

DOI:10.11937/bfyy.201620029

四种毒植物对核桃黑斑病伴生病原菌的抑菌活性研究

王 瀚, 王让军, 赵淑玲, 卓平清, 田凤鸣

(陇南师范高等专科学校 农林技术学院, 甘肃 陇南 742500)

摘 要:以4种常见的有毒植物荨麻(*Urtica fissa* E. Pritz.)、曼陀罗(*Datura stramonium* Linn.)、马桑(*Coriaria nepalensis* Wall.)及商陆(*Phytolacca acinosa* Roxb.)为试材,采用抑菌圈法,研究了4种植物水提液对核桃黑斑病伴生病原菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)抗菌抑菌活性,以期为核桃黑斑病的综合生物防治提供参考。结果表明:4种常见的有毒植物水提液均对该菌株具有良好的抗性,表现出较强的抑菌作用。其中马桑水提物对该病原菌的抑菌活性最佳,抑制率为44%。

关键词:核桃;黑斑病;成团泛菌;抑菌作用

中图分类号:S 436.64 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)20-0114-03

在世界各核桃产区,核桃黑斑病是一种广泛发生的植物病害。在我国,其危害范围遍及大部分核桃栽培区。该病常造成核桃早期落叶,幼果腐烂进而引起落果,直接影响核桃品质及栽培区果农的经济收入。

长期以来,为了更高效地提高病害防治效果,人们逐渐开发出许多具有抗菌作用的化学农药,并已投入该病的防治,但是许多化学农药对环境造成的污染较为严重。随着人们环境保护意识的增强,生物农药应用而生。生物农药用于防治病害具有一定的选择性,对人畜无害、不污染环境、不破坏生态平衡、抗药性发展缓慢,原料丰富,生产较为方便,逐渐引起了人们的关注,尤其是有毒植物是生物农药开发的重要源泉。并且在我国具有非常悠久的开发应用历史。有毒植物从广义上来讲是指对捕食者具有毒杀作用的植物,如毒鱼、毒虫活性;从狭义来讲,有毒植物指的是对人和家畜有毒的植物^[1]。近些年,从天然有毒植物材料中获取具有较高抗菌活性的抗菌素的研究多有报道,也发现了诸多具有较好活性的天然产物分子。

该研究利用甘肃成县常见的几种有毒植物,研究其水提物对核桃黑斑病伴生病原菌的抑制作用,以期为核

桃黑斑病的综合生物防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

伴生病原菌成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)由课题组从核桃黑斑病病叶中筛选得到,并进行形态与分子鉴定后保存备用。

供试植物荨麻(*Urtica fissa* E. Pritz.)、曼陀罗(*Datura stramonium* Linn.)、马桑(*Coriaria nepalensis* Wall.)及商陆(*Phytolacca acinosa* Roxb.)块茎采自甘肃成县。

1.2 试验方法

1.2.1 植物提取母液的制备 将从野外采回的4种植物洗净后于烘箱内80℃烘干,粉碎后称量,按照100 mg·mL⁻¹的浓度加入蒸馏水浸泡,24 h后过滤成母液,稀释后放4℃冰箱备用。从冰箱取出保存的核桃伴生病原菌成团泛菌,将其置于LB液体培养基中活化,活化后的菌液放入4℃冰箱备用。

1.2.2 不同浓度植物提取液制备 采用双倍稀释法,将植物母液依次稀释为100、50、25、12.5 mg·mL⁻¹的溶液,置于4℃冰箱备用。

1.2.3 抑菌圈法测定不同浓度提取液的抑菌作用 首先将稀释后的菌液涂布于LB平板,之后将直径为0.9 cm的无菌滤纸片分别在不同浓度水提液中浸泡后,将其分别均匀贴于平板培养基表面,互不交叉,每皿5块。对照组则将无菌滤纸浸于LB液体培养基后贴于平板表面。之后倒置于培养箱于30℃条件下培养,然后分别培养24、48、72、96 h后测量抑菌圈直径并拍照。所有试

第一作者简介:王瀚(1975-),男,博士,副教授,研究方向为农业微生物。E-mail:wanghzhangy@126.com.

基金项目:2015年甘肃省委组织部陇原青年创新人才扶持计划资助项目(2015-13);甘肃省教育厅高等学校科研资助项目(2015B-147);陇南师专2014年校级重点科研资助项目(2014LSZK01003)。

收稿日期:2016-07-21

验重复 3 次,统计数据后按照下述公式计算相对抑菌率。相对抑菌率(%)=(处理组菌落直径-对照组菌落直径)/对照组直径×100。

1.3 数据分析

数据为平均值±标准差($\bar{x} \pm s$),SPSS 16.0 软件绘制标准曲线,求得毒力回归方程、相关系数及 EC_{50} 值。

2 结果与分析

2.1 抑菌圈测定结果

抑菌圈法是研究化学药剂对微生物作用最直接、最有效的方法之一。通过测量抑菌圈的直径可以间接地反映出这种药剂对微生物生长的抑制作用。由表 1 可

表 1 不同植物提取液处理病原菌后抑菌圈直径

Table 1		Diameter of bacteriostatic circle after treated by different extracts of poisonous plants				
植物种类	处理时间	提取液浓度 Concentration of extracts/(mg · mL ⁻¹)				
Plants type	Time/h	100	50	25	12.5	CK
荨麻 (<i>Urtica fissa</i> E. Pritz.)	24	1.05±0.10ab	0.96±0.10 ab	0.92±0.04b	0.90±0.01c	
	48	1.06±0.13ab	1.04±0.10 ab	1.02±0.11b	0.98±0.08bc	
	72	1.20±0.12b	1.20±0.07b	1.14±0.15ab	1.12±0.08ab	
	96	1.20±0.13b	1.20±0.05b	1.15±0.12ab	1.13±0.03ab	
曼陀罗 (<i>Datura stramonium</i> Linn.)	24	1.18±0.08b	1.20±0.12bc	1.20±0.12bc	1.16±0.11b	
	48	1.20±0.08bc	1.24±0.09bc	1.20±0.13bc	1.16±0.11b	
	72	1.28±0.08c	1.26±0.05bc	1.22±0.08bc	1.12±0.10b	
	96	1.28±0.08c	1.26±0.05bc	1.20±0.12bc	1.12±0.10b	
马桑 (<i>Coriaria nepalensis</i> Wall.)	24	1.10±0.16b	1.10±0.10b	0.92±0.13ab	0.96±0.15ab	1.00±0.00a
	48	1.18±0.10b	1.24±0.08c	1.04±0.11b	1.04±0.11b	
	72	1.28±0.08c	1.26±0.05c	1.18±0.13bc	1.20±0.10bc	
	96	1.30±0.05cd	1.26±0.03c	1.18±0.11bc	1.20±0.12bc	
商陆 (<i>Phytolacca acinosa</i> Roxb.)	24	1.10±0.07ab	1.04±0.11ab	0.96±0.11ab	1.06±0.09ab	
	48	1.16±0.09b	1.14±0.05b	1.06±0.09ab	1.10±0.10b	
	72	1.24±0.09bc	1.18±0.11bc	1.16±0.11b	1.14±0.05b	
	96	1.24±0.09bc	1.20±0.07bc	1.16±0.11b	1.14±0.05b	

注:表中数据为平均值±标准差(n=3);表中不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。
Note: Data are mean±SD (n=3). Different lowercase letters in the Table mean significant difference at 0.05 level.

表 2 4 种植物提取物处理病原菌 96 h 后的抑菌率

植物农药来源	抑菌率
Source of plant pesticide(100 mg · mL ⁻¹)	Inhibition rate/ %
荨麻(<i>Urtica fissa</i> E. Pritz.)	33
曼陀罗(<i>Datura stramonium</i> Linn.)	42
马桑(<i>Coriaria nepalensis</i> Wall.)	44
商陆(<i>Phytolacca acinosa</i> Roxb.)	38

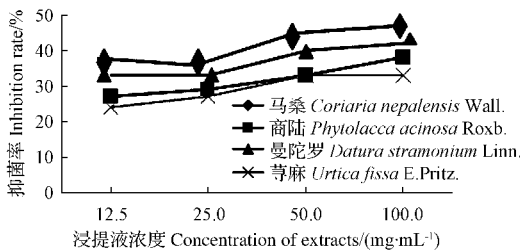


图 1 不同浓度植物提取物处理病原菌 96 h 后的抑菌情况
Fig. 1 Antibacteriostatic effects of extracts from four poisonous plants after treated 96 hours

知,在不同浓度提取液处理条件下,随着浓度的增加,抑菌圈的平均直径都在增加,表现了提取液的剂量效应。随着处理时间的不同,提取液的杀菌效果也在逐渐增加,表现出较强的时间效应。

2.2 抑菌率比较

农药在植物表面喷洒过程中,既要考虑其时间效应,也要考虑其剂量效应,因此,该研究中主要考虑最高浓度 100 mg · mL⁻¹、处理时间 96 h 条件下植物提取液对于病原菌的杀伤作用。从表 2 明显看出,同等处理条件下,马桑和曼陀罗的抑菌效果最佳,分别为 44%和 42%,其余 2 种植物商陆和荨麻次之,分别为 38%和 33%。

2.3 不同植物提取液的毒力测定

利用提取液稀释浓度的对数值和抑菌率,求出毒力回归方程,之后计算出相应的 EC_{50} 值。由表 3 可知,4 种植物提取液中,马桑和曼陀罗的 EC_{50} 值最低,说明其生物活性最佳,更具有潜在的开发利用价值。

表 3 不同浓度 4 种植物提取物处理病原菌 96 h 后毒力测定

Table 3 Toxicity determination of plant extracts from four poisonous plants			
植物农药来源	毒力方程	相关系数(R^2)	EC_{50}
Source of plant pesticide	Regression equation	Correlation coefficient	/(g · mL ⁻¹)
荨麻(<i>Urtica fissa</i> E. Pritz.)	$y=0.033x+0.210$	0.896 3	5.948
曼陀罗(<i>Datura stramonium</i> Linn.)	$y=0.034x+0.285$	0.875 8	0.532
马桑(<i>Coriaria nepalensis</i> Wall.)	$y=0.036x+0.275$	0.762 4	0.496
商陆(<i>Phytolacca acinosa</i> Roxb.)	$y=0.037x+0.225$	0.967 5	1.603

3 讨论

甘肃成县地处陇南徽、成盆地,气候温润、雨水较多,特别适宜于核桃黑斑病原菌的传播。另外,不同品种接穗的交流调运频繁,加快了细菌传播的速度,严重影响核桃生产安全。核桃黑斑病是一种复合侵染性病害^[2]。据课题组前期研究发现,该病在发生过程中除了其典型的病原菌之外,尚存在其它类型的伴生病原菌,这些病原菌的存在又进一步加剧了黑斑病的为害程度。

目前,由于病害的大范围流行,以化学合成农药为主的各类防治是首选的防治策略。但是长期的化学农药的使用极易造成土壤残留,严重影响其它农作物产品的质量,危及人类健康。一些植物代谢物在长期的进化过程中,逐步形成了对微生物的拮抗机制,其次生代谢物的存在也不会在土壤中长期累积,具有绿色环保的功效。

该研究选取了在当地核桃主产区最常见的农田杂草,利用其提取物筛选较佳的天然植物农药。其中,效果最佳的有马桑和曼陀罗。研究中发现,马桑对该病原菌的杀伤作用最强,其 EC_{50} 值最低,活性最佳。该植物是马桑科马桑属植物,多年生落叶有毒小灌木和小乔木,全株有毒,民间有作为土农药的记录^[3-5]。马桑体内毒性成分主要有马桑毒素(tutin)、马桑亭(coriatin)、马桑宁(corianin)等倍半萜内酯^[6-7]。目前对于其抗虫活性的研究较多,但对于核桃伴生病原菌的研究尚鲜见报道。因此,具有较好的开发利用价值。曼陀罗(*Datura stramonium*)属茄科曼陀罗属一年生大型有毒草本植物,全国各地具有分布。其叶、花和果实均有杀虫作用,但

对于核桃黑斑病伴生病原菌的研究也尚少见。在抗核桃黑斑病伴生病原菌方面具有重要的意义,该研究资料可为后期化学成分深入提取分离及抗菌作用机理研究奠定基础。

综上所述,植物中存在较多的杀菌活性成分,目前的研究中,杀虫研究的报道较多,但对于抑菌作用由于病原的分离鉴定的不足,这类工作相对较难展开。利用当地植物资源有效防止农业病虫害,作用方式多样,防治谱较广,与化学合成农药相比,具有较好的可降解性能,具有较为广阔的应用前景。今后的研究方向是利用植物天然产物的纯提物进一步研究其作用机理,以期开发出更好、更环保的植物新农药。

参考文献

- [1] 王瀚,张和平,何九军. 有毒植物及其开发利用的主要途径[J]. 甘肃高师学报, 2010, 15(2): 29-31.
- [2] 曲文文,杨克强,刘会香,等. 山东省核桃主要病害及其综合防治[J]. 植物保护, 2011, 37(2): 136-140.
- [3] 尉芹,马希汉,苏印泉. 亟待开发的马桑资源[J]. 陕西林业科技, 1995(4): 36-38.
- [4] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴[M]. 2册. 北京: 科学出版社, 1985: 20-24.
- [5] 谢宗万,余有岑. 全国中药名鉴[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 40-42.
- [6] 崔俊,张雁冰,朱献民,等. 秦岭马桑籽化学成分研究[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(3): 176-178.
- [7] 张雁冰,李玲,刘宏民. 马桑化学成分研究[J]. 郑州大学学报, 2005, 37(1): 75-77.
- [8] 周静,胡冠芳,刘敏艳. 四种曼陀罗对粘虫和菜青虫的触杀和拒食作用研究[J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 43(3): 102-106.

Antibacterial Activity of Four Plant Extracts *in vitro* Against *Pantoea agglomerans* on Walnut

WANG Han, WANG Rangjun, ZHAO Shuling, ZHUO Pingqing, TIAN Fengming
(College of Life Science, Longnan Teacher's College, Longnan, Gansu 742500)

Abstract: *Urtica fissa* E. Pritz., *Datura stramonium* Linn., *Coriaria nepalensis* Wall. and *Phytolacca acinosa* Roxb. were used as test materials, the antibacterial activity of four plant extracts against *Pantoea agglomerans* were tested by the method of bacteriostatic circle. The results showed that the growth of *Pantoea agglomerans* was obviously inhibited by biological pesticides. Such four poisonous plants could be candidates for the prevention and treatment of the associated pathogens causing blight on walnut. *Coriaria nepalensis* Wall. had the best inhibition effect and its inhibition rate was 44%.

Keywords: walnut; walnut blight; *Pantoea agglomerans*; antibacterial activity