

喜树碱对番茄灰霉病菌的毒理效应

毛胜凤^{1,2}, 周 湘², 范闻春², 张立钦², 叶建仁¹

(1. 南京林业大学 林学院 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037; 2. 浙江农林大学 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300)

摘要:为探明喜树碱对番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 的毒理效应, 应用生长速率法、电子显微镜观察研究不同质量浓度喜树碱对番茄灰霉病菌菌丝生长、细胞壁结构的影响; 番茄 *Lycopersicon esculentum* 叶片经喜树碱处理后接种番茄灰霉病菌, 观察药剂对病菌侵染活性的影响。结果表明: 喜树碱为 $3.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时就能强烈抑制番茄灰霉病菌菌丝生长, 抑菌率达 45.49%, 差异显著 ($P < 0.05$); 可显著影响番茄灰霉病菌对番茄活体叶片的侵染活性; 喜树碱处理可导致菌体细胞壁表面出现破损、穿孔, 细胞内含物外渗等现象。喜树碱能破坏菌丝体细胞结构, 从而抑制番茄灰霉病菌的生长, 而在活体叶片可显著影响病菌的侵染活性。图 1 表 3 参 14

关键词: 植物保护学; 喜树碱; 番茄灰霉病菌; 毒理效应

中图分类号: S482.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2015)04-0585-05

Toxicological effects of camptothecin to *Botrytis cinerea*

MAO Shengfeng^{1,2}, ZHOU Xiang², FAN Wenchun², ZHANG Liqin², YE Jianren¹

(1. Collaborative Innovation Center of Sustainable Forestry in Southern China, College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 2. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

Abstract: In order to ascertain the toxicology effects of camptothecin to *Botrytis cinerea*, growth rates were determined by the application of different concentrations of camptothecin inhibition of mycelial growth and cell wall structure of *B. cinerea*. The results showed that camptothecin concentration $3.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ can strongly inhibit the mycelial growth, inhibition rate 45.49% antibacterial rate of significant differences. In the scanning electron microscope, camptothecin treated by *B. cinerea*, mycelial cells rupture, perforation, shriveled, growing point of collapse, cytoplasmic extravasation. *In vivo* effects of camptothecin on *B. Cinerea* showed that camptothecin against *B. cinerea* has a significant protective effect. [Ch, 1 fig. 3 tab. 14 ref.]

Key words: plant protection; camptothecin; *Botrytis cinerea*; toxicological effects

番茄灰霉病 *Botrytis cinerea* 是番茄 *Lycopersicon esculentum* 生产的限制性障碍^[1-2]。生产上主要依靠化学防治来控制灰霉病的危害, 而长期、大量、单一地使用同种药剂已经对环境和人类健康带来很大的隐患, 同时也引起番茄灰霉病菌产生抗药性^[3], 因此, 必须寻找一种既有效又安全的防治措施。目前, 有近一半的新药物来自于天然产物^[4]。喜树碱(camptothecin)是从喜树 *Camptotheca acuminata* 中提取出来的一种生物碱, 1966年 Wall 等发现喜树果实提取物对小鼠肺癌 Ad-755 有一定的抑制作用, 国内外掀起了对喜树碱的研究热潮, 并对喜树碱的药理活性、临床应用及光照对喜树碱合成影响等方面进行了大量研究^[5], 喜树碱系列衍生物抗癌药物是附加值极高的高技术产品^[6]。已有报道: 作为植物源农药的喜树叶乙醇提取物和水提取物对金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*, 大肠埃希菌 *Escherichia coli*, 枯草杆

收稿日期: 2015-01-04; 修回日期: 2015-03-04

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(LY14C140005); 浙江农林大学大学生创新训练项目(201302021)

作者简介: 毛胜凤, 高级实验师, 从事森林保护与生物防治研究。E-mail: maosf@126.com。通信作者: 叶建仁, 教授, 博士, 从事森林保护与森林病理学研究。E-mail: jrye@njfu.com.cn

菌 *Bacillus subtilis*, 八叠球菌 *Sarcina ventriculi* 有明显的抑制作用, 喜树叶乙醇提取物对黑曲霉 *Aspergillus niger*, 木霉 *Trichoderma virid* 和青霉 *Penicillium chrysogenum* 有的抗菌活性, 但是水提物对霉菌没有抑制作用^[7]。发现喜树叶乙醇提取物对黄瓜枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*, 小麦赤霉病菌 *Fusarium graminearum*, 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和油菜菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 等 15 种植物病原菌有抗菌活性^[8]。张立钦等^[9]以喜树碱为原药, 进行农用杀菌剂的开发与研究。室内盆栽的活体实验研究结果表明: 喜树碱对水稻纹枯病 *Rhizoctonia solani*, 黄瓜白粉病 *Sphaerotheca fuliginea*, 黄瓜霜霉病 *Pseudoperonospora cubensis* 均有较高的杀菌活性, 半数致死质量浓度分别为 41.964, 40.495, 27.489 mg·L⁻¹。同时, 黄瓜霜霉病的田间药剂试验结果表明: 喜树碱对霜霉病菌有杀菌活性, 其半数致死质量浓度为 11.221 mg·L⁻¹, 因此, 喜树碱可能成为有效的生物源杀菌剂。然而截至目前, 对于喜树碱是如何抑制植物病原菌的却知之甚少。本试验研究了喜树碱对番茄灰霉病菌的形态毒理, 对菌体细胞壁和菌体生长发育的影响, 以期植物源农药的开发利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

病原菌: 番茄灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 由浙江农林大学微生物实验室提供。药剂和主要仪器: 喜树碱(camptothecin, 简写 CPT)(纯度≥95%)从湖北威得利化学科技有限公司购买。MLS-3750 全自动高压蒸汽灭菌锅(日本 SANYO), Mf II 全自动菌落计数器(中国杭州 SHINESO), HCP-2 型临界干燥仪(日本), IB-5 型离子溅射仪(日本), XL30-ESEM 型环境扫描电镜(荷兰飞利浦公司), Reichert 超薄切片机(德国)。

供试植株: 供试番茄品种为欧粉 308 F1, 采用基质育苗, 待幼苗长至 2~4 片真叶时, 选择长势一致的健康植株移栽到直径 12.5 cm 的塑料钵中, 于温室中培养, 待用。

溶液配制: 准确称取喜树碱粉末 0.2 g, 加入到 200 mL 的锥形瓶中, 然后往锥形瓶中加入 50 mL 的 N,N-二甲基亚砜(DMSO), 在 40 °C 水浴锅中加热溶解, 直到溶液完全澄清, 即为 4 000 mg·L⁻¹ 的喜树碱溶液(母液)。放在 4 °C 冰箱里保存备用。

1.2 方法

1.2.1 喜树碱对病菌的抑菌活性 菌种培养: 供试番茄灰霉病菌接于装有马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基直径为 9 cm 的培皿中, 于 25 °C 恒温培养箱中倒置培养 48 h 后, 备用。在超净工作台上, 将喜树碱母液加入到灭菌后冷却至 50~60 °C 的 PDA 培养基中, 使喜树碱溶液与 PDA 培养基完全混匀, 制得喜树碱的质量浓度梯度为 200.00, 100.00, 50.00, 25.00, 12.50, 6.25, 3.13 和 0 mg·L⁻¹ 的含喜树碱的培养基, 然后将制得的含喜树碱的培养基倒入灭过菌的培养皿中, 15 mL·皿⁻¹。待培养基凝固后, 用 6 mm 的打孔器在长有番茄灰霉病菌菌落的培养基上打孔, 用无菌镊子分别加到凝固的含药平板培养基表面的正中。接种时按 7 个质量浓度梯度和 1 个空白对照水来接种, 重复接种 3 个·质量浓度⁻¹。在 25 °C 下恒温培养, 每天定时测量菌落直径。按公式计算菌落抑菌率(计算抑菌率时以水处理为对照): 菌落直径(mm)=菌落平均直径(mm)-5 mm(菌饼直径)。相对抑制率=[(对照菌落直径(mm)-处理菌落直径(mm))/对照菌落直径(mm)]×100%。所得数据用 DPS 软件中的 Duncan 新复极差法进行方差分析和差异显著性检验($P=0.05$), 并计算半最大效应浓度(C_{EC50})的软件得到线形回归方程和 C_{EC50} 的浓度。

1.2.2 喜树碱对病菌的形态毒理 将喜树碱配成所需的半最大效应浓度(C_{EC50}), 将剪好的适量的滤纸片分别放入稀释好的喜树碱溶液和无菌水中, 浸泡 0.5 h。将灭过菌的融化的培养基倒入已灭菌的培养皿中, 15 mL·皿⁻¹, 共倒 6 个皿。待其凝固后, 在其中 3 个皿中央加入喜树碱浸泡的滤纸片, 然后将菌饼(直径 5 mm)接种于滤纸片里面中央位置。另 3 个皿中加入无菌水浸泡的滤纸片, 在中央接入上述的菌饼。于 28 °C 下恒温培养 48 h。取样及前处理^[10]: 取培养 24, 48, 72 h 的经过药液处理和未处理的对照番茄灰霉病菌, 分别于菌丝边缘处(菌丝稀疏处)切约 1.0 cm × 1.0 cm 大小的正方形小块(各 2 块)样品。将样品固定在质量分数为 2.5% 的戊二醛溶液中 4 °C 固定过夜; 倒掉固定液, 用 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品 3 次, 15 min·次⁻¹; 在质量分数 1% 的钨酸溶液中固定 1~2 h; 倒掉固定液, 用 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.0 的磷酸缓冲液漂洗样品 3 次, 15 min·次⁻¹; 用梯度体积分数不同的乙醇(包括 50%,

70%，80%，90%，95%）溶液对样品进行脱水处理，处理 $15 \text{ min} \cdot \text{体积分数}^{-1}$ ，用体积分数为 100% 的乙醇处理 2 次， $20 \text{ min} \cdot \text{次}^{-1}$ ；用乙醇与醋酸异戊脂的混合液 [$V(\text{乙醇}) : V(\text{醋}) = 1 : 1$] 处理样品 30 min，再用纯醋酸异戊脂处理样品 1~2 h。将处理好的样品进行干燥，将干燥好的样品镀膜，扫描电镜观察，得到图像后进行结果分析。

1.2.3 活体条件下喜树碱对番茄灰霉病菌的活性^[11] 保护作用的测定：用剪刀将生长旺盛的 8~10 叶期番茄植株相同部位叶片带叶柄快速剪下，将叶片在不同质量浓度的喜树碱药液中浸渍 3~5 s 后自然晾干，叶柄用脱脂棉包裹，置于 9 cm 培养皿中，对照以不含药剂的质量分数为 0.1% 的 T-80 无菌水处理。用直径 6 mm 的灭菌打孔器从 25 °C 下培养 4 d 的番茄灰霉病菌菌落边缘打取菌饼，接种于叶片中脉处，置于 25 °C 培养箱中培养，3 d 后观察发病情况，十字交叉法测量叶片上的病斑直径。重复 3 次·质量浓度⁻¹，叶片 10 片·处理⁻¹。

1.2.4 数据处理 所得数据用 DPS 软件中的 Duncan 新复极差法进行方差分析和差异显著性检验 ($P = 0.05$)。叶片法中，十字交叉测量叶片上的病斑直径，根据调查数据，计算防治效果。 $P(\%) = [(D_0 - D_1) / D_0] \times 100\%$ 。其中： P 为防治效果； D_0 为空白对照病斑直径； D_1 为药剂处理病斑直径。

2 结果与分析

2.1 喜树碱对番茄灰霉病菌的毒力

离体测定结果表明：喜树碱对菌丝生长有抑制作用，其质量浓度反应曲线相关性较好。喜树碱带毒培养基培养番茄灰霉病菌，培养 7 d 后，测量各质量浓度的菌落直径并计算平均值和各质量浓度的抑制率 (表 1)。发现较低质量浓度的喜树碱就对番茄灰霉病菌的生长有抑制作用，质量浓度为 $6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时，抑制率达 62%。喜树碱对番茄灰霉抑制的半最大效应浓度 ($C_{\text{EC}_{50}}$) 是 $3.503 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。这比百菌清对番茄灰霉抑制 $C_{\text{EC}_{50}}$ ($9.583 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 小了近 3 倍，跟福美双 ($C_{\text{EC}_{50}}$ 为 $4.480 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和退菌特 ($C_{\text{EC}_{50}}$ 为 $3.208 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)^[12] 差不多。根据上表的结果，用计算标准曲线的软件得到标准曲线 (表 2)。

表 1 不同质量浓度的喜树碱对番茄灰霉菌的抑制效果

Table 1 Restraining effect of different concentration camptothecin on *Botrytis cinerea*

质量浓度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	菌落直径/mm	抑制率/%
0	76.57 a	0.00
3.13	41.74 b	45.49
6.25	29.10 c	62.00
12.50	12.87 d	83.20
25.00	10.98 d	85.66
50.00	4.42 e	94.22
100.00	3.33 e	95.65
200.00	2.35 e	96.93

说明：表中数据为 3 次重复的平均值，数据后不同小写字母表示 5% 水平时差异显著。

表 2 喜树碱对番茄灰霉菌的毒力回归方程

Table 2 Toxicity regression equation of camptothecin for *Botrytis cinerea*

药剂	回归方程	x^2	$C_{\text{EC}_{50}}/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	95% 的置信度/ $(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$
喜树碱	$y = 4.2524 + 1.3731x$	1.934	3.5031	2.34~5.25

2.2 喜树碱对番茄灰霉病菌的形态毒理影响

喜树碱处理的番茄灰霉病菌其菌落边缘的菌丝生长杂乱，生长速度减缓，如图 1 所示。对照组的未经喜树碱处理的番茄灰霉病菌生长良好，菌落边缘的菌丝纤细直长，粗细均匀一致，线条流畅；经喜树碱处理 24 h 后的番茄灰霉病菌，菌落边缘的菌丝生长没有对照组那么均匀，菌丝生长速度变慢；处理 48 h 后，菌落边缘的菌丝部分出现塌陷现象，菌丝不再有明显的生长；处理 72 h 后，菌落边缘的菌丝塌陷较多，菌落不再向外缘扩展。

喜树碱处理的番茄灰霉病菌菌丝出现了塌陷现象 (图 1 下右)。未经喜树碱处理的番茄灰霉病菌，菌丝光滑而饱满，伸展良好 (图 1 上左)；经喜树碱处理 24 h 后的番茄灰霉病菌，菌丝表面粗糙 (图 1 上右)；处理 48 h 后，菌丝表面粗糙，并且部分出现了塌陷现象 (图 1 下左)；处理 72 h 后，菌丝基本上全部出现塌陷现象 (图 1 下右)。

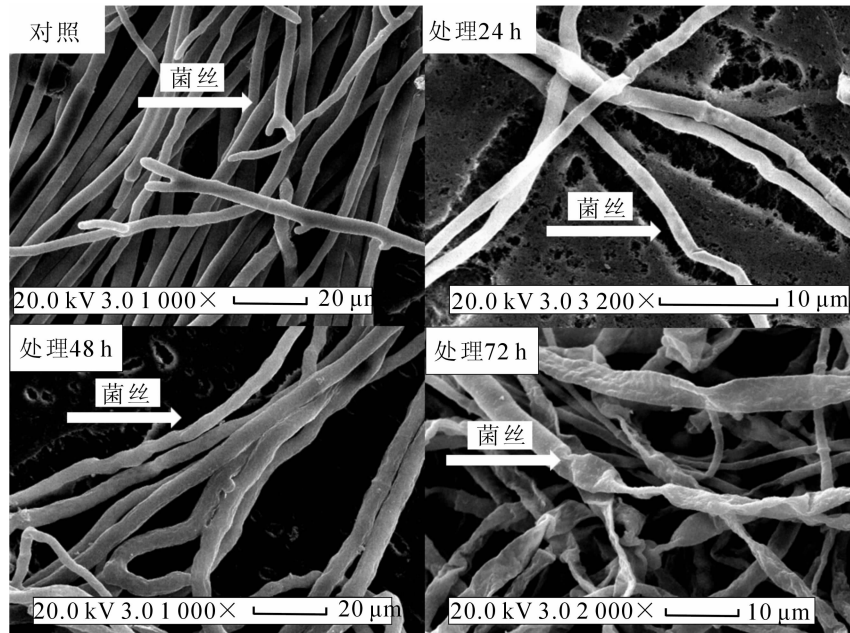


图1 喜树碱处理对番茄灰霉病菌菌丝形态的影响

Figure 1 Effect of camptothecin treatment on mycelial shape of *Botrytis cinerea*

2.3 活体条件下喜树碱对番茄灰霉病菌的影响

从健康番茄植株相同部位上取下生长一致的叶片测定喜树碱的活性(表3)。经喜树碱处理后再接菌的番茄叶片上的病斑大小与对照存在显著差异,且不同喜树碱质量浓度处理间也存在显著差异。质量浓度为 $3.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $6.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时没有什么防治效果,叶片上的病斑随着质量浓度的增大有所减小,防治效果则随着质量浓度的增大有所提高。

3 结论与讨论

本试验从离体和活体试验的变化上来研究喜树碱对番茄灰霉菌的毒理效应。发现喜树碱对番茄灰霉病菌的菌丝生长有抑制作用,质量浓度为 $3.13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,抑制率有45.49%;喜树碱对番茄灰霉病菌菌丝形态有明显的影响,处理后的菌丝塌陷现象严重、生长点畸形和缢缩、内含物外渗现象明显。初步推测喜树碱处理番茄灰霉病菌后,引起细胞膜损伤及结构改变,接着出现细胞内含物外渗,最后导致菌丝体塌陷,直到停止生长。活体试验得出了相同的结论,即当叶片使用喜树碱处理,可对该病菌的侵染起到一定的控制作用。而在试验中发现离体的毒力效果要比活体试验时强,原因可能是离体培养时所有的培养条件比较一致,不存在寄主的影响,而在活体试验中增加了番茄植株为寄主,在喷施药剂后对病菌的影响就没有单一培养基上效果那么显著。若要作为农药开发,还要进行环境毒理研究和大田试验等进一步的探索。

在医学上研究得到:喜树碱的作用是使拓扑异构酶 I、喜树碱和 DNA 形成三元复合体,而使 DNA 在复制和转录过程发生断裂,最终导致细胞死亡^[13]。喜树碱处理细胞导致短暂的细胞色素 cyt c 表达增加,活化呼吸链,引起细胞色素 cyt c 释放,激活胞质和线粒体中的 caspase,导致线粒体发生内源性降解和膜电位的丧失,最终导致细胞凋亡^[14]。我们研究发现:喜树碱处理后的菌丝内含物外渗随即出现菌丝塌陷现象,导致细胞坏死,但是喜树碱对于番茄灰霉病菌的作用位点是否就是在线粒体,是否会引起细胞色素 cyt c 表达量的变化,喜树碱的抑菌机理是否通过相同的方式作用还需要深入研究。

表3 活体条件下喜树碱对番茄灰霉病菌的活性

喜树碱质量浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	菌斑直径/cm	防治效果/%
0	1.52 a	-
3.13	1.42 a	6.58
6.25	1.39 a	8.55
12.50	1.14 b	24.78
25.00	0.99 b	35.09
50.00	0.77 c	49.12
100.00	0.63 cd	58.55
200.00	0.47 d	68.64

说明:表中数据为3次重复的平均值,数据后不同小写字母表示5%水平时差异显著。

4 参考文献

- [1] WILLIAMSON B, TUDZYNSKI B, TUDZNSKI P, *et al.* *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease [J]. *Mol Plant Pathol*, 2007, **8**(5): 561 – 580.
- [2] 杨晓楠, 王猛, 申瑞平, 等. 微孔板法检测番茄灰霉病菌对杀菌剂的敏感性[J]. 中国农业科学, 2012, **45**(15): 3075 – 3082.
YANG Xiaonan, WANG Meng, SHEN Ruiping, *et al.* Microtiter method to test the sensitivity of *Botrytis cinerea* to fungicides [J]. *Sci Agric Sin*, 2012, **45**(15): 3075 – 3082.
- [3] 牛芳胜, 马志强, 毕秋艳, 等. 哈茨木霉菌与 5 种杀菌剂对番茄灰霉病菌的协同作用[J]. 农药学学报, 2013, **15**(2): 165 – 170.
NIU Fangsheng, MA Zhiqiang, BI Qiuyan, *et al.* Synergism of *Trichoderma harzianum* and five fungicides to *Botrytis cinerea* [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2013, **15**(2): 165 – 170.
- [4] YAMAZAKI M, ASANO T, YAMAZAKI Y, *et al.* Biosynthetic system of camptothecin: an anticancer plant product [J]. *Pure Appl Chem*, 2010, **82**(1): 213 – 218.
- [5] 顾青, 朱睦元. 光照对喜树愈合组织生理及喜树碱合成的影响[J]. 浙江林学院学报, 2006, **23**(3): 280 – 284.
GU Qing, ZHU Muyuan. Effects of light on physiology and camptothecin accumulation in *Camptotheca acuminata* callus [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2006, **23**(3): 280 – 284.
- [6] 肖坤福. 喜树碱的研究新进展[J]. 时珍国医国药, 2004, **15**(11): 787 – 789.
XIAO Kunfu. New progress camptothecin [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2004, **15**(11): 787 – 789.
- [7] 毛胜凤, 雷应飞, 薛勇, 等. 喜树叶提取物的抗菌活性研究[J]. 林业科技, 2009, **34**(2): 23 – 25.
MAO Shengfeng, LEI Yingfei, XUE Yong, *et al.* Antimicrobial activity of extracts of *Camptotheca acuminata* leaves [J]. *For Sci & Technol*, 2009, **34**(2): 23 – 25.
- [8] 毛胜凤, 雷应飞, 吴建, 等. 喜树叶乙醇提取物对植物病原菌的抗菌活性研究[J]. 林业科技, 2009, **34**(6): 25 – 27.
MAO Shengfeng, LEI Yingfei, WU Jian, *et al.* Study on antimicrobial activities of *Camptotheca acuminata* leaves ethanol extracts to plant pathogen [J]. *For Sci & Technol*, 2009, **34**(6): 25 – 27.
- [9] 张立钦, 孙逸钊, 王品维, 等. 喜树碱对黄瓜白粉病和霜霉病及水稻纹枯病的抑菌活性[J]. 浙江林学院学报, 2008, **25**(6): 681 – 684.
ZHANG Liqin, SUN Yizhao, WANG Pinwei, *et al.* Antifungal activity of camptothecin on *Rhizoctonia solani*, *Sphaerotheca fuliginea* and *Pseudoperonospora cubensis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2008, **25**(6): 681 – 684.
- [10] 毛胜凤, 林海萍, 陈安良, 等. 喜树碱对番茄灰霉病菌的病理反应[J]. 中国生物防治学报, 2014, **30**(1): 143 – 148.
MAO Shengfeng, LIN Haiping, CHEN Anliang, *et al.* Antifungal reaction of *Botrytis cinerea* on camptothecin [J]. *Chin J Biol Contr*, 2014, **30**(1): 143 – 148.
- [11] 康立娟, 张小风, 王文桥, 等. 灰霉菌的抗药性与适合度测定[J]. 农药学学报, 2000, **2**(3): 39 – 42.
KANG Lijuan, ZHANG Xiaofeng, WANG Wenqiao, *et al.* Estimation of fungicide-resistance and fitness of *Botrytis cinerea* [J]. *Chin J Pestic Sci*, 2000, **2**(3): 39 – 42.
- [12] 张从宇, 高智谋, 岳永德. 常用杀菌剂及其复配剂对番茄灰霉病菌的毒力测定[J]. 农药, 2003, **42**(8): 28 – 29.
ZHANG Congyu, GAO Zhimou, YUE Yongde. Virulence of commonly used fungicides to *Botrytis cinerea* [J]. *Pesticide*, 2003, **42**(8): 28 – 29.
- [13] PARK S Y, CHENG Y C. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 could facilitate the religation of topoisomerase I-linked DNA inhibited by camptothecin [J]. *Cancer Res*, 2005, **65**(9): 3894 – 3902.
- [14] SANCHEA-ALCAZAR J A, AULT J G, KHODJAKOV A, *et al.* Increased mitochondrial cytochrome c levels and mitochondrial hyperpolarization precede camptothecin-induced apoptosis in Jurkat cells [J]. *Cell Death Differ*, 2000, **7**(11): 1090 – 1100.