。采用考马斯亮蓝G-250方法,以牛血清蛋白制作标准曲线。取上述制备的待测液0.1 mL,加入考马斯亮蓝工作液5 mL,用蒸馏水定容至6 mL,以蒸馏水1 mL加入考马斯亮蓝工作液5 mL为空白对照,测定 $OD_{595\text{ nm}}$,每个处理重复3次。依据标准曲线计算单位质量菌丝体内的可溶性蛋白含量。

流分L7对菌丝内还原糖含量的影响:参考张志良等(2009)方法,取6支具塞25 mL试管并标号,分别精确加入1 mg/mL的葡萄糖标准液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL和3,5-二硝基水杨酸试剂各1.5 mL,将各试管摇匀后在沸水浴中加热5 min,取出后立即放入冷水中冷却至室温,用蒸馏水定容至25 mL,振荡摇匀。在540 nm波长下用1号管调零,分别读出2~6号管的吸光值,绘制标准曲线。取上述制备的待测液2 mL和3,5-二硝基水杨酸1.5 mL,分别测定各处理的吸光值,每个处理重复3次,依据标准曲线计算单位质量菌丝体内的还原糖含量。

流分L7对菌丝内丙酮酸含量的影响:取6支具塞25 mL试管并标号,分别加入60 μ g/mL的丙酮酸标准液0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL,8%的三氯乙酸溶液3.0、2.8、2.6、2.4、2.2、2.0 mL,0.1%的2,4-二硝基苯肼溶液各1 mL和1.5 mol/L的NaOH溶液各5 mL,混匀后分别在540 nm波长下测定吸光值,并绘制标准曲线。取上述制备的待测液1 mL,加入8%的三氯乙酸溶液2 mL、0.1%的2,4-二硝基苯肼溶液1 mL,振荡摇匀,最后加入1.5 mol/L的NaOH

溶液5 mL,于540 nm波长下测定吸光值,每处理重复3次,依据标准曲线计算单位质量菌丝体内的丙酮酸含量。

1.3 数据分析

试验数据通过SPSS 20.0软件进行单因素方差分析,采用Duncan氏新复极差法检验差异显著性。采用OriginPro 9.0软件进行图表制作。

2 结果与分析

2.1 地肤子乙醇粗提物对苹果树腐烂病菌的抑制活性

地肤子乙醇粗提物浓度为2 mg/mL时对苹果树腐烂病菌表现出较强的离体抑制活性,其96 h时的抑菌率达到92.16%。采用回归分析得到毒力方程 $y=0.49x+4.93$,相关系数 R 为0.9746,计算得出 EC_{50} 为0.14 mg/mL。

2.2 不同溶剂萃取物对苹果树腐烂病菌的抑菌活性

依次用石油醚、氯仿和正丁醇对地肤子乙醇粗提物进行萃取,3种溶剂萃取物对苹果树腐烂病菌均有一定的抑制活性,其中石油醚萃取物的抑菌效果最为明显,其 EC_{50} 为0.07 mg/mL(表1)。

表1 96 h时地肤子3种溶剂萃取物对苹果树腐烂病菌的抑制活性

Table 1 Inhibitory effects of three solvent extracts of fructus kochiae on *Valsa mali* at 96 h

溶剂 Solvent	毒力方程 Toxicity equation	EC_{50} (mg/mL)	相关系数 Correlation coefficient
石油醚 Petroleum ether	$y=1.04x+6.46$	0.07	0.9846
氯仿 Chloroform	$y=0.70x+5.75$	0.14	0.9805
正丁醇 <i>n</i> -butanol	$y=0.97x+6.29$	0.10	0.9708

2.3 石油醚萃取物各流分的抑菌活性

在石油醚萃取物通过硅胶柱层析分离得到的9种流分中,流分L7对苹果树腐烂病菌的抑制作用最强,96 h的抑菌率达到了96.73%;流分L5次之,其抑菌率为52.82%;其余7种流分对苹果树腐烂病菌的抑菌率均在45.33%以下,无明显抑制作用。

2.4 流分L7对苹果树腐烂病菌结构和功能的影响

2.4.1 对菌丝形态的影响

在400倍显微镜下观察发现,与对照组相比(图1-A),在含有0.1 mg/mL流分L7的PDA培养基中生长的苹果树腐烂病菌菌丝粗细不一,菌丝多发生畸形、干瘪萎缩或菌丝体内有气泡状内容物等(图1-B)。

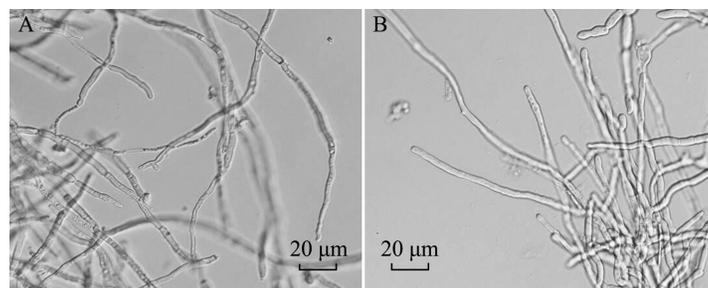


图1 0.1 mg/mL流分L7对苹果树腐烂病菌菌丝形态的影响

Fig. 1 Effects of 0.1 mg/mL L7 on mycelial morphology of *Valsa mali*

A: 流分L7处理; B: 对照。A: L7 treatment; B: control.

2.4.2 对菌丝细胞膜离子通透性的影响

在20℃条件下,随着处理时间的增加,对照组和处理组溶液的电导率持续增大,处理组电导率增幅高于对照组,且随着流分L7浓度增大,处理组溶液电导率增幅也呈增大趋势;当流分L7浓度为6.25 μg/mL时,处理后溶液的电导率增幅在480 min时为11.24%,当流分L7浓度为100 μg/mL时,处理后溶液的电导率增幅在480 min时为26.41%(图2)。

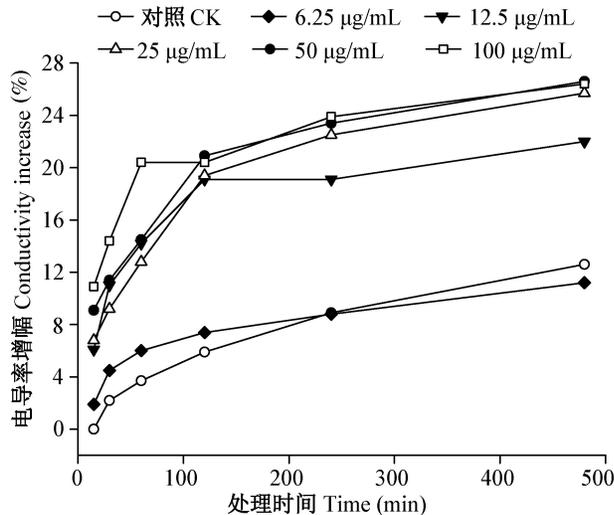


图2 不同浓度流分L7对苹果树腐烂病菌菌丝细胞膜渗透性的影响

Fig. 2 Effects of L7 of different concentrations on cell membrane permeability of *Valsa mali*

表2 不同浓度流分L7处理后苹果树腐烂病菌菌丝可溶性蛋白、还原糖及丙酮酸的含量

Table 2 Soluble protein, reducing sugar and pyruvic acid contents of *Valsa mali* mycelia treated by L7 of different concentrations

L7浓度 (μg/mL) L7 concentration	可溶性蛋白 (μg/g) Soluble protein	还原糖 (μg/g) Reducing sugar	丙酮酸 (μg/g) Pyruvic acid
0.00	172.26±4.55 a	17.15±0.74 a	0.18±0.005 a
6.25	163.61±6.17 a	15.63±1.16 a	0.16±0.014 b
12.50	148.69±3.62 b	13.44±0.63 b	0.13±0.012 c
25.00	121.60±1.66 c	10.42±1.09 c	0.12±0.004 c
50.00	90.63±5.04 d	8.17±0.17 d	0.06±0.004 d
100.00	50.33±1.30 e	4.89±0.52 e	0.04±0.003 e

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

3 讨论

目前,已有学者研究了植物提取物对苹果树腐烂病菌的抑制作用。如同红豆等(2014)测定了5种植物侧柏、五倍子、藿香、百部、旋覆花乙醇提取物对苹果树腐烂病菌的抑制作用,10 mg/mL的5种植物粗提物的抑菌率均在75%以下;李少华等(2009)研

2.4.3 对菌丝体内可溶性蛋白含量的影响

各处理组的苹果树腐烂病菌菌丝可溶性蛋白含量均受到流分L7的影响,且随着流分L7浓度的升高而显著降低。对照组菌丝的可溶性蛋白含量为172.26 μg/g,当流分L7浓度为100 μg/mL时,菌丝可溶性蛋白含量较对照组显著降低了70.78%,仅为50.33 μg/g;当流分L7浓度为6.25 μg/mL时,菌丝可溶性蛋白含量变化微弱,仅较对照组降低了5.02%,为163.61 μg/g(表2)。说明流分L7可能影响菌丝可溶性蛋白的合成,或是破坏菌丝体细胞膜的结构造成菌丝体胞内内容物外渗,使菌丝体内可溶性蛋白含量下降。

2.4.4 对菌丝体内还原糖含量的影响

与对照组相比,处理组苹果树腐烂病菌菌丝体内还原糖含量均减少,流分L7的浓度越高,还原糖含量越低,当流分L7浓度为100 μg/mL时,还原糖含量较对照组显著降低了71.74%,仅为4.89 μg/g,而对照组还原糖含量为17.15 μg/g(表2)。

2.4.5 对菌丝体内丙酮酸含量的影响

处理组菌丝体内的丙酮酸含量随着流分L7浓度的增大而减小,当流分L7浓度为100 μg/mL时,菌丝体内的丙酮酸含量较对照组显著降低了78.68%,仅为0.04 μg/g,对照组的丙酮酸含量为0.18 μg/g(表2)。

究了大戟狼毒石油醚提取物对苹果树腐烂病菌的抑制作用,提取物浓度为2 mg/mL时的抑菌率为94%, EC_{50} 为0.43 mg/mL;本研究结果表明,中药地肤子乙醇提取物对苹果树腐烂病菌具有较强的抑制作用,粗提物浓度为2 mg/mL时的抑菌率达到92.16%, EC_{50} 为0.14 mg/mL。同时通过3种不同极性的溶剂对乙醇提取物进行萃取得到的相应萃取物中,石油

醚萃取物的抑菌活性最强, EC_{50} 为 0.07 mg/mL, 通过对石油醚萃取物进一步分离得到的流分 L7 对苹果树腐烂病菌的抑制效果最好, 96 h 的抑菌率达到了 96.73%。并通过室内常规分析法观测了流分 L7 对苹果树腐烂病菌菌体结构及功能的影响。

细胞膜具有调节和选择物质进出细胞的功能, 因此, 测定一定条件下细胞膜的通透性对于衡量细胞生理功能至关重要, 若细胞膜受到外界因素的干扰或破坏, 将无法有选择地控制细胞内外的物质进出细胞, 这将会导致细胞内的各种物质代谢无法正常进行, 严重时会导致细胞裂解死亡。在本试验中, 苹果树腐烂病菌经流分 L7 处理后, 细胞处理液的电导率持续增大且随着药液浓度的增加, 电导率增幅也随之增大, 说明流分 L7 提高了菌体细胞膜的通透性, 造成细胞内含物外渗, 进而影响菌体的正常生理功能, 抑制菌体的正常生长。

蛋白质是生理代谢过程中最重要的物质之一, 而菌体可溶性蛋白含量的正常与否是衡量菌体能否正常生长的重要指标。抑制病原菌的物质代谢是杀菌剂发挥杀菌或抑菌作用的途径之一。经流分 L7 处理后苹果树腐烂病菌菌体内的可溶性蛋白含量降低, 造成这一现象的原因可能是流分 L7 提高了细胞膜的通透性导致菌体内的可溶性蛋白流失, 也可能是流分 L7 抑制了蛋白的合成代谢。还原糖是菌体的主要产能物质, 菌体对还原糖的利用率决定了菌体的生长和繁殖。本试验用流分 L7 处理苹果树腐烂病菌菌丝后, 菌体内还原糖的含量显著下降, 可能是膜结构的变化导致还原糖外渗, 最终菌体因能量供应不足而逐渐死亡。这些均表明流分 L7 能通过干扰菌丝体的物质代谢从而阻止其正常的生长发育(周梦娇等, 2014)。另外, 可溶性蛋白和还原糖是细胞内重要的渗透调节物质, 二者含量降低使得菌丝体无法较好地维持细胞渗透势, 造成细胞质外渗(惠竹梅等, 2013; 史晓晶等, 2017)。丙酮酸是代谢过程中重要的中间产物, 不论是在三羧酸循环中, 还是在糖类转化为蛋白质或是脂类的过程中, 丙酮酸都发挥着重要的作用。比较本试验中流分 L7 处理后菌体内可溶性蛋白、还原糖和丙酮酸含量的变化发现, 流分 L7 对丙酮酸的影响均大于另外 2 个指标, 说明流分 L7 可能对丙酮酸的合成或代谢有更直接的影响, 但具体影响丙酮酸合成或代谢的哪种途径或哪个关键作用位点, 目前还不清楚。

综上所述, 在地肤子乙醇提取物分离得到的流

分 L7 胁迫下, 皿内培养的苹果树腐烂病菌菌丝出现肿胀、膨大、畸形; 细胞膜通透性增大, 细胞膜结构和功能的稳定性遭到破坏; 菌丝体内可溶性蛋白、还原糖及丙酮酸流失或合成受阻, 菌丝生长受到明显抑制。但是流分 L7 致使细胞膜通透性增大的具体机理, 流分 L7 是否直接影响丙酮酸的合成或代谢, 以及流分 L7 的具体组成成分等一些问题, 仍有待于进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiqeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Rihetti PG. 2004. Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25(9): 1327-1333
- Cantrell CL, Dayan FE, Duke SO. 2012. Natural products as sources for new pesticides. *Journal of Natural Products*, 75(6): 1231-1242
- Cao H, Wang YN, Zhang TQ, Li YS, Liu SQ, Li XH, Shi GL. 2007. Acarocidal activity of different parts of *Kochia scoparia* against *Tetranychus viennensis*. *Scientia Silvae Sinicae*, 43(9): 27-30 (in Chinese) [曹挥, 王有年, 张铁强, 李奕松, 刘素琪, 李向花, 师光禄. 2007. 地肤不同部位提取物对山楂叶螨活性的研究. *林业科学*, 43(9): 27-30]
- Cao KQ, Guo LY, Li BH, Sun GY, Chen HJ. 2009. Investigations on the occurrence and control of apple canker in China. *Plant Protection*, 35(2): 114-116 (in Chinese) [曹克强, 国立耘, 李保华, 孙广宇, 陈汉杰. 2009. 中国苹果树腐烂病发生和防治情况调查. *植物保护*, 35(2): 114-116]
- Gao KX, Liu XG. 1995. Review of researches on the *Valsa* canker of apple trees. *Journal of Hebei Forestry College*, 10(1): 87-91 (in Chinese) [高克祥, 刘晓光. 1995. 苹果树腐烂病研究概况. *河北林学院学报*, 10(1): 87-91]
- Gao ZP, Ke XW, Wei JL, Chen YC, Kang ZS, Huang LL. 2009. Biocontrol efficacy of apple tree *Valsa* canker by endophytic actinomycetes. *Journal of Plant Protection*, 36(5): 410-416 (in Chinese) [郜佐鹏, 柯希望, 韦洁玲, 陈银潮, 康振生, 黄丽丽. 2009. 七株植物内生放线菌对苹果树腐烂病菌的防治作用. *植物保护学报*, 36(5): 410-416]
- Lee HJ, Choi GJ, Cho KY. 1998. Correlation of lipid peroxidation in *Botrytis cinerea* caused by dicarboximide fungicides with their fungicidal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(2): 737-741
- Li SH, Cao H, Liu SQ. 2009. Study on antifungal activities of the petroleum ether extract from *Euphorbia fischeriana* Steud. against *Valsa mali* Miyabe et Yamada. *Journal of Shanxi Agricultural University (Natural Science Edition)*, 29(6): 559-561 (in Chinese) [李少华, 曹挥, 刘素琪. 2009. 大戟狼毒石油醚提取物对苹果树腐烂病抑菌活性初步研究. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 29(6): 559-561]

- Shao RJ, Shao SH. 2015. Progress in study on medicinal value of medicinal parts of *Kochia scoparia*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 46(23): 3605–3610 (in Chinese) [邵荣杰, 邵世宏. 2015. 地肤的各药用部位药用价值研究进展. 中草药, 46(23): 3605–3610]
- Shi XJ, Yang QQ, Ren L, Han JC. 2017. Variation of cell membrane permeability of early blight pathogen *Alternaria solani* resistant to boscalid. Journal of Plant Protection, 44(2): 240–245 (in Chinese) [史晓晶, 杨琴琴, 任璐, 韩巨才. 2017. 番茄早疫病病原抗啮酰菌胺菌株细胞膜透性变化. 植物保护学报, 44(2): 240–245]
- Wei Y, Zhang XH, Liu ZD, Hao SH. 2009. Pesticidal activity of extracts of *Kochia scoparia*. Journal of Northwest Forestry University, 24(6): 129–132 (in Chinese) [魏艳, 张晓华, 刘正东, 郝双红. 2009. 地肤农用生物活性研究. 西北林学院学报, 24(6): 129–132]
- Wu J, Shi GL, Su XY, Wen ZY, Wang YN. 2008. A preliminary study on bioactivity of extracts from fructus kochiae against several phytopathogens. Journal of Beijing University of Agriculture, 23(3): 36–39 (in Chinese) [吴静, 师光禄, 苏学友, 温哲屹, 王有年. 2008. 地肤子提取物对几种植物病原菌生物活性的影响. 北京农学院学报, 23(3): 36–39]
- Xi ZM, Wang ZZ, Hu Y, Deng MM, Zhang ZW. 2013. Effects of 24-epibrassinolide on the antioxidant system and osmotic adjustment substance in grape seedlings (*V. vinifera* L.) under chilling stress. Scientia Agricultura Sinica, 46(5): 1005–1013 (in Chinese) [惠竹梅, 王智真, 胡勇, 邓敏敏, 张振文. 2013. 24-表油菜素内酯对低温胁迫下葡萄幼苗抗氧化系统及渗透调节物质的影响. 中国农业科学, 46(5): 1005–1013]
- Xu T, Hu TL, Wang YN, Wang ST, Cao KQ. 2012. Isolation of endophytic fungi from apple bark and their potential for biological control of *Valsa ceratosperma*. Journal of Plant Protection, 39(4): 327–333 (in Chinese) [徐涛, 胡同乐, 王亚南, 王树桐, 曹克强. 2012. 苹果树皮内生真菌的分离及其对腐烂病菌的生物防治潜力. 植物保护学报, 39(4): 327–333]
- Yan HD, Wang YN, Tang XM, Hu TL, Wang ST, Cui Y, Cao KQ. 2014. Antifungal activity of extracts from 5 species of plants against 3 phytopathogens of apple trees. China Fruits, (2): 22–26 (in Chinese) [闫红豆, 王亚南, 唐兴敏, 胡同乐, 王树桐, 崔彦, 曹克强. 2014. 5种植物提取物抑制苹果树3种病原菌活性的研究. 中国果树, (2): 22–26]
- Yang SZ, Peng LT, Cheng YJ, Chen F, Pan SY. 2010. Control of citrus green and blue molds by Chinese propolis. Food Science and Biotechnology, 19(5): 1303–1308
- Yuan ZL, Luo L, Meng ZL. 2006. Control effect of artificial synthesized fungicide Yintai on 2 kinds of apple diseases. Journal of Plant Protection, 33(2): 223–224 (in Chinese) [袁忠林, 罗兰, 孟昭礼. 2006. 仿生农用杀菌剂银泰对苹果树两种主要病害的防治效果. 植物保护学报, 33(2): 223–224]
- Zhang X, Ma ZQ, Feng JT, Wu H, Han LR. 2015. Review on research and development of botanical pesticides. Chinese Journal of Biological Control, 31(5): 685–698 (in Chinese) [张兴, 马志卿, 冯俊涛, 吴华, 韩立荣. 2015. 植物源农药研究进展. 中国生物防治学报, 31(5): 685–698]
- Zhang ZL, Qu WJ, Li XF. 2009. Guide of plant physiology experiment (4th edition). Beijing: Higher Education Press, pp. 103–104 (in Chinese) [张志良, 瞿伟菁, 李小方. 2009. 植物生理学实验指导(第4版). 北京: 高等教育出版社, pp. 103–104]
- Zhao L, Du J, Liu SQ, Cao H. 2008. Antifeeding effects of *Plutella xylostella* L. by extracts of the seed of *Kochia scoparia* (L.) Schrad. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 36(10): 38–39 (in Chinese) [赵磊, 杜娟, 刘素琪, 曹挥. 2008. 地肤子粗提物对小菜蛾的拒食作用. 山西农业科学, 36(10): 38–39]
- Zhou MJ, Wan CP, Chen JY. 2014. Serecing and antifungal mechanism of Chinese herb extracts against green mold of citrus. Modern Food Science and Technology, 30(3): 144–149 (in Chinese) [周梦娇, 万春鹏, 陈金印. 2014. 柑橘绿霉病中草药高效抑菌剂的筛选及抑菌机理研究. 现代食品科技, 30(3): 144–149]

(责任编辑:李美娟)