

关丽杰,董瑞芳. 补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌的抑制活性[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):160-162.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.045

# 补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌的抑制活性

关丽杰,董瑞芳

(沈阳化工大学制药与生物工程学院,辽宁沈阳 110142)

**摘要:**采用菌丝生长速率法、孢子萌发法,研究了补骨脂提取物及0.2%异补骨脂查尔酮可溶液剂对黄瓜炭疽病菌的抑制活性的影响。结果发现,补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌菌丝生长、孢子萌发均有很强的抑制作用,其中对菌丝生长的抑制中浓度  $EC_{50}$  为 62.973 mg/L,孢子萌发的抑制中浓度  $EC_{50}$  为 8.213 mg/L。此外,0.2%异补骨脂查尔酮可溶液剂对黄瓜炭疽病有很强的防效,当施药浓度为 375 倍液时,防效即达到 90.90%。以上结果表明,0.2%异补骨脂查尔酮可溶液剂是一种很有市场前景的防治黄瓜炭疽病的植物源杀菌剂。

**关键词:**植物源杀菌剂;补骨脂提取物;黄瓜炭疽病菌;抑制率

**中图分类号:** S436.421.1<sup>+</sup>9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)01-0160-03

黄瓜炭疽病是黄瓜叶部的重要病害,在全国各地均有发生,是世界性的农业问题。当前,生产上对黄瓜炭疽病的防治主要还是依赖于化学农药,但是化学农药防治存在成本高、农药残留、环境污染、病原抗药性增强等问题,影响着人类的健康,且不符合可持续发展战略的要求<sup>[1-4]</sup>。陈义娟等发现茄子茎叶与辣椒茎叶提取液对黄瓜炭疽病菌具有一定的抑制效果<sup>[5]</sup>。田菲菲等发现甘草、枸杞、金钱草等 11 种植物的 80% 乙醇提取物对黄瓜炭疽病菌都有一定程度的抑制作用<sup>[6]</sup>。Lee 等从中药石菖蒲根茎的挥发油中分离出有效成分细辛脑,且发现 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  细辛脑对黄瓜炭疽病病变的形成

具有很强的抑制作用<sup>[7]</sup>。Shimizu 等发现内寄生的链霉菌属 MBCu-56 菌株对黄瓜炭疽病有很好的防治作用,10<sup>9</sup> CFU/mL 菌株的防治效果为 93%<sup>[8]</sup>。本研究发现补骨脂乙醇提取物对黄瓜炭疽病菌菌丝生长、分生孢子萌发具有抑制作用,并开展了 0.2% 异补骨脂查尔酮可溶液剂在室内进行黄瓜炭疽病的初步防治试验,旨在为其进一步进行田间推广及应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

1.1.1 供试菌种和植物材料 供试菌种:黄瓜炭疽病菌 (*Collettrichum anthracnose*),由沈阳化工大学生物工程教研室保存。

供试黄瓜品种:冠军密刺。

1.1.2 供试药剂 95% 乙醇(沈阳市新化试剂厂);琼脂(福

(2):525-533。

[4] 淮虎银,金银根,张彪,等. 外来植物空心莲子草分布的生境多样性及其特征[J]. 杂草科学,2003(1):21-23.

[5] Li J M, Liao J J, Guan M, et al. Salt tolerance of *Hibiscus hamabo* seedlings: a candidate halophyte for reclamation areas [J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2012, 34(5): 1747-1755.

[6] 李金花,李镇清. 不同放牧强度下冷蒿、星毛委陵菜的形态可塑性及生物量分配格局[J]. 植物生态学报,2002,26(4):435-440.

[7] 何维明. 水分因素对沙地柏实生苗水分和生长特征的影响[J]. 植物生态学报,2001,25(1):11-16.

[8] 许凯扬,叶万辉,李静,等. 入侵种喜旱莲子草对土壤水分的表型可塑性反应[J]. 华中师范大学学报:自然科学版,2005,39(1):100-103.

[9] 原立地,顾万荣,孙继,等. DCPTA 对低温胁迫下玉米幼苗叶片叶绿素含量及其荧光特性的影响[J]. 作物杂志,2012(5):63-67.

[10] 耿宇鹏. 入侵种喜旱莲子草在异质生境中的适应对策研究[D]. 上海:复旦大学,2006.

收稿日期:2014-12-03

基金项目:国家科学支撑计划(编号:2011BAE06B02);国家科技型中小企业技术创新基金(编号:13C26212100966)。

作者简介:关丽杰(1968—),女,辽宁沈阳,博士,副教授,主要从事生物农药研究。E-mail:weed0@163.com。

论与许凯扬等的研究结果<sup>[8]</sup>较为一致。为弥补这一变化,陆生生境的空心莲子草净光合速率显著提高,叶绿素含量增加,从而具有更强的光合作用能力,可以更好地捕获光能,创造更多的光合作用产物以保证植株的生长<sup>[9]</sup>。

近年来一些研究发现,从水生到陆生生境拓展过程中的空心莲子草比同属莲子草具有更大的表型可塑性<sup>[10]</sup>,空心莲子草从水生到陆生生境扩散中的生长与防御变化机制尚需进一步研究,这将为空心莲子草入侵机制的深入研究提供进一步理论参考。

## 参考文献:

- [1] 闫小玲,寿海洋,马金双. 中国外来入侵植物研究现状及存在的问题[J]. 植物分类与资源学报,2012,34(3):287-313.
- [2] 翁伯琦,林嵩,王义祥. 空心莲子草在我国的适应性及入侵机制[J]. 生态学报,2006,26(7):2373-2381.
- [3] Kleczewski N M, Herms D A, Bonello P. Nutrient water availability alter belowground patterns of biomass allocation carbon partitioning, and ectomycorrhizal abundance in *Betula nigra* [J]. *Trees*, 2012, 26

建省泉州市泉港化工厂);葡萄糖(国药集团化学试剂有限公司);0.2%异补骨脂查尔酮可溶液剂(补骨脂提取物质量浓度为10%,沈阳化工大学生物工程教研室制备);75%脲菌·戊唑醇水分散粒剂(有效成分含量75%,拜耳作物科学公司)。

1.1.3 主要仪器 LDZX-40BI 立式自动电热压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);PH140A 型光照培养箱/干燥箱(上海益恒实验仪器有限公司);HNP-1S 水平流形超净工作台(南通沪南科学仪器有限公司);SCOUT 电子天平 SCA210(斐豪斯国际贸易有限公司);METTLER AE240s 电子分析天平(特勒-托利多仪器有限公司);LRH-280 微电脑控制生化培养箱(广东省医疗器械厂);MOTIC BA220 型显微镜(上海精密仪器仪表有限公司)。

## 1.2 试验方法

1.2.1 补骨脂提取物的制备 提取溶剂为70%乙醇,固液比为1g:5mL,提取温度为室温,提取时间每次为3h,合并滤液次数为2次以上,将所得的乙醇提取液在60℃下用旋转蒸发仪进行蒸馏浓缩,然后再在真空干燥箱内进行干燥。将干燥后的植物提取物密封好后,放入4℃冰箱内保存备用。

1.2.2 补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌菌丝生长抑制作用测定 采用菌丝生长速率法。用乙醇将补骨脂膏完全溶解分别配成浓度为243、81、27、9、3 mg/mL的溶液。取上述配制的5个浓度的溶液各1 mL,分别加入到100 mL,在50℃左右的PDA培养基中。充分混匀后,即配制成所设浓度含药培养基,将1 mL的乙醇溶液加入到100 mL PDA培养基中作为对照,然后倒入直径为90 mm的培养皿中制成平板,备用。使用直径为6 mm的打孔器在事先在PDA平板上打孔,将在28℃下培养了3~5 d的供试病菌菌落边缘处切取菌饼,并且接种到不同浓度的补骨脂平板和对照平板中央,每次处理重复4次,置于28℃下培养5~7 d,测量菌落的直径。每种菌落取相交垂直线方向测其直径,以其均值减去菌饼直径即得菌落净生长直径。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照皿菌落直径} - \text{处理皿菌落直径}}{\text{对照皿菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%$$

1.2.3 补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌孢子萌发的抑制作用测定 将黄瓜炭疽病菌菌饼放置于菜豆培养基平板中央,置于28℃下培养7~10 d,待菌丝长满后,取长势良好的黄瓜炭疽病菌平板,加5 mL 1%的无菌葡萄糖水,用毛刷刷洗病原菌平板,8层纱布过滤,用1%的葡萄糖水溶液调至每个视野15~20个孢子,制备成孢子悬液。移取190 μL的孢子悬液至32微孔板,加入10 μL一定浓度的补骨脂乙醇溶液,使补

骨脂提取物的终浓度为3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 mg/L。加入等量的乙醇为对照,等量1%葡萄糖水为空白,每个处理重复3次。每隔2 h镜检孢子萌发的状态。当空白孢子萌发率达到90%时,每处理随机选取200个孢子,并以芽管长度超过孢子短径的1/2时视为萌发,统计孢子萌发率,并计算抑制率。

$$\text{孢子萌发抑制率} = \frac{\text{对照孢子萌发率} - \text{处理孢子萌发率}}{\text{对照孢子萌发率}} \times 100\%$$

1.2.4 室内盆栽试验 将芽势一致的黄瓜种子播种在花盆中,当植株长到2叶1心时,喷施不同稀释倍数的0.2%异补骨脂查尔酮可溶液剂,以75%脲菌·戊唑醇水分散粒剂为对照药剂,并设清水对照。24 h风干之后,将黄瓜炭疽病菌孢子悬液均匀喷洒于植株上。接种后的试材放置在迷雾气候箱中培养;温度28~30℃,相对湿度RH为100%,接种24 h内保证黑暗条件,24 h之后光照:黑暗=12 h:12 h处理;每处理10株黄瓜苗,重复3次;待对照充分发病后调查防病效果,调查分级标准采用《农药田间药效试验》标准。

黄瓜炭疽病分级标准:0级为叶片无病斑;1级为病斑面积占整个叶面积5%以下;3级为病斑面积占整个叶面积6%~10%;5级为病斑面积占整个叶面积11%~25%;7级为病斑面积占整个叶面积26%~50%;9级为病斑面积占整个叶面积50%以上。

按以下公式计算病情指数和相对防效:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum[\text{各级病株(叶、果)数} \times \text{相应代表及数}]}{\text{调查(叶、果)数总和} \times \text{发病最重极的代表值}} \times 100\%$$

$$\text{防效} = \frac{\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}}{\text{对照病情指数}} \times 100\%$$

1.2.5 数据处理 (1)独立回归方法:采用最小二乘法计算独立回归方程,计算有效抑制终浓度(EC<sub>50</sub>)。(2)显著性检验方法:采用Duncan's 新复极差法在0.05水平进行显著性检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌菌丝生长的影响

补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌菌丝生长的抑制率与提取物浓度呈现正相关,即随着提取物浓度的升高,抑制率也依次增高。当补骨脂提取物浓度为30、90、270、810、2430 mg/L时,对黄瓜炭疽病菌菌丝生长的抑制率分别为47.64%、48.51%、62.50%、83.12%、91.33%。其对黄瓜炭疽病原菌EC<sub>50</sub>值为62.973 mg/L,说明补骨脂提取物对黄瓜炭疽病原菌菌丝生长具有较高的抑制活性(表1)。

表1 补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌菌丝生长的影响

浓度(mg/L)	菌落平均直径(cm)	抑制率(%)	毒力回归方程	相关系数	EC <sub>50</sub> (mg/L)
CK	4.01 ± 0.16	0a			
30	2.38 ± 0.62	47.64b			
90	2.35 ± 0.55	48.51b			
270	1.87 ± 0.10	62.50c	$y = 3.5530 + 0.8043x$	0.9282	62.9730 ± 15.4614
810	1.16 ± 0.33	83.12d			
2430	0.93 ± 0.42	91.33e			

注:同列数据后小写字母不同者表示在0.05水平检验差异显著。下表同。

## 2.2 补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌孢子萌发的抑制活性

补骨脂提取物的浓度与黄瓜炭疽病菌孢子萌发的抑制率呈正相关,即随着补骨脂提取物浓度升高,抑制率也增大。当补骨脂提取物的浓度为 3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 mg/L 时,其抑制率分别为 16.35%、32.91%、

68.38%、97.74%、98.31%。由此可以得出补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌抑制作用的毒力回归方程与  $EC_{50}$ ,其对黄瓜炭疽病原菌  $EC_{50}$  值为 8.213 1 mg/L(表 2)。可见补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌的孢子具有很强的抑制作用,且随着药剂浓度的增加对孢子萌发的抑制作用明显增强。

表 2 不同浓度的补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌孢子萌发的影响

浓度 (mg/L)	萌发率 (%)	抑制率 (%)	毒力回归方程	$EC_{50}$ (mg/L)
3.125	76.00	16.35	$y = 2.4841 + 2.8736x$	8.2131 ± 0.5312
6.250	60.95	32.91		
12.500	28.72	68.38		
25.000	2.05	97.74		
50.000	1.54	98.31		

## 2.3 室内盆栽试验结果

室内盆栽试验发现,0.2% 异补骨脂查尔酮可溶液剂对黄瓜炭疽病有明显的防治效果,且防治效果与可溶液剂的稀释倍数呈现正相关,其中 3 000 倍液的防效为 59.08%,防效好于 75% 脲菌·戊唑醇水分散粒剂的效果(表 3)。结果表明,0.2% 异补骨脂查尔酮可溶液剂对黄瓜炭疽病有很显著的防效,且其药效要好于 75% 脲菌·戊唑醇水分散粒剂。室内盆栽试验为能够进行田间实验或是真正应用于实际生产中防治黄瓜炭疽病提供一定的数据支持与理论依据。

表 3 0.2% 异补骨脂查尔酮可溶液剂防治黄瓜炭疽病的防治效果

供试药剂	处理剂量 (稀释倍数)	病情指数 (%)	防治效果 (%)
清水	0	61.10	0a
0.2% 异补骨脂查尔酮可溶性液剂	3 000	25.00	59.08c
	1 500	22.20	63.67d
	750	7.40	87.89e
75% 脲菌·戊唑醇水分散粒剂	375	5.55	90.90e
	2 000	27.67	54.70b

## 3 讨论

本研究通过菌丝生长速率法及孢子萌发法测定了补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌的抑制作用,发现抑制中浓度  $EC_{50}$  分别为 62.973、8.213 mg/L,说明补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌有极强的抑制作用。最后通过盆栽试验,测定了 0.2% 异补骨脂查尔酮可溶液剂对黄瓜炭疽病的防治效果,结果表明 0.2% 异补骨脂查尔酮可溶液剂对黄瓜炭疽病具有很好的防效。

目前国内外对黄瓜炭疽病的防治,特别是植物源杀菌剂的研究较少,本研究首次发现补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌具有显著的抑制效果。以往的报道中,陈义娟等发现茄子茎叶和辣椒茎叶的乙醇提取液对黄瓜炭疽有显著的抑菌作用,当浓度为 20 g/L 时,其对黄瓜炭疽病菌菌丝的抑制率分别为 72.86%、72.57%, $EC_{50}$  依次为 6.962 7、8.254 g/L<sup>[5]</sup>。在本研

究中当补骨脂提取物浓度为 2.43 g/L 时,对黄瓜炭疽病菌菌丝的抑制率为 91.33%,其中  $EC_{50}$  为 62.973 mg/L。田菲菲等发现甘草的乙醇提取物的质量浓度为 10 g/L 时,对黄瓜炭疽病菌分生孢子萌发的抑制率达 99.6%<sup>[6]</sup>。在本研究中,补骨脂提取物的浓度为 50 mg/L 时,抑制率为 98.31%。可见,补骨脂提取物对黄瓜炭疽病菌菌丝生长、孢子萌发均有很强的抑制作用

本试验结果表明,补骨脂对黄瓜炭疽病菌具有很强的抑制作用,且补骨脂制剂作为植物源杀菌剂,它的作用靶标或对病原菌的作用一般都是多因子的,故不易使靶标菌产生抗药性。因此,补骨脂作为一种绿色环保的植物源农药对防治黄瓜炭疽病具有很好的应用前景。本研究为田间药效实验及补骨脂的推广利用提供了理论依据。

## 参考文献:

- [1] 詹儒林,李伟,郑服丛. 芒果炭疽病菌对多菌灵的抗药性[J]. 植物保护学报,2005,32(1):71-76.
- [2] 周明国,叶钟音. 植物病原菌对苯并咪唑类及相关杀菌剂的抗药性[J]. 植物保护,1987(2):31-33.
- [3] 刘井兰,于建飞,印建莉,等. 化学农药对植物生理生化影响的研究进展[J]. 农药,2006,45(8):511-514.
- [4] 谭亚军,李少南,孙利. 农药对水生态环境的影响[J]. 农药,2003,42(12):12-14,8.
- [5] 陈义娟,贾福丽,陈佳,等. 植物提取物对黄瓜炭疽病的抑制作用及其苗期防治效果[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2011,29(4):67-71.
- [6] 田菲菲,孙明清,蒋继志,等. 植物提取物对黄瓜炭疽病菌的抑制作用[J]. 中国农学通报,2006,22(12):327-330.
- [7] Lee J Y, Lee J Y, Yun B S, et al. Antifungal activity of beta-asarone from rhizomes of *Acorus gramineus* [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(4):776-780.
- [8] Shimizu M, Yazawa S, Ushijima Y. A promising strain of endophytic *Streptomyces* sp. for biological control of cucumber anthracnose [J]. Journal of General Plant Pathology, 2009, 75(1):27-36.