

石菖蒲醇提物对番茄灰霉抑菌稳定性及防效研究

刘铁秋^{1,2}, 卢发瑞², 杨晓红², 何苗², 孙雪丹², 卢勇³, 曾宪垠^{1,2*}

¹四川农业大学原子能农业应用研究室, ²四川农业大学生命科学院, 雅安 625014;

³四川玛思特农业开发有限公司, 南充 637105

摘要: 本文通过菌丝生长速率法研究石菖蒲醇提物对番茄灰霉的抑菌稳定性, 采用凹玻片法和盆栽法研究其对灰霉孢子萌发的影响和温室防效, 从而形成系统完整的数据基础, 为石菖蒲杀菌剂的研发提供科学依据。结果表明, 醇提物在不同 pH 和紫外照射下抑菌活性稳定, 在高于 78 °C 时抑菌活性下降, 在蔗糖处理浓度高于 0.08 g/mL 时抑菌活性增强, 在室温 (22 ~ 28 °C) 和低温 (4 °C) 下可长期储存; 其对灰霉孢子萌发的 EC₅₀ 为 0.0109 g/mL, EC₉₀ 为 0.0318 g/mL; 温室防效的 EC₅₀ 为 0.0221 g/mL, EC₉₀ 为 0.1533 g/mL。石菖蒲醇提物可抑制番茄灰霉菌丝生长和孢子萌发, 抑菌稳定性和温室防效良好, 可进一步研发为中药杀菌剂。

关键词: 石菖蒲; 醇提物; 灰霉菌; 稳定性; 孢子萌发; 防治效果

中图分类号: R284.2; S482.2

文献标识码: A

Antifungal Stability and Preventive Effects of Ethanol Extracts of *Acorus tatarinowii* on *Botrytis cinerea*

LIU Tie-qiu^{1,2}, LU Fa-rui², YANG Xiao-hong², HE miao², SUN Xue-dan², LU Yong³, ZENG Xian-yin^{1,2*}

¹Isotope Research Laboratory, ²College of Life Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China;

³Sichuan Master Agricultural Development Co., Ltd, Nanchong 637105, China

Abstract: In order to provide the scientific basis for developing fungicide from *Acorus tatarinowii*, the antifungal stability of *A. tatarinowii* ethanol extracts were tested by mycelial growth rate method, the inhibition rate of conidial germination were determined by microscope concave slides method, and the preventive effects of *A. tatarinowii* ethanol extracts on *Botrytis cinerea* were determined by pot-culture method. The results showed that the antifungal activity of *A. tatarinowii* ethanol extracts was not influenced by pH or UV-irradiation, the antifungal activity decreased when the temperature was higher than 78 °C, and increased when the concentration of saccharose in culture was higher than 0.08 g/mL, it was stable when stored at 22 ~ 28 °C or 4 °C. Its EC₅₀ and EC₉₀ on grey mould spore germination were 0.0109 g/mL and 0.0318 g/mL, respectively. Its EC₅₀ and EC₉₀ on preventive effects in green house were 0.0221 g/mL and 0.1533 g/mL, respectively. In conclusion, the spore germination and growth of mycelial can be effectively inhibited by ethanol extracts from *A. tatarinowii*. *A. tatarinowii* can be used for the further development of a Chinese herbal fungicide.

Key words: *Acorus tatarinowii*; ethanol extracts; *Botrytis cinerea*; stability; spore germination; control effect

番茄灰霉病是由灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 引起的一种世界性作物病害, 严重危害茄科等蔬菜的全株和整个生育期, 经常导致减产 40% ~ 50%, 甚至绝产^[1,2]。目前, 由于尚未发现灰霉病的抗源, 其防治主要依靠化学手段, 但化学农药的长期使用, 不仅造成环境污染, 而且严重影响到食品安全和人类健康^[3,4]。因此, 寻找天然活性物质, 研发新型植物

源农药, 对该病进行绿色防治就显得意义重大。

我国是人工栽培天然药物最早的国家, 也是世界天然药物资源最丰富的国家之一, 具有杀菌抑菌潜力的中药材具有显著的地域优势和资源特色, 从中药材中提取天然活性物质, 用于代替化学方法作为防治果蔬病害的新手段具有广阔的发展前景^[5,6]。通过以 20 种川产道地药材为天然抗菌活性物质提取原料, 研究发现石菖蒲 (*Acorus tatarinowii*) 对番茄灰霉病菌菌丝生长具有显著的抑制作用^[7]。前人对石菖蒲的研究主要集中在化学成分, 药理药效等方面^[8], 而在抑制果蔬类病原真菌方面

收稿日期: 2013-12-12 接受日期: 2014-04-30

基金项目: 四川省科技厅国际合作项目 (2012HH0013); 四川农业大学双支计划项目 (00770107)

* 通讯作者 Tel: 86-835-2886138; E-mail: xyzeng@sicau.edu.cn

研究较少,对番茄灰霉孢子萌发的抑制活性及其抑菌稳定性未见报道。本试验前期研究了石菖蒲醇提取物对番茄灰霉菌菌丝生长的抑制作用及其提取工艺^[9],说明其具有较强的抑菌作用,可以研发成中药杀菌剂。鉴于此,本文将进一步研究其抑菌稳定性、对灰霉孢子萌发的影响及其温室盆栽防治效果,从而形成较为系统的科学数据,为新型中药杀菌剂的研发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

石菖蒲(*A. tatarinowii*)购于北京同仁堂四川省成都市总府路店,经四川农业大学作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室植物学教授丁春邦鉴定为天南星科菖蒲属石菖蒲;番茄灰霉病菌(*B. cinerea*)由四川农业大学原子能农业应用研究室提供;供试番茄品种为粉欧贝,购于山东寿光旺盛种业总公司;PDA培养基由杭州微生物试剂有限公司生产;无水乙醇(AR)由四川西陇化工有限公司生产;葡萄糖、蔗糖由成都市科龙化工试剂厂生产。

LQ-CTS1 恒温振荡器,上海琅环试验设备有限公司;DGG-9140A 电热恒温鼓风干燥箱、GHP-9050 隔水式恒温培养箱,上海齐欣科学仪器有限公司;SW-CJ-1CU 洁净工作台,苏净集团苏州安泰空气技术有限公司;RE-2000B 旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂;MLS-3780-SV 高压蒸汽灭菌器,日本三洋电机株式会社;BSA223S 电子天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 醇提取物制备

供试药材 50 ℃ 烘干,粉碎,过 40 目筛。乙醇提取物制备采用震荡浸提法^[10],准确称取 10 g 样品 10 份,分别置于 250 mL 锥形瓶内,加 120 mL 无水乙醇,38 ℃,240 rpm 震荡提取 12 h,过滤,滤渣重复提取 2 次,合并 3 次滤液,旋转蒸发浓缩至 10 mL,密封,4 ℃ 保存备用,1 mL 提取物相当于含原药 1 g。

1.2.2 pH 稳定性

取 2 mL 石菖蒲醇提取物 8 份,用 HCl 和 NaOH 将其 pH 分别调至 1、3、5、6、7、9、11、13,平衡 24 h, pH_{自然} = 6 为对照,另设无菌水为空白对照。提取物滤菌,PDA 灭菌,制备原药浓度为 0.01 g/mL 的培养基,取 30 mL 倒平板。采用菌丝生长速率法^[11]测定抑菌率,取培养 7 d 的番茄灰霉菌饼,直径为 5

mm,菌丝面朝上,接种于平板中央,每个处理 3 次重复,23 ~ 24 ℃ 恒温培养 7 d 后,采用十字交叉法测量菌落直径,并按下式计算菌丝生长抑制率:

菌落生长量(mm) = 菌落直径测量值 - 菌饼直径

抑菌率(%) = [(空白组生长量 - 处理组生长量) / 空白组生长量] × 100%

1.2.3 温度稳定性

取 2 mL 石菖蒲醇提取物 12 份,分别置于 -18、-8、8、18、28、38、48、58、68、78、88、98 ℃ 条件下密封处理 2 h,低温处理采取冰箱冷藏,高温处理采取水浴加热,无菌水为空白对照。按照 1.2.2 述方法测定不同温度下醇提取物的抑菌率。

1.2.4 紫外照射稳定性

取 2 mL 石菖蒲醇提取物 13 份,在无菌条件下紫外线照射处理,功率 40 W,照射时间分别为 0、4、8、12、16、20、24、28、32、36、40、44、48 h,无菌水为空白对照。按照 1.2.2 述方法测定不同照射时间下醇提取物的抑菌率。

1.2.5 蔗糖处理稳定性

取 2 mL 石菖蒲醇提取物 7 份,加入蔗糖,使蔗糖浓度分别为 0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32 g/mL,平衡 2 h,无菌水作为空白对照。按照 1.2.2 述方法测定不同蔗糖浓度处理下醇提取物的抑菌率。

1.2.6 室温储存的稳定性

取 2 mL 石菖蒲醇提取物 8 份,在室温(22 ~ 28 ℃)下分别储存 1、2、4、8、16、32、64、128 d,以无菌水为空白对照。按照 1.2.2 述方法测定不同处理时间下醇提取物的抑菌率。

1.2.7 4 ℃ 储存的稳定性

取 2 mL 石菖蒲醇提取物 8 份,在 4 ℃ 条件下分别储存 1、2、4、8、16、32、64、128 d,以无菌水为空白对照。按照 1.2.2 述方法测定不同处理时间下醇提取物的抑菌率。

1.2.8 对灰霉孢子萌发的影响

采用凹玻片法^[12]研究石菖蒲醇提取物对灰霉孢子萌发的影响。取事先培养 7 d 的番茄灰霉菌,用去离子水将孢子洗脱,过滤,1000 rpm 离心 5 min,去上清液,重复 2 次。重悬浮孢子至每毫升含孢子 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个,加入 0.5% 的葡萄糖。取 5 mL 石菖蒲醇提取物 8 份,浓缩至 5 g/mL,分别取 0.04 mL,用 0.1% 的吐温 80 水溶液分别稀释到浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12、0.14、0.16 g/mL。取上述药剂和孢子悬浮液按 1:1 混匀并滴到凹玻片

上,架于盛有浅层无菌水的培养皿中,22 ℃ 加盖保湿培养 10 d,每个处理 3 次重复,以无菌水处理为空白对照。

检查孢子萌发情况,每个处理随机观察 8 个视野,记录孢子总数和萌发数,以孢子芽管长于孢子短半径为萌发,按下式计算萌发率和相对抑制率:

$$\text{萌发率}(\%) = (\text{孢子萌发数} / \text{孢子总数}) \times 100\%$$

$$\text{校正萌发率}(\%) = (\text{处理孢子萌发率} / \text{对照孢子萌发率}) \times 100\%$$

$$\text{相对抑制率}(\%) = [(\text{对照孢子萌发率} - \text{校正孢子萌发率}) / \text{对照孢子萌发率}] \times 100\%$$

1.2.9 温室防治效果

采用盆栽法^[13]研究石菖蒲醇提物对番茄灰霉病的温室防治效果。按照 1.2.8 方法配置孢子悬浮液和制备浓度为 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.12、0.14、0.16 g/mL 的供试药剂。取 108 株长势相同的健康供试番茄幼苗,温室单株栽培,待 2~4 片真叶期时,分为 9 组。用孢子悬浮液均匀喷雾接种,20~22 ℃,相对湿度 95%,黑暗保湿条件下培养 24 h。将备用药剂均匀喷施于叶正反面至润湿,以 0.1% 的吐温 80 水溶液为对照,每处理 3 盆,4 次重复。在 20~23 ℃,9000 Lux 的光照 12 h/d,相对湿度 85~90% 条件下培养 7 d。按表 1 的分级标准调查记录叶片发病情况,每处理调查 10 个片叶,按下式计算病情指数和防治效率。

$$\text{病情指数}(\%) = [\sum(\text{各病级叶数} \times \text{病级}) / (\text{调查总叶数} \times 9)] \times 100\%$$

$$\text{防治效果}(\%) = [(\text{对照病情指数} - \text{处理病情指数}) / \text{对照病情指数}] \times 100\%$$

表 1 番茄灰霉病病叶分级标准

Table 1 Grade criteria of leaves infected by *B. cinerea*

病级 Grade of infected leaves	发病程度 Severity of infected leaves
0 级	无病斑
1 级	病斑占叶面积的 5% 以下
3 级	病斑占叶面积的 5% ~ 15%
5 级	病斑占叶面积的 15% ~ 25%
7 级	病斑占叶面积的 25% ~ 50%
9 级	病斑占叶面积的 50% 以上

1.2.10 统计分析

本文采用 PASW Statistics 18 软件进行统计分

析,其中以 DMRT 法进行显著性分析,以提取物浓度对数值和孢子萌发相对抑制率的几率值,浓度对数值和温室防效几率值作回归分析,根据回归方程计算两次分析的 EC₅₀、EC₉₀ 值及 95% 的置信限。

2 结果与分析

2.1 pH 稳定性

不同 pH 处理石菖蒲醇提物对番茄灰霉病菌抑菌菌丝生长抑制效果的影响见表 2。结果显示,各处理对提取物抑菌效果无显著影响。提取物在实验酸碱范围内环境下可以保持一定的抑菌稳定性。

表 2 不同 pH 处理对石菖蒲醇提物抑菌稳定性的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

Table 2 Effects of pH on antifungal stability of *A. tatarinowii* ethanol extracts ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

pH 值 pH value	菌落生长量 Growth of colonies (mm)	抑菌率 Inhibition rate (%)
1	9.08 ± 0.20 ^a	65.73
3	9.79 ± 0.25 ^b	63.04
5	9.90 ± 0.14 ^b	62.64
7	9.71 ± 0.16 ^b	63.34
9	9.52 ± 0.12 ^{ab}	64.06
11	9.71 ± 0.16 ^b	63.35
13	9.80 ± 0.14 ^b	63.00
6 _{自然}	9.82 ± 0.11 ^b	62.94
CK	26.50 ± 0.39 ^c	-

注:“-”表示对菌丝生长无抑制作用,同列数据后不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Note:“-” represent no inhibitory effect, values in the same column with different letters indicate significant differences among treatments, $P < 0.05$.

2.2 温度稳定性

不同温度处理石菖蒲醇提物对番茄灰霉病菌菌丝生长抑制效果的影响见表 3。结果显示,在 -18~68 ℃ 温度范围内,提取物抑菌效果无显著性差异;当温度不低于 78 ℃ 时抑菌效果显著降低。提取物的抑菌成分在高温下活性降低,可能是高温破坏了有效成分的化学结构或各组成成分之间相互作用使抑菌活性降低。

2.3 紫外照射稳定性

紫外光照射不同时间,石菖蒲醇提物对番茄灰霉病菌菌丝生长抑制效果的影响见表 4。结果显示,随着紫外线照射时间的延长,抑菌效果未发生显著变化。提取物在紫外照射下具有一定的稳定性。

表3 温度对石菖蒲醇提物抑菌稳定性的影响($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)Table 3 Effects of temperature on antifungal stability of *A. tatarinowii* ethanol extracts ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

温度 Temperature (°C)	菌落生长量 Growth of colonies (mm)	抑菌率 Inhibition rate (%)
-18	10.11 ± 0.16 ^a	60.47
-8	10.10 ± 0.05 ^a	60.51
8	10.24 ± 0.08 ^a	59.97
18	10.20 ± 0.11 ^a	60.10
28	10.31 ± 0.11 ^a	59.68
38	10.27 ± 0.06 ^a	59.84
48	10.20 ± 0.07 ^a	60.10
58	10.28 ± 0.05 ^a	59.80
68	10.29 ± 0.07 ^a	59.76
78	11.07 ± 0.10 ^b	56.70
88	12.17 ± 0.09 ^c	52.41
98	15.49 ± 0.45 ^d	39.41
CK	25.57 ± 0.17 ^e	-

注:“-”表示对菌丝生长无抑制作用,同列数据后不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Note:“-” represent no inhibitory effect, values in the same column with different letters indicate significant differences among treatments, $P < 0.05$.

表4 紫外线照射对石菖蒲醇提物抑菌稳定性的影响($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)Table 4 Effects of ultraviolet light on antifungal stability of *A. tatarinowii* ethanol extracts ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

照射时间 Time (h)	菌落生长量 Growth of colonies (mm)		抑菌率 Inhibition rate (%)
	处理组 Treatment group	对照组 CK	
0	14.35 ± 0.09	24.74 ± 0.26	42.00 ± 0.63 ^a
4	14.27 ± 0.05	25.30 ± 0.24	43.58 ± 0.49 ^a
8	14.41 ± 0.10	25.55 ± 0.41	43.60 ± 0.34 ^a
12	14.34 ± 0.07	25.07 ± 0.05	42.80 ± 0.42 ^a
16	14.47 ± 0.12	25.03 ± 0.18	42.19 ± 0.90 ^a
20	14.40 ± 0.13	25.14 ± 0.06	42.70 ± 0.79 ^a
24	14.67 ± 0.19	25.05 ± 0.14	41.41 ± 1.53 ^a
28	14.45 ± 0.11	25.28 ± 0.04	42.84 ± 0.67 ^a
32	14.39 ± 0.13	25.17 ± 0.04	42.83 ± 0.58 ^a
36	14.43 ± 0.14	24.91 ± 0.31	42.06 ± 1.07 ^a
40	14.34 ± 0.02	25.21 ± 0.03	43.13 ± 0.12 ^a
44	14.50 ± 0.07	25.32 ± 0.15	42.36 ± 0.20 ^a
48	14.36 ± 0.03	25.15 ± 0.08	42.47 ± 0.28 ^a

注:同列数据后不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Note: values in the same column with different letters indicate significant differences among treatments, $P < 0.05$.

2.4 蔗糖处理稳定性

不同蔗糖浓度处理石菖蒲醇提物对番茄灰霉菌抑菌菌丝生长抑制效果的影响见表5。结果显示,当浓度不高于0.08 g/mL时抑菌效果无显著性差异,当浓度高于0.16 g/mL时的抑菌效果显著增强。

高浓度蔗糖平衡后,可能是因为与提取物抑菌成分发生相互作用,产生新的复合体增强了有效成分的活性;或在菌丝生长过程中,与抑菌成分协同作用使抑菌效果增强。

表5 蔗糖处理对石菖蒲醇提物抑菌稳定性的影响($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)Table 5 Effects of concentrations of saccharose on antifungal stability of *A. tatarinowii* ethanol extracts ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

蔗糖浓度 Saccharose concentration(g/mL)	菌落生长量 Growth of colonies (mm)	抑菌率 Inhibition rate (%)
0	7.96 ± 0.09 ^a	66.47
0.01	7.81 ± 0.14 ^a	67.10
0.02	7.86 ± 0.17 ^a	66.86
0.04	7.94 ± 0.11 ^a	66.54
0.08	7.59 ± 0.16 ^a	68.02
0.16	7.22 ± 0.06 ^b	69.56
0.32	7.08 ± 0.05 ^b	70.15
CK	23.72 ± 0.11 ^c	-

注：“-”表示对菌丝生长无抑制作用，同列数据后不同字母表示差异显著， $P < 0.05$ 。

Note:“-” represent no inhibitory effect, values in the same column with different letters indicate significant differences among treatments, $P < 0.05$.

2.5 室温储存稳定性

在室温条件下储存不同时间，石菖蒲醇提物对番茄灰霉菌菌丝生长抑制效果见表6。结果显示，

随着储存时间的延长，抑菌效果无显著性变化。

提取物在室温条件下具有一定的稳定性，可长期储存。

表6 室温储存对石菖蒲醇提物稳定性的影响($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)Table 6 Effects of storage at 22 ~ 28 °C on antifungal stability of *A. tatarinowii* ethanol extracts ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

储存时间 Time (d)	菌落生长量 Growth of colonies (mm)		抑菌率 Inhibition rate (%)
	处理组 Treatment group	对照组 CK	
1	16.11 ± 0.10	25.00 ± 0.12	35.59 ± 0.14 ^{ab}
2	16.15 ± 0.05	25.69 ± 0.22	37.11 ± 1.05 ^a
4	16.14 ± 0.05	24.12 ± 0.38	33.02 ± 1.76 ^b
8	16.04 ± 0.09	25.01 ± 0.15	35.85 ± 0.55 ^{ab}
16	16.12 ± 0.06	24.70 ± 0.13	34.74 ± 0.76 ^{ab}
32	15.92 ± 0.13	24.10 ± 0.21	33.94 ± 0.88 ^b
64	15.75 ± 0.14	24.07 ± 0.10	34.57 ± 0.83 ^{ab}
128	15.80 ± 0.12	24.21 ± 0.28	34.74 ± 0.29 ^{ab}

注：同列数据后不同字母表示差异显著， $P < 0.05$ 。

Note: values in the same column with different letters indicate significant differences among treatments, $P < 0.05$.

2.6 4 °C 储存稳定性

在4 °C条件下储存不同时间，石菖蒲醇提物对番茄灰霉菌菌丝生长抑制效果见表7。结果显示，

随着储存时间的延长，抑菌效果无显著性变化。

提取物在低温条件下具有一定的稳定性，可长期储存。

表7 4 °C 储存对石菖蒲醇提物稳定性的影响($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)Table 7 Effects of storage at 4 °C on antifungal stability of *A. tatarinowii* ethanol extracts ($n = 6, \bar{x} \pm SEM$)

储存时间 Time (d)	菌落生长量 Growth of colonies (mm)		抑菌率 Inhibition rate (%)
	处理组 Treatment group	对照组 CK	
1	15.71 ± 0.14	24.41 ± 0.20	35.62 ± 1.60 ^a
2	15.72 ± 0.19	25.26 ± 0.04	37.78 ± 0.86 ^a
4	15.67 ± 0.21	25.01 ± 0.11	37.34 ± 1.44 ^a
8	15.72 ± 0.10	25.12 ± 0.08	37.38 ± 0.87 ^a
16	15.79 ± 0.19	25.27 ± 0.03	37.51 ± 1.17 ^a

32	15.24 ± 0.07	24.26 ± 0.34	37.14 ± 1.01 ^a
64	15.27 ± 0.08	24.51 ± 0.34	37.64 ± 1.35 ^a
128	15.34 ± 0.13	24.79 ± 0.12	38.13 ± 0.34 ^a

注:同列数据后不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Note: values in the same column with different letters indicate significant differences among treatments, $P < 0.05$.

2.7 灰霉孢子萌发的影响

石菖蒲醇提取物对番茄灰霉孢子萌发的影响见表8。结果显示,在实验条件下培养10 d,随着药剂浓度的增加,孢子萌发率呈显著降低趋势,孢子萌发

相对抑制率呈显著升高趋势,当浓度不低于0.05 g/mL时,提取物对灰霉孢子萌发的相对抑制率达到100%。石菖蒲醇提取物不仅可以抑制灰霉菌菌丝的生长,对孢子萌发也有明显的抑制作用。

表8 石菖蒲醇提取物对番茄灰霉病菌孢子萌发的影响($n = 3, \bar{x} \pm SEM$)

Table 8 Effects of *A. tatarinowii* ethanol extracts on the spore germination of *B. Cinerea* ($n = 3, \bar{x} \pm SEM$)

药剂浓度 Concentration (g/mL)	萌发率 Germination rate (%)	校正萌发率 Correction rate of germination (%)	相对抑制率 Relative inhibition rate (%)
0.01	33.57 ± 1.62	41.95 ± 2.70	47.54 ± 4.25 ^a
0.02	15.20 ± 0.43	18.98 ± 0.88	76.27 ± 1.52 ^b
0.03	9.60 ± 0.90	11.98 ± 1.15	85.04 ± 1.53 ^c
0.04	2.90 ± 0.23	3.62 ± 0.35	95.46 ± 0.51 ^d
0.05	0.00	0.00	100.00
0.06	0.00	0.00	100.00
0.07	0.00	0.00	100.00
0.08	0.00	0.00	100.00
CK	80.20 ± 1.54	100.00	-

注:“-”表示对菌丝生长无抑制作用,同列数据后不同字母表示差异显著, $P < 0.05$ 。

Note:“-” represent no inhibitory effect, values in the same column with different letters indicate significant differences among treatments, $P < 0.05$.

当石菖蒲醇提取物浓度为0.01~0.04 g/mL时,通过对浓度对数与灰霉孢子萌发相对抑制率几率值作回归分析,可以进一步分析提取物对孢子萌发的抑制效果。结果如图1所示,回归方程为 $Y = 2.750X + 10.399$,相关系数 $R^2 = 0.945$,可知石菖蒲乙醇提取物对灰霉孢子萌发的抑制作用与其浓度在一定范围内呈正相关。得出提取物有效抑菌浓度 $EC_{50} = 0.0109$ g/mL, $EC_{90} = 0.0318$ g/mL, 95%置信

限分别为0.0095~0.0120 g/mL和0.0300~0.0345 g/mL。

2.8 温室防治

石菖蒲醇提取物对番茄灰霉病温室防治效果见表9。结果显示,随着药剂浓度的增加,番茄叶片发病率和病情指数均有逐渐降低的趋势,并且均显著低于对照组。防治效果随药剂浓度的增加而增强且趋势逐渐变缓。相邻浓度药剂的试验结果存在无显著性差异的现象,可能是由于药剂浓度梯度间距较小的原因。

通过对浓度对数与防效几率值作直线回归分析,如图2所示,回归方程为 $Y = 1.524X + 7.523$,相关系数 $R^2 = 0.851$ 。 $EC_{50} = 0.0221$ g/mL, $EC_{90} = 0.1533$ g/mL, 95%置信限分别为0.0179~0.0258 g/mL和0.1377~0.1775 g/mL。与室内对灰霉孢子萌发的抑制作用相比,受植物和环境的综合影响,石菖蒲醇提取物抑菌效果明显降低,但其仍具有明显的防治效果,且其防治效果与药剂浓度在一定范围内成正相关。

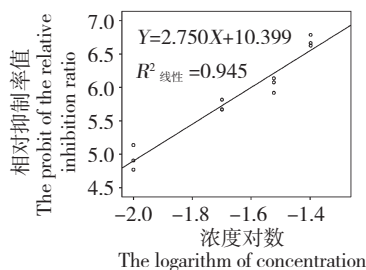


图1 浓度对数与灰霉孢子萌发相对抑制率几率值的回归分析

Fig. 1 Regression analysis with logarithm of concentration and probit value of relative inhibition rate

表9 石菖蒲醇提物对番茄灰霉病的温室防治效果($n = 4, \bar{x} \pm SEM$)Table 9 Potted plant test for *A. tatarinowii* ethanol extracts control *B. cinerea* ($n = 4, \bar{x} \pm SEM$)

药剂浓度 Concentration (g/mL)	发病率 Morbidity (%)	病情指数 Disease index (%)	防治效果 Control effect (%)
0.02	60.00 ± 0.08 ^a	26.11 ± 0.03 ^a	50.78 ± 0.06 ^a
0.04	50.00 ± 0.08 ^{ab}	19.44 ± 0.02 ^b	63.24 ± 0.05 ^b
0.06	52.50 ± 0.05 ^{ab}	14.72 ± 0.03 ^c	71.89 ± 0.07 ^c
0.08	42.50 ± 0.05 ^{bc}	10.28 ± 0.02 ^d	80.35 ± 0.05 ^d
0.10	45.00 ± 0.06 ^{bc}	10.28 ± 0.02 ^d	82.34 ± 0.04 ^{de}
0.12	40.00 ± 0.16 ^{bcd}	9.44 ± 0.01 ^d	85.47 ± 0.01 ^{def}
0.14	35.00 ± 0.06 ^{cd}	7.78 ± 0.02 ^d	88.61 ± 0.03 ^{ef}
0.16	27.50 ± 0.10 ^d	4.17 ± 0.03 ^e	91.81 ± 0.05 ^f
CK	75.00 ± 0.06 ^e	53.33 ± 0.06 ^f	-

注：“-”表示对菌丝生长无抑制作用，同列数据后不同字母表示差异显著， $P < 0.05$ 。

Note:“-” represent no inhibitory effect, values in the same column with different letters indicate significant differences among treatments, $P < 0.05$.

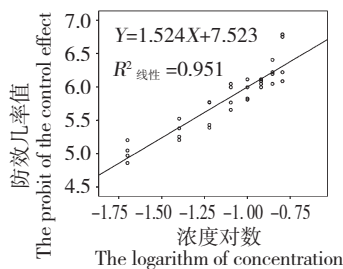


图2 浓度对数与防效几率值直线回归分析

Fig. 2 Regression analysis with logarithm of concentration and probit value of control effect

3 结论与讨论

石菖蒲乙醇提取物抑制番茄灰霉菌菌丝生长的活性在不同 pH、紫外照射时间下有较强的稳定性，表明提取物中的抑菌成分结构和活性不受酸碱和紫外照射影响。在制备和储存时温度不宜高于 78 °C，高温可能破坏抑菌成分的结构或生物活性。在室温和 4 °C 条件下活性稳定，可长期储存。蔗糖可通过增加病原菌的营养，本可促进灰霉菌的生长，但试验结果表明，由于 PDA 培养基中有丰富的营养，添加的蔗糖相对少量，并不会促进菌丝生长，相反由于较高浓度蔗糖与抑菌成分的相互作用可以增强其抑菌效果。提取物对灰霉病孢子萌发具有较强的抑制作用，虽然对番茄灰霉病的温室防治效果不及室内抑菌效果，但效果也很明显。

随着人类健康和环保意识的增强，新型绿色农药必将成为未来农业绿色高产的有力保障。近 20 年来，世界各国掀起研究开发植物源无公害农药的热潮^[14]，利用植物资源开发和创制新农药已成为现

代农药开发的重要途径^[15]。前人在石菖蒲抑菌及其有效成分方面有过研究^[16]，本文研究得出石菖蒲醇提物可以抑制灰霉菌丝生长和孢子萌发，并具有较强的稳定性，同时具有良好温室防治效果。因此，通过进一步研究石菖蒲醇提物抑制果蔬类病原真菌生长的有效成分，研发新型中药农药潜力巨大。

参考文献

- Zhao TM(赵统敏), Yu WG(余文贵), Zhao LP(赵丽萍), et al. Research progress in breeding of tomato resistance to *Botrytis cinerea*. *Jiangsu J Agric Sci* (江苏农业学报), 2011, 27: 1141-1147.
- Soylu EM, Kurt S, Soylu S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *Int J Food Microbiol*, 2010, 143: 183-189.
- Wang YF, Yu T, Xia JD, et al. Biocontrol of postharvest gray mold of cherry tomatoes with the marine yeast *Rhodosporidium paludigenum*. *Biol Control*, 2010, 53: 178-182.
- Kishor A, Fred HJ, Bishal KS. Health and environmental costs of pesticide use in vegetable farming in Nepal. *Environ Dev Sustain*, 2012, 14: 477-493.
- Chen JJ(陈佳佳), Liao ST(廖森泰), Sun YM(孙远明), et al. Research progress in antibacterial active components of Chinese herbal medicine. *J Chin Med Mater* (中药材), 2011, 34: 1313-1317.
- Yan Z(严振), Muo XL(莫小路), Wang YS(王玉生). Researches and application on pesticides from Chinese medicine plant origin. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2005, 30: 1714-1716.

(下转第 1420 页)