

藁本提取物对 2 种柑桔贮藏病害病原菌的抑制作用研究

贺磊^{1,2}, 胡军华², 姚廷山², 李鸿筠², 冉春², 刘浩强², 刘娟^{1,2}, 雷慧德²
(1 西南大学园艺园林学院, 重庆, 400716; 2 中国农业科学院柑桔研究所/国家柑桔工程技术研究中心)

摘要: 采用菌丝生长速率法, 测定了藁本提取物对柑桔炭疽菌和柑桔绿霉菌的离体抑菌活性。结果表明, 在藁本初提物浓度为 3.500 mg/mL 时, 对绿霉病原菌抑制率为 93.8% (培养 3 天) 和 85.4% (培养 5 天), 对炭疽病原菌抑制率为 98.2% (培养 3 天) 和 91.71% (培养 5 天)。藁本提取物对炭疽菌的有效中浓度(EC₅₀) 分别为 0.146 mg/mL (培养 3 天) 和 0.2109 mg/mL (培养 5 天); 对柑桔绿霉菌的 EC₅₀ 为 0.1544 mg/mL (培养 3 天) 和 0.3222 mg/mL (培养 5 天)。显微观察发现, 藁本提取物处理后, 2 种病原菌菌丝出现扭曲、膨大、液泡增多、间隔改变及分枝增加等情况。藁本提取物抑菌活性的发现为进一步研究开发新型植物源农药提供了重要信息。
关键词: 藁本提取物; 柑桔绿霉病; 柑桔炭疽病; 抑菌活性; 抑菌机理
中图分类号: S 666.209; S 436.661.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-1431(2010)02-0006-05

Antifungal Activities of the extract from *Ligusticum sinense* against two Citrus Storage Pathogens

HE Lei^{1,2}, HU Jun-hua², YAO Tin-shan², LI Hong-jun², RAN Chun², LIU Hao-qiang², LIU Juan^{1,2}, LEI Hu-de²
(1 College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China ;
2 Citrus Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences)

Abstract: The extract from *Ligusticum sinense* was investigated for its bioactivity against *Penicillium digitatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* using mycelial growth rate method. The results showed that the inhibition rates were 93.8% (3 d) and 85.4% (5 d) against *P. digitatum*, and 98.2% (3 d) and 91.7% (5 d) against *C. gloeosporioides* at 3.5 mg/mL. Bioassay of extract showed that the ethanol extract was effective to *P. digitatum* and *C. gloeosporioides*, in which the EC₅₀ was 0.146 mg/mL (3 d), 0.2109 mg/mL (5 d) and 0.1544 mg/mL (3 d), 0.3222 mg/mL (5 d) respectively. Microscope observation showed that the mycelia of the two pathogens were abnormal, showing distorted, bulged, more vacuolated, and more branched. The results indicated that *L. sinense* is potentially a new botanic fungicide.
Key words: Antifungal activity; *Ligusticum sinense*; *Colletotrichum gloeosporioides*; *Colletotrichum gloeosporioides*

柑桔在贮藏运输过程中易发生多种病害, 造成果实腐烂变质, 严重时可达 60% 以上, 经济损失严重。其中, 最常见的是柑桔绿霉病菌和炭疽病病菌引起的果实腐烂, 一般占腐烂果实的 80% ~ 90%^[1]。柑桔保鲜剂以化学药剂为主, 因为食品安全的需要, 现在生物源保鲜剂已成为研究的热点之

一。植物源保鲜剂来源于天然植物代谢产物,具有对人畜安全、不污染环境、不易引起抗药性、在自然环境中易于降解等优点^[5]。研究发现,藁本提取物能够较好地抑制柑桔绿霉病和炭疽病病原菌的生长。藁本 *Ligusticum sinense* Oliv. 为伞形科、藁本属的多年生草本植物,在我国分布广泛。通过对藁本提取物的抑菌作用进行研究,旨在为植物源农药的开发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

藁本:购于成都荷花池药材市场。菌种:柑桔绿霉菌 *Penicillium digitatum* Sacc.、柑桔炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. 由中国农业科学院柑桔研究所综合防治课题提供。

1.2 方法

1.2.1 藁本提取物的制备

将藁本剪成小段,50℃烘干后研成粉末,保存备用。称取20g藁本粉末,加入95%乙醇溶液200mL50℃超声提取,重复3次,每次40分钟。将提取液浓缩,称重后定容到20mL,4℃贮藏备用。用下列公式计算提取率。

$$\text{提取率}(\%) = \frac{\text{提取物的量}(\text{g})}{\text{材料干重}(\text{g})} \times 100$$

无菌条件下配成质量浓度为35mg/mL的溶液。

1.2.2 藁本提取物对病原菌的抑制作用

用移液枪吸取1mL藁本提取物置入装有9mL已融化的PDA培养基(温度约为60℃)的三角瓶中,摇匀,再倒入直径为90mm的培养皿中,制成质量浓度为3.500mg/mL的含药培养基平板,平板凝固冷却后用接种针在不同培养皿平板中央分别接入生长一致的柑桔绿霉病和炭疽病病原菌菌饼(直径为6mm),每皿接1个菌饼,生长有菌落的一面朝向培养基。每处理3个重复。同时,设对照(清水)。28℃培养72小时,采用十字交叉法测定菌丝生长直径,按下列公式计算抑制率。

$$\text{菌落直径}(\text{mm}) = \text{平均菌丝直径}(\text{mm}) - 0.6(\text{mm})$$

$$\text{相对抑制率}(\%) = \frac{IC - I1}{I1}$$

其中,IC表示对照的菌落直径(mm),I1表示处理的菌落直径(mm)。

1.2.3 藁本提取物对病原菌的毒力测定

在无菌条件下,配制不同浓度的藁本提取物,方

法与1.2.2相同。所得数据用DPS软件完成毒力回归方程、有效中浓度(EC₅₀)和95%置信区间。

1.2.4 藁本提取物对病原菌菌丝形态的影响

1.2.2中各处理和对照菌25℃培养5天后在显微镜下观察病原菌形态特征。

2 结果与分析

2.1 藁本提取物对病原菌的抑制作用

通过处理,得到藁本提取物2.1g,其提取率为10.5%。在PDA培养基(对照1)上,柑桔绿霉病原菌的分生孢子极易扩散,培养3天时长满培养皿(由许多绿霉菌落共同生长长成);在带药PDA培养基(藁本提取物浓度3.500mg/mL)上培养3天时,菌落扩展明显受到影响,无扩展,边缘菌丝颜色变浅;培养5天时,菌落扩展受到的影响减小,形成的菌落较小,呈白色或浅绿色,说明藁本提取物能抑制柑桔绿霉病病原菌菌丝生长或阻碍其生长代谢。在PDA培养基上,柑桔炭疽病病原菌生长旺盛,菌丝在培养基上均匀扩展,培养5天时扩展至培养皿的3/4,菌落边缘的菌丝呈白色,中心的菌丝呈灰色,并逐渐向边缘扩散;在带药PDA培养基(藁本提取物浓度3.500mg/mL)上培养3天时,菌落只均匀地扩展了1mm,菌丝生长受到明显的抑制作用;培养5天时,菌丝生长依然受到较强的抑制作用,菌落只扩展了3mm。说明藁本提取物对柑桔炭疽病菌菌丝生长均有强烈的抑制作用(见图1)。

2.2 藁本提取物对病原菌的毒力

试验结果表明,不同浓度藁本提取物对柑桔绿霉病和炭疽病病原菌均有抑制作用,随着藁本提取物浓度增大,抑制效果逐渐增强。其中,浓度为3.500mg/mL时抑制效果最好,对柑桔绿霉病病原菌抑制率达到93.8%(培养3天)和85.4%(培养5天);对柑桔炭疽病病原菌抑制率达到98.2%(培养3天)和91.71%(培养5天)。经计算,藁本提取物对柑桔绿霉病病原菌的EC₅₀为0.1544mg/mL(培养3天)和0.3222mg/mL(培养5天),对柑桔炭疽病病原菌的EC₅₀为0.1460mg/mL(培养3天)和0.2109mg/mL(培养5天)。藁本提取物对柑桔炭疽病病原菌的抑制效果要好于对柑桔绿霉病病原菌的抑制效果。通过试验比较,发现藁本提取物对柑桔绿霉病和炭疽病病原菌的EC₅₀均随时间增长而增大,说明藁本提取物的抑菌作用随着时间增长而逐渐减弱。当藁本提取物达到一定浓度

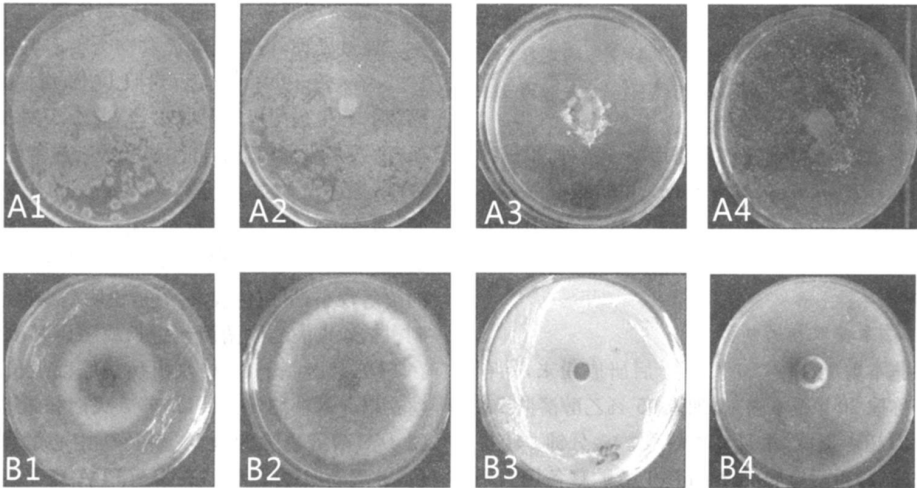
(3.500 mg/mL) 后,柑桔绿霉病和炭疽病病原菌的菌丝培养 5~14 天几乎没有生长,说明高浓度藁本提取物可以完全抑制其生长(见表 1、表 2,见图 2)。

2.3 藁本提取物乙醇对病原菌菌丝形态的影响

在光学显微镜下观察发现,低浓度藁本提取物(0.219 mg/mL)处理的柑桔绿霉菌菌丝形态与对照无明显差异,对照和低浓度处理的柑桔绿霉菌菌丝

表 1 藁本提取物对病原菌的抑制效果

藁本浓度/ mg/ml	绿霉菌菌抑菌率/%		对炭疽病菌抑菌率/%	
	培养 3 天	培养 5 天	培养 3 天	培养 5 天
0.219	25.0	9.8	35.14	25.71
0.438	55.0	14.6	42.34	33.43
0.875	60.0	52.4	57.21	49.71
1.750	65.0	56.1	68.47	61.43
3.500	93.8	85.4	98.20	91.71

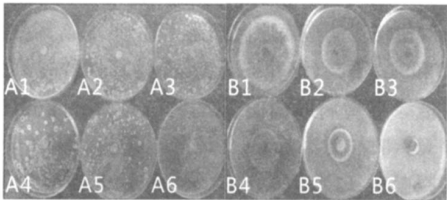


注: A1 为柑桔绿霉病病原菌(对照 1, 培养 3 天), A2 为柑桔绿霉病病原菌(对照 1, 培养 5 天), A3 为处理后柑桔绿霉病病原菌(培养 3 天), A4 为处理后柑桔绿霉病病原菌(培养 5 天); B1 为柑桔炭疽病病原菌(对照 2, 培养 3 天), B2 为柑桔炭疽病病原菌(对照 2, 培养 5 天), B3 为处理后柑桔炭疽病病原菌(培养 3 天), B4 为处理后柑桔炭疽病病原菌(培养 5 天)。

图 1 藁本提取物对柑桔绿霉病和炭疽病病原菌菌丝生长的抑制

表 2 藁本提取物对柑桔贮藏病害病原菌的毒力

藁本处理	毒力回归方程	R ²	EC ₅₀ /g·L ⁻¹ (95%置信区)	F 检验值	p 值
绿霉菌菌培养 3 天	y = 58.413x + 37.125	0.8205	0.1544(0.0960~0.2484)	20.2998	0.0204
绿霉菌菌培养 5 天	y = 76.381x + 14.063	0.8554	0.3222(0.2440~0.4254)	50.9714	0.0057
炭疽病菌培养 3 天	y = 64.429x + 35.306	0.9775	0.1460(0.0799~0.2667)	13.2344	0.0358
炭疽病菌培养 5 天	y = 67.298x + 26.320	0.9727	0.2109(0.1460~0.3046)	28.1152	0.0131

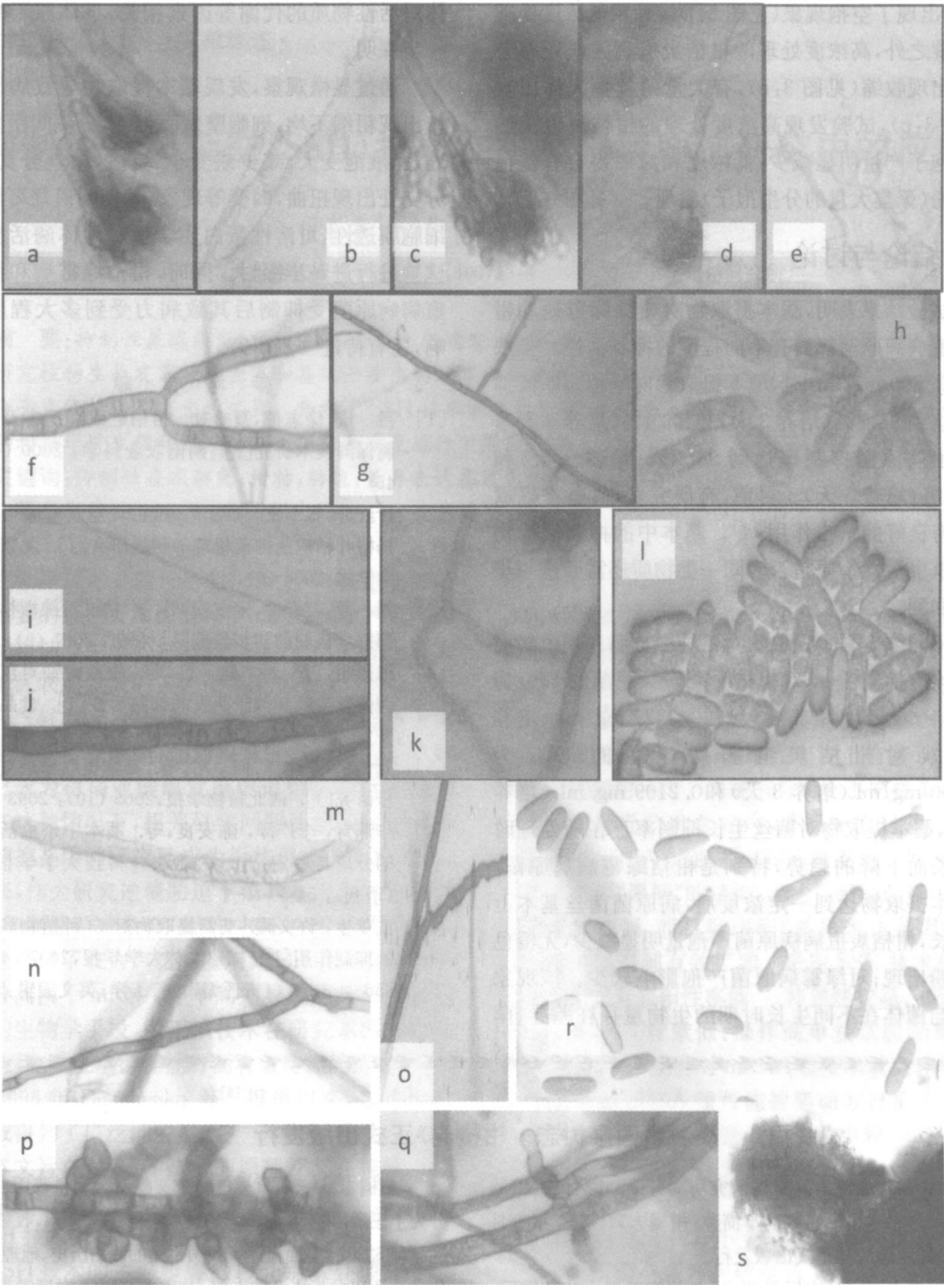


注: A 为柑桔绿霉病病原菌, B 为柑桔炭疽病病原菌; 1: 对照(清水), 2~6 表示藁本提取物的浓度分别为: 0.219、0.438、0.875、1.750 和 3.500 mg/mL

图 2 不同浓度藁本提取物对柑桔绿霉病和柑桔炭疽病病原菌菌丝生长的抑制

饱满,细胞壁光滑,隔膜明显(见图 3: a ~ c),高浓度提取物(3.500 mg/mL)处理的绿霉菌菌丝形态与对照差异明显,高浓度处理的柑桔绿霉菌菌丝分支增多,粗细不均匀,扭曲,畸变,节间拉长,隔膜减少,孢子产生少,但分生孢子形态无明显变化(见图 3: d 和 e)。

低浓度和高浓度藁本提取物处理的柑桔炭疽病菌丝形态与对照均有差异,高浓度处理的菌丝差异更加明显。未经处理的柑桔炭疽菌丝,菌丝饱满,光滑,粗细均匀,原生质均匀,隔膜明显,生长旺盛,产孢量大(见图 3: f ~ h)。低浓度处理柑桔炭疽病菌



注: a 和 b 为未经处理的绿霉菌丝; c 为低浓度处理的绿霉菌丝; d 和 e 为高浓度处理的绿霉菌丝; f 和 g 为未经处理的炭疽菌丝; h 为未经处理的炭疽的分生孢子; i~ k 为低浓度处理的炭疽菌丝; l 为低浓度处理的炭疽的分生孢子; m~ q 为高浓度处理的炭疽菌丝 r 为高浓度处理的炭疽的分生孢子; s 为橙色孢子粉。

图 3 藁本提取物对柑桔绿霉病和炭疽病病原菌菌丝形态的影响

菌丝粗细不均, 细胞壁表面粗糙, 分隔间距拉长或缩短, 液泡变大、减少或变小、增多, 菌丝分支处出现扭曲, 畸变, 部分菌丝的细胞壁不规则凹陷, 局部发生

溶壁现象, 内含物外渗, 菌丝变得非常透明, 出现空泡, 菌体破坏严重(见图 3: i~ k), 部分孢子中部出现浅色, 似油滴状物, 个别孢子出现一个或两个泡状

物质,出现了空孢现象(见图 3:l)。除了低浓度处理所表现之外,高浓度处理的柑桔炭疽病菌丝还有节间处出现收缩(见图 3:n),有大量菌丝膨大体出现(见图 3:p),试验发现高浓度处理的柑桔炭疽菌的分生孢子产量明显减少,低浓度和对照组会有橙色孢子粉(聚集大量的分生孢子)出现^[2-4](见图 3:s)。

3 结论与讨论

试验结果表明,藁本提取物对柑桔绿霉病和柑桔炭疽病原菌都具有不同程度的抑制活性。当浓度在 3.500 mg/mL 时,藁本提取物对绿霉病原菌抑制率达到 93.8% (培养 3 天)和 85.4% (培养 5 天),对炭疽病原菌抑制率达到 98.2% (培养 3 天)和 91.71% (培养 5 天)。目前,有研究发现,藁本提取物具有良好的杀虫作用^[5,6]。藁本中的抑菌活性物质和杀虫活性物质是否为同一类物质还需要进一步分析和测定。

不同浓度藁本提取物对柑桔绿霉病和炭疽病原菌均有抑制活性,对柑桔绿霉病原菌的 EC_{50} 为 0.1544 mg/mL (培养 3 天)和 0.3222 mg/mL (培养 5 天),对柑桔炭疽病原菌的 EC_{50} 为 0.1460 mg/mL (培养 3 天)和 0.2109 mg/mL (培养 5 天),藁本提取物对菌丝生长抑制率存在随处理时间延长而下降的趋势,特别是柑桔绿霉病原菌。当藁本提取物达到一定浓度后,病原菌菌丝基本上不生长,柑桔炭疽病原菌产孢量明显减少,无橙色孢子粉出现;对绿霉病原菌产孢影响较少。该现象可能与菌体在不同生长时期的生物量存在差异、菌

体对活性物质的代谢等因素相关,具体原因尚待进一步探明。

通过显微观察,发现藁本提取物导致病原菌菌丝出现粗细不均,细胞壁表面粗糙,分隔间距拉长或缩短,液泡变大、减少或变小、增多,菌丝分支增多,分支处出现扭曲,畸变等现象,其抑制机理可以通过细胞膜透性、可溶性蛋白质含量和菌体酶活测定等试验进行进一步探讨。同时,柑桔绿霉病和柑桔炭疽病原菌受抑制后其致病力受到多大程度的影响,还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 吕庆,徐志德,夏金初. 柑桔贮藏期病害及药剂防腐保鲜技术研究[J]. 湖南农业科学, 2000 (4): 44-45
- [2] 计红芳,张令文,宋瑞清. 绒白乳菇发酵液提取物对杨树叶枯病菌抑菌机理的初步研究[J]. 北京林业大学学报, 2008 (4): 146-149
- [3] 刘芳,刁春铃,宋宝安,等. 广枯灵对辣椒枯萎病原菌抑制机制的初步研究[J]. 农药, 2007 (2): 89-91
- [4] 朱德明,丁丽,匡钰,等. 柑茶树油对芭蕉炭疽菌菌丝生长和孢子萌发的抑制活性[J]. 食品研究与开发, 2008 (6): 134-137
- [5] 万传星,李广泽,何军,等. 藁本提取物杀虫活性初步研究[J]. 西北植物学报, 2005 (10): 2093-2096
- [6] 华燕青,李广泽,陈安良,等. 藁本中杀虫活性成分的分离与鉴定[J]. 西北农林科技大学学报, 2004 (增刊): 54-60
- [7] 江茂生,许文耀. 艾蒿提取物对 13 种植物病原菌的抑制作用[J]. 福建农林大学学报, 2007 (4): 352-356

(责任编辑:鲁玉洋;英文编辑:董朝菊)

《中国果树志·柑橘卷》正式出版发行

由中国农业科学院柑橘研究所周开隆、叶荫民主编的《中国果树志·柑橘卷》(以下简称《柑橘志》), 2010 年 1 月由中国林业出版社正式出版发行。

《柑橘志》是在《中国果树志》总编辑委员会的指导下,由中国农业科学院柑橘研究所主持,全国广大科技工作者通力协作编写而成。该书图文并茂,采用国际标准 16 开本,精装本出版,定价 148 元。

该书的编写始于 20 世纪 60 年代,由于种种原因,编写一度中断。1981 年,《柑橘志》作为《中国果树志》的一部志卷,在中国农业科学院柑橘研究所的组织下,全国有柑橘分布的省(市、区)科技工作者共同努力重新编写,历经近 30 年时间,最终完成该书的编写工作并出版发行。

《柑橘志》是一部优秀的科技文献专著和科普用书。全书分为十三章,共 456 页、80 余万字,有彩图 317 幅,收集各类柑橘品种 533 个,全面概述了我国柑橘的栽培历史、地理分布、植物学分类和农业技术特点等,并重点介绍了柑橘类果树三属(枳属、柑橘属、金柑属)植物的种类、品种的形态特征及经济价值。

《柑橘志》的出版,将为研究柑橘起源、演化、分类及种质的开发利用,充分发挥柑橘的生物学潜力提供较为完整的资料,对我国柑橘业的发展和科学研究具有深远意义。

中国农业科学院柑桔研究所(重庆,4000712)

谭志友