

曾令达,黄仲景,廖建良,等. 花椒油主要活性物质对荔枝霜疫霉的抑菌活性[J]. 江苏农业科学,2018,46(21):103-105.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.21.025

# 花椒油主要活性物质对荔枝霜疫霉的抑菌活性

曾令达,黄仲景,廖建良,尹 艳,宋冠华,郑 倩

(惠州学院生命科学院,广东惠州 516007)

**摘要:**为寻找新型植物源抑菌物用于荔枝霜疫霉菌(*Phytophthora litchi* Chen.)的防治,以花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)油中主要活性物质柠檬烯、桉树脑、月桂烯等为试验材料,采用菌丝生长速率法测定其对荔枝霜疫霉菌的抑制活性,并将柠檬烯与苦参碱复配,测定复配物的抑菌效果。结果表明,当柠檬烯、桉树脑的浓度分别为 32.0、40.0 mg/L 时,抑菌率均为 100.0%,当月桂烯的浓度为 400.0 mg/L 时,抑菌率为 88.2%,柠檬烯、桉树脑、月桂烯等 3 种活性物质的抑菌中浓度分别为 7.2、6.5、97.2 mg/L;当柠檬烯和苦参碱复配时增效比为 1.8,抑菌效果具有增效作用。花椒油中 3 种主要活性物质均对荔枝霜疫霉菌具有抑制作用,从抑菌中浓度来看,桉树脑的抑菌能力最佳,其次为柠檬烯,月桂烯最弱。柠檬烯与苦参碱复配后抑菌效果更佳。

**关键词:**新型植物源抑菌物;荔枝霜疫霉;花椒油;抑菌活性;抑菌中浓度;苦参碱;桉树脑;柠檬烯;月桂烯

**中图分类号:**S436.67

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2018)21-0103-03

荔枝霜疫霉病是荔枝生产和果实贮藏中最主要的一种病害,会给产量和果品贮藏带来极大的损失<sup>[1-2]</sup>,其病原为荔枝霜疫霉<sup>[3]</sup>。南方夏季荔枝果实发育期及采收期正值高温多雨季节,荔枝果实极易受荔枝霜疫霉的侵染,造成果实腐烂变质。荔枝霜疫霉病在果园管理中仍以安克锰锌、瑞毒霉锰锌等化学药剂防治为主<sup>[4-5]</sup>,在荔枝生产中使用化学药剂容易造成荔枝霜疫霉抗药性提高,频繁用药又易造成环境污染和农药残留,存在安全隐患。因此,研究和开发植物活性物质防治荔枝霜疫霉病对环境和果品安全,对促进荔枝产业发展具有重要意义。目前,已研究发现一些植物的提取物对荔枝霜疫霉具有较强的抑制活性<sup>[6]</sup>。宋冠华等发现,白鲜、虎杖、蛇床等植物的乙醇提取物对荔枝霜疫霉有较强的抑制效果<sup>[7]</sup>。吴光旭等发现,开口箭中的 1 $\beta$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,5 $\beta$ ,7 $\alpha$ -六羟基螺甾-25(27)-烯-6-酮和螺甾-25(27)-烯-1 $\beta$ ,2 $\beta$ ,3 $\beta$ ,4 $\beta$ ,5 $\beta$ ,6 $\beta$ ,7 $\alpha$ -七醇具有抗荔枝霜疫霉菌活性<sup>[8]</sup>。胡珊等研

究发现,丁香酚、香芹酚、柠檬醛、肉桂醛等均对荔枝霜疫霉有抑制作用<sup>[9]</sup>。曾令达等发现,苦参提取物对荔枝霜疫霉具有较强的抑制作用<sup>[10]</sup>,但目前关于花椒(*Zanthoxylum bungeanum* Maxim.)油中的柠檬烯、桉树脑、月桂烯等 3 种主要活性物质对荔枝霜疫霉的抑菌效果和差异的研究未见报道。因此,本试验在离体培养条件下,运用菌丝生长法测定 3 种物质的抑菌活性,进一步探索植物提取物具有抑菌活性的原因,同时研究不同抑菌活性物质的抑菌能力差异,以及活性物质复配对荔枝霜疫霉的抑制作用,以期探寻新型的植物源抑菌活性物质用于荔枝霜疫霉病的防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和试剂

供试菌种为荔枝霜疫霉菌(*Peronophythora litchi* Chen.),由惠州学院生命科学院植物学实验室提供。供试柠檬烯(纯度 $\geq 97\%$ )、桉树脑(纯度 $\geq 99\%$ )、月桂烯(纯度 $\geq 90\%$ )、苦参碱(纯度 $\geq 98\%$ )等,均购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。吐温-80(分析纯),购自天津市大茂化学试剂厂。

### 1.2 抑菌活性测定

1.2.1 单一活性物质的抑菌活性测定 在培养皿中倒入经高温高压灭菌的马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar,简称 PDA)培养基[200 g 马铃薯,20 g 葡萄糖,15~20 g 琼脂,

收稿日期:2017-07-15

基金项目:广东省科技计划项目(编号:2013B020304010、2017A020213031);广东省惠州市科技计划项目(编号:2009B010001024、2016X0427042)。

作者简介:曾令达(1974—),男,广东河源人,博士研究生,副教授,主要从事植物生理生态和生物技术研究。E-mail:hzlingda@139.com。

[14]谭景艾,李保同,潘晓华,等. 江西省晚粳品种对稻曲病的抗性评价及稻曲病药剂防治技术研究[J]. 农学学报,2016,6(5):11-17.

[15]阮宏椿,杨秀娟,石姐姐,等. 不同杀菌剂对水稻稻曲病菌的室内毒力及田间药效[J]. 福建农业学报,2013,28(6):580-583.

[16]张 震,柴荣耀,陈桂华,等. 几种药剂防治水稻稻曲病效果试验[J]. 浙江农业科学,2010(6):1328-1329.

[17]宋益民,从国林. 稻曲病、水稻穗颈瘟防治药剂筛选及其协同防治技术[J]. 江苏农业学报,2016,32(6):1268-1272.

[18]王大为,董 海,杨 皓,等. 几种杀菌剂防治稻曲病药效试验

初报[J]. 辽宁农业科学,2003(5):47-48.

[19]张君成,张炳欣,陈志谊,等. 稻曲病的接种方法及其效果初探[J]. 中国水稻科学,2003,17(4):390-392.

[20]赖晓春. 稻曲病病从率、病穗率、穗病粒数之间的关系测定[J]. 植物保护,1989,15(3):37.

[21]李友荣,唐善军,高杜娟,等. 籼型杂交晚稻新组合穗部性状与稻曲病抗性相关性研究[J]. 中国农学通报,2011,27(21):234-238.

[22]唐善军,高杜娟,陈友德,等. 水稻稻曲病不同病情指标间关系研究[J]. 植物保护,2014,40(1):154-156,168.

1 000 mL 自来水,pH 值自然],制成平板后接种荔枝霜疫霉菌。于 28 ℃培养 7 d 后荔枝霜疫霉菌菌种培养完成,用无菌打孔器沿着菌种菌落边缘打取直径为 4 mm 的菌饼。将柠檬烯和桉树脑纯品预先稀释成浓度为 0.20 mg/mL 的母液(加入适量的吐温-80 作为分散剂),将月桂烯纯品制成浓度为 25.00 mg/mL 的母液,经细菌过滤器过滤膜过滤后摄取适量的母液与已灭菌尚未凝固的 PDA 培养基混合,得到一定浓度含活性物质的培养基。培养基凝固后,用已灭菌的镊子将菌饼移接到含药培养基中央,将培养皿倒置,在 28 ℃条件下进行恒温培养,7 d 后用十字交叉法测量并记录菌落直径,同时以只添加吐温-80 的培养基作为空白对照,每个处理重复 5 次。

抑菌率计算公式:抑菌率=(对照菌落净生长量-处理菌落净生长量)/对照菌落净生长量×100%。按抑菌率大小查生物统计概率值换算表,将抑菌率换算成相应的概率值,质量浓度用其对数值表示,以各抑菌剂浓度的对数值( $X$ )和抑菌率的概率值( $Y$ )求毒力回归方程  $Y=a+bX$ ,并计算抑菌中浓度( $EC_{50}$ )。

1.2.2 活性物质复配物的抑菌活性测定及其增效比的计算  
将柠檬烯和苦参碱预先稀释成浓度为 0.1 mg/mL 的母液(加入适量吐温-80 作为分散剂),摄取适量苦参碱、柠檬烯母液按 1:1(体积比)配制一定浓度的含活性物质的培养基。接种培养、菌落测定及  $EC_{50}$  的计算同“1.2.1”节。

参照农药组合物协同增效作用判断方法<sup>[11]</sup>计算增效比。活性物质复配物的理论  $EC_{50}$  计算公式为复配物理论  $EC_{50}=(a+b)/[(a/A \text{ 的 } EC_{50})+(b/B \text{ 的 } EC_{50})]$ ,式中,A、B 分别代表不同植物提取物,a、b 分别为 2 种提取物在混剂中含量的占比。以增效比(synergic ratio,简称 SR)判定不同混合组配的抑菌物质的抑菌作用是否具有增效作用,SR<0.5 为拮抗作用,0.5≤SR≤1.5 为相加作用,SR>1.5 为增效作用。SR 计算公式为  $SR=EC_{50} \text{ 理论值}/EC_{50} \text{ 实测值}$ 。

1.3 统计分析

试验数据采用 Excel 2007、SPSS 19.0 进行统计的分析。

2 结果与分析

2.1 柠檬烯对荔枝霜疫霉菌的抑制活性

由表 1 可知,柠檬烯对荔枝霜疫霉菌的抑制率随着柠檬烯浓度的增加而变大。当柠檬烯浓度为 2.0 mg/L 时,抑菌率为 11.5%,当柠檬烯浓度为 16.0 mg/L 时,抑菌率为 89.8%,当柠檬烯浓度达到 32.0 mg/L 时,抑菌率达到 100.0%,说明此时柠檬烯对荔枝霜疫霉菌菌丝生长具有完全的抑制作用。根据抑菌率和柠檬烯的浓度计算出柠檬烯的毒力方程为  $Y=3.6808X+2.3851,r^2=0.911$ ,从毒力方程得出柠檬烯对荔枝霜疫霉菌的  $EC_{50}$  为 7.2 mg/L。

2.2 桉树脑对荔枝霜疫霉菌的抑制活性

由表 2 可知,当桉树脑浓度为 2.5 mg/L 时,抑菌率为 20.5%,而当桉树脑浓度为 20.0 mg/L 时,抑菌率达到了 86.7%,当桉树脑浓度为 40.0 mg/L 时,抑菌率为 100.0%。随着桉树脑浓度的增加,对荔枝霜疫霉菌的抑制作用随之增大,当桉树脑浓度为 40.0 mg/L 时,对荔枝霜疫霉菌的生长具有完全的抑制用。根据抑菌率和桉树脑的浓度计算出桉树脑

表 1 不同浓度柠檬烯对荔枝霜疫霉菌的抑制效果

柠檬烯浓度 (mg/L)	菌落半径 (mm)	抑菌率 (%)
0.0	24.2±0.2	0.0
2.0	22.6±0.8	11.5
4.0	20.9±0.6	24.7
8.0	15.6±1.8	58.1
16.0	7.9±0.8	89.8
32.0	0.0±0.0	100.0

表 2 不同浓度桉树脑对荔枝霜疫霉菌的抑制效果

桉树脑浓度 (mg/L)	菌落半径 (mm)	抑菌率 (%)
0.0	24.3±0.1	0.0
2.5	21.4±1.5	20.5
5.0	19.8±1.8	31.8
10.0	16.5±0.8	52.3
20.0	8.7±0.6	86.7
40.0	0.0±0.0	100.0

的毒力方程为  $Y=3.5308X+2.1181,r^2=0.993$ ,从毒力方程得出桉树脑对荔枝霜疫霉菌的  $EC_{50}$  为 6.5 mg/L。

2.3 月桂烯对荔枝霜疫霉菌的抑制活性

由表 3 可知,当月桂烯的浓度为 25.0 mg/L 时,对荔枝霜疫霉的抑菌率为 17.3%,当月桂烯的浓度为 50.0 mg/L 时,抑菌率为 25.5%,说明月桂烯对荔枝霜疫霉菌有抑菌活性,但月桂烯的浓度增加了 1 倍,抑菌率才增加 8.2%,说明月桂烯的抑菌效果较低。在月桂烯的处理浓度较大时,抑菌率有所增加,当月桂烯的浓度为 200.0 mg/L 时,抑菌率为 74.3%,而当月桂烯的浓度为 400.0 mg/L 时,抑菌率仅为 88.2%。从月桂烯的不同处理来看,月桂烯对荔枝霜疫霉菌的抑菌率随着处理浓度的增加而加大,说明月桂烯对荔枝霜疫霉菌具有抑菌活性,但在较高处理浓度时,抑菌率未达 100%。根据抑菌率和月桂烯的浓度可以计算出月桂烯的毒力方程为  $Y=1.7276X+1.5661,r^2=0.976$ ,从毒力方程得出月桂烯对荔枝霜疫霉菌的  $EC_{50}$  为 97.2 mg/L。

表 3 不同浓度月桂烯对荔枝霜疫霉菌的抑制效果

月桂烯浓度 (mg/L)	菌落半径 (mm)	抑菌率 (%)
0.0	24.3±0.1	0.0
25.0	21.8±2.3	17.3
50.0	20.6±1.1	25.5
100.0	17.7±1.3	45.3
200.0	12.1±0.5	74.3
400.0	8.20±1.2	88.2

2.4 苦参碱+柠檬烯复配剂对荔枝霜疫霉菌的抑制活性

由表 4 可知,当复配物浓度为 2.0 mg/L 时,抑菌率为 8.7%,当复配剂的浓度提高时,抑菌率增加,当复配物浓度为 32.0 mg/L 时,抑菌率达到 95.7%。将复配剂的浓度和抑菌率进行回归分析,得到复配剂的毒力回归方程为  $Y=2.5976X+2.5401,r^2=0.953$ , $EC_{50}$  实测值为 8.9 mg/L。通过计算复配剂的  $EC_{50}$  理论值为 16.4 mg/L,增效比为 1.8,苦参碱与柠檬烯的复配作用表现为增效作用。

表 4 苦参碱 + 柠檬烯复配剂对荔枝霜疫霉菌的抑制效果

复配剂浓度 (mg/L)	菌落半径 (mm)	抑菌率 (%)
0.0	24.1 ± 0.1	0.0
2.0	23.0 ± 0.4	8.7
4.0	20.1 ± 0.6	15.7
8.0	19.9 ± 0.6	31.8
16.0	12.8 ± 0.5	72.2
32.0	5.3 ± 0.0	95.7

注:苦参碱对荔枝霜疫霉菌的  $EC_{50}$  为 105.0 mg/L,数据暂未发表。

### 3 讨论与结论

花椒是一种重要的食用调味品、中药材、香料及木本油料树种,属芸香科(Rutaceae)花椒属(*Zanthoxylum*)<sup>[12]</sup>。张怀予等分析发现,花椒油中成分共有 73 种化学物质,以萜烯、醇、酯类物质为主,柠檬烯、桉树脑、月桂烯的含量分别为 20.204%、5.049%、4.937%,这 3 种物质为花椒油的主要成分<sup>[13]</sup>。袁娟丽等发现,花椒挥发油主要化合物成份鉴定出的物质中有 5 种物质的相对含量超过 60%,其中桉树脑占 15.64%、D-柠檬油精占 13.72%、 $\beta$ -月桂烯占 10.20%<sup>[14]</sup>。不同产地的花椒油成分不太一样,花椒果皮挥发油相对含量在 3% 以上,成分各有不同,但主要以单萜类物质为主,但共有的成分有柠檬烯、月桂烯、桉树脑等<sup>[15]</sup>。花椒油对真菌有抑制作用,是天然的抑菌植物源物质<sup>[16]</sup>。唐裕芳等发现,花椒油含有的桉树油、其酯类、 $\beta$ -月桂烯、柠檬烯等成分有协同作用,具有一定的抑菌能力<sup>[17]</sup>。花椒油乙醇提取物对荔枝霜疫霉菌具有较好的抑制作用<sup>[10]</sup>。高红亮等发现,柠檬烯在橙汁保鲜中具有较好的保鲜效果<sup>[18]</sup>。柠檬烯是安全无毒、应用广泛的防腐剂,且具有广谱的抗菌性<sup>[19]</sup>。孟雪等发现,桉树脑对 5 种真菌具有一定的抑制作用<sup>[20]</sup>。郭阿君发现,月桂烯对枯草芽孢杆菌有抑制作用<sup>[21]</sup>。本试验中柠檬烯、桉树脑、月桂烯等 3 种物质对荔枝霜疫霉菌均表现出抑制作用,3 种活性物质中桉树脑对荔枝霜疫霉菌的  $EC_{50}$  最低,为 6.5 mg/L,其次为柠檬烯,为 7.2 mg/L,月桂烯的最高,为 97.2 mg/L。

苦参碱属于四环喹啉啉类化合物,是苦参、苦豆子、广豆根等豆科中草药的活性物质,分子式为  $C_{15}H_{24}N_2O$ ,相对分子质量为 266<sup>[22-24]</sup>。苦参碱对多种真菌具有抑菌活性<sup>[25-26]</sup>。曾令达等用乙醇提取花椒和苦参的抑菌活性物质,发现苦参和花椒的粗提物按 1:1(体积比)复配对抑制荔枝霜疫霉菌具有增效作用<sup>[27]</sup>。本试验中以花椒中的活性物质柠檬烯与苦参碱按 1:1(体积比)进行复配,在对荔枝霜疫霉菌的抑制试验中增效比为 1.8,两者复配具有增效作用。因此,从本试验的结果来看,可以从花椒中提取活性物质用于荔枝霜疫霉菌的防治,为增加抑菌效果,可以选择与其他植物的活性物质进行复配。

### 参考文献:

[1]姜子德,习平根,洗继东,等. 对未来五年我国荔枝植保研究的思考[J]. 中国热带农业,2011,42(5):61-63.

- [2]戚佩坤. 果蔬贮藏病害[M]. 北京:中国农业出版社,1994:35-36.
- [3]陶挺燕,何凡,范鸿雁,等. 荔枝霜疫霉病原菌生物学特性研究[J]. 中国南方果树,2010,39(3):44-46.
- [4]曾蓉姿. 荔枝病虫害的防治分析[J]. 南方农业,2015,9(30):56,58.
- [5]李望娟,黄远峰,叶建春,等. 五种杀菌剂防治荔枝霜疫霉病的田间药效试验[J]. 广西农学报,2013,28(2):12-13,37.
- [6]徐迟默,谢龙莲,曾筱芬,等. 荔枝霜霉病生物防治研究进展[J]. 南方农业学报,2015,46(1):72-78.
- [7]宋冠华,蔡丹丹,王绍芬,等. 植物粗提物对荔枝霜疫霉的抑菌活性研究[J]. 惠州学院学报,2016,36(3):18-21.
- [8]吴光旭,刘爱媛,魏孝义,等. 开口箭甾体皂元的分离鉴定及其抗荔枝霜疫霉菌活性[J]. 武汉植物学研究,2007,25(1):89-92.
- [9]胡珊,黄皓,罗诗,等. 4 种植物精油对荔枝主要病害抑制作用研究[J]. 中国南方果树,2015,44(5):63-65.
- [10]曾令达,张荣,蔡韞,等. 17 种植物提取物对荔枝霜疫霉菌的抑制作用[J]. 广东农业科学,2012,39(12):89-92.
- [11]王廷廷. 农药组合物发明专利协同增效作用判断方法[J]. 农药市场信息,2013(29):4-7.
- [12]陈旅,杨途熙,魏安智,等. 花椒研究概况[J]. 中国调味品,2016,41(10):149-156.
- [13]张怀予,王军节,陈园凡,等. 水蒸气蒸馏法提取花椒精油及挥发性成分分析[J]. 食品与发酵工业,2014(7):166-172.
- [14]袁娟丽,王四旺,崔雪娜. 花椒挥发油的化学成分分析及体外抑菌活性研究[J]. 现代生物医学进展,2009,9(21):4108-4112.
- [15]邵红军,程俊侠,段玉峰. 花椒挥发油化学成分、生物活性及加工利用研究进展[J]. 食品科学,2013,34(13):319-322.
- [16]干信,吴士筠,高雯琪. 花椒挥发油抑菌作用研究[J]. 食品科学,2009,30(21):128-130.
- [17]唐裕芳,唐小辉,张妙玲,等. 花椒挥发油化学组成及抑菌活性研究[J]. 湘潭大学自然科学学报,2013,35(2):64-69.
- [18]高红亮,王雪梅,孙永红,等. 天然防腐剂柠檬烯在橙汁保鲜中的应用[J]. 食品科学,2010,31(8):257-259.
- [19]王雪梅,谌徽,李雪姣,等. 天然活性单萜-柠檬烯的抑菌性能研究[J]. 吉林农业大学学报,2010,32(1):24-28.
- [20]孟雪,王志英,吕慧. 绿萝和常春藤主要挥发性成分及其对 5 种真菌的抑制活性[J]. 园艺学报,2010,37(6):971-976.
- [21]郭阿君. 红皮云杉自然挥发物成分及抑菌作用[J]. 北华大学学报(自然科学版),2016,17(6):736-740.
- [22]张丽华,陈邦恩,潘明佳. 苦参碱药理作用研究进展[J]. 中草药,2009,40(6):1000-1003.
- [23]薛爱华,宋文静. 苦参碱药理作用研究概况[J]. 天津药学,2010,22(5):62-64,73.
- [24]Lai J P, He X W, Jiang Y, et al. Preparative separation and determination of matrine from the Chinese medicinal plant *Sophora flavescens* Ait by molecularly imprinted solid-phase extraction[J]. Analytical & Bioanalytical Chemistry,2003,375(2):264-269.
- [25]袁静,张宗俭,丛斌. 苦参碱的生物活性及其研究进展[J]. 农药,2003,42(7):1-4.
- [26]袁静,关丽杰,丛斌,等. 苦参生物碱抑菌生物活性测定[J]. 农药,2005,44(2):86-89.
- [27]曾令达,彭惠莲,宋冠华,等. 5 种植物乙醇提取物及其复配物对荔枝霜疫霉菌的抑菌活性[J]. 南方农业学报,2016,47(8):1332-1337.