

周德明,艾 芹,周国英. 12 种植物对油茶炭疽病菌和软腐病菌的抑制活性[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):121-123.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.039

# 12 种植物对油茶炭疽病菌和软腐病菌的抑制活性

周德明,艾 芹,周国英

(中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室,湖南长沙 410004)

**摘要:**采用滤纸片法初步测定了 12 种植物的 3 种有机溶剂粗提取物对油茶炭疽病菌、油茶软腐病菌的生物抑制活性,筛选出抑菌效果好的植物,测定其对 2 种油茶病原菌的抑菌作用。结果表明,博落回的 3 种粗提取物对油茶炭疽病菌、油茶软腐病菌均有抑制作用,其中乙醇粗提取物的抑制效果最好,对油茶炭疽病菌、油茶软腐病菌的抑制中浓度分别为 16.58、41.39 mg/mL,其中在浓度为 62.5 mg/mL 时,对油茶炭疽病菌、油茶软腐病菌的室内离体抑制率分别达 80.87% 和 61.1%。离体叶片保护治疗作用与林间防治作用和对照药剂效果相当,可达 60% 以上。

**关键词:**植物提取物;油茶;病原真菌;抑菌活性

**中图分类号:** S482.2<sup>+</sup>92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0121-03

油茶(*Camellia oleifera*)是我国特有的木本油料植物,主要分布于南方地区,是世界四大木本油料树种之一<sup>[1]</sup>。油茶籽及其副产品富含多种活性成分<sup>[2]</sup>,综合利用价值极高,具有较大的经济竞争潜力。近年来,油茶病害的频繁发生,尤其是油茶炭疽病、油茶软腐病等发病率高,危害普遍严重,是阻碍油茶林健康发展及发挥经济效益的重要原因之一<sup>[3]</sup>。

目前,化学防治仍然是油茶病害防治的主要途径,为了降低环境污染和减少茶油农药残留,实现油茶病害的综合治理,研究者们积极寻找环境友好型广谱杀菌剂<sup>[4]</sup>和其他的防治方法<sup>[5]</sup>。生物防治法以其安全、高效及环境友好等特点显示出了光明的前景,逐渐成为研究热点,其中利用抑菌植物提取物研制植物源杀菌剂就是一个重要方面<sup>[6]</sup>。本研究以油茶产区常见且有抑菌报道的植物为研究对象,筛选出了抑菌效果好的抑菌植物。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 油茶炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、油茶软腐病菌 *Agaricodochium camellia* 由中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室菌种保藏中心提供,经鉴定具有较强致病性。

1.1.2 供试植物 试验共用 9 个科 12 种植物样品(表 1),于 2014 年 3—6 月采集于江西宜春油茶基地和中南林业科技大学周边。洗净后在室温下自然阴干,粉碎,过 40 目筛,置于 4℃ 冰箱中保存备用<sup>[7]</sup>。

1.1.3 供试药剂 95% 乙醇、丙酮、甲醇、二甲基亚砜,均为分析纯。

1.1.4 培养基 马铃薯液体培养基(PD),马铃薯琼脂培养基(PDA)。

### 1.2 方法

1.2.1 植物提取物的制备 每一种植物称取 3 份,每份 20 g,分别用 90% 乙醇、甲醇和丙酮按料液比 1 g:10 mL 在室温下浸渍提取 72 h<sup>[8]</sup>。抽滤后旋转蒸发至少量,待剩余溶剂自然挥发成浸膏状,于 4℃ 下保存备用<sup>[9]</sup>。

1.2.2 病原菌菌液的制备 将供试油茶炭疽病菌和油茶软腐病菌进行活化,转接到马铃薯液体培养基中,置于摇床中振

收稿日期:2015-01-26

基金项目:林业公益性行业科研专项(编号:2013044403)。

作者简介:周德明(1964—),男,湖南祁东人,博士,副教授,主要从事微生物教学与科研工作。

通信作者:周国英,博士,教授,主要从事森林保护、微生物教学及研究。E-mail:gyzhou2118@163.com。

[7] Tang Q B, Jiang J W, Yan Y H, et al. Genetic analysis of larval host-plant preference in two sibling species of *Helicoverpa* [J]. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2006, 118(3): 221-228.

[8] Zhou D S, Wang C Z, van Loon J J. Chemosensory basis of behavioural plasticity in response to deterrent plant chemicals in the larva of the small cabbage white butterfly *Pieris rapae* [J]. *Journal of Insect Physiology*, 2009, 55(9): 788-792.

[9] Hodgson E S, Lettvin J Y, Roeder K D. Physiology of a primary receptor unit [J]. *Science*, 1955, 122: 417-418.

[10] Glendinning J I, Ensslen S, Eisenberg M E, et al. Diet-induced plasticity in the taste system of an insect: localization to a single transduction pathway in an identified taste cell [J]. *Journal of*

*Experimental Biology*, 1999, 202: 2091-2102.

[11] Zhang H J, Faucher C P, Anderson A, et al. Comparisons of contact chemoreception and food acceptance by larvae of polyphagous *Helicoverpa armigera* and oligophagous *Bombyx mori* [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2013, 39(8): 1070-1080.

[12] 汤德良,王琛柱,罗林儿,等. 棉铃虫和烟青虫幼虫下颚栓锥感器对某些化合物反应特性的比较 [J]. *中国科学: C 辑*, 2000, 30(5): 511-516.

[13] Glendinning J I, Valcic S, Timmermann B N. Maxillary palps can mediate taste rejection of plant allelochemicals by caterpillars [J]. *Journal of Comparative Physiology A: Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology*, 1998, 183(1): 35-43.

荡培养 2 d。

1.2.3 植物提取物生物抑制活性筛选测定 滤纸片法<sup>[10]</sup>:用 10% 二甲基亚砷把植物提取物配制成植物干样浓度 5 g/mL 的溶液,再制备若干直径为 5 mm 的植物粗提取物流滤纸片。在平板上涂布接种病原菌菌液,用无菌镊子夹取同一植物的 3 种提取物滤纸片,依次平整放在接种后的平板上,呈正边形放置。每处理重复 3 次。以 10% 二甲基亚砷滤纸片为对照。倒置放入培养箱中,于 28 ℃ 下培养 2 d 后用“十”字交叉法测量抑菌圈直径。

1.2.4 博落回提取物对 2 种油茶病原菌的室内毒力测定 菌丝生长速率法<sup>[11]</sup>:用无菌水配制博落回提取物母液,吸取一定体积的提取物母液加入培养基中,制成浓度为 62.5 mg/mL 的含药培养基,以清水及 70% 多菌灵可湿性粉剂为对照。用 5 mm 打孔器在培养 5 d 的病原菌培养基上打取菌碟,挑取 1 个菌碟接种在含药培养基上,菌丝面朝下,倒置放入培养箱中,28 ℃ 下培养 4 d,用“十”字交叉法测量菌落直径,每处理重复 3 次,取平均值按下列公式计算抑制率。

抑菌率 =  $\frac{(\text{清水对照菌落直径} - 5 \text{ mm}) - (\text{处理菌落直径} - 5 \text{ mm})}{\text{清水对照菌落直径} - 5 \text{ mm}} \times 100\%$ 。

1.2.5 博落回乙醇提取物对 2 种油茶病原菌的室内毒力曲线测定 制备系列浓度的博落回乙醇提取物含药平板,以清水为对照。转接直径 5 mm 的病原菌菌饼,28 ℃ 下培养 4 d 后计算抑制率。将抑制率根据生物统计几率值换算表换算成几率值。以处理浓度的对数值为  $x$  轴,以几率值为  $y$  轴建立毒力回归方程,并计算出相关系数及抑制中浓度  $EC_{50}$ <sup>[12]</sup>。

1.2.6 博落回乙醇提取物对油茶离体叶片 2 种病原菌的预防治疗作用 取厚薄一致的健康油茶叶片,洗净晾干。将提取物药液均匀喷施于叶片背面,每处理 10 张叶,重复 3 次。待药液自然风干后,把各处理叶片排放在培养皿中保湿。以无菌水和 70% 多菌灵为对照药剂。预防作用试验在药剂处理 24 h 后,用接种器把直径 5 mm 菌碟有菌丝一面接种于叶片背面,治疗作用在药剂处理 24 h 前接种。接种后盖上皿盖,放入人工气候箱中培养<sup>[13]</sup>。待蒸馏水对照发病比较严重时,观察试验结果,根据油茶病害分级标准统计病情指数<sup>[14]</sup>,并按下列公式计算预防治疗效果。

预防/治疗效果 =  $\frac{\text{对照组平均病情指数} - \text{处理组平均病情指数}}{\text{对照组平均病情指数}} \times 100\%$ 。

1.2.7 博落回乙醇提取物对油茶 2 种病原菌的林间防治效果 林间防治试验地点位于湖南省株洲市攸县油茶基地。2014 年 5 月选取长势一致的 6 年左右的油茶林作为试验林,在进行油茶 2 种主要病害病情调查后,每隔 15 d 喷 1 次药,共施药 3 次,每 10 棵树为 1 个处理,每处理重复 3 次。以无菌水和 70% 多菌灵为对照。油茶为自然发病,30 d 后进行病情调查,计算防治效果。

2 结果与分析

2.1 植物粗提取物对油茶主要病原真菌的生物抑制活性

室内滤纸片法测定结果(表 1)表明,供试植物粗提取物对 2 种主要的油茶病原菌均有一定的生物抑制活性,不同种植物 and 不同溶剂提取物间的抑菌活性存在差异。在供试植物中,博落回粗提取物对 2 种油茶病原菌的生物抑制活性最高,

且其乙醇提取物对 2 种病原菌的抑制作用最好,抑菌圈直径均达 10 mm 以上,优于甲醇提取物和丙酮提取物。

表 1 植物提取物对油茶主要病原菌的生物抑制活性

植物	部位	提取溶剂	抑制作用	
			油茶炭疽病	油茶软腐病
博落回 <i>Macleaya cordata</i>	地上部分	90% 乙醇	+++	++
		甲醇	++	+
		丙酮	+	+
雪松 <i>Cedrus deodara</i>	松针	90% 乙醇	+	+
		甲醇	+	+
		丙酮	-	-
樟树 <i>Cinnamomum camphora</i>	叶	90% 乙醇	+	+
		甲醇	-	-
		丙酮	-	-
老鹳草 <i>Geranium sibiricum</i>	全株	90% 乙醇	+	-
		甲醇	-	-
		丙酮	-	-
枇杷 <i>Eriobotrya japonica</i>	叶	90% 乙醇	+	+
		甲醇	-	-
		丙酮	-	-
羊蹄 <i>Rumex japonicus</i>	地上部分	90% 乙醇	+	+
		甲醇	+	-
		丙酮	-	-
益母草 <i>Leonurus artemisia</i>	地上部分	90% 乙醇	++	+
		甲醇	+	-
		丙酮	-	-
接骨木 <i>Sambucus williamsii</i>	地上部分	90% 乙醇	+	+
		甲醇	+	-
		丙酮	-	-
间距紫堇 <i>Corydalis</i>	全株	90% 乙醇	++	++
		甲醇	+	+
		丙酮	+	-
金荞麦 <i>Fagopyrum dibotrys</i>	地上部分	90% 乙醇	+	+
		甲醇	-	-
		丙酮	-	-
何首乌 <i>Fallopia multiflora</i>	地上部分	90% 乙醇	+	+
		甲醇	-	-
		丙酮	-	-
黎蒿 <i>Artemisia</i>	地上部分	90% 乙醇	+	+
		甲醇	-	-
		丙酮	-	-

注:“+”表示抑菌圈直径为 5 ~ 10 mm,“++”表示抑菌圈直径为 11 ~ 15 mm,“+++”表示抑菌圈直径为 16 ~ 20 mm,“-”表示无明显抑菌效果。

2.2 博落回提取物对 2 种油茶病原真菌的室内毒力

博落回 3 种溶剂粗提取物对油茶炭疽病菌、油茶软腐病菌菌丝生长的抑制效果测试结果见表 2。

由表 2 可以看出,博落回 3 种溶剂提取物对供试 2 种油茶病害病原菌均表现出抑制作用,与滤纸片法试验结果一致。在试验浓度下,博落回乙醇提取物对 2 种病原菌的抑制率均达 60% 以上,显著高于甲醇和丙酮提取物的抑制效果。

2.3 博落回乙醇提取物对 2 种油茶病原菌的室内毒力

博落回乙醇提取物对油茶炭疽病菌和油茶软腐病菌的毒力回归方程、 $EC_{50}$  结果见表 3,其  $EC_{50}$  值分别为 16.58、41.39 mg/L,具有开发为植物源杀菌剂的潜力。

表 2 博落回 3 种溶剂提取物对 2 种油茶病原菌的抑制效果

药剂	抑制率(%)	
	油茶炭疽病菌	油茶软腐病菌
博落回乙醇提取物	80.87	61.1
博落回甲醇提取物	50.21	33.54
博落回丙酮提取物	30.01	22.32
70%多菌灵可湿性粉剂	68.1	62.5

注:植物提取物浓度为干样 62.5 mg/mL,对照药剂 70%多菌灵可湿性粉剂浓度为 10 mg/L。

2.4 博落回乙醇提取物对油茶离体叶片 2 种病原菌的预防治疗作用

博落回乙醇提取物对 2 种油茶病原菌的保护作用优于治疗作用,对油茶炭疽病菌的预防治疗作用优于油茶软腐病菌的

表 4 博落回乙醇提取物对 2 种油茶病原菌的预防治疗效果

药剂	浓度	油茶炭疽病菌		油茶软腐病菌	
		预防作用(%)	治疗作用(%)	预防作用(%)	治疗作用(%)
博落回乙醇提取物	45 mg/mL	60.96	56.16	54.81	47.41
博落回乙醇提取物	90 mg/mL	81.46	76.22	77.04	72.80
70%多菌灵可湿性粉剂	20 mg/L	84.27	79.66	85.43	81.87

表 5 博落回乙醇提取物对 2 种油茶病原菌的林间防治效果

药剂	浓度	油茶炭疽病菌		油茶软腐病菌	
		病情指数 (%)	防治作用 (%)	病情指数 (%)	防治作用 (%)
博落回乙醇提取物	45 mg/mL	9.8	44.63	8.2	39.26
博落回乙醇提取物	90 mg/mL	5.9	66.67	4.6	65.93
70%多菌灵可湿性粉剂	20 mg/L	5.1	71.19	3.9	71.11
无菌水		17.7		13.5	

3 讨论

通过滤纸片法测试并比较了 12 种植物的 3 种有机溶剂粗提取物对油茶炭疽病和软腐病的生物抑制活性,表明不同科植物及同一科不同种植物的粗提取物对 2 种病原菌的抑制活性均存在较大差异。提取溶剂不同时,同一植物的粗提物对 2 种病原菌的抑制活性不同。在本试验中,博落回 3 种溶剂粗提取物均表现出了较强的抑菌活性,益母草和间距紫堇的对 2 种病原菌也有一定的抑制活性。

采用生长速率法测定博落回 3 种溶剂提取物对油茶炭疽病菌、油茶软腐病菌的室内抑制效果,与滤纸片法测定的结果一致。博落回乙醇提取物的抑制效果最好,和对照药剂的抑制效果相当,对 2 种油茶病原菌的抑制中浓度 EC<sub>50</sub> 分别为 16.58、41.39 mg/mL。在供试浓度下,博落回乙醇提取物对炭疽病菌和软腐病菌的离体叶片预防治疗效果及林间防治效果表现出一致性,与化学农药作用效果相当,说明其具有开发研制成油茶主要病害杀菌剂的巨大潜能。

不同溶剂提取的博落回粗提取物中抑菌成分存在差异<sup>[15]</sup>,是 3 种博落回粗提物对油茶炭疽病菌、油茶软腐病菌抑制效果不同的主要原因,还有待进一步研究。因此,在油茶主要病害植物源药剂的研制开发中,对博落回有效成分的分析及提取方法的优化将具有重要意义。

表 3 博落回乙醇提取物对 2 种油茶病原菌的毒力

病原菌	毒力回归方程	EC <sub>50</sub> (mg/mL)	相关系数 <i>r</i>
油茶炭疽病菌	$y = 3.3616 + 1.3433x$	16.58	0.9687
油茶软腐病菌	$y = 3.2846 + 1.0609x$	41.39	0.9655

预防治疗作用。在浓度 90 mg/mL 时,博落回乙醇提取物对 2 种病原菌的预防治疗作用与对照药剂多菌灵相当(表 4)。

2.5 博落回乙醇提取物对油茶 2 种病原菌的林间防治作用

博落回乙醇提取物对 2 种病原菌的林间防治作用与对 2 种病原菌的室内离体叶片预防治疗作用表现出相似性。在浓度为 90 mg/mL 时,博落回乙醇提取物对油茶炭疽病菌和软腐病菌的林间防治效果均可达 60% 以上,与化学农药多菌灵的防治效果相近(表 5)。

参考文献:

[1]何 方,胡芳名. 经济林栽培学[M]. 北京:中国林业出版社, 2004:278-288.

[2]朱 彬,钟海雁,曹清明,等. 油茶活性成分研究进展与展望[J]. 经济林研究,2010,28(3):140-145.

[3]周国英,宋光桃,李 河. 油茶病虫害防治现状及应对措施[J]. 中南林业科技大学学报,2007,27(6):179-182.

[4]李石磊,刘君昂,赵 莹,等. 6 种杀菌剂对油茶主要病害的室内毒力测定[J]. 中南林业科技大学学报,2013,33(9):60-62.

[5]卢丽俐,周国英,李 河,等. 油茶炭疽病拮抗真菌的分离与筛选[J]. 经济林研究,2009,27(1):54-56.

[6]李永刚,文景芝,郝中娜. 植物源杀菌剂的研究现状与展望[J]. 东北农业大学学报,2002,33(2):198-202.

[7]冯俊涛,石勇强,张 兴. 56 种植物抑菌活性筛选试验[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2001,29(2):65-68.

[8]王 欣,周 乐,季春燕,等. 博落回中生物碱的超声提取和分离[J]. 西北农业学报,2005,14(5):118-120,124.

[9]Bussaman P, Namsena P, Rattanasena P, et al. Effect of crude leaf extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. [J]. Psyche, 2012;1-6.

[10]张 佳,王 莹,张 峰,等. 滤纸片法测定黄花蒿提取物对霉菌的抑制活性[J]. 湖北农业科学,2009,48(5):1153-1154.

[11]吴文君. 植物化学保护试验技术导论[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1988.

[12]孟昭礼,罗 兰,袁忠林,等. 人工模拟的植物源杀菌剂银泰防治番茄 3 种病害效果研究[J]. 中国农业科学,2002,35(7):863-866.

[13]NY/T 1156.9—2008 农药室内生物测定试验准则[S]. 2006:1-3.

[14]陈绍红,孙 思,王 军. 14 种杀菌剂对油茶炭疽病的防治研究[J]. 广东林业科技,2007,23(2):42-45.

[15]万学攀,赵宝玉,赵延涛,等. 博落回生物碱成分初步分析及其抑菌活性部位筛选[J]. 黑龙江畜牧兽医,2007(2):89-91.