

花椒提取物对桃褐腐病菌的抑制作用及酶活性的影响

莫熙礼, 赵同贵, 邓伟, 吴彤林, 杨云彩, 赵应婉

(黔西南民族职业技术学院 生物工程系, 贵州 兴义 562400)

摘要:以花椒提取物为试材,采用生长速率法测定了不同浓度的花椒提取物对桃褐腐病菌的抑制效果;并对处理后桃果实的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)活性进行检测。结果表明:不同浓度的花椒提取物对褐腐病菌菌丝的生长表现出较强的抑制效果,浓度为 5.00 mg/mL 时抑制效果最好,抑制生长率达到 96.71%,其 EC_{50} 为 0.504 mg/mL;桃果实经提取物处理后,能显著诱导果实中抗病相关酶 PAL、POD、PPO 活性升高,并在整个试验过程中保持较高的水平。花椒提取物对桃褐腐病菌具有一定的抑制作用和诱导桃果实产生抗性的作用。

关键词:花椒;桃褐腐病;苯丙氨酸解氨酶(PAL);过氧化物酶(POD);多酚氧化酶(PPO)

中图分类号:S 436.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)20-0129-04

褐腐病是果实生长后期和储藏期的一种常发病害,可引起核果类与仁果类果实腐烂^[1]。桃褐腐病在黔西南州为害极其严重。在果实成熟期,果实平均腐烂率达 10%,库存期平均腐烂率达 17%,出库 5 d 后平均腐烂率达 45%。该病害已成为制约黔西南州桃果实生产和果品出口的重要因素。目前主要是使用化学药剂防治褐

腐病,但大量化学农药的使用会造成农药残留在果实上,并且造成环境污染,危及人类健康^[2-5]。植物源杀菌剂具有高效、低毒、不易污染环境等优点,已成为传统化学药剂的有效替代^[6]。作者已对花椒提取物对褐腐病菌抑制作用进行初步研究,发现其对褐腐病菌有很强的抑制作用。因此,该试验在已有的研究基础上,测定不同浓度的花椒提取物对褐腐病菌菌丝生长的抑制作用,并通过检测花椒提取物诱导后,不同时间内果实抗病相关酶(PAL、PPO、POD)活性的变化,初步探讨花椒提取物对桃褐腐病的诱导抗性的机理,以期为植物源农药的研发提供理论依据。

第一作者简介:莫熙礼(1982-),男,广西梧州人,硕士,讲师,现主要从事植物病虫害防治等教学与科研工作。E-mail:moxili1982@163.com.

基金项目:黔西南州科技局计划资助项目(2010-14)。

收稿日期:2014-05-22

Population Dynamic and Toxicity Determination of Nine Insecticides Against *Myzus persicae* Sulzer on Chinese Cabbage

XU Guang-zeng, WANG Gui-qing, LIU Shou-zhu

(College of Agriculture, Liaocheng University, Liaocheng, Shandong 252059)

Abstract: Taking *Myzus persicae* as material, the population dynamics of it on Chinese cabbage was investigated in spring and autumn. The toxicities of nine insecticides to *M. persicae* were determined with COMBO POTTER spray tower. The results showed that the population of aphids in spring was lower than in autumn; *M. persicae* disappeared in the end of May in spring, while in autumn it disappeared in the end of October. 4.5% beta-cypermethrin microemulsion had the best lethal effect against *M. persicae* after spraying 24 hours, which LC_{50} was 1.07110 mg/L; followed by 2.5% lambda-cyhalothrin emulsifiable concentrate, 65% chlorpyrifos emulsifiable concentrate and 20% acetamiprid soluble powder, and LC_{50} were 1.17656, 1.22235, 1.30093 mg/L, respectively; 50% pymetrozine wettable powder showed poor activity, which LC_{50} was 4.85809 mg/L.

Keywords: *Myzus persicae*; population dynamic; insecticides; toxicity

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试病原菌于兴义市顶效开发区绿化桃基地桃褐腐病病果分离得到,并在 PDA 上培养活化,用含有 0.05% Tween-80 的无菌水冲洗孢子得到孢子悬浮液,采用血球计数法将其配制成孢子浓度为 $10^4 \sim 10^5$ 个/mL 的悬浮液,备用。

供试花椒购于菜市场,将花椒放至恒温烘箱内加温至 50°C 烘干,粉碎后过 40 目(0.35 mm)置于密封袋中,低温保存备用。供试桃品种为“艳红”采于兴义市顶效桃花谷果园。

1.2 试验方法

1.2.1 不同浓度的花椒提取物的抑菌效果 采用生长速率法^[7]测定。制备含提取物浓度为 5.00、2.50、1.25、0.625、0.313 mg/mL 培养基。用打孔器在菌落外缘均匀打孔,得到菌饼并将其接种到培养皿中央,菌丝一面朝下。以纯 PDA 培养基为 CK,以含扑海因 0.5 mg/mL 的培养基为负对照(CK-)。并置于 28°C 恒温箱中培养,每处理 3 次重复。定期观察菌丝的生长情况,用十字交叉法测量记录菌落的大小,计算抑菌率。抑菌率(%) = (CK 净生长量 - 处理生长量) / CK 净生长量 $\times 100\%$ 。

1.2.2 桃果实的诱导处理 将试验用的果实(无损伤、无病虫害)放在 2% 氯酸钠溶液中浸泡 2 min,再清洗晾干备用。花椒提取物的浓度设为 0.625 mg/mL(根据之前的试验结果得出其 MFC 为 0.625 mg/mL)。诱导试验设 A(打孔 + 30 μL 提取液)、B(打孔 + 30 μL 的提取液 + 15 μL 孢子悬浮液)、C(打孔 + 15 μL 孢子悬浮液)、CK1(不打孔)、CK2(打孔)5 个处理。果实放在塑料包装盒中,外套一塑料袋以保持湿度,置于室温下贮藏。于处理后 0、1、2、3、4 d 取样测定酶活性,每处理 15 个果实,取样于病健交界处的果肉,设 3 次重复。

1.3 项目测定

1.3.1 苯丙氨酸解氨酶(PAL) 取 5 g 果肉,加入 0.1 mol/L, pH 8.8 的硼酸缓冲液 25 mL(含 5 mmol/L 巯基乙醇和 0.5% 聚乙烯吡咯烷酮 PVP),冰浴研磨,12 000 r/min 离心 30 min,上清液用于酶活性的测定。PAL 活性的测定参照秦国政等^[8]的方法。

1.3.2 过氧化物酶(POD) 取 5 g 果肉,加入 0.1 mol/L, pH 6.4 预冷的磷酸钠缓冲液(含有少许的 PVP) 20 mL,冰浴研磨,然后于 12 000 r/min 离心 30 min,上清液即为 PPO 酶粗提液,用于酶活性的测定。POD 活性的测定参照李华琴^[9]的方法。

1.3.3 多酚氧化酶(PPO) 酶液的提取同 POD。PPO 活性的测定参照张宗申等^[10]的方法。

2 结果与分析

2.1 不同浓度的花椒提取物对桃褐腐病菌的抑制效果

由表 1 可知,花椒提取物对桃褐腐病菌较好的抑制作用。提取物的浓度不同,其抑制效果不同。随着花椒提取物的浓度提高,抑制作用也随之增强。当浓度为 5.00 mg/mL 抑制效果最好,抑制率为 96.71%。从菌落大小和形态来看,经花椒提取物处理后,菌落小,长势弱,菌丝短,生长量少,扁平且中央呈突起状。花椒提取物的抑菌效果与浓度密切相关,表现为线性相关,毒力回归方程 $y = 5.4672 + 1.5740x$, $R^2 = 0.9973$,其有效中浓度 EC_{50} 为 0.504 mg/mL。

表 1 花椒提取物的抑菌效果

Table 1 Inhibitory effect of extracts of *Zanthoxylum bungeanum* against *M. fructicola*

提取物浓度 Exact concentrations /(mg · mL ⁻¹)	抑制率 Inhibitory rate/%	毒力回归方程 Toxicity regression equation	EC ₅₀ /(mg · mL ⁻¹)
CK	0.00f		
0.313	35.60e		
0.625	53.80d		
1.25	76.70c	$y = 5.4672 + 1.5740x$	0.504
2.50	87.40b		
5.00	96.71a		
CK-	100.00a		

注:表中字母不同表示差异显著($P < 0.05$)。

Note: Different letters in the table show significant difference at 0.05 level.

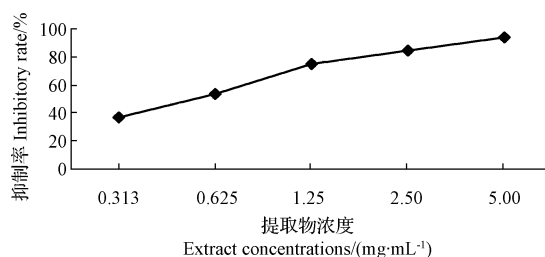


图 1 花椒提取的抑菌率

Fig. 1 Inhibitory rate of extracts against *M. fructicola*

2.2 不同处理对桃果实抗病相关酶活性的影响

2.2.1 PAL 活性的变化 由图 2 可知,各处理均能诱导桃果实 PAL 活性升高。第 1 天 CK1 处理桃果实的 PAL 活性变化不明显,其它各处理的桃果实的 PAL 活性显著升高;C 处理的 PAL 活性于第 2 天达到了整个培养过程的最高值;第 3 天 A、B 处理的 PAL 活性均达到了整个培养过程的最高值;随后各处理的 PAL 活性都有所下降。结果表明,花椒提取物能迅速诱导果实中

PAL 活性升高,说明花椒提取物可以作为诱导桃果实 PAL 活性升高的一个因子。

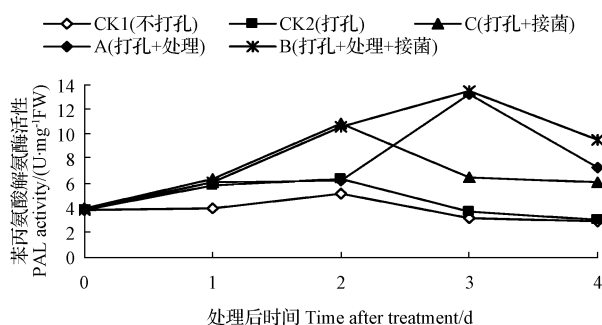


图2 处理后 PAL 活性的变化

Fig.2 Change of PAL activity after treatment

2.2.2 POD 活性的变化 由图 3 可知,用花椒提取物处理果实,其 POD 活性在整个培养过程都显著高于 CK1。第 1 天 A、B 处理的 POD 活性升高,显著高于 CK1、CK2、C 处理;第 2 天 CK2、C 处理 POD 活性显著升高,且都达到整个培养过程最大值;第 3 天 A、B 处理的 POD 活性到达了整个培养过程的最大值;随后各处理的 POD 活性都有所下降。结果表明,用花椒提取物处理后,能迅速提高桃果实中 POD 活性。

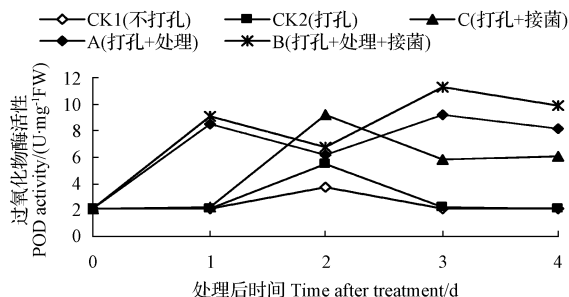


图3 处理后 POD 活性的变化

Fig.3 Change of POD activity after treatment

2.2.3 PPO 活性的变化 由图 4 可知,A、B 处理果实后,其 PPO 活性显著升高;C 处理第 2 天 PPO 活性才明显升高,且这 3 个处理在第 3 天都到达整个培养过程的最大值。整个培养过程,CK1、CK2 处理 PPO 活性变化不明显,说明机械损伤不一定能提高果实的 PPO 活性。结果表明,花椒提取物处理后,桃果实中的 PPO 活性显著升高。

3 讨论与结论

花椒果实含有一定的具有抑菌作用的活性成分,该成分可以成为传统农药的有效替代,减少环境污染。花椒是我国特有的香料,有益于人类身体健康。该试验研究发现,不同处理花椒提取物对褐腐病菌有较强的抑

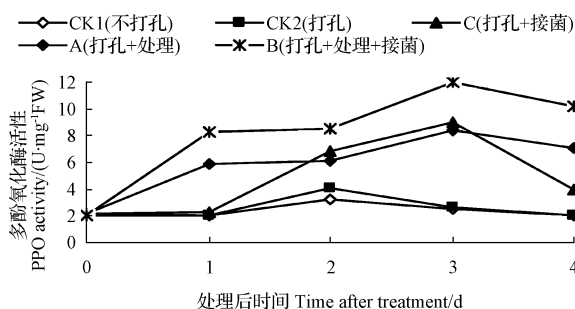


图4 处理后 PPO 活性的变化

Fig.4 Change of PPO activities after treatment

制效果,浓度为 5.00 mg/mL 抑制效果最好,抑制生长率达到 96.71%。其对桃褐腐病菌生长的 50%抑制有效浓度 EC_{50} 为 0.504 mg/mL。

已有研究表明,苯丙氨酸解氨酶(PAL)、过氧化物酶(POD)、多酚氧化酶(PPO)与桃果实的抗性密切相关^[11]。PAL 是诱导合成木质素的常见酶,参与了多种植物抗毒素的合成^[12]。通常,植物在受到病原菌侵染后体内的 PAL 活性会升高,就伴随着抗毒素的积累,二者变化呈正相关^[13]。POD 在木质素生物合成的最后一步反应过程中催化 H_2O_2 分解^[14],且直接参与了细胞壁的木质化和角质化,生长素代谢、受伤组织的栓化愈合及对病原的防御^[15]。近来的研究表明,POD 活性提高是作物植物获得抗病性的表现之一,对植物抗病性起积极作用^[14]。PPO 将酚类氧化成对病菌毒性较高的棕褐色的醌类物质,而醌类物质与大分子物质聚合形成封闭感染组织,阻碍病原菌的扩展^[16]。一般认为 PPO 活性的升高与抗病性呈正相关^[17]。研究结果表明,花椒提取物、机械损伤和病原菌处理的桃果实的 PAL、POD、PPO 活性提高显著,尤其是花椒提取物和花椒提取物+病原菌这 2 个处理后,PAL、POD、PPO 活性一直处于较高水平,显著高于 CK1(不打孔)、CK2(打孔)。说明花椒提取物能诱导果实的 PAL、POD、PPO 活性升高,有可能提高果实的抗褐腐病的能力。

研究结果表明,花椒提取物诱导桃果实产生的抗性,与 PAL、POD、PPO 活性密切相关。这与吴振宇等^[6]用鹿蹄草素+褐腐病菌处理诱导桃果肉中 PAL、POD、PPO 活性升高的结果是一致的。说明植物一些衍生物或提取物可以诱导植物产生或增强自然防御机能^[18]。花椒提取物不仅能诱导桃果实对褐腐病产生抗性,还能对褐腐病菌起到抑制或杀死作用。但花椒提取物对采后桃褐腐病菌的抑制机理,如提取物有效成分的结构,作用方式等还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 吴小虎,艾启俊,闫彬. 中草药制剂对苹果褐腐病防治效果的影响[J]. 保鲜与加工, 2006, 6(5): 35-37.
- [2] 王英祥,王革,曾千春,等. 果实褐腐病的调查与防治研究[J]. 云南农业大学学报, 1998(3): 29-32.
- [3] 冯晓元,孔苗. 中草药提取物对桃褐腐病菌抑制作用增效组合筛选[J]. 中国农学通报, 2005(12): 292-294.
- [4] 吴振宇,艾启俊,王燕,等. 中草药提取物对桃褐腐病菌抑制作用的研究[J]. 食品工业科技, 2008(11): 102-105.
- [5] 符伟辉,葛喜珍,田平芳,等. 小檗碱和多菌灵复配对桃褐腐病菌的抑制效果[J]. 北京化工大学学报, 2013, 40(1): 89-92.
- [6] 吴振宇,艾启俊,王燕,等. 鹿蹄草素对桃褐腐病菌抑制作用及其抑菌机理[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2784-2792.
- [7] 孙广宁,宗兆锋. 植物病理学试验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002, 143.
- [8] 秦国政,田世平,刘海波,等. 拮抗菌与病原菌处理对采后桃果实多酚氧化酶、过氧化物酶及苯丙氨酸解氨酶的诱导[J]. 中国农业科学, 2003, 36(1): 89-93.
- [9] 李华琴. 小麦抗白粉病生理生化特性的研究II. 小麦感染白粉病后过氧化物酶及多酚氧化酶的变化[J]. 贵州农业科学, 1983(2): 40-45.
- [10] 张宗申,彭新湘,姜子德,等. 非生物诱抗剂草酸对黄瓜叶片中过氧化物酶的系统诱导作用[J]. 植物病理学报, 1998, 28(1): 145-150.
- [11] 庄霞,马强,刘晓燕. 青霉素处理苹果树腐烂病 SOD、POD、PAL、PPO 的变化[J]. 内蒙古农业科技, 2008(4): 54-56.
- [12] 王海河,林奇英,谢联辉,等. 黄瓜花叶病毒三个毒株对烟草细胞内防御酶系统及细胞膜通透性的影响[J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 43-49.
- [13] 侯学太. 苯并噻二唑, 噻唑类植物抗性诱导剂的合成及相关酶活性的变化[J]. 中国农业科学, 2001, 34(6): 656-661.
- [14] Bruce R J, West C A. Elicitation of lignin biosynthesis and isoperoxidase activity by pectic fragments in suspension cultures castor bean[J]. Plant Physiology, 1989, 91: 889-897.
- [15] 李靖,利容干,袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1991, 21(42): 277-283.
- [16] 尹玲莉,侯小杰. 植物抗性信号分子——水杨酸研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 338-342.
- [17] Bashan Y, Okon Y, Henis Y. Peroxidase, polyphenoloxidase and phenols in relation to resistance against *Pseudomonas syringae* pv. tomato in tomato plant[J]. Can J Bot, 1985, 65: 366-372.
- [18] 侯学太. 苯并噻二唑, 噻唑类植物抗性诱导剂的合成及其生物活性研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2001.

Effect of Extract of *Zanthoxylum bungeanum* on Pathogen Inhibition and Activities of Antioxidative Enzyme of *Monilinia fructicola* in Peach

MO Xi-li, ZHAO Tong-gui, DENG Wei, WU Tong-lin, YANG Yun-cai, ZHAO Ying-wan

(Department of Biological Engineering, Qianxinan National Vocational and Technical College, Xingyi, Guizhou 562400)

Abstract: Taking extract of *Zanthoxylum bungeanum* as material, the mycelium growth rate method was used to test the inhibitory effect of extracts with different concentrations on *Monilinia fructicola*; the activities of phenylalanine ammoniumlyase (PAL), peroxidase (POD) and polyphenol oxidase (PPO) induced by inoculation with extract were studied in peach. The results showed that the extract of *Zanthoxylum bungeanum* displayed strong antifungal activity to *M. fructicola*. When the concentration of extracts was 5.00 mg/mL, the inhibitory effect was best; the inhibitory rate was 96.71%. The EC_{50} value was 0.504 mg/mL. The activities of PAL, POD and PPO in peach increased significantly when inoculated with extract and *M. fructicola*, and maintained at a high level throughout the experiment. The extract of *Zanthoxylum bungeanum* had antifungal activity and exerted a potent impact on inducing resistance of peach to *M. fructicola*.

Keywords: *Zanthoxylum bungeanum*; *Monilinia fructicola*; phenylalanine ammoniumlyase (PAL); peroxidase (POD); polyphenol oxidase (PPO)