

# 壳寡糖对烟草赤星病病原菌的抑制作用

胡国元<sup>1</sup>, 胡坚<sup>1</sup>, 李超影<sup>1</sup>, 杨春雷<sup>2</sup>, 袁军<sup>1</sup>, 余君<sup>2</sup>, 杨锦鹏<sup>2</sup>

(1. 武汉工程大学化工与制药学院, 绿色化工过程教育部重点实验室, 湖北省新型反应器与绿色化学工艺重点实验室, 湖北武汉 430074; 2. 湖北省烟草研究所, 湖北武汉 430030)

**摘要:**探讨了壳寡糖对烟草赤星病病原菌(链格孢菌)菌丝生长、孢子萌发、产孢量的影响,并研究了温度和pH值对壳寡糖抑菌作用的影响。结果表明:浓度为15 g/L的壳寡糖在48 h对烟草赤星病病原菌菌丝生长的抑制率为94.74%。壳寡糖抑制病原菌孢子萌发能力强于抑制病原菌菌丝生长,浓度为2.5 g/L的壳寡糖对病原菌孢子萌发抑制率达到100%。质量浓度为10 g/L的壳寡糖在144 h对链格孢菌产孢抑制率为69.7%。壳寡糖的抑菌效果具有良好的热稳定性,pH值对抑菌效果影响较大,质量浓度为15 g/L的壳寡糖在48 h、培养基pH为4时对菌丝生长抑制率达到100%,培养基pH为7时抑制率为62.26%。

**关键词:**壳寡糖;烟草赤星病;链格孢菌;抑制作用

**中图分类号:**Q939.95

**文献标识码:**A

**doi:**10.3969/j.issn.1674-2869.2012.12.002

## 0 引言

烟草黑胫病、赤星病等真菌病害严重影响了烟草的产量和质量,采用化学农药控制烟草病害仍然很普遍。然而,化学农药的残留对生物和环境存在着潜在的威胁,而且它们的使用导致病原菌的抗性越来越严重。为此,开发化学农药替代品的研究日益引起人们的重视<sup>[1]</sup>。

壳寡糖是由2~10个2-氨基葡萄糖通过 $\beta$ -1,4-糖苷键连接而成的一种寡糖<sup>[2]</sup>。壳寡糖为壳聚糖的衍生物,壳聚糖及其衍生物属含氮高分子聚合物,在土壤中易被微生物分解,其终产物可被植物吸收<sup>[3]</sup>。利用壳寡糖控制病原真菌的研究已有大量报道<sup>[1-7]</sup>。应用壳寡糖抑制烟草真菌病原菌的报道较少。本研究旨在探索壳寡糖对烟草赤星病病原菌的抑制效果。通过测定不同浓度的壳寡糖对烟草赤星病病原菌的菌丝生长、孢子萌发、产孢的抑制作用及壳寡糖抑菌作用的热稳定性和pH值对壳寡糖抑菌作用的影响。

## 1 实验部分

### 1.1 材料

**1.1.1 壳寡糖** 壳寡糖由大连中科格莱克生物科技有限公司提供,批号MP-91,聚合度为2~10,平均分子量 $\leq 1\ 000$ 。

**1.1.2 菌种来源** 链格孢菌 [*Alternaria alternata* (Fr.) Keissler] 由湖北省烟草研究所提供的赤星病病原菌。

**1.1.3 培养基** 马铃薯蔗糖琼脂(potato sucrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g,蔗糖20 g,蒸馏水1 000 mL,琼脂粉18 g,自然状态pH值。121℃下湿热灭菌20 min备用。

### 1.2 方法

**1.2.1 抑制菌丝生长试验** 称取一定量的壳寡糖粉末,用无菌水溶解后得到质量浓度为200 g/L的原液,吸取一定量的壳寡糖原液,注入到定量的PDA培养基中,使培养基中的壳寡糖质量浓度分别为10,12,15 g/L,对照组添加等量的无菌水。赤星病病原菌在PDA培养基上培养7 d后,用打孔器获得生长旺盛的菌饼( $\Phi 7.6$  mm),将菌饼接种到装有不同质量浓度壳寡糖PDA培养基的培养皿( $\Phi 90$  mm)中央,实验组与对照组各重复5个培养皿。28℃培养48 h后开始采用交叉法测量菌落直径取平均值记录,并计算菌丝生长抑制率<sup>[2,6-7]</sup>。

菌丝生长抑制率=

$$\frac{\text{对照平均菌丝生长直径} - \text{实验组平均菌丝生长直径}}{\text{对照平均菌丝生长直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%$$

**1.2.2 孢子萌发试验** 用无菌水将在马铃薯蔗糖琼脂培养基上培养7 d后赤星病病原菌的孢

收稿日期:2012-11-04

基金项目:武汉工程大学研究生教育创新基金项目(CX201119)

作者简介:胡国元(1965-),男,湖北红安人,教授,博士,研究方向:生物源农药。

子洗脱下来并振荡摇匀,通过二倍稀释法使其在显微镜低倍镜( $\times 40$ )视野中保持个数为 100 左右.所需的壳寡糖溶液采用 1.2.1 中壳寡糖原液稀释获得.采用载玻片悬滴法,将孢子悬浮液  $10\ \mu\text{L}$  滴在凹玻片上,实验组壳寡糖质量浓度分别为 0.5,1,2.5,5,10 g/L.将不同浓度壳寡糖溶液取  $10\ \mu\text{L}$  溶液滴加在孢子悬浮液中,对照组取等量的蒸馏水作同样处理.28 °C 培养 5 h 后观察孢子萌发情况,每组包含三个重复,并计算孢子萌发抑制率<sup>[3]</sup>.

**1.2.3 产孢量试验** 用无菌水将在马铃薯蔗糖琼脂培养基上培养 7 d 后赤星病病原菌的孢子洗脱下来,通过二倍稀释法使  $10\ \mu\text{L}$  的孢子悬液在显微镜低倍镜( $\times 40$ )视野中保持个数为 100 左右,统计实验组与对照组每个培养皿中孢子总数,实验组壳寡糖质量浓度分别为 5,10 g/L.计算产孢量的抑制率<sup>[7]</sup>.

**1.2.4 壳寡糖热稳定性试验** 将配制好的壳寡糖原液(200 g/L)分别置于烘箱并调节温度为 40,50,60,70,80 °C 中处理 20 min<sup>[2]</sup>,然后利用不同温度处理后的壳寡糖原液按方法 1.2.1 制备装有壳寡糖质量浓度为 15 g/L 的马铃薯蔗糖琼脂培养基的培养皿,之后操作方法同 1.2.1.

**1.2.5 壳寡糖 pH 值稳定性试验** 吸取一定量配制好的壳寡糖原液并分别添加到四组试验组当中,在培养基固化前调节四组试验组 pH 值分别为 4,5,6,7.相应四组对照组加入等量的无菌水,并在培养基固化前调节其 pH 值为 4,5,6,7 之后操作方法同 1.2.1,实验组壳寡糖溶液质量浓度为 15 g/L<sup>[2]</sup>.

## 2 结果与讨论

### 2.1 壳寡糖对菌丝生长的抑制作用

由图 1,图 2 可以看出,随着壳寡糖质量浓度的提高,对赤星病病原菌菌丝的抑制作用也在提高.48 h 壳寡糖质量浓度 10 g/L 时,对赤星病原菌菌丝的抑制率达到了 89.36%.当壳寡糖质量浓度达到 15 g/L 时,对赤星病原菌菌丝的抑制率则达到了 94.74%以上.随着培养时间的延长,壳寡糖对赤星病原菌菌丝的抑制率略有下降.

### 2.2 壳寡糖对孢子萌发的抑制作用

由表 1 可知,壳寡糖质量浓度为 2.5 g/L 以上时对赤星病病原菌孢子萌发抑制率均在 100%,即使质量浓度降低至 0.5 g/L,其抑制率也可以达到 95.36%.从壳寡糖对赤星病病原菌孢子萌发的抑制来看,所需的质量浓度远低于对菌丝生长抑

制的质量浓度,其可能的原因是孢子萌发试验中孢子量少,每个孢子充分接触壳寡糖,降低了抑制萌发所需要的质量浓度.

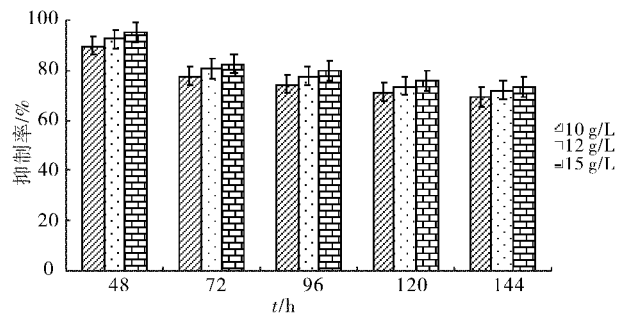


图 1 不同质量浓度壳寡糖对赤星病病原菌菌丝生长的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of oligochitosan on mycelial growth of *Alternaria alternata*

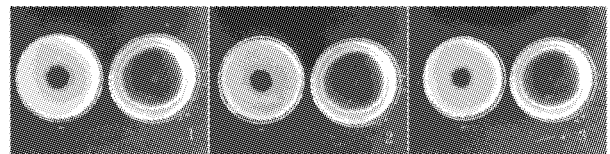


图 2 不同浓度壳寡糖对赤星病病原菌菌丝生长的影响(144 h)

Fig. 2 Effects of different concentrations of oligochitosan on mycelial growth of *Alternaria alternata* in 144 h

注: 1,2,3 中壳寡糖浓度分别为 10 g/L、12 g/L、15 g/L. 1、2、3 中左为试验组,右为对照组.

表 1 不同浓度壳寡糖对赤星病病原菌孢子萌发的影响

Table 1 Effects of different concentrations of oligochitosan on spore germination of *Alternaria alternata*

浓度/(g/L)	10	5	2.5	1	0.5
抑制率/%	100	100	100	99.21	95.36

### 2.3 壳寡糖对产孢量的抑制作用

如表 2 所示,质量浓度为 5 和 10 g/L 的壳寡糖溶液处理赤星病病原菌 144 h 产孢量的抑制率分别为 53.1% 和 69.7%,低于对菌丝生长的抑制率.

表 2 不同质量浓度壳寡糖对赤星病病原菌产孢量的影响

Table 2 Effects of different concentrations of oligochitosan on spore production of *Alternaria alternata*

壳寡糖质量浓度/(g/L)	孢子数( $\times 10^7$ 个)	产孢量抑制率/%
对照组	25.8	
5	12.1	53.1
10	7.83	69.7

## 2.4 壳寡糖热稳定性

如图 3,图 4 所示,在 48 h,5 组壳寡糖质量溶液对赤星病病原菌的抑制率分别为 90.46%,89.19%,91.88%,92.39%,92.74%。在 144 h,5 组壳寡糖溶液对赤星病病原菌菌丝的抑制率分别为 68.13%,68.05%,65.52%,69.02%,70.13%。比较各组抑制率的大小可以得出壳寡糖的抑菌作用具有良好的热稳定性。该结果与徐俊光(2007)<sup>[2]</sup>报道不同温度处理不同质量浓度壳寡糖质量溶液对其抑菌活性没有显著性影响的结果一致。

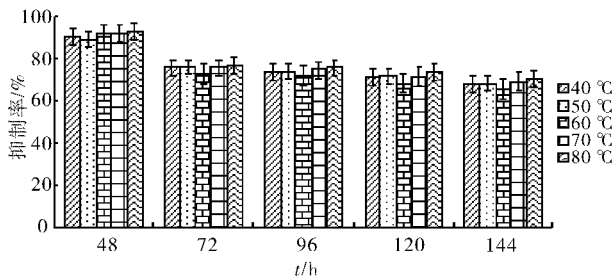


图 3 不同温度处理后的壳寡糖对赤星病病原菌菌丝生长的影响

Fig. 3 Effects of different temperature of oligochitosan on mycelial growth of *Alternaria alternata*



图 4 不同温度处理后的壳寡糖对赤星病病原菌菌丝生长的影响(144h)

Fig. 4 Effects of different temperature of oligochitosan on mycelial growth of *Alternaria alternata* in 144 h  
注: 1、2、3、4、5 中壳寡糖处理温度分别为 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃。1、2、3、4、5 中左图为试验组,右图为对照组。

## 2.5 壳寡糖 pH 值稳定性

由图 5,图 6 可知,pH 值对壳寡糖溶液对烟草赤星病病原菌的抑菌率影响较大。在 48 h,培养基 pH 值为 4,5,6,7 的实验组对应的抑制率分别为 100%,98%,85.05%,60.26%。在 120 h,培养基 pH 值为 4,5,6,7 的实验组对应的抑制率分别为 100%,91.24%,68.78%,46.24%。然而,徐俊光(2007)<sup>[2]</sup>报道 pH 值对壳寡糖抑菌活性的影响因菌而异。这一结果暗示着壳寡糖对不同类别的菌可能存在不同的抑菌机理,并且说明在使用壳寡糖生物农药时要注意溶液酸碱性的影响。

## 3 结 语

- a. 壳寡糖对烟草赤星病病原菌具有较好的抑制作用。
- b. 质量浓度为 10 g/L 的壳寡糖在 48 h 时,对烟草赤星病病原菌菌丝的抑制率达到了

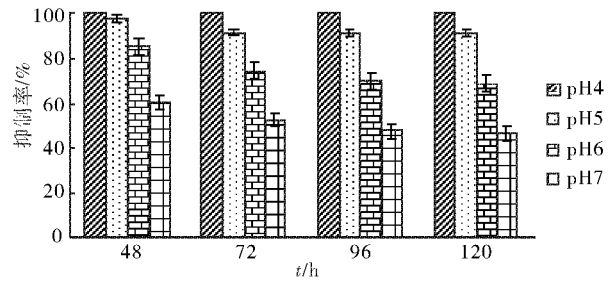


图 5 不同 pH 值壳寡糖对烟草病原菌菌丝生长的影响

Fig. 5 Effects of different pH of oligochitosan on mycelial growth of *Alternaria alternata*

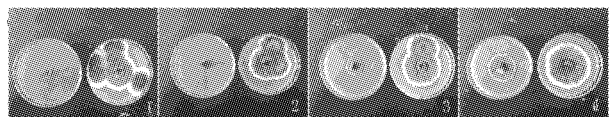


图 6 不同 pH 值壳寡糖对烟草病原菌菌丝生长的影响(120 h)

Fig. 6 Effects of different pH of oligochitosan on mycelial growth of *Alternaria alternata* in 120 h

注: 1、2、3、4 中培养基 pH 值分别 4、5、6、7。1、2、3、4 中左图为试验组,右图为对照组。

89.36%。当壳寡糖质量浓度达到 15 g/L 时,对赤星病原菌菌丝的抑制率则达到了 94.74%以上。

c. 壳寡糖质量浓度为 2.5 g/L 以上时对烟草赤星病病原菌孢子萌发抑制率均在 100%,所需的壳寡糖质量浓度远低于对菌丝生长抑制的浓度。

d. 质量浓度为 5 和 10 g/L 的壳寡糖溶液在 144 h 时,对烟草赤星病病原菌产孢量的抑制率分别为 53.1%和 69.7%,低于对菌丝生长的抑制率。

e. 壳寡糖对烟草赤星病病原菌菌丝的抑制作用对于热处理具有良好的稳定性。

f. 质量浓度为 15 g/L 的壳寡糖 PDA 培养基 pH 值为 4,5,6,7 在 48 h 时,对烟草赤星病病原菌菌丝的抑制率分别为 100%,98%,85.05%,60.26%,pH 值对壳寡糖溶液的抑菌率影响较大。

## 参考文献:

- [1] 沈奕. 丁儿寡糖对烟草黑胥病和赤星病的控制效应及其机制研究[D]. 合肥:安徽农业大学植物保护学院,2004.
- [2] 徐俊光. 壳寡糖对植物病原真菌的抑菌活性及其机理的初步研究[D]. 大连:中国科学院大连化学物理研究所,2007.
- [3] 张敏,何熙璞,彭好文,等. 壳寡糖基聚合物对 3 种病原真菌抑菌作用研究[J]. 中国果树,2008(3): 35-37.
- [4] MENG Xian Ghong, YANG Ling Yu, Kennedy John F, et al. Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological

- properties in pear fruit[J]. Carbohydrate Polymers, 2010, 81(1): 70-75.
- [5] 杨玲玉.壳聚(寡)糖的抑菌规律及对果实采后病害防治作用研究[D]. 青岛:中国海洋大学海洋生物系,2009.
- [6] 刘晓宇,刘志恒,吕淑霞.壳寡糖对植物病原真菌的抑制作用[J].安徽农业科学,2005,33(2):225,282.
- [7] 卢金清,王琴,何冬黎,等.两种植物源农药对烟草赤星病的药效试验[J].湖北农业科学,2011,50(6):1155-1157,1161.

## Inhibition activities of oligochitosan against *alternaria alternata* of tobacco

HU Guo-yuan<sup>1</sup>, HU Jian<sup>1</sup>, LI Chao-ying<sup>1</sup>, YANG Chun-lei<sup>2</sup>, YUAN Jun<sup>1</sup>, YU Jun<sup>2</sup>, YANG Jin-peng<sup>2</sup>

(1. Hubei Key Lab of Novel Reactor & Green Chemical Technology, Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Wuhan 430074, China; 2. Tobacco Research Institute of Hubei Province, Wuhan 430030, China)

**Abstract:** The effects of oligochitosan on mycelial growth, spore germination and sporulation of *Alternaria alternata* of tobacco were explored, and the effects of temperature and pH values to the antibacterial effect of oligochitosan were also studied. The results show that when the concentration of oligochitosan is 15 g/L, the inhibition rate of mycelial growth to mycelial growth of *A. alternata* is 94.74% in 48 h, and when the concentration of oligochitosan is only 2.5 g/L, the inhibition rate to spore germination of *A. alternata* is 100%. When the concentration of oligochitosan is 10 g/L, the inhibition rate of sporulation of *A. alternata* is 69.7% in 144 h. The antibacterial effect of oligochitosan has a good thermal stability. The pH values show great influence to the antibacterial effect of oligochitosan. When the concentration of oligochitosan is 15 g/L, the inhibition rates of mycelial growth of *A. alternata* is 100% with the medium pH 4 in 48 h, and 62.26% with the medium pH 7 in 48 h.

**Key words:** oligochitosan; tobacco brown spot; *Alternaria alternata*; inhibiting activity

本文编辑:张 瑞



(上接第 3 页)

## On synthesis of bosentan

YANG Yi-hong, YIN Di, ZHANG Heng

(Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan institute of technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract:** Bosentan is an orally active dual endothelin (ET) receptor antagonist, can improve exercise capacity and survival in patients with pulmonary arterial hypertension. With 5-(2-methoxy-phenyl)-2-(pyrimidin-2-yl)-tetrahydropyrimidin-4,6-dione as starting material, bosentan (1) was prepared by chlorination, sulfonylation and etherification,. The structures of target molecule and intermediates were confirmed by IR, <sup>1</sup>H-NMR and MS. Using single factor analysis and the uniform design, the optimal reaction conditions of each reaction were obtained. The total yield was up to 71.5%. The chlorination reaction of this process gets rid of deacid reagent and uses less phosphorus oxychloride; phase transfer catalyst in sulfonylation reaction shortens reaction time and increases reaction yield; etherification reaction introduces hydroxyethoxy group only in one step, decreasing reaction steps. Therefore the process is concise, environmental friendly and economically.

**Key words:** pulmonary arterial hypertension drug; bosentan; synthesis

本文编辑:张 瑞