

# 黄连、黄芩提取液与二氧化氯复配对结球甘蓝种传黑斑病的抑菌效果研究

易 旻, 孙 成 虎, 尚 庆 茂, 张 志 刚

(中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘 要:**采用三元二次回归正交旋转组合设计方法, 确立了黄连、黄芩提取液与二氧化氯对甘蓝链格孢菌抑制效果最佳的复配组合: 黄连提取液 13.48%、黄芩提取液 15.56%、二氧化氯 0.14%。用此复配剂浸种, 芸苔链格孢菌和甘蓝链格孢菌的侵染率分别降低了 97.33%和94.85%, 且提高了种子发芽势及萌发相关酶活性。

**关键词:** 黄连; 黄芩; 二氧化氯; 结球甘蓝; 种传病害; 黑斑病

**中图分类号:** S 436.35; S 482.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2009)05—0051—03

结球甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. capitata L.), 作为主要叶菜类蔬菜, 在世界各地均有大面积栽培。种子带菌是结球甘蓝苗期发病的主要诱因, 也是结球甘蓝病害远距离传播、扩散的主要途径。芸薹链格孢菌(*Alternaria brassicae* Sacc.), 核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum* de Bary)、黑胫茎点霉菌(*Phoma lingam* Desm.)、油菜黄单胞杆菌(*Xanthomonas campestris* pv. *Campestris* Dowson)等均可通过种子传带, 引发结球甘蓝黑斑病、菌核病、黑胫病、黑腐病<sup>[1]</sup>, 导致产量和品质下降。

黄连是一味常用中药, 其活性成分小檗碱能抑制菌体细胞的生长与呼吸, 抑制细胞中葡萄糖及糖代谢中间产物的氧化过程, 特别是脱氧反应, 从而达到杀菌的效果<sup>[2]</sup>。在农业生产上, 黄连提取液对辣椒疫病菌、番茄灰霉病菌、茄黄萎病菌、黄瓜枯萎病菌和黄瓜菌核病菌等均有较为明显的抑制作用<sup>[3]</sup>。黄芩的主要活性成分为黄酮类化合物, 具有广谱的抗菌和抗病毒作用。研究表明, 黄芩提取液处理能有效抑制番茄灰霉病菌菌丝的生长<sup>[4]</sup>, 抑制番茄花叶病毒, 防治番茄花叶病<sup>[5]</sup>。

二氧化氯是一种高效消毒剂, 具有高效、广谱的杀菌作用。其杀菌原理主要依靠强大的氧化作用, 使细胞内蛋白质中的氨基酸氧化分解, 导致氨基酸链断裂, 蛋白质失去功能而使细胞死亡。在农业生产上, 以二氧化氯为主要成分的菌毒净水剂对大豆根腐病防效达 95%~98%<sup>[6]</sup>。

第一作者简介: 易旻(1984-), 男, 硕士, 现主要从事蔬菜生理研究工作。E-mail: yi2002002@163.com。  
基金项目: 农业结构调整重大技术研究专项资助项目(04-060-1B); 公益性行业(农业)科研专项资助项目(nyhyzx07-007)。  
收稿日期: 2008—12—25

该研究以黄连、黄芩提取液和二氧化氯为原料进行复配, 采用三元二次回归正交旋转组合设计方法, 研究了三者复配对甘蓝黑斑病的抑菌效果及对种子萌发的影响, 以期对结球甘蓝种子的无公害控制提供理论和实践依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

结球甘蓝品种(中甘 11 号), 来自中国河北。

黄连和黄芩购自北京同仁堂大药房, 二氧化氯购自北京化学试剂公司(AR 级)。

### 1.2 方法

1.2.1 复配剂优化结果的确立 试验采用三元二次回归正交旋转组合设计, 以抑菌率(*Y*)为目标函数, 黄连提取液(*X*<sub>1</sub>)、黄芩提取液(*X*<sub>2</sub>)和二氧化氯(*X*<sub>3</sub>)浓度为因变量, 构建数学模型。3 因素不同水平的编码值见表 1。按设计要求, 共有 23 个不同的药剂复配组合, 每种组合 4 次重复, 药剂处理后第 8 天, 统计各处理甘蓝链格孢菌的侵染率。

表 1 试验因素水平编码

Table 1		Code levels of the experimental factors				
试验因子	变化间距	编码水平 Code levels				
Factors	Interval/ %	1.682	1	0	-1	-1.682
<i>X</i> <sub>1</sub>	7.43	25.00	19.93	12.5	5.07	0.00
<i>X</i> <sub>2</sub>	8.92	30	23.92	15	6.08	0.00
<i>X</i> <sub>3</sub>	0.06	0.20	15.95	0.10	0.04	0.00

1.2.2 种子处理的效果测定 随机取种子 100 粒, 以复配药剂浸种 30 min, 对照用无菌水, 然后取出种子摆放在无菌滤纸上, 无菌的环境中自然干燥。干燥后的种子等距离摆放于 9 cm 直径的 PDA 平板上, 每皿摆放 20 粒, 25℃避光培养 7 d, 统计种子带菌率, 4 次重复。

1.2.3 种子萌发试验 按照 ISTA (1996) 方法<sup>[7]</sup> 略加改

进。种子经过浸种处理后,等距离摆放于盛有 3 层灭菌滤纸的 9 cm 培养皿中,每皿放置 20 粒,用封口膜封好,恒温 23℃避光培养 7 d,第 8 天计算发芽率、发芽势,活力指数 (Abdul-Baki 和 Anderson, 1973)<sup>[8]</sup>,4 次重复。

1.2.4 种子生理生化指标的测定 种子脱氢酶活性测定参照徐本美等<sup>[9]</sup>方法;种子酸性磷酸酯酶活性测定参照宋松泉等<sup>[10]</sup>方法;参照覃凤云等<sup>[11]</sup>方法测定种子蛋白酶活性;种子脂肪酶活性参照张宪政<sup>[12]</sup>方法测定;种子α-淀粉酶和β-淀粉酶活性参照王晶英<sup>[13]</sup>方法测定。

1.3 数据统计分析

采用 SAS (Statistical Analysis System) 8.02 和 Duncan 法,对三元二次回归正交旋转试验结果及其它试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 复配剂优化结果

根据表 2 结果,以甘蓝链格孢菌侵染率为目标函数 (Y),以黄连提取液浓度 (X<sub>1</sub>)、黄芩提取液浓度 (X<sub>2</sub>)和二氧化氯浓度 (X<sub>3</sub>)控制变量,用计算机对数据进行处理,得到甘蓝链格孢菌侵染率对三者的回归数学模型 (经显著性检验剔除不显著项)为:

$$Y = 5.3038 - 3.428X_1 - 3.1783X_2 - 9.4353X_3 + 3.1852X_1^2 + 2.3015X_2^2 + 1.875X_3X_1 + 2.5X_3X_2 + 4.0689X_3^2$$
通过对回归方程的失拟性和显著性测验,  $F_{失拟} = 2.44 < F_{0.05}(5, 8) = 3.69$ ,失拟不显著,说明回归方程的拟合性好。同时  $F_{回归} = 39.24 > F_{0.01}(9, 13) = 4.19$ ,达到极显著水平,也说明方程回归反映了客观实际,数学模型的拟合程度好。由于设计中各因素均经无量纲线性编码处理,各偏回归系数不受因素取值的大小和单位的影响,即已经标准化,其绝对值的大小直接反映变量对侵染率的影响程度。因此,该试验中 3 因素对侵染率影响的顺序依次为 X<sub>3</sub>、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>,即二氧化氯>黄连提取液>黄芩提取液。

通过对模型进行典型分析与模型特征向量分析,得

表 4 Effect of medicament treatment on the percentage germination and vigor index of cabbage seeds

处理	发芽率	发芽势	胚根长	胚轴长	活力指数
Treatment	Germination rate/ %	Germination potential/ %	Radicle length/ cm	Radicle length/ cm	Vigor index
复配剂	88.75±4.01 a A	81.25±4.79 a A	7.95±0.76 a A	6.22±0.49 a A	1 257.06±106.23 a A
CK	80.03±3.08 b A	71.25±3.54 b A	4.66±0.23 b B	4.38±0.53 b A	723.20±36.91 b B

表 5 Effect of medicament treatment on the membrane conductivity and activities of enzymes of cabbage seeds

处理	脱氢酶	酸性磷酸酯酶	蛋白酶	脂肪酶	α-淀粉酶	β-淀粉酶
Treatment	Dehydrogenase /ug · g <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>	Acid phosphatase /nmol · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup>	Protease /U · mg <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>	Lipase /nmol · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup>	α-amylase /mg · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup>	β-amylase /mg · g <sup>-1</sup> · min <sup>-1</sup>
复配剂	692.73±4.76 a A	2.42±0.01 a A	130.84±4.08 a A	158.68±6.99 a A	2.68±0.07 a A	5.49±0.53 a A
CK	577.80±6.26 b B	2.04±0.12 b B	55.55±3.84 b B	83.66±10.17 b B	0.90±0.26 b B	6.04±0.82 a A

2.4 药剂处理对种子萌发相关酶活性的影响 试验结果表明(表 5),经过复配剂处理,除β-淀粉酶

出甘蓝链格孢菌的侵染率最低点的预测值为-0.3198,相对应的坐标为 X<sub>1</sub>=0.1317, X<sub>2</sub>=0.0631, X<sub>3</sub>=0.6396,将各代码值转换成药剂浓度:黄连提取液为 13.48%,黄芩提取液为 15.56%,二氧化氯为 0.14%。即在此条件下,甘蓝链格孢菌的侵染率最低。

表 2 各处理侵染率统计结果

Table 2 The statistical results of infection under different treatments

处理	侵染率	处理	侵染率	处理	侵染率
Treatment	Infection/ %	Treatment	Infection/ %	Treatment	Infection/ %
1	2.50±1.2	9	10.00±1.7	17	5.00±2.6
2	10.00±2.3	10	20.00±3.3	18	7.50±2.7
3	5.00±2.4	11	10.00±2.3	19	2.50±1.1
4	25.00±6.1	12	15.00±4.1	20	7.50±3.4
5	5.00±1.8	13	0.00±0.0	21	5.00±1.6
6	22.50±9.2	14	35.00±6.9	22	5.00±1.4
7	10.00±1.3	15	5.00±2.8	23	2.50±1.2
8	35.00±9.7	16	7.50±4.5		

2.2 药剂处理种子的消毒效果

根据表 3 结果,复配剂处理使芸苔链格孢菌和甘蓝链格孢菌的侵染率分别比对照降低了 97.33%和 94.85%,达到差异极显著水平 (n=4, P<0.01)。

表 3 药剂处理对链格孢菌侵染率的影响

Table 3 Effect of medicament treatment on the infection of Alternaria alternata

处理	芸苔链格孢菌侵染率	甘蓝链格孢菌侵染率
Treatment	Infection of Alternaria brassicae/ %	Infection of Alternaria brassicicola/ %
复配剂	1.0±0.4 b B	2.5±0.6 b B
CK	37.5±4.2 a A	48.5±5.8 a A

注:同列比较,不同小写和大写字母分别表示差异显著 (P<0.05)和极显著 (P<0.01),下表同。

Note: Note: Different small and capital letters within the same column indicate significant difference at 5% level and 1% level respectively, the same as follow.

2.3 药剂处理对种子萌发的影响

试验结果表明(表 4),复配剂浸种处理显著提高了甘蓝种子萌发相关指标 (n=4, P<0.05)。其中,胚根长和种子活力指数最为明显,分别比对照提高了 70.6%和 73.82%,达到差异极显著水平 (n=4, P<0.01)。

外,甘蓝种子脱氢酶、酸性磷酸酯酶、蛋白酶、脂肪酶和α-淀粉酶活性均得到极显著提高 (n=4, P<0.01),分别

比对照提高了 19. 89%、18. 63%、135. 54%、89. 67%和 197. 78%。

3 结论与讨论

以黄连、黄芩提取液和二氧化氯为供试药剂, 以甘蓝黑斑病为防治对象, 通过三元二次正交旋转回归设计, 利用 SAS 统计软件进行统计分析, 确定对甘蓝链格孢菌抑制效果最佳的复配剂组合如下: 黄连提取液 13. 48%, 黄芩提取液 15. 56%, 二氧化氯 0. 14%。

通过复配剂浸种处理, 显著降低了黑斑病病原菌对甘蓝种子的侵染率( $n=4, P<0. 01$ )。与对照相比, 芸苔链格孢菌和甘蓝链格孢菌的侵染率分别降低了 97. 33%和 94. 85%。复配剂处理促进了种子的萌发, 各相关指标均显著高于对照( $n=4, P<0. 05$ ), 其中, 胚根长和种子活力指数分别比对照提高了 70. 6%和 73. 82%, 达到差异极显著水平( $n=4, P<0. 01$ )。

脱氢酶活性的高低, 已被国际上公认为测定种子活力的生化指标。酸性磷酸酯酶在生物体内催化水解有机磷酸酯键, 在种子中普遍存在, 通常酸性磷酸酯酶的活性与种子活力呈正相关。种子的萌发与淀粉酶的活性直接相关, 萌发过程中  $\alpha$ -淀粉酶的合成是由过程中产生的 GA 诱导<sup>[14]</sup>, 它的合成需要消耗从蛋白质分解的氨基酸, 并由磷酸化酶通过糖酵解和有氧呼吸提供能量<sup>[15]</sup>, 因而蛋白酶的活性又影响着淀粉酶的活性, 种子中脂肪在脂肪酶等的作用下分解为甘油和脂肪酸, 最后生成碳水化合物, 为种子的萌发提供能量。根据该研究结果, 经过复配剂处理, 甘蓝种子脱氢酶活性、酸性磷酸酯酶活性、蛋白酶活性、脂肪酶活性和  $\alpha$ -淀粉酶活性分别提高了 19. 89%、18. 63%、135. 54%、89. 67%和 197. 78%, 与对照相比均达到差异极显著水平( $n=4$ ,

$P<0. 01$ )。说明复配剂处理可能通过提高这些酶的活性从而促进了种子的萌发。

参考文献

[ 1 ] 刘惕若. 农作物种传病害[ M ]. 北京: 中国农业出版社, 2000.  
[ 2 ] 吴静, 王克露. 中药制剂体外抑杀幽门螺杆菌的研究进展[ J ]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 631-633.  
[ 3 ] 黄奔立, 朱华, 顾艳, 等. 中草药对 5 种蔬菜病菌的抑制作用[ J ]. 扬州大学学报, 2006, 27(3): 84-86.  
[ 4 ] 王树桐, 胡同乐, 王晓燕, 等. 对番茄灰霉病菌有抗菌活性的植物提取物的室内筛选[ J ]. 河北农业大学学报, 2003, 26(1): 61-64.  
[ 5 ] 姚广龙, 侯晓东, 王晓星, 等. 中草药提取物抑菌作用的研究进展[ J ]. 食品科技, 2007, 32(8): 16-18.  
[ 6 ] 王晓俭, 商洪涛. 菌毒净防治农业病害的探讨[ J ]. 现代预防医学, 2002, 29(3): 381-382.  
[ 7 ] International Seed Testing Association. International rules for seed testing[ J ]. Seed Science and Technology, 1999, 27(Supplement): 333.  
[ 8 ] Abdul-Baki A A, Anderson J D. Vigour determination in soybean seed by multiple criteria[ J ]. Crop Science, 1973, 13: 630-633.  
[ 9 ] 徐本美, 顾增辉, 郑光华. 测定种子生活力方法之探讨( I ). —TTC 定量法/[ M ]. 种子生理学研究. 北京: 科学出版社, 2004: 700-704.  
[ 10 ] 宋松泉, 程红焱, 龙春林, 等. 种子生物学研究指南[ M ]. 北京: 科学出版社, 2005: 25-26.  
[ 11 ] 覃凤云, 吕金印, 梁宗锁, 等. 外源精胺对水分胁迫下小麦幼苗蛋白酶和核糖核酸酶活性的影响[ J ]. 干旱地区农业研究, 2004, 22(2): 95-99.  
[ 12 ] 张宪政, 陈凤玉, 王荣富. 植物生理学实验技术[ M ]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1994: 14-15.  
[ 13 ] 王晶英, 敖红, 张杰, 等. 植物生理生化实验技术与原理[ M ]. 沈阳: 东北林业大学出版社, 2003: 35-38.  
[ 14 ] 王伟, 朱平, 程克棣. 植物赤霉素生物合成和信号传导的分子生物学[ J ]. 植物学通报, 2002, 19(2): 137-149.  
[ 15 ] 宋国清, 肖竞鹏, 周勇, 等. 植酸对杂交稻种子萌发过程及几种酶活性影响的研究[ J ]. 湖北大学学报(自然科学版), 1997, 19(2): 379-383.

Inhibition of Mixture of Coptis Chinensis Franch, Scutellaria baicalensis Extraction Solution and Chlorine Dioxide on Cabbage Seed-borne Black Spot Disease

YI Yang, SUN Cheng-hu, SHANG Qing-mao, ZHANG Zhi-gang  
(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** With the method of the quadratic orthogonal rotational combination design with three factors, the best inhibition of mixture of *Coptis Chinensis* Franch extraction solution, *Scutellaria baicalensis* extraction solution and Chlorine dioxide on *Alternaria brassicicola* were quantified; the mixture of 13. 48% *Coptis Chinensis* Franch, 15. 56% *Scutellaria baicalensis* and 0. 14% Chlorine dioxide showed the best; seeds soaking with this mixture, the infection rates of *Alternaria brassicae* and *A. brassicicola* were conspicuously decreased by 97. 33% and 94. 85% compared with control ( $n=4, P<0. 05$ ), the seeds germination were promoted and the correlative enzymes activity of seeds germination were increased. The research provided the scientific basis for the biological agents development of seed treatment on cabbage Seed-borne Black Spot Disease.  
**Key words:** *Coptis Chinensis* Franch; *Scutellaria baicalensis*; Chlorine dioxide; Cabbage; Seed-borne disease; Black spot disease