

马欣,霍蓉,乔俊卿,等. 黄柏提取物对番茄枯萎病的生物防治效果[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):178-180.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.049

黄柏提取物对番茄枯萎病的生物防治效果

马欣¹,霍蓉²,乔俊卿³,成少宁¹

(1. 运城职业技术学院有机食品工程系,山西运城 044000;

2. 南京农业大学植物保护学院/农作物生物灾害综合治理教育部重点实验室,江苏南京 210095;

3. 江苏省农业科学院植物保护研究所,江苏南京 210014)

摘要:通过测定菌丝干质量、菌丝生长速率、孢子萌发率等,研究黄柏的乙醇提取物对番茄枯萎病菌的室内抑菌作用,利用温室盆栽试验评估黄柏提取物对番茄枯萎病的防治效果。试验结果表明,黄柏提取物对番茄枯萎病菌的菌丝生长和孢子萌发均有显著抑制作用,且抑制率随提取物质量浓度的增大而升高,质量浓度为 32 000 mg/L 时对枯萎病菌菌丝生长的抑制作用达到 80% 以上,抑制中浓度(MIC)为 7 530 mg/L。质量浓度为 16 000 mg/L 的处理对孢子萌发的抑制率高达 100%。在盆栽试验中,质量浓度为 16 000 mg/L 的处理对番茄枯萎病的保护防治效果达 73.53%,显著高于常规化学药剂。试验表明,黄柏提取物对番茄枯萎病菌具有较好的防治效果。

关键词:黄柏;乙醇提取物;番茄枯萎病;抑菌作用;防治效果

中图分类号: S436.412.1⁺9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0178-03

番茄枯萎病是由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)引起的番茄生产中一种重要的土传病害^[1]。该病原菌经土壤传染,从根部侵入,传染性极强^[2],发病率一般为 20%~30%,受害较重的地区发病率高达 80% 以上,严重危害番茄的产量和品质^[3]。目前生产中主要采用多菌灵、咪唑胺、苯醚甲环唑等化学药剂防治番茄枯萎病^[4],长期大量使用化学农药将导致番茄枯萎病菌抗药性风险增加、有毒化学物质残留量增加、生态环境污染加重,严重威胁人类健康和生存。人们对绿色、有机食品的需求越来越大,开发低毒、低残留、无污染、与环境和谐的新型农药已迫在眉睫^[5]。植物中含有多种天然化学成分,已成为新型生物农药开发的重要材料资源。笔者曾用近 10 种中草药的乙醇提取物对番茄枯萎病菌进行抑菌活性的离体测定,研究结果表明,黄柏提取物对番茄枯萎病菌的抑菌活性最高^[6]。本研究利用黄柏的乙醇提取物对番茄枯萎病菌菌丝生长、孢子萌发的抑制作用,以及在番茄活体上的保护和治疗作用进行测定,以期对新型植物源杀菌剂的开发奠定基础。

收稿日期:2015-12-20

基金项目:国家自然科学基金(编号:31201556)。

作者简介:马欣(1985—),女,山东章丘人,硕士,助教,主要从事植物病害生物防治与生物农药研究。E-mail: mx3250235@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 黄柏 供试中药黄柏(*Phellodendron chinense* Schneid.)属芸香科,购自山西省运城市中药市场,使用枝皮部位。

1.1.2 供试菌种和培养基 番茄枯萎病原菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*)分离自发病番茄的根部,由马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基于 28℃ 下继代培养,置于 4℃ 冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 黄柏提取液的制备 采用超声波提取法制备黄柏提取液。将阴干的黄柏材料置于 45℃ 恒温电热鼓风干燥箱中吹干至发脆,采用植物粉碎机将材料粉碎,过 80 目筛后备用。称取样品干粉 100 g,用 70% 乙醇按 1 g:6 mL 的料液比浸泡,充分搅拌使溶剂完全浸没中草药材料,置于避光处静置 24 h;于 45℃、80 Hz 条件下超声辅助提取 30 min,减压抽滤得滤液,再次采用同样方法处理残渣,重复提取 3 次,合并 3 次滤液。采用旋转蒸发器于 40℃ 条件下将滤液减压浓缩至无溶剂蒸出(呈浸膏状),并用 50% 乙醇定容至 10⁶ mg/L,密封标记后置于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.2.2 黄柏提取物对番茄枯萎病原菌菌丝生长的抑制作

[45] Volkl W. Aphids or their parasitoids: Who actually benefits from ant-attendance[J]. *Journal of Animal Ecology*, 1992, 61: 273-281.

[46] Wimp G M, Whitham T G. Biodiversity Consequences of predation and host plant hybridization on an aphid-ant mutualism[J]. *Ecology*, 2001, 82: 440-45.

[47] Nielsen C, Agrawal A A, Hajek A E. Ants defend aphids against lethal disease[J]. *Biology Letters*, 2010, 6(2): 205-208.

[48] Yao I. Costs and constraints in aphid-ant mutualism[J]. *Ecological Research*, 2014, 29(3): 383-391.

[49] Fischer C, Lognag G, Haubruge E, et al. Implication of honeydew microflora in ant-aphid mutualism[C]. 17th PhD Symposium on Applied and Biological Sciences, 2012.

[50] Abdala-Roberts L, Agrawal A A, Mooney K A. Ant-aphid interactions on *Asclepias syriaca* are mediated by plant genotype and caterpillar damage[J]. *Oikos*, 2012, 121(11): 1905-1913.

用 采用菌丝干质量法测试黄柏提取物对番茄枯萎病病原菌菌丝生长的抑制作用。用 100 mL PD 培养液将黄柏提取物分别稀释至 32 000、16 000、8 000 mg/L, 在各质量浓度培养液中分别加入 3 片直径为 0.6 cm 的番茄枯萎病病原菌饼, 于 28 ℃ 下振荡培养 10 d。采用经充分干燥并称质量的滤纸过滤, 于 80 ℃ 下烘干至恒质量。以不添加任何药剂的 PD 培养液作为空白对照, 称量菌丝干质量并计算抑菌率, 每个处理重复 3 次^[7]。

抑菌率 = (对照菌丝干质量 - 处理菌丝干质量) / 对照菌丝干质量 × 100%。

1.2.3 黄柏提取物对番茄枯萎病病原菌菌丝抑制中浓度 (MIC) 的测定 将 1 g/mL 的黄柏提取液分别稀释成质量浓度为 16 000、8 000、4 000、2 000、1 000、500 mg/L 的带药培养基, 采用生长速率法进行抑菌活性的离体测定, 每个处理重复 3 次; 以混有 50% 乙醇的 PDA 培养基、纯 PDA 培养基作为对照。于 28 ℃ 恒温培养箱中培养后, 采用十字交叉法测量各处理的菌落直径, 计算不同质量浓度黄柏提取物对番茄枯萎病病原菌菌丝生长的抑制率, 并计算抑制率达到 50% 时黄柏提取物的质量浓度, 即抑制中浓度 (MIC)^[8]。

菌落直径 = 测量菌落直径平均值 - 0.6 cm;

抑菌率 = (对照菌落直径 - 处理菌落直径) / 对照菌落直径 × 100%。

1.2.4 黄柏提取物对番茄枯萎病病原菌孢子萌发的抑制作用试验 采用稀释平板计数法^[9]测定黄柏提取物对番茄枯萎病病原菌孢子萌发的抑制作用。制备 6×10^6 CFU/mL 的番茄枯萎病菌菌悬液, 并稀释至约 100 CFU/mL。吸取 20 μ L 菌悬液于含黄柏提取物质量浓度为 16 000、8 000、4 000、2 000、1 000、500 mg/L 的带药固体培养基平板中, 采用涂菌棒涂布均匀并静置 15 min, 将培养皿倒置以防止皿盖冷凝水下滴, 于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 96 h, 每个处理重复 3 次。培养完成后进行菌落计数, 涂布提取物平板菌落数记为 C, 对照组菌落数记为 C₀, 计算抑制率。

萌发率 = 孢子萌发数 / 检查孢子总数 = C / C₀ × 100%;

抑制率 = (对照萌发率 - 处理萌发率) / 对照萌发率 = (C₀ - C) / C₀ × 100%。

1.2.5 黄柏提取物对番茄枯萎病的保护和治疗效果 采用盆栽试验法测定黄柏提取物对番茄枯萎病的保护和治疗效果。将番茄种播于灭菌土壤中, 当番茄苗长出 6 片真叶时进行移苗。将秧苗移栽至装有 100 g 无菌土的盆钵中, 每盆 1 株。

进行黄柏提取物对番茄枯萎病的保护效果试验。分别取质量浓度为 16 000、8 000、4 000、2 000、1 000 mg/L 的黄柏提取物 20 mL, 灌根处理番茄苗, 24 h 后灌根接种 20 mL 番茄枯萎病菌孢子悬浮液 (5×10^6 CFU/mL)。

进行黄柏提取物对番茄枯萎病的治疗效果试验。每株番茄苗灌根接种 20 mL 番茄枯萎病菌孢子悬浮液 (5×10^6 CFU/mL), 24 h 后分别取质量浓度为 16 000、8 000、4 000、2 000、1 000 mg/L 的黄柏提取物 20 mL, 灌根处理番茄苗。以 50% 多菌灵处理作为化学药剂对照, 以清水处理作为空白对照。每个处理重复 3 次, 每个重复设 3 盆番茄, 常规管理, 于 30 d 后调查病情, 计算病情指数和防治效果。

病害分级标准如下。0 级: 无症状; 1 级: 1 或 2 片叶子明显变黄以致脱落; 2 级: 3 或 4 片真叶变黄, 叶片萎蔫下垂; 3 级: 5 或 6 片真叶变黄, 或真叶萎蔫下垂; 4 级: 全株严重萎蔫以致枯死^[10]。

病情指数 = Σ (各级病株数 × 代表级值) / (调查总株数 × 最高代表级值) × 100%;

防治效果 = (1 - 试验区病情指数 / 对照区病情指数) × 100%。

2 结果与分析

2.1 黄柏提取物对菌丝生长的抑制作用

在含有不同质量浓度黄柏提取物的培养液中生长的番茄枯萎病菌菌丝, 其质量受到不同程度的抑制。试验结果 (表 1) 表明, 经黄柏提取物处理的菌丝, 其平均干质量在 0.05 水平与对照存在显著差异, 且黄柏提取物各质量浓度处理间也存在显著差异。其中, 质量浓度为 32 000 mg/L 的黄柏提取物处理对番茄枯萎病菌菌丝生长的抑制作用最强, 抑制率高达 80.42%; 质量浓度为 8 000 mg/L 的处理对番茄枯萎病菌菌丝生长的抑制率不到 50%。可见, 黄柏提取物对番茄枯萎病菌菌丝的抑菌作用与提取物质量浓度呈正相关, 抑菌效果随着质量浓度的降低而减弱。

表 1 黄柏提取物对番茄枯萎病菌菌丝生长的抑制作用

植物提取物质量浓度 (mg/L)	平均菌丝干质量 (g)	抑制率 (%)
对照	1.890 0 ± 0.020 00a	-
8 000	0.950 0 ± 0.026 46b	49.74
16 000	0.760 0 ± 0.040 00c	59.79
32 000	0.370 0 ± 0.036 06d	80.42

注: 表中数据为 3 次重复的平均值, 同列数据后不同小写字母表示在 5% 水平下差异显著。下表同。

2.2 黄柏提取物对菌丝的抑制中浓度 (MIC)

分别以黄柏提取物的质量浓度、对番茄枯萎病菌菌丝生长的抑制率为坐标轴, 得到抑制率变化趋势曲线, 其相关拟合方程为 $y = 0.049 3x + 0.128 9$ 。根据此方程计算抑制率达到 50% 时黄柏提取物的质量浓度, 即抑制中浓度 (MIC) 为 7 530 mg/L (图 1)。

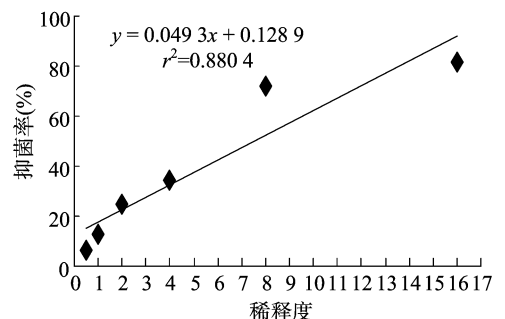


图 1 黄柏提取物对番茄枯萎病菌的抑制中浓度

2.3 黄柏提取物对孢子萌发的抑制作用

黄柏提取物对番茄枯萎病菌孢子萌发的抑制作用见表 2, 不同质量浓度的黄柏提取物对番茄枯萎病菌孢子的萌发均有一定抑制作用。质量浓度为 16 000 mg/L 时抑制作用最显著, 抑制率达到 100%, 完全抑制了番茄枯萎病菌孢子的萌发; 质

量浓度为 1 000 mg/L 时抑制作用不显著,抑制率仅为 14.29%,抑制作用随着质量浓度的降低而减弱。

表 2 黄柏提取物对番茄枯萎病菌孢子萌发的抑制作用

处理	质量浓度 (mg/L)	平均抑制率 (%)
黄柏提取物	16 000	100.00a
	8 000	85.71ab
	4 000	64.28b
	2 000	35.71c
	1 000	14.29c
50% 乙醇(对照)		—

表 3 不同质量浓度的黄柏提取物对番茄枯萎病的保护及治疗作用

处理	保护作用		治疗作用	
	病情指数	防治效果 (%)	病情指数	防治效果 (%)
16 000 mg/L	25.00	73.53 ± 0.09a	33.33	64.71 ± 0.09a
8 000 mg/L	41.67	55.88 ± 0.09b	47.22	50.00 ± 0.05b
4 000 mg/L	61.11	35.29 ± 0.13c	66.67	29.41 ± 0.09c
2 000 mg/L	66.67	29.41 ± 0.09c	75.00	20.59 ± 0.03c
1 000 mg/L	88.89	5.88 ± 0.05d	91.67	2.94 ± 0.05d
50% 多菌灵	50.00	47.06 ± 0.09bc	50.00	47.06 ± 0.09b
对照	94.44	—	94.44	—

3 结论与讨论

生物农药具有选择性强、不易使害虫和病菌产生抗药性、对环境友好、对人畜安全、不杀伤天敌、易分解的优点,新型生物农药的研究与开发已成为农药发展的重要方向,具有巨大发展潜力。近年来,对番茄枯萎病生物防治的研究集中于生防菌,已报道的有木霉菌、非致病尖孢镰刀菌、假单胞菌、芽孢杆菌、链霉菌等^[1,11],而关于抑菌植物的应用和研究极少。目前已报道的对番茄枯萎病具有显著抑制作用的植物主要有月腺大戟、大蒜。月腺大戟根总黄酮纯化物对番茄枯萎病菌具有显著抑制作用,且抑制率随总黄酮浓度的升高而增加^[11]。谢成俊研究表明,大蒜素挥发油 2 000 倍液对番茄枯萎病菌的防治效果为 99.12%,抑制作用显著^[12]。月腺大戟、大蒜的抑菌稳定性及其在番茄生产中的应用有待进一步研究。

中国拥有丰富的药用植物资源,是开发植物源农药的理想来源^[13]。黄柏是芸香科植物黄皮树(*Phellodendron chinense* Schneid.)的干燥树皮,具有抗菌、抗滴虫、治疗肝炎、抗溃疡、抗氧化、抗癌等多种药理活性,已被广泛应用于医药领域^[14],然而几乎没有关于抑制植物病原菌的研究。本研究结果表明,黄柏提取物对番茄枯萎病菌菌丝生长和孢子萌发均有显著的抑制作用,且抑制率随提取物质量浓度的升高而增加,抑制中浓度(MIC)为 7 530 mg/L。质量浓度为 16 000 mg/L 时的抑制作用最显著,对孢子萌发的抑制率达到 100%;在盆栽试验中表现出较强的保护防治作用,防治效果达 73.53%,显著高于常规化学药剂。以黄柏为材料开发防治番茄枯萎病的植物源杀菌剂,具有较好的开发潜力和应用前景。本试验在黄柏提取物对番茄枯萎病菌的防治作用方面取得了一定进展,而黄柏提取物的抑菌有效成分、作用机制、抑菌稳定性等

2.4 黄柏提取物对番茄枯萎病的防效试验

由表 3 可知,对照处理中番茄枯萎病的病情指数为 94.44,表明盆栽试验中对照处理的发病程度较严重。在保护作用的测定中,不同质量浓度黄柏提取物的防治效果存在一定差异。黄柏提取物对番茄具有一定保护作用,能够抑制番茄枯萎病菌的侵染,防治效果随黄柏提取物质量浓度的增大而提高,16 000 mg/L 时防治效果达 73.53%,显著高于常规化学药剂多菌灵。在治疗作用的测定中,不同质量浓度黄柏提取物的防治效果存在一定差异,且防治效果随质量浓度的增大呈上升趋势;在相同质量浓度处理下,治疗防治效果均低于保护防治效果。可见,质量浓度为 16 000 mg/L 的黄柏提取物处理表现出较强的保护防治效果。

有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘邮洲,陈志滔,梁雪杰,等. 番茄枯萎病和青枯病拮抗细菌的筛选、评价与鉴定[J]. 中国生物防治学报,2012,28(1):101-108.
- [2] 田雪莲,尹显慧,李荣玉,等. 几种杀菌剂对番茄枯萎病的毒力及田间防效[J]. 农药,2015,54(2):143-145,149.
- [3] 刘邮洲. 番茄枯萎病和梨轮纹病生防菌控病机制研究及几丁质酶基因的克隆与表达[D]. 南京:南京农业大学,2011:39-40.
- [4] 范怀峰. 山东番茄土传病害调查与化学防治技术研究[D]. 泰安:山东农业大学,2014:5-6.
- [5] 李少华. 细辛对番茄早疫病菌的抑制作用及其活性成分的分离[J]. 中国农业大学学报,2011,16(3):67-71.
- [6] 马欣,乔俊卿. 中草药提取物对蔬菜土病原真菌的抑制作用[J]. 安徽农业科学,2015,43(6):113-115.
- [7] 王树桐,曹克强,张凤巧,等. 中药丁香提取物对番茄灰霉病菌抑制作用及生防效果[J]. 植物病理学报,2005,35(S1):91-94.
- [8] 王树桐. 对番茄灰霉病菌等具抗菌活性的植物提取物研究[D]. 保定:河北农业大学,2001:13-14.
- [9] 孙辉,赵成爱,周正辉. 落地生根叶乙醇提取物的抑真菌作用[J]. 农药,2010,49(12):915-916,926.
- [10] 孙红霞. 甘草根提取物对番茄枯萎病菌生物活性及抑菌机理的研究[D]. 晋中:山西农业大学,2014:31-32.
- [11] 高椽. 月腺大戟根总黄酮对番茄枯萎病诱导抗性的研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2008:22-24.
- [12] 谢成俊. 大蒜素、石香薷挥发油防治番茄病害试验研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2005:19-20.
- [13] 于九伶,卜春亚,王有年,等. 13 种药用植物粗提物抑菌活性的初步研究[J]. 北京农学院学报,2011,26(2):10-13.
- [14] 张冠英,董瑞娟,廉莲. 川黄柏、关黄柏的化学成分及药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(10):812-821.