

13种植物提取物对5种果蔬病原真菌的抑菌活性

张万里, 乔润香, 尹飞, 向准, 胡美英

(天然农药与化学生物学教育部重点实验室, 华南农业大学昆虫毒理研究室, 广东广州510642)

摘要:采用生长速率法测定了岗松 *Baeckea frutescens* 等13种植物乙醇提取物对芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、香蕉炭疽病菌 *C. musae*、香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、草莓灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和黄瓜炭疽病菌 *C. orbiculare* 的抑菌活性。结果表明,在 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度下处理 96 h, 马尾松 *Pinus massoniana* 乙醇提取物(浸膏)对香蕉炭疽病菌和香蕉枯萎病菌抑菌率均达到 100%; 岗松乙醇提取物对5种病原菌抑菌率分别为 96.53%、90.20%、90.55%、89.63% 和 62.59%; 四季米仔兰 *Aglaia duperreana* 和阴香 *Cinnamomum burmani* 的乙醇提取物对黄瓜炭疽病菌抑菌率也在 80% 以上。岗松精油对以上5种病原菌的 EC_{50} 分别为: 0.104 7、0.137 3、0.122 6、0.046 9 和 0.126 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 抑菌效果显著, 且具有广谱的抑菌活性。

关键词: 马尾松; 岗松; 抑菌活性

中图分类号: S436.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)02-0040-04

Antifungal Activity of Extracts from 13 Species of Plants Against Five Pathogenic Fungi of Fruits and Vegetables

ZHANG Wan-li, QIAO Run-xiang, YIN Fei, XIANG Zhun, HU Mei-ying

(Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Lab of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Antifungal activity of the ethanol extracts of *Baeckea frutescens* and other 12 species of plants against *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea*, *C. orbiculare* were studied in the laboratory by mycelial growth rate method. The results indicated that the ethanol extracts of *Pinus massoniana* showed inhibition rates of 100 % against *C. musae* and *F. oxysporum* in 96 h after treatment with a immersed cream mass concentration of $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, while those from *B. frutescens* revealed inhibition rates of 96.53%, 90.20%, 90.55%, 89.63% and 62.59% on the five species of pathogenic fungi with the same mass concentrations, respectively. The ethanol extracts of *Aglaia duperreana* and *Cinnamomum burmani* showed inhibition rates were more than 80% against *C. orbiculare*. Antifungal activity of essential oil of *B. frutescens* was tested and the result indicated its notable effect. Their EC_{50} values of *B. frutescens* oil against mycelial growth of five pathogenic fungi were 0.104 7, 0.137 3, 0.122 6, 0.046 9 and 0.126 2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively.

Key words: *Pinus massoniana*; *Baeckea frutescens*; antifungal activity

在农业领域,由于农业无公害、绿色、有机生产,以及农产品出口贸易跨越“绿色技术壁垒”的迫切需要,使研究和开发生物农药成为当今世界农药发展的必然趋势。从生物体特别是植物中寻找高效、低毒、低残

留且与环境相容性好的新的天然活性物质是当今新农药创制开发的热点^[1]。目前发现,具杀菌活性的植物有1400余种,其产生的次生代谢产物超过40万种,其中许多含有对病原菌有抑制作用的活性物

收稿日期: 2008-07-17

作者简介: 张万里(1981—),男,硕士研究生;通讯作者: 胡美英(1954—),女,教授, E-mail: humy@scau.edu.cn

基金项目: 广东省科技计划项目(2008B050100045)

质^[2],将对植物病原真菌具有显著抑制作用的植物提取物的功能活性成分作为前体,人工合成新的杀菌剂,成为近年来研制新农药的重要途径^[3-4].

芒果炭疽病是危害芒果最严重的病害之一,在国内外芒果产区普遍发生^[5],在贮运期果实后熟时造成大量烂果.香蕉是世界四大水果之一,世界年产量近1亿吨,仅次于柑橘类水果,居第2位^[6],香蕉炭疽病和枯萎病都是香蕉上的重要病害,炭疽病在香蕉采后危害严重,造成严重经济损失,枯萎病是香蕉的一个毁灭性病害,具有很强的传染性,一旦扩散蔓延则难以控制^[7],Nel等^[8]认为除苯并噻二唑对香蕉枯萎病有一定的防治效果外,其他化学药剂几乎无效.草莓灰霉病是草莓的主要病害之一,果实一旦染病,很快发生腐烂,并能迅速传播,严重影响草莓的产量和品质.黄瓜炭疽病是目前影响黄瓜产量和品质的主要病害之一^[9],有效控制其发生是提高黄瓜产量和质量的保障.目前,防治以上5种病害主要以化学药剂为主,由于抗药性的产生及农药残留的限制,使原本对这些病害防效很好的药剂逐渐被淘汰.为此,笔者用隶属于11科的13种植物乙醇提取物及岗松精油对这5种果蔬病原菌的抑菌活性进行了初探,以筛选理想植物提取物,为进一步研制开发广谱、高效、低毒、无残留的植物源杀菌剂提供理论依据和技术基础.

1 材料与方法

1.1 供试植物及试剂

供试植物从山东省泰安市、广西浦北县及广东省广州市五山镇华南农业大学杀虫植物标本园等地采集,共11科13属13种(表1).试验所用无水乙醇和石油醚,都为分析纯试剂,由天津市富宇精细化工有限公司生产.

1.2 供试病原菌

芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、香蕉炭疽病菌 *C. musae*、香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum*、草莓灰霉病菌 *Botrytis cinerea* 和黄瓜炭疽病菌 *C. orbiculare* 由华南农业大学植物病理系提供.

1.3 植物提取物制备

乙醇提取物(浸膏):将采集的植物材料进行清理,去除泥土、坏死的老叶、缠绕物及其他异物,置于避光通风处自然阴干,再置于电热恒温干燥箱中,以50℃烘干,用植物粉碎机将其粉碎,过40目筛,存于密封袋中备用.每种植物材料称取80g干粉于1000mL三角瓶中,加入800mL分析乙醇,超声波提取30min,重复3次,最后用乙醇冲洗滤渣3次,合并滤液,旋转蒸发仪浓缩至干,得浸膏,称其质量,低温保存备用.

表1 供试植物样品¹⁾
Tab.1 Catalogue of plants tested

科名	种名	采集地点
茄科 Solanaceae	水茄 <i>Solanum torvum</i>	广州五山
马鞭草科 Verbenaceae	荆条 <i>Vitex negundo</i> var. <i>heterophylla</i>	山东泰安
芸香科 Rutaceae	花椒 <i>Zanthoxylum bungeanum</i>	山东泰安
楝科 Meliaceae	四季米仔兰 <i>Aglaia duperreana</i>	广州五山
樟科 Lauraceae	阴香 <i>Cinnamomum burmanni</i>	广州五山
菊科 Compositae	野艾蒿 <i>Artemisia lavandulaefolia</i>	山东泰安
松科 Pinaceae	马尾松 <i>Pinus massoniana</i>	山东泰安
菊科 Compositae	蟛蜞菊 <i>Wedelia chinensis</i>	广州五山
漆树科 Anacardiaceae	漆树 <i>Toxicodendron verniciflua</i>	广西浦北
豆科 Leguminosae	鸡骨草 <i>Abrus canoniensis</i>	广西浦北
桃金娘科 Myrtaceae	岗松 <i>Baeckea frutescens</i>	广西浦北
旋花科 Convolvulaceae	五爪金龙 <i>Ipomoea cairica</i>	广州五山
菊科 Compositae	鬼针草 <i>Bidentis bipinnatae</i>	广州五山

1)供试部位除四季米仔兰和阴香为叶、蟛蜞菊为花外,其余均为茎叶

岗松精油:采用共水蒸馏法提取^[10],植物材料粉碎前置于电热恒温干燥箱中以42℃烘干,称取植物干粉300g于5000mL的圆底烧瓶中,加入3000mL水浸泡4h,然后放到加热套中加热,保持烧瓶中水微沸,通过冷凝装置将水蒸汽和精油冷凝回收,用石油醚将混在水中的植物精油萃取出来,浓缩后自然条件下挥发干剩余石油醚,即得到岗松精油,称量,低温保存备用.

1.4 抑菌活性测定

采用生长速率法测定植物乙醇提取物的抑菌活性^[11].称取植物提取物浸膏1g,将其溶解在1mL乙醇中,在无菌操作条件下,加入无菌水,配成100mg·mL⁻¹的提取物液,用移液枪吸取1mL到装有9mL已融化PDA培养基(温度约60℃)的三角瓶中,充分摇匀,再倒入直径90mm的培养皿中制成质量浓度为10mg·mL⁻¹的含药培养基平板,以含乙醇($\varphi=1\%$)的PDA培养基作为对照(CK),26℃条件下培养96h.用十字交叉法测量供试真菌菌落直径,计算抑菌率.

量取岗松精油1mL,加入0.5mL乙醇和0.1mL乳化剂2201,在无菌操作条件下,加入无菌水,配成100mg·mL⁻¹的精油母液,然后用倍半稀释法将其稀释成系列浓度,保持每个处理浓度中乙醇和乳化剂2201的含量都相同.将系列处理浓度的精油混合液加到已融化的PDA培养基中,制成含药PDA培养基平板,使精油在培养基平板中的最终质量浓度分别为1.0000、0.5000、0.2500、0.1250和0.0625mg·mL⁻¹,乙醇和乳化剂2201在每个培养基平板(包括对照)的体积分数均为0.5%和0.001%,26℃

条件下培养 96 h,用十字交叉法测量菌落直径,采用生长速率法计算抑菌率.

抑菌率 = $\frac{\text{对照菌落直径} - \text{处理菌落直径}}{\text{对照菌落直径} - \text{菌饼直径}} \times 100\%$.

2 结果与分析

2.1 乙醇提取物对 5 种病原菌的抑菌活性

菌丝生长速率法测定结果(表 2)表明:供试马尾松乙醇提取物 10 mg · mL⁻¹质量浓度处理对香蕉炭疽病菌和香蕉枯萎病菌抑菌作用明显,抑菌率都为 100%,显著高于其他供试植物;岗松乙醇提取物对芒果炭疽病菌、香蕉炭疽病菌、香蕉枯萎病菌和黄瓜炭疽病菌都有很好的抑菌活性,抑菌率分别为 96.53%、90.20%、90.55% 和 89.63%,对草莓灰霉病菌抑菌率也在 60% 以上,表现出广谱的抑菌活性;四季米仔兰和阴香乙醇提取物对黄瓜炭疽病菌抑菌作用较明显,抑菌率都在 80% 以上;水茄乙醇提取物对草莓灰霉病菌、马尾松乙醇提取物对黄瓜炭疽病菌、四季米仔兰乙醇提取物对香蕉枯萎病菌和香蕉

炭疽病菌、花椒乙醇提取物对香蕉炭疽病菌和芒果炭疽病菌也都有较好的抑制作用,抑菌率都在 70% 以上;而荆条、漆树、鸡骨草、鬼针草乙醇提取物对 5 种供试病原菌抑制作用都不明显,对其中任意一种病原菌的抑菌率都低于 60%,表现出弱的抑菌活性.

2.2 岗松精油对 5 种病原菌的抑菌活性

从抑菌的活性和广谱性及资源 and 安全性考虑,本试验从筛选的植物中选定岗松作为进一步研究对象,并经初步研究结果表明,其抑菌活性物质主要为岗松精油.岗松精油对 5 种病原菌抑菌活性表明,岗松精油对芒果炭疽菌和黄瓜炭疽菌的抑菌活性极为显著,在处理质量浓度 1 mg · mL⁻¹时的抑菌率均为 100%,在处理质量浓度 0.5 mg · mL⁻¹时的抑菌率分别为 91.62% 和 97.09%,在处理质量浓度 1 mg · mL⁻¹时对其他 3 种菌的抑菌率也在 80% 以上,表现出广谱的抑菌活性(表 3).从室内生测结果来看,岗松精油对 5 种菌的 EC₅₀ 都小于 0.15 mg · mL⁻¹,其中对黄瓜炭疽菌的 EC₅₀ 仅为 0.046 9 mg · mL⁻¹(表 4),说明岗松精油在低处理浓度下对供试病菌就有很好的抑菌效果.

表 2 供试植物乙醇提取物对 5 种植物病原菌的抑菌活性¹⁾
Tab. 2 Inhibition of ethanol extracts of tested plants on 5 species of pathogenic fungi n = 3

供试植物 ²⁾	芒果炭疽病菌		香蕉炭疽病菌		香蕉枯萎病菌		黄瓜炭疽病菌		草莓灰霉病菌	
	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%
水茄	1.53 ± 0.04	54.70d	2.70 ± 0.03	64.71e	1.75 ± 0.09	64.70d	5.65 ± 0.02	31.10h	1.63 ± 0.02	72.47a
荆条	1.72 ± 0.05	49.21e	3.25 ± 0.04	57.52g	3.05 ± 0.01	38.36h	6.52 ± 0.02	20.53j	3.32 ± 0.01	44.10d
花椒	0.88 ± 0.02	73.91b	1.83 ± 0.05	76.03d	2.53 ± 0.03	48.82f	3.33 ± 0.02	59.35e	3.50 ± 0.04	41.00e
四季米仔兰	1.23 ± 0.02	63.55c	1.53 ± 0.02	79.96c	1.07 ± 0.02	78.42c	1.18 ± 0.02	85.67b	2.17 ± 0.01	63.48b
阴香	3.05 ± 0.01	9.84j	6.50 ± 0.04	15.03j	4.40 ± 0.11	11.13i	1.37 ± 0.02	83.33b	7.00 ± 0.16	-17.94i
野艾蒿	1.63 ± 0.02	51.70de	1.63 ± 0.01	51.70e	2.20 ± 0.07	55.55e	3.37 ± 0.08	58.94e	2.17 ± 0.01	63.48b
马尾松	1.23 ± 0.02	63.54c	0.00 ± 0.00	100.00a	0.00 ± 0.00	100.00a	1.97 ± 0.02	76.02c	2.48 ± 0.04	58.14c
蟛蜞菊	2.03 ± 0.02	39.90f	2.98 ± 0.01	61.00f	2.98 ± 0.09	39.69h	3.47 ± 0.11	57.72f	4.25 ± 0.16	28.36g
漆树	2.18 ± 0.06	35.42g	5.15 ± 0.10	32.68i	2.60 ± 0.02	47.43g	5.55 ± 0.01	32.32h	3.88 ± 0.05	34.56f
鸡骨草	2.20 ± 0.04	34.99g	5.25 ± 0.05	31.37i	3.15 ± 0.08	36.29h	5.95 ± 0.02	27.44i	5.40 ± 0.08	9.00h
岗松	0.12 ± 0.03	96.53a	0.75 ± 0.01	90.20b	0.47 ± 0.02	90.55b	0.85 ± 0.03	89.63a	2.22 ± 0.06	62.59b
五爪金龙	3.43 ± 0.08	13.81i	4.70 ± 0.02	43.03h	5.00 ± 0.01	9.91i	3.10 ± 0.03	64.77d	2.00 ± 0.01	69.39a
鬼针草	2.92 ± 0.07	26.78h	3.73 ± 0.04	54.75g	4.93 ± 0.00	11.11i	4.95 ± 0.01	43.75g	2.82 ± 0.01	56.89c
CK	3.38 ± 0.02		7.65 ± 0.07		4.95 ± 0.02		8.20 ± 0.01		5.93 ± 0.04	

1) 同列数据后标有相同字母者表示差异不显著(DMRT 法, $P > 0.05$); 2) 供试植物乙醇提取物质量浓度均为 10 mg · mL⁻¹

表 3 不同处理浓度岗松精油对 5 种病原菌的抑菌活性¹⁾
Tab. 3 Inhibition of *Baekkea frutescens* oil by different concentrations on 5 species of pathogenic fungi n = 3

ρ (岗松精油)/ (mg · mL ⁻¹)	芒果炭疽病菌		香蕉炭疽病菌		香蕉枯萎病菌		黄瓜炭疽病菌		草莓灰霉病菌	
	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%	<i>d</i> _{菌落} /cm	抑菌率/%
1.000 0	0.00 ± 0.00	100.00a	0.52 ± 0.03	88.04a	0.82 ± 0.03	81.23a	0.00 ± 0.00	100.00a	0.75 ± 0.01	88.13a
0.500 0	0.30 ± 0.00	91.62b	0.92 ± 0.05	78.78b	1.28 ± 0.01	70.50b	0.20 ± 0.00	97.09a	2.00 ± 0.03	68.35b
0.250 0	1.13 ± 0.08	68.34c	1.50 ± 0.08	65.28c	1.42 ± 0.01	67.43c	0.68 ± 0.01	90.07b	3.02 ± 0.08	52.27c
0.125 0	1.73 ± 0.04	51.58d	1.85 ± 0.07	57.18d	1.58 ± 0.04	63.60c	1.78 ± 0.03	74.08c	2.92 ± 0.06	53.85c
0.062 5	2.17 ± 0.06	39.48e	2.47 ± 0.07	42.90e	3.20 ± 0.05	26.44d	2.70 ± 0.00	60.76d	3.73 ± 0.02	40.93d
CK	3.58 ± 0.03		3.72 ± 0.04		4.35 ± 0.05		6.88 ± 0.06		6.32 ± 0.03	

1) 同列数据后标有相同字母者表示差异不显著(DMRT 法, $P > 0.05$)

表 4 不同处理浓度岗松精油对 5 种病菌室内毒力测定结果
Tab.4 Toxicity of *Baekkea frutescens* oil by different concentrations on 5 species of pathogenic fungi

供试病菌	毒力回归方程 ¹⁾	相关系数 (<i>r</i>)	EC ₅₀ / (mg·mL ⁻¹)
芒果炭疽病菌	$Y=1.640\ 17+1.663\ 40X$	0.969 91	0.104 7
香蕉炭疽病菌	$Y=2.394\ 50+1.218\ 92X$	0.996 58	0.137 3
香蕉枯萎病菌	$Y=2.776\ 02+1.064\ 82X$	0.897 59	0.122 6
黄瓜炭疽病菌	$Y=2.073\ 36+1.750\ 97X$	0.994 92	0.046 9
草莓灰霉病菌	$Y=2.921\ 55+0.989\ 30X$	0.930 43	0.126 2

1) *X* 为供试植物提取物浓度的对数, *Y* 为校正抑菌率几率

3 讨论

从植物中寻找抑菌活性物质,从中探索生物活性具有重要意义^[12]. 植物界存在丰富的抑菌植物资源,是研制和生产无毒(或低毒)、无残留、高效和低成本生物农药的理想材料来源. 目前,国内外对植物源抑菌物质的研究非常活跃^[13]. 本试验采用生长速率法测定发现,马尾松和岗松乙醇提取物对供试 5 种病原菌中的多种都有很好的抑菌活性,以马尾松对香蕉炭疽病菌和香蕉枯萎病菌最为显著,但是岗松的抑菌谱更广,因此,选择岗松进一步试验. 对岗松乙醇提取物用不同极性溶剂萃取,对各萃取物进行抑菌活性试验,结果表明乙醇提取物的活性成分在石油醚层,经笔者分析后推测,岗松乙醇提取物主要抑菌活性物质为精油. 鉴于一些植物存在广谱抑菌活性,在以后的研究中,应该进一步扩大筛选的病原菌菌谱,有利于发现这些植物新的抑菌活性和具有较好活性的新植物材料.

本研究发现的具有广谱抑菌活性的马尾松和岗松 2 种植物中都含有植物精油,植物精油目前已经被广泛应用在医药、化妆品、杀虫剂等方面^[14],马尾松等植物的精油在抑菌活性方面的研究也已有报道^[15-16]. 目前,国内外对岗松精油抑菌活性的研究鲜见报道,但已有对其化学成分研究的报道^[17],笔者经过初步研究后推测,岗松精油中起抑菌活性的化合物为桉叶素、侧柏烯、蒎烯、石竹烯、芳樟醇和松油醇中的一种或几种共同作用. 进一步研究发现,岗松精油在低浓度处理下对 5 种供试病菌均表现出很好的抑菌活性,值得进一步研究开发.

参考文献:

[1] 杨从军,孟昭礼,郭景,等. 番茄茎叶提取物对 8 种植

物病原菌的生物活性初步研究[J]. 植物保护学报, 2005, 31(1): 28-31.

[2] 周丽,高飞,滕云,等. 17 种高原草地有毒植物对植物病原真菌生物活性的初步研究[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2008, 45(1): 214-218.

[3] 蒋继志,史娟,赵丽坤,等. 几种植物诱导马铃薯对致病疫菌的抗性[J]. 植物病理学报, 2001, 31(2): 144-151.

[4] 蒋继志,梁宁. 植物提取物对草莓根腐病病原真菌的抑制作用[J]. 河北大学学报: 自然科学版, 2005, 25(4): 399-404.

[5] 何衍彪,詹儒林,赵艳龙. 丁香提取物对芒果炭疽病菌和香蕉枯萎病菌的抑制作用[J]. 四川农业大学学报, 2006, 24(4): 394-397.

[6] 魏岳荣,杨护,黄秉智,等. 生物技术在香蕉育种中的应用[J]. 果树学报, 2003, 20(5): 393-398.

[7] 王芳,严进,吴品珊. 香蕉枯萎病的检测与监控[J]. 植物检疫, 2007, 21(5): 301-303.

[8] NEL B, VILJOEN A, STEINBERG C, et al. Evaluation of chemical substances for the management and control of *Fusarium* wilt of banana[C] // CLAUDINE P, ANNE V. 2nd International symposium on *Fusarium* wilt on banana. Brazil, Salvador de Bahia: [s. n.], 2003.

[9] 赵建方,陈洪美,王明友,等. 两种化合物联合诱导黄瓜对炭疽病的抗病性研究初报[J]. 中国植保导刊, 2008, 28(5): 9-12.

[10] 瞿新华. 植物精油的提取与分离技术[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(32): 10194-10198.

[11] 方中达. 植病研究方法[M]. 3 版. 北京: 中国农业出版社, 1998: 141-142.

[12] 徐汉虹,张志祥,查友贵. 中国植物性农药开发前景[J]. 农药, 2003, 42(3): 1-9.

[13] 张应烙,尹彩萍,冯俊涛,等. 植物源杀菌剂的研究进展[J]. 西南民族大学学报, 2005, 31(3): 402-409.

[14] 张东峰. 植物精油的研究开发新进展[J]. 河北化工, 2008, 31(2): 10-12.

[15] BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review[J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 94(3): 223-253.

[16] 毛胜凤,张立钦,张健,等. 马尾松叶提取物的抗菌活性[J]. 浙江林学院学报, 2008, 25(3): 359-362.

[17] N' GUYEN T T, DUONG T T, ANGE B, et al. *Baekkea frutescens* leaf oil from Vietnam: composition and chemical variability[J]. Flavour and Fragrance Journal, 2004, 19: 217-22.

【责任编辑 李晓卉】