

四种植物提取物对烟草赤星病菌抑菌活性研究

张焱珍¹, 肖志新², 浦勇², 郭应成², 尚慧³, 李家瑞³

(1. 临沧师范高等专科学校 农学系, 云南 临沧 677000; 2. 云南省烟草公司, 云南 昆明 650051; 3. 云南省农业科学院, 云南 昆明 650205)

摘要:以烟草赤星病菌为供试靶标, 采用孢子萌发及生长速率测定法, 对华山姜、毗黎勒、团花树和金钮扣的 95%乙醇粗提物进行了抑菌活性测定。结果表明:在终浓度为 200 μg/mL 下, 华山姜对该菌的孢子萌发及菌丝生长的抑制率最高, 分别为 72%、53%, 其次为毗黎勒。团花树和金钮扣只对该菌的孢子萌发有低抑制活性。因此, 华山姜对烟草赤星病菌孢子萌发及菌丝生长的抑制效果显著优于另外 3 种提取物, 与 75%百菌清 WP 阳性对照在相同浓度下达到同一显著水平。

关键词:植物提取物; 烟草赤星病菌; 抑菌活性

中图分类号:S 435.72 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)11-0108-03

烟草赤星病(*Alternaria alternata*)是影响烟叶品质的重要叶部病害之一, 该病盛发于烟叶成熟期^[1], 各产烟区均有发生, 其中以云南、贵州、湖北等省发生较为严重。近年来, 针对该病原菌的植株抗病性^[2]、基因表达图谱^[3]、次级代谢产物功能^[4-5]、分类及鉴定^[6-9]、拮抗微生物的筛选^[10-11]等研究较多。但是, 烟草赤星病作为一种世界性烟草病害, 其防治是烟草产业的重点^[12]。目前,

该病主要以化学防治为主^[13], 其它方法相结合的方式^[14]。化学农药面临环境污染、生态破坏等风险, 而植物源农药具有安全威胁小、无污染、易降解等^[15]优点, 因而生物源防治方法的研究成为了当今新型农药研究的热点^[16]和趋势。

现以烟草赤星病菌为靶标, 采用孢子萌发及生长速率测定法, 对华山姜、毗黎勒、团花树和金钮扣的 95%乙醇粗提物进行了抑菌活性测定, 以期对植物源杀菌剂的研究和野生植物资源开发利用提供思路和依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试植物由云南省农业科学院药用植物研究所提供, 植物名录见表 1。

供试菌种: 烟草赤星病菌 [*Alternaria alternata* (Fries)] 由云南省农科院植物病理室提供。

第一作者简介:张焱珍(1986-), 女, 硕士, 助教, 研究方向为植物病理学。E-mail: 421154119@qq.com.

责任作者:李家瑞(1964-), 男, 本科, 研究员, 研究方向为天然产物研发及应用技术研究。E-mail: jiaruili@hotmail.com.

基金项目:国家烟草专卖局中烟办资助项目(2012[200]110201202015); 云南省烟草专卖局资助项目(云烟司[2012]263-2012YN11, [2012]263-2012YN08)。

收稿日期:2014-01-21

Allelopathy of *Oxalis corymbosa* DC on *Bidens pilosa* L.

JIANG Gui-bo, WU Wei-shan, LIN Li-qiang, LIN Kai-cheng, LIN Zhuang-sen, LIU Shu-yuan
(Jieyang Vocational and Technical College, Jieyang, Guangdong 522000)

Abstract: Taking *Oxalis corymbosa* DC as the donor plant, its root, stem and leaf water extract as allelochemicals, *Bidens pilosa* L. seed as the receptor, using the petri dishes with filter paper method to test allelopathy, the impact of the root, stem and leaf of *Oxalis corymbosa* DC water extraction liquid on root length, shoot height, fresh weight of *Bidens pilosa* L. seedling were determined. The results showed that the different parts and different concentrations water extraction of *Oxalis corymbosa* DC had obvious allelopathy on *Bidens pilosa* L. seed germination and seedling growth, and the effect of different concentrations (0.05, 0.10, 0.20 g/mL) on *Bidens pilosa* L. had differences, and when the concentration was 0.20 g/mL, the inhibition was the strongest.

Key words: *Oxalis corymbosa* DC; allelopathy; *Bidens pilosa* L.; aqueous extract

表 1 供试植物

Table 1 Catalogue of plants tested

| 科名 Family name | 种名 Species name | 采集部位 Collection site | 来源 Source |
|-------------------|------------------------------------|-------------------------|--------------|
| 姜科 Zingiberaceae | 华山姜 <i>Alpinia chinensis</i> | 整株 | 云南 |
| 使君子科 Combretaceae | 毗黎勒 <i>Terminalia bellirica</i> | 叶 | 云南 |
| 茜草科 Rubiaceae | 团花树 <i>Anthocephalus chinensis</i> | 叶 | 广东 |
| 菊科 Compositae | 金钮扣 <i>Spilanthes paniculata</i> | 整株 | 云南 |

培养基:PSA 培养基(马铃薯 200 g,蔗糖 15 g,琼脂粉 15 g,自来水 1 000 mL,pH 自然)。

1.2 试验方法

1.2.1 植物活性物质的提取 将 4 种植物的全株晾干,粉碎。称量 500 g 植物粉末用 95%乙醇按 1:1 回流提取,过滤。滤液在 30℃ 以下用旋转蒸发仪减压浓缩,得浸膏,称其质量,低温保存备用。称取浓缩物 100 mg 溶解在 1 mL 95%乙醇中配成质量浓度为 10^5 $\mu\text{g/mL}$ 的活性物质提取物。

1.2.2 植物提取物对烟草赤星病菌孢子萌发的影响 采用孢子萌发法^[17],测定各样品对病原菌孢子萌发的抑制效果。在 PSA 平板上接种烟草赤星病菌,待长满菌丝后用无菌水洗去表面菌丝,置于光照下 24 h 即可产孢,再用无菌水洗下孢子,稀释为每视野 50~100 个孢子的悬浮液,备用。分别取质量浓度为 10^5 $\mu\text{g/mL}$ 的活性物质提取物 200 μL ,分散于 100 mL 孢子悬浮液中(即样品最终浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$),各取 100 μL 于 96 孔板,每样品 5 次重复,阳性对照为 200 $\mu\text{g/mL}$ 75%百菌清 WP,并以 95%乙醇 PSA 和无菌水为空白对照,覆盖保鲜膜保湿,置于 24℃ 恒温箱。待无菌水空白对照孢子完全萌发后开始观察结果。萌发率=孢子萌发数/检查孢子总数 $\times 100\%$ 。孢子萌发抑制率=(对照萌发率-处理萌发率)/对照萌发率 $\times 100\%$ 。

1.2.3 植物提取物对烟草赤星病菌菌丝生长的影响 采用平皿生长速率法^[18],测定各样品对病原菌生长速率的抑制效果。取质量浓度为 10^5 $\mu\text{g/mL}$ 的活性物质提取物 200 μL ,混合于 100 mL、45℃ 的 PSA 培养基,制成含毒培养基平板,最终浓度约为 200 $\mu\text{g/mL}$ 。以添加等体积的 95%乙醇 PSA 平板为空白对照,阳性对照为 75%百菌清 WP,每个样品设 3 个重复。将已活化且经直径 7 mm 打孔器处理的供试菌株菌饼接种到含毒 PSA 平板中央,置于生化培养箱中,适宜温度培养至空白对照菌落直径达到培养皿的 2/3 时,用十字交叉法测量菌落直径,计算抑制率(%),并对数据进行统计分析。抑制率(%)=(对照菌落半径-处理菌落半径)/对照菌落半径 $\times 100\%$ 。

1.3 数据分析

试验数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析^[19]。

2 结果与分析

2.1 植物提取物对孢子萌发的抑制作用

由表 2 可知,与空白对照相比,华山姜对该菌孢子

萌发抑制率最强,其次为毗黎勒,均达到了差异显著水平,而金钮扣、团花树对该菌孢子萌发抑制率较低。华山姜与毗黎勒在控制烟草赤星病菌孢子的萌发方面效果较好。

表 2 4 种植物提取物对烟草赤星病菌孢子萌发的抑制作用

Table 2 The inhibition of 4 plant extracts on spore germination of *Alternaria alternata*

| 处理 Treatment | 孢子总数 The total number of spores/个 | 孢子萌发数 Number of spore germination/个 | 显著性 Significance | 萌发率 Germination rate/% | 抑制率 Inhibition rate/% |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--|---------------------|---------------------------|--------------------------|
| 团花树 <i>Anthocephalus chinensis</i> | 69 | 64 | b B | 93 | 5 |
| 华山姜 <i>Alpinia chinensis</i> | 76 | 21 | d D | 27 | 72 |
| 毗黎勒 <i>Terminalia bellirica</i> | 90 | 31 | c C | 34 | 65 |
| 金钮扣 <i>Spilanthes paniculata</i> | 83 | 72 | a A | 87 | 11 |
| 75%百菌清 WP | 65 | 27 | cd CD | 42 | 57 |
| 95%乙醇 | 80 | 78 | a A | 98 | 2 |
| 95% Ethanol | 80 | 78 | a A | 98 | 2 |
| 无菌水对照 Aque sterilisata | 88 | 88 | a A | 100 | 0 |

注:同列数字后不同小写字母表示在 0.05 水平有显著差异;不同大写字母表示在 0.01 水平有极显著差异。下同。

Note: Different lowercase letters behind the data in the same column mean significant difference at 0.05 level. Different capital letters mean extremely significant difference at 0.01 level. The same below.

2.2 植物提取物对菌丝生长的抑制作用

从表 3 可以看出,利用 95%乙醇对 4 种植物进行提取所得到的提取物中,在终浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 下,对烟草赤星病菌菌丝生长抑制最好的是华山姜,抑制率达到 53%,与 75%百菌清 WP 阳性对照相比差异不显著,其次为毗黎勒,而团花树与金钮扣对该菌菌丝生长没有任何抑制作用。总之,华山姜粗提物对烟草赤星病菌菌丝生长具有良好的抑制作用。

表 3 4 种植物提取物对烟草赤星病菌菌丝生长的抑制作用

Table 3 The inhibition of 4 plant extracts on mycelial growth of *Alternaria alternata*

| 处理 Treatment | 菌落直径 Mycelial diameter / cm | 显著性 Significance | 抑制率 Inhibition rate/% |
|------------------------------------|--------------------------------|---------------------|--------------------------|
| 团花树 <i>Anthocephalus chinensis</i> | 6.05 | a A | 0 |
| 华山姜 <i>Alpinia chinensis</i> | 2.84 | c C | 53 |
| 毗黎勒 <i>Terminalia bellirica</i> | 4.11 | b B | 32 |
| 金钮扣 <i>Spilanthes paniculata</i> | 6.05 | a A | 0 |
| 75%百菌清 WP | 2.66 | c C | 56 |
| 95%乙醇 95% ethanol | 6.05 | a A | 0 |

3 讨论

该试验研究了 4 种植物 95%乙醇粗提物对烟草赤

星病菌孢子萌发及菌丝生长的影响,结果表明在统一浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 下,华山姜对该菌的孢子萌发及菌丝生长的抑制率最高,分别为 72% 和 53%,其抑制效果显著优于其它 3 种提取物,与 75% 百菌清 WP 阳性对照在相同浓度下达到同一显著水平;其次为毗黎勒,团花树与金钮扣只对该菌的孢子萌发有低抑制活性。因此,不同植物中存在不同的抗菌活性物质,它们的作用机制存在差异^[20],同种植物的提取物对烟草赤星病菌的孢子萌发及菌丝生长也有不同的影响。

很多来源于植物的组分及其代谢产物都有很好的抑菌作用,研究价值较高,但该研究所采用的植物提取物都是粗提物,尚未形成剂型,且测试浓度较高^[21],为了更好的利用华山姜防治植物病害,应进一步研究其活性成分,从中寻找有高杀菌活性的先导化合物,最终建立良好的提取工艺和适合的剂型来提高其防治效果,这些还有待开展深入的筛选研究。

(该文作者还有杨佩文,单位为云南省农业科学院;周会明,单位为临沧师范高等专科学校;冯继明,单位为云南省烟草公司。)

参考文献

- [1] 关博元. 重庆烟草赤星病菌种级地位及致病力分化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [2] Durrant W E, Dong X. Systemic acquired resistance[J]. Annual Review of Phytopathology, 2004, 42: 185-209.
- [3] Liu T, Li L, Wang Y, et al. Differential expression profiles of *Alternaria alternata* genes in response to carbonyl sulfide fumigation[J]. The Journal of Microbiology, 2010, 48(4): 480-485.
- [4] Tsuge T, Harimoto Y, Akimitsu K, et al. Host-selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata* [J]. FEMS Microbiology Reviews, 2013, 37(1): 44-66.
- [5] 程丹丹, 孙学娟, 高辉远, 等. 烟草赤星病菌代谢产物诱导的烟草 BY-2 细胞 ROS 爆发和 ATP 损耗[J]. 中国农业科学, 2011, 44(8): 1610-1617.
- [6] Simmons E G. *Alternaria*: An identification manual[M]. Utrecht: CBS Fungal Biodiversity Centre, 2007: 1-585.
- [7] Dilip, Monga D. Reaction of some Motibari Tobacco Against Brown Spot Disease[J]. Tobacco Research, 1989, 15(2): 138-140.
- [8] Monga D. Laboratory Evaluation of Fungicides Against *Alternaria alternata* (Fries) Keissler Causing Brown Spot of Motibari Tobacco CN[J]. Tobacco Research, 1990, 16(1): 61-64.
- [9] 祖艳青, 蒋士君, 王海涛, 等. 河南省烟草赤星病原鉴定[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(4): 73-77.
- [10] 廉立慧, 高丽君, 杨娜, 等. 烟草赤星病菌拮抗性放线菌 Q14 的筛选及鉴定[J]. 生物技术通报, 2013(10): 127-130.
- [11] 陈雪, 万科, 张传萍, 等. 烟草赤星病拮抗细菌的筛选, 鉴定及机制初步研究[J]. 生物学通报, 2013, 48(7): 51-54.
- [12] 马志远. 烟草赤星病菌拮抗芽孢杆菌的筛选、鉴定及应用研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.
- [13] 周建国. 防治烟草赤星病药剂筛选研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [14] 易龙, 肖崇刚, 马冠华, 等. 防治烟草赤星病有益内生细菌的筛选及抑菌作用[J]. 微生物学报, 2004, 44(1): 19-22.
- [15] 江绍玫. 植物源无公害农药研究开发现状[J]. 江西农业大学学报, 2000, 22(1): 140-142.
- [16] 卢金清, 王琴, 何冬黎, 等. 两种植物源农药对烟草赤星病的药效试验[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(6): 1155-1157.
- [17] 杨晓楠, 王猛, 申瑞平, 等. 微孔板法检测番茄灰霉病菌对杀菌剂的敏感性[J]. 中国农业科学, 2012, 45(15): 3075-3082.
- [18] 张伟, 廖静静, 朱贵李, 等. 8 种植物挥发物和浸提液对三七根腐病菌的抑制活性研究[J]. 中国农学通报, 2013, 29(30): 197-201.
- [19] 周会明, 柴红梅, 赵静, 等. 基于 SPSS 的杨柳田头菇菌丝生长速度与交配型相关性分析[J]. 西南农业学报, 2010, 23(6): 1992-1998.
- [20] 邓业成, 毕秀莲, 杨林林, 等. 红树植物苦郎树提取物及其活性成分对植物病原真菌的抑菌活性研究[J]. 湖北农业科学, 2012, 51(10): 2010-2013.
- [21] 曹静, 段英姿, 马艳芝. 菊花提取物对番茄晚疫病病菌抑制效果的研究[J]. 北方园艺, 2009(2): 111-112.

Study on Antifungal Activity of Four Plant Extracts on *Alternaria alternata*

ZHANG Yan-zhen¹, XIAO Zhi-xin², PU Yong², GUO Ying-cheng², SHANG Hui³, LI Jia-rui³,

YANG Pei-wen³, ZHOU Hui-ming¹, FENG Ji-ming²

(1. Department of Agronomy, Lincang Teachers' College, Lincang, Yunnan 677000; 2. Yunnan Provincial Tobacco Company, Kunming, Yunnan 650051; 3. Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming, Yunnan 650205)

Abstract: Using *Alternaria alternata* as the trail target, the antifungal activity of 95% ethanol crude extract from *Alpinia chinensis*, *Terminalia bellirica*, *Anthocephalus chinensis*, *Spilanthes paniculata* were studied by the spore germination and growth rate method. The results showed that *Alpinia chinensis* had the highest inhibitory rate for spore germination and mycelial growth, the inhibition rate were 72% and 53% respectively at the concentration of 200 $\mu\text{g/mL}$, followed by *Terminalia bellirica*. The extracts of *Anthocephalus chinensis* and *Spilanthes paniculata* only had low inhibitory activities against the spores of *Alternaria alternata*. Therefore, at the same concentration, the extract of *Alpinia chinensis* showed equivalent strong inhibitory effects with the positive control of 75% Chlorothalonil WP, and significantly stronger than the other three extracts.

Key words: plant extracts; *Alternaria alternata*; antifungal activity