

莫熙礼,赵同贵,邓伟,等. 植物提取物对桃褐腐病菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学,2015,43(6):124-126.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.040

植物提取物对桃褐腐病菌的抑制作用

莫熙礼, 赵同贵, 邓伟, 吴彤林, 杨云彩, 赵应婉, 李本华

(黔西南民族职业技术学院, 贵州兴义 562400)

摘要:采用生长速率法测定 8 种植物提取物对桃褐腐病菌菌丝体生长的抑制作用;采用倍比稀释法测定花椒、大蒜和薄荷提取物的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小杀菌浓度 (MFC), 并测定其在采后桃果实上对褐腐病的防治效果。结果表明,不同植物提取物对桃褐腐病的抑制作用存在一定的差异。在提取物浓度为 0.5 mg/mL 时,8 种植物提取物中花椒提取物对桃褐腐病菌丝生长的抑制效果最好,抑制率达 92.42%,其次是薄荷和大蒜。测得花椒、薄荷、大蒜提取物的 MIC 为 0.313、0.625、1.25 mg/mL, MFC 为 0.625、2.5、5.0 mg/mL;测得花椒、薄荷、大蒜提取物对采后桃褐腐病具有较好的防治效果,花椒提取物浓度为 2.5 mg/mL 时,能完全抑制桃褐腐病的发生。说明花椒、薄荷和大蒜体内的有效成分对桃褐腐病菌具有较强的抗菌作用。

关键词:植物提取物;抑制活性;桃褐腐病菌;最小抑菌浓度;最小杀菌浓度

中图分类号: S482.2⁺92 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0124-03

桃褐腐病原菌属于子囊菌亚门链核盘属,不仅能引起桃、李、杏、樱桃等核果类果实发生褐腐病,还能引起苹果、梨等仁果类果实腐烂^[1]。桃褐腐病是黔西南州桃树主要病害之一,对桃的生产造成很大的威胁。每年病果率可以达到 20% 以上,管理不好的果园病果率甚至可以达到 50% 以上。该病害已成为制约黔西南州桃果生产的重要因素。目前对褐腐病的防治主要是使用化学药剂^[2]。然而,长期大量使用化学药剂会引起病原菌抗药性的产生、毒性残留以及环境污染等种种弊端,严重危及到人类健康、生态平衡以及社会发展。因此,研究开发天然、安全、残留量低、对人畜和环境危害小的植物源杀菌剂进行植物病害的防治,受到人们的普遍关注,且具有很大的开发价值和应用前景^[3]。本研究通过离体试验,初步测试花椒等 8 种植物提取物对桃褐腐病的抑制作用,筛选出 3 种抑菌效果较好的植物提取物,检测其对桃果实褐腐病的防治效果,以期开发新的防治桃褐腐病的植物源农药提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种:于贵州省兴义市顶效开发区绿化桃基地桃褐腐病病果分离得到褐腐病菌,在 PDA 培养基上培养继代保存。28℃ 活化培养 7 d,用含有 0.05% Tween-80 的无菌水制成 1 万~10 万个/mL 孢子悬浮液备用。悬浮液孢子计数法采用血球计数板法。

供试植物:大蒜、花椒、鱼腥草、薄荷购于菜市场,麻黄、泽泻、马钱购于中药店,夹竹桃采集于兴义市顶效开发区。将阴干的植物材料放至恒温烘箱内加温至 50℃ 烘干,粉碎后过

40 目筛(0.35 mm)置于密封袋中,低温保存备用。桃采于兴义市顶效桃花谷果园,品种艳红。植物名称及供试部位见表 1。

表 1 植物名称及供试部位

植物	学名	供试部位
大蒜	<i>Allium sativum</i>	鳞茎
花椒	<i>Zanthoxylum bungeanum</i>	果实
鱼腥草	<i>Houttuynia cordata</i>	根
薄荷	<i>Mentha haplocalyx</i>	叶片
草麻黄	<i>Ephedra sinica</i>	根
泽泻	<i>Alisma plantago-aquatica</i>	块茎
马钱	<i>Strychnos muxuomica</i>	种子
夹竹桃	<i>Nerium oleander L.</i>	叶片

1.2 方法

1.2.1 植物提取液的制备 植物材料的提取采用 CEP 提取法^[4],称取样品干粉 20 g 放于三角瓶内,加入 200 mL 95% 乙醇,在室温下于摇床上振荡提取过滤,提取液经 50℃ 减压浓缩,真空干燥至恒质量,在密封、置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 植物提取物的抑菌活性的测定 采用生长速率法^[5]测定植物提取物对褐腐病菌生长的抑制作用。用浓度为 50% 的乙醇将上述植物提取物充分溶解,制成 5 mg/mL 母液。将母液加至于 PDA 培养基中,制成浓度为 0.5 mg/mL 的带药培养基,倒皿,待冷却后在培养皿中央移入菌饼(Φ=6 mm)。以加相应量的乙醇的 PDA 培养基为对照,每个处理重复 3 次。将培养皿置于 26℃ 恒温培养 72 h,测量记录菌落大小(用十字交叉法测量菌落直径),计算抑菌率:抑菌率=(CK 的净生长量-处理的生长量)/CK 的净生长量×100%。

1.2.3 植物提取物的最小抑菌浓度 (MIC) 和最小致死浓度 (MFC) 的测定 参考袁剑刚等的方法^[6],首先制备含提取物浓度为 20 mg/mL 的 PDA 培养液,采用连续稀释法制备含提取物浓度为 20.000、10.000、5.000、2.500、1.250、0.625、0.313、0.160 mg/mL 的系列培养液 200 μL。将 96 孔培养板

收稿日期:2014-06-27

基金项目:贵州省黔西南州科技局计划(编号:2010-14)。

作者简介:莫熙礼(1982—),男,广西梧州人,硕士,讲师,从事植物病虫害防治教学和科研工作。E-mail:moxili1982@163.com。

置于紫外灯下照射 30 min 灭菌,在孔中加入上述培养液 200 μ L,纯培养液设为 CK。然后每孔中加入 50 μ L 浓度为 1 万~10 万个/mL 的相应病原菌孢子悬浮液,放入 25 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养。48 h 后取出观察孔中病原菌菌丝生长情况,以完全无菌生长为最低药物浓度为 MIC。在 MIC 测定的基础上,继续培养 7 d,以完全无菌生长的最低药物浓度为 MFC^[7]。

1.2.4 植物提取物对桃褐腐病的防治效果 以花椒提取物对桃褐腐病菌的 MFC 为抑菌浓度下限,设 4 个浓度梯度:一级浓度(MFC \times 1)、二级浓度(MFC \times 2)、三级浓度(MFC \times 4)、四级浓度(MFC \times 8)。选择外观整齐、无损伤和无病虫害的桃果实,用 2% 氯酸钠溶液消毒 2 min 后,自来水冲洗晾干备用。用接种针在果实上打 3 mm(宽) \times 4 mm(深)的伤口,加入各浓度的处理液 20 μ L,稍干后(2 h),接种 1 万~10 万个/mL 病菌孢子悬浮液 15 μ L。伤口晾干后将果实放在塑料包装盒中,外套一塑料袋以保持湿度,置于室温下贮藏。以无菌水为对照。每隔 1 d 统计果实的发病率和病斑直径,每个处理 15 个果实,3 次重复。

2 结果与分析

2.1 不同植物提取物对桃褐腐病菌菌丝生长的抑制作用

采用生长速率法测定 8 种植物提取物对褐腐病菌生长的抑制作用,由表 2 可知,8 种植物提取物对褐腐病菌表现出不同程度的抑制作用,不同植物样品对桃褐腐病菌的抑制作用存在一定的差异,在植物提取液浓度为 0.5 mg/mL 的条件下,花椒、大蒜、薄荷的提取物对褐腐病菌的抑制效果较好,抑制率为 92.42%、83.21%、85.11%。选用花椒、大蒜、薄荷的提取物进行后续的研究。

表 2 植物提取物对桃褐腐病菌菌丝的抑制作用

植物	抑制率 (%)
大蒜	83.21bc
花椒	92.42a
鱼腥草	56.25cd
薄荷	85.11b
草麻黄	55.35bcd
泽泻	37.24cde
马钱	73.17bc
夹竹桃	55.82c

注:同列数据后标不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。

2.2 植物提取物对桃褐腐病菌的 MIC 和 MFC

从表 3 可以看出,随着植物提取物的浓度升高,其抑制作用越明显,花椒提取物中的褐腐病菌在培养 2 d 后,0.313 mg/mL 及以上浓度处理完全无菌生长,根据完全无菌生长的最低药物浓度为最小抑菌浓度标准,判定花椒提取物对褐腐病菌的 MIC 为 0.313 mg/mL;继续培养 7 d,0.625 mg/mL 及以上浓度处理的平皿上完全无菌生长,MFC 为 0.625 mg/mL。同样,大蒜提取物的 MIC 和 MFC 为 1.250、5.000 mg/mL;薄荷的 MIC 和 MFC 为 0.625、2.500 mg/mL。

2.3 植物提取物对桃褐腐病的防治效果

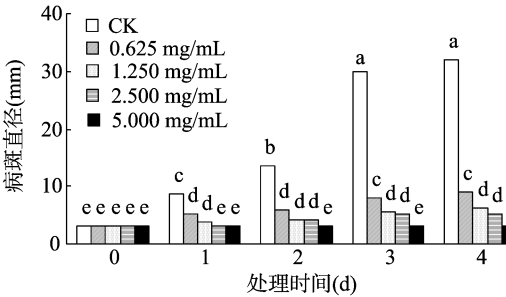
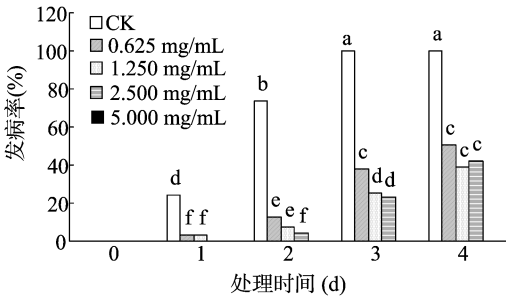
2.3.1 花椒提取物对桃褐腐病的防治效果 不同浓度的花椒提取物在常温下对桃褐腐病都有明显的抑制效果(图 1),抑制效果差异显著($P < 0.01$)。花椒提取物一、二级浓度处

表 3 植物提取物 MIC 和 MFC 的测定结果

浓度 (mg/mL)	花椒		大蒜		薄荷	
	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
20.000	-	-	-	-	-	-
10.000	-	-	-	-	-	-
5.000	-	-	-	-	-	-
2.500	-	-	-	+	-	-
1.250	-	-	-	+	-	+
0.625	-	-	+	+	-	+
0.313	-	+	+	+	+	+
0.160	+	+	+	+	+	+
CK	+	+	+	+	+	+

注:“+”表示有菌丝生长,“-”表示无菌丝生长。

理的果实和 CK 从处理后 1 d 起开始发病,但一、二级浓度处理的桃果实的发病率显著低于 CK。处理后 3 d,CK 的发病率为 100%,病斑直径达 30 mm,显著高于其他处理的果实。而花椒提取物的四级浓度在整个试验过程一直没有发病,说明花椒提取物四级浓度能明显抑制桃褐腐病的发生。



柱上不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$) ; 下图同

图 1 花椒提取物对桃褐腐病的防治效果

2.3.2 大蒜提取物对桃褐腐病的防治效果 用大蒜提取物的 4 个浓度处理果实,对褐腐病都有不同程度的抑制作用。一、二、三级浓度处理果实后,从处理后 1 d 就开始发病,一级浓度处理的发病率明显高于二、三级浓度处理,且病斑直径与二、三级浓度差异显著($P < 0.05$)。到处理后 4 d,这 3 个浓度的发病率差异不显著,但发病率和病斑直径与 CK 比较都差异显著($P < 0.05$)。四级浓度处理果实在处理后 3 d 开始发病,但病斑直径显著小于其他处理(图 2)。以上分析说明大蒜提取物在一定程度上能推迟果实发病和降低发病率,并且随着浓度的升高,抑制效果增强。

2.3.3 薄荷提取物对桃褐腐病的防治效果 从试验的整个培养过程来看(图 3),4 个浓度处理果实的发病率和病斑直径显著低于 CK($P < 0.05$)。四级浓度处理在整个培养过程一直没有发病,完全抑制了褐腐病菌对桃果实的侵染。果实

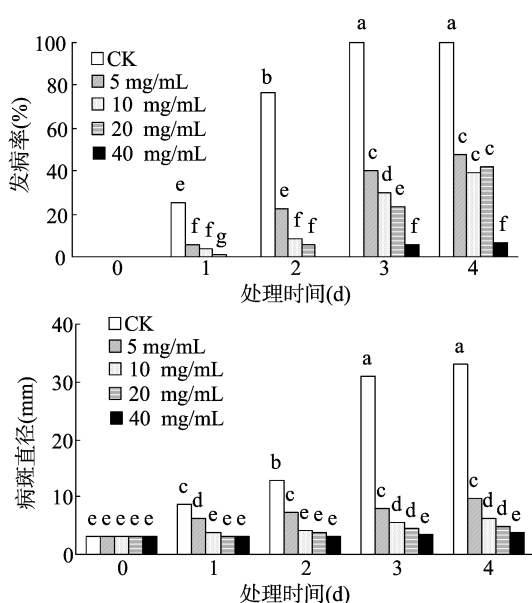


图2 大蒜提取物对桃褐腐病的防治效果

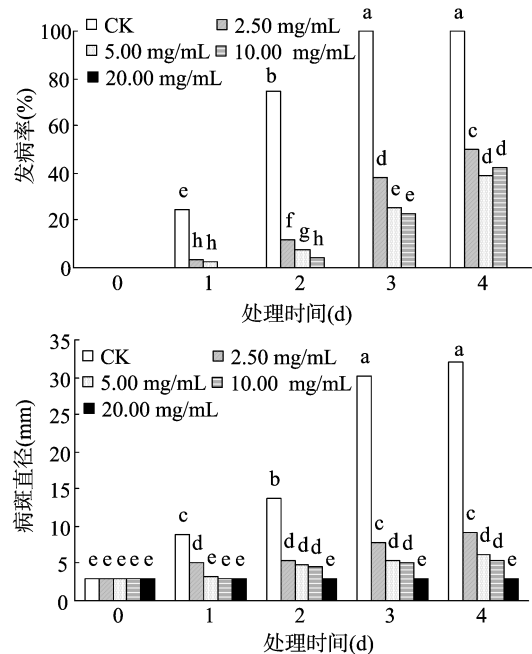


图3 薄荷提取物对桃褐腐病的防治效果

的发病情况随着处理浓度的升高,有减轻的趋势。

3 结论与讨论

在植物中寻找生物活性物质或者直接开发植物源农药是目前农药研究领域的热点之一。本试验采用菌丝生长速率法,对 8 种植物乙醇提取物对桃褐腐病菌的抑制活性进行测定。结果表明,在提取物浓度为 0.5 mg/mL 的条件下,花椒、大蒜、薄荷的提取物对褐腐病菌的抑制效果较好,抑制率

为 92.42%、83.21%、85.11%。可以推断花椒、大蒜和薄荷体内有强烈的抑菌有效成分,具有开发的潜力。

本研究采用倍比稀释法测定花椒、大蒜和薄荷等 3 种植物提取物的 MIC 和 MFC,结果表明花椒和薄荷提取物的 MIC 和 MFC 较低,表明花椒和薄荷提取物能在较低的浓度下抑制和杀死褐腐病菌,体现了强烈的抑菌活性。

周邦靖等研究结果表明,在离体抑菌试验中抑菌能力强的植物提取物在活体上的抑菌效果不一定好^[8]。本研究发现,在离体条件下抑菌效果较好的花椒、大蒜和薄荷等 3 种植物提取物在活体试验中显示了较好的防治效果,并随着浓度升高抑制作用增强。花椒提取物浓度为 2.5 mg/mL 时,在整个培养时间内完全抑制了采后桃褐腐病的发生,其他的处理浓度抑制或推迟了褐腐病菌对桃果实的侵染。这 3 种植物提取物的 MFC 在培养时间内没有完全抑制采后桃果实上褐腐病的发生,说明这些提取物的 MFC 不能完全杀死果实上的病原菌,只是起到抑制它们的生长,延迟果实发病,这与离体抑菌结果不一致。这可能有 2 个方面原因:其一,果实刺伤后接种病原菌,为其侵染果实和致病提供便利条件,同时也为病原菌提供了可供生长的营养环境;其二,植物提取物在低浓度(MFC)处理果实时,可能诱导果实产生对褐腐病菌的抗性,没有发挥其杀菌性,这与冉隆贤等的研究结果——低浓度水杨酸仅能提高桉树苗对青枯病菌的抗性但不能抵御病菌对树苗的侵害^[9]相符。

本研究表明,花椒提取物在低浓度下对桃褐腐病菌具有强烈的抑制作用,随着浓度升高,抑制作用增强,并在桃果实上具有较好的防治效果,其作用方式和作用机制均有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 吴小虎,艾启俊,闫彬. 中草药制剂对苹果褐腐病防治效果的影响[J]. 保鲜与加工,2006,6(5):35-37.
- [2] Luo C X, Schnabel G. Adaptation to fungicides in *Monilinia fructicola* isolates with different fungicide resistance phenotypes[J]. Phytopathology,2008,98(2):230-238.
- [3] 严振,莫小路,王玉生. 中草药农药研究与应用[J]. 中国中药杂志,2005,3(21):1714-1717.
- [4] 孙文基,张登科,党治德. 天然药物成分提取分离和制备[M]. 北京:中国医药科技出版社,1994:27-29.
- [5] 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,1988:57-63.
- [6] 袁剑刚,汤展球. 橄榄的抑菌效应及其药效成分的初步研究[J]. 食品科学,2001,22(3):82-84.
- [7] 王红星,张稚,郭燕群,等. 芳香型植物精油抑菌效果测定和比较[J]. 中国饲料,1996(6):32-34.
- [8] 周邦靖. 常用中药的抗菌作用及其测定方法[M]. 重庆:科学技术文献出版社重庆分社,1987:289.
- [9] 冉隆贤,谷文众,吴光金. 水杨酸诱导桉树抗青枯病的作用及相关酶活性变化[J]. 林业科学研究,2004,17(1):12-18.