

苦参碱及氧化苦参碱对番茄灰霉菌的抑制效果

姚红丽, 张 浩, 叶 嘉

(邯郸学院 生命科学与工程学院, 河北 邯郸 056005)

摘要:为研究苦参碱及氧化苦参碱对番茄灰霉菌菌丝体和孢子的抑制作用,以番茄灰霉菌(*Botrytis cinerea* 野生型菌株 38B1)为供试靶菌,采用平皿法测定了不同浓度苦参碱(Matrine)和氧化苦参碱(Oxymatrine)对灰霉菌孢子萌发及菌丝体生长的抑制效果。结果表明:接菌培养时间相同,苦参碱和氧化苦参碱对灰霉菌丝体生长的最佳抑制浓度为 8 和 10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。处理 8 h 后,苦参碱浓度为 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、氧化苦参碱为 4 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时即能抑制孢子萌发。苦参碱及氧化苦参碱浓度、处理时间相同时,孢子悬浮液的滴加体积为 0.06 mL,孢子萌发率最低。

关键词:苦参碱;氧化苦参碱;灰霉菌;菌丝体;孢子萌发

中图分类号:S641.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2016)11-0072-05 DOI:10.11942/j.issn1002-2767.2016.11.0072

灰霉菌(*Botrytis cinerea*)又称灰葡萄孢,其无性阶段属于真菌界半知菌类葡萄孢属,有性阶段属于子囊菌门葡萄孢盘菌属。灰霉菌除对番茄叶片、茎蔓、花器与果实有危害之外,对水果(草莓、葡萄等)和蔬菜(黄瓜、大葱、莴苣等)均产生恶劣影响^[1-3]。苦参碱(matrine,又名母菊碱、苦参草)和氧化苦参碱(oxymatrine,又名苦参素),属喹诺里西啶类生物碱,是从豆科槐属植物苦豆子(*Sophora alopecuroides*)地上部分或果实提取的一种生物碱^[4]。苦参生物碱具有抗病毒、抗菌作用^[5]。冯俊涛等发现苦参病菌孢子萌发^[6-7]。袁静等人研究发现 3% 苦参碱水剂和氧化苦参碱对黄瓜霜霉病表现出显著的抑制作用,防效达 80% 以上^[8]。

本文研究不同浓度的苦参碱和氧化苦参碱水制剂对番茄灰霉菌孢子萌发及菌丝体生长的抑制效果,检测对番茄灰霉菌菌丝体和孢子的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料

90% 苦参碱和 90% 氧化苦参碱粉剂购自西安沃森生物科技有限公司;灰霉菌(野生型菌株 38B1)由浙江大学生物技术研究所提供。

收稿日期:2016-06-15

基金项目:河北省平台建设资助项目;邯郸学院校级资助项目(15105;15217)

第一作者简介:姚红丽(1993-),女,河北省廊坊市人,学士,从事生物技术方面研究。E-mail: 981448123@qq.com。

通讯作者:叶嘉(1963-),女,硕士,教授,从事资源植物开发利用方面研究。E-mail: yejia630819@126.com。

1.2 方法

1.2.1 苦参碱及氧化苦参碱对灰霉菌丝体生长的影响 苦参碱和氧化苦参碱干品分别配成浓度为 2、4、6、8、10、12 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。放线菌酮溶液作为阳性对照浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。阴性对照采用无菌水。

将 PDA 培养基灭菌冷却后,在无菌条件下分别加入不同浓度的苦参碱、氧化苦参碱和放线菌酮溶液、无菌水各 2 mL,混匀后倾注于无菌培养皿内。待培养基凝固后,将活化好的灰霉菌用无菌枪头(6 mm)将等大小菌块接种到培养基中,每皿中央放置 1 个,用 Parafilm 封口后置 28 ± 1 °C 条件下培养,分别于 12、24、36 和 48 h 后统计菌落生长情况,计算抑菌率。

1.2.2 苦参碱及氧化苦参碱对灰霉菌孢子萌发的影响 苦参碱和氧化苦参碱溶液浓度分别为 1、2、3、4、5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。放线菌酮(阳性对照)溶液浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。阴性对照采用无菌水。

将不同浓度的苦参碱和氧化苦参碱、放线菌酮 11 个处理^[9],在无菌条件下各吸 20 μL ,分别加入到放有载玻片、直径为 9 cm 的 12 个培养皿中,3 次重复;分别取孢子悬浮液 0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mL 均匀滴在载玻片上,在培养皿内滴加适量蒸馏水以保证适当的湿度,28 ± 1 °C 条件下培养,分别于 2、4、6 和 8 h 后统计孢子的萌发情况,计算萌发率。

1.2.3 测定项目及方法 抑菌率及萌发率计算公式:

抑菌率(%) = (对照菌落生长直径 - 处理菌

落生长直径)/对照菌落生长直径 $\times 100$

萌发率(%)=孢子萌发数/检查孢子总数 $\times 100$

2 结果与分析

2.1 苦参碱及氧化苦参碱对灰霉菌丝体生长的抑制作用

2.1.1 作用时间相同、浓度不同的苦参碱和氧化苦参碱对灰霉菌丝体生长的抑制 苦参碱浓度对灰霉菌丝体生长有极显著影响($P < 0.01$),其处理时间对灰霉菌丝体生长有显著影响($P < 0.05$)。氧化苦参碱浓度及其处理时间对灰霉菌丝体生长有极显著影响($P < 0.01$)。

由图 1、图 2 看出,接菌培养 12 h 后,苦参碱和氧化苦参碱浓度为 2、4、6、8、10、12 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,抑菌率分别为 93.9%、96.9%、98.8%、100.0%、100.0%、100.0%和 93.9%、96.9%、98.8%、100.0%、100.0%、100.0%。相同作用时间,抑菌率随苦参碱和氧化苦参碱溶液浓度的增加而增强,当苦参碱和氧化苦参碱浓度分别为 8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或以上浓度时,对菌丝体的抑制率均为 100%。苦参碱和氧化苦参碱对菌丝体的最佳抑制浓度为 8 和 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。放线菌酮(阳性对照)抑菌率也为 100%。无菌水作为阴性对照时,接菌培养 12、24、36 和 48 h 后,灰霉菌菌落直径分别为 22.3、32.6、42.5 和 50.8 mm,远大于各处理组。

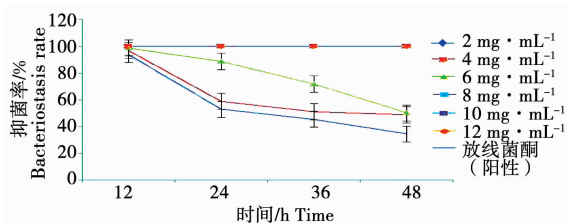


图 1 不同浓度的苦参碱对灰霉菌丝体生长的抑菌率

Fig. 1 Bacteriostasis rates of different concentrations of matrine against *Botrytis cinerea* mycelial growth

2.1.2 作用时间不同、浓度相同的苦参碱和氧化苦参碱对灰霉菌丝体生长的抑制 当苦参碱和氧化苦参碱浓度分别在 2~6 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 2~10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,同浓度苦参碱和氧化苦参碱对菌丝体的抑制率随接菌培养时间的延长而逐渐降低,接菌培养 12 h 时,苦参碱和氧化苦参碱溶液对菌丝体的抑制率高于 24、36 和 48 h 的处理组。苦参碱浓度在 8~12 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,氧化苦参碱为 12 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,随着时间的增长,其抑菌率均达

到 100%。

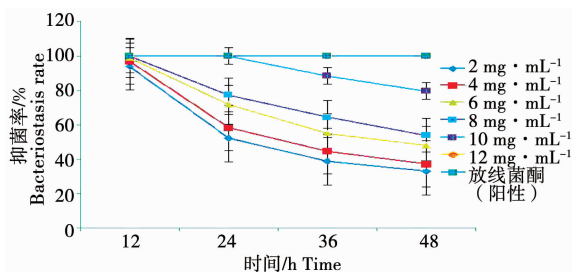


图 2 不同浓度的氧化苦参碱对灰霉菌丝体生长的抑菌率

Fig. 2 Bacteriostasis rates of different concentrations of oxymatrine against *Botrytis cinerea* mycelial growth

2.2 苦参碱和氧化苦参碱对灰霉孢子萌发的抑制作用

2.2.1 处理时间、孢子悬浮液体积相同,不同浓度苦参碱和氧化苦参碱对孢子萌发的抑制 苦参碱溶液浓度对孢子的萌发有极显著影响($P < 0.01$),其处理时间和孢子悬浮液体积对孢子萌发有显著影响($P < 0.05$)。氧化苦参碱浓度对孢子萌发有极显著影响($P < 0.01$),其处理时间对孢子萌发有显著影响($P < 0.05$),孢子悬浮液体积对孢子萌发的影响不显著($P > 0.05$)。

由图 3、图 4 可以看出,处理时间 2 h,孢子悬浮液体积为 0.02 mL 时,苦参碱与氧化苦参碱浓度为 1、2、3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,孢子萌发率分别为 1.9%、0.8%、0%和 0.8%、0.7%、0.5%,当苦参碱浓度为 3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及以上和氧化苦参碱浓度 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 或以上时,均未观察到孢子萌发,孢子萌发率均为 0%。

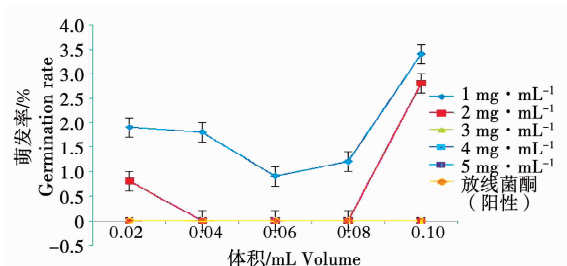


图 3 不同浓度苦参碱处理 2 h 后的灰霉孢子萌发率

Fig. 3 Spore germination rate of different concentrations of matrine against *Botrytis cinerea* after 2 h

由图 3 至图 10 可以看出,处理时间不变,孢子悬浮液体积分别为 0.04、0.06、0.08、0.10 mL 处理时,孢子萌发率的变化趋势同 0.02 mL。综上所述,处理时间、孢子悬浮液体积相同,孢子萌发率随苦参碱和氧化苦参碱浓度的增加而降低,

苦参碱和氧化苦参碱对孢子萌发的最佳抑制浓度为 3 和 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。放线菌酮作为阳性对照处理的孢子萌发率均为 0%。无菌水作为阴性对照,处理 2、4、6 和 8 h 后,0.02 mL 孢子悬浮液中孢子萌发率分别为 10%、25%、75% 和 100%;0.04~0.10 mL 孢子悬浮液阴性对照组的孢子萌发率远大于各处理组。

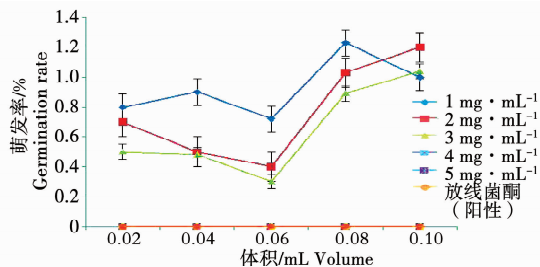


图 4 不同浓度氧化苦参碱处理 2 h 后的灰霉孢子萌发率
Fig. 4 Spore germination rate of different concentrations oxymatrine against *Botrytis cinerea* after 2 h

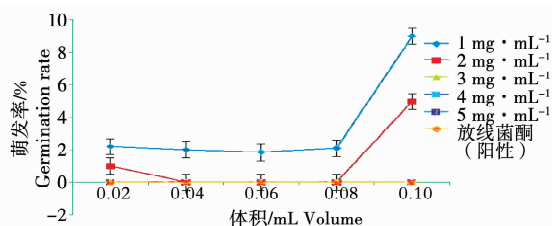


图 5 不同浓度苦参碱处理 4 h 后的灰霉孢子萌发率
Fig. 5 Spore germination rate of different concentrations matrine against *Botrytis cinerea* after 4 h

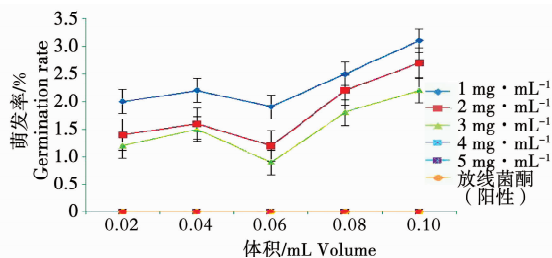


图 6 不同浓度氧化苦参碱处理 4 h 后的灰霉孢子萌发率
Fig. 6 Spore germination rate of different concentrations oxymatrine against *Botrytis cinerea* after 4 h

2.2.2 处理时间、苦参碱和氧化苦参碱浓度相同,对不同体积悬浮液孢子萌发的抑制 由处理 2、4、6 和 8 h 后的孢子萌发率统计得出:处理时间相同,当苦参碱和氧化苦参碱浓度分别在 1~2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 1~3 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,同浓度苦参碱及氧化苦参碱处理的孢子萌发率随孢子悬浮液体积的增加,呈现先降后增趋势,当孢子悬浮液体积为 0.06 mL 时,孢子萌发率最低。处理时间相同,苦

参碱和氧化苦参碱浓度分别为 3 和 4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,随着孢子悬浮液体积的增加,均未观察到孢子萌发,两个处理的萌发率均为 0。

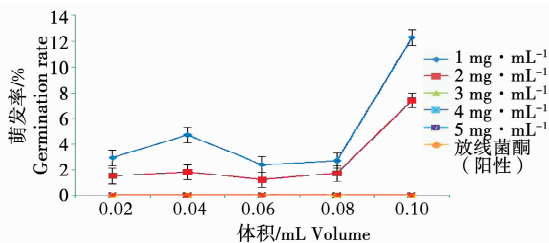


图 7 不同浓度苦参碱处理 6 h 后的灰霉孢子萌发率
Fig. 7 Spore germination rate of different concentrations matrine against *Botrytis cinerea* after 6 h

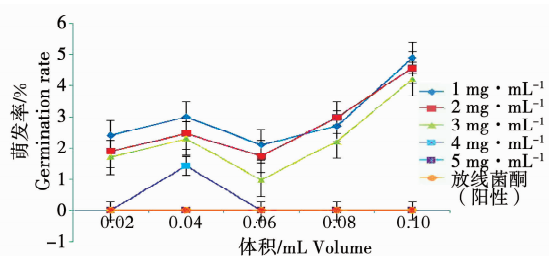


图 8 不同浓度氧化苦参碱处理 6 h 后的灰霉孢子萌发率
Fig. 8 Spore germination rate of different concentrations oxymatrine against *Botrytis cinerea* after 6 h

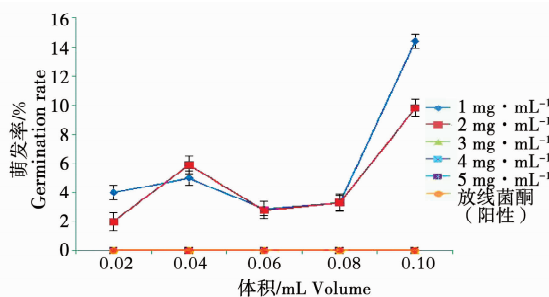


图 9 不同浓度苦参碱处理 8 h 后的灰霉孢子萌发率
Fig. 9 Spore germination rate of different concentrations matrine against *Botrytis cinerea* after 8 h

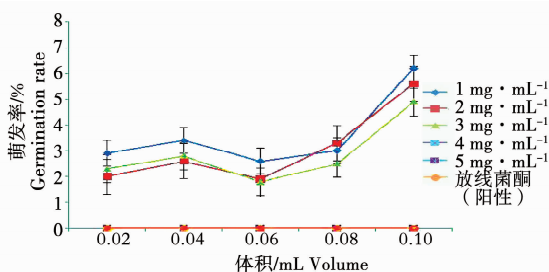


图 10 不同浓度氧化苦参碱处理 8 h 后的灰霉孢子萌发率
Fig. 10 Spore germination rate of different concentrations oxymatrine against *Botrytis cinerea* after 8 h

2.2.3 不同处理时间,相同孢子悬浮液体积和同浓度苦参碱和氧化苦参碱对孢子萌发的抑制 由图 11 至图 20 可以看出,滴加同体积孢子悬浮液,当苦参碱和氧化苦参碱浓度分别在 $1 \sim 2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $1 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围时,同浓度的苦参碱和氧化苦参碱在处理 $2 \sim 4 \text{ h}$,灰霉孢子萌发率增加缓慢;处理 $4 \sim 8 \text{ h}$,孢子萌发速率增加较快,最高达到 14.4% 和 6.2% 。处理 2 h 的苦参碱和氧化苦参碱溶液对孢子萌发的抑制率高于 $4, 6$ 和 8 h 。苦参碱和氧化苦参碱浓度增至为 $3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,随着时间的增长,均未观察到孢子萌发,两个处理的萌发率均为 0 。

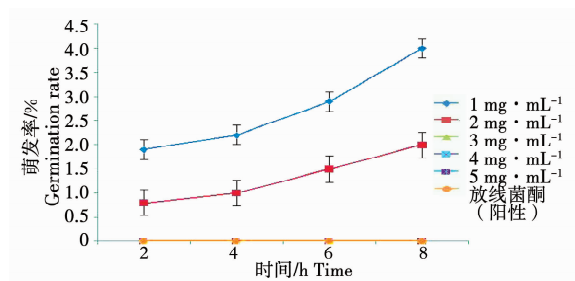


图 11 苦参碱对 0.02 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 11 Effect of matrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.02 mL

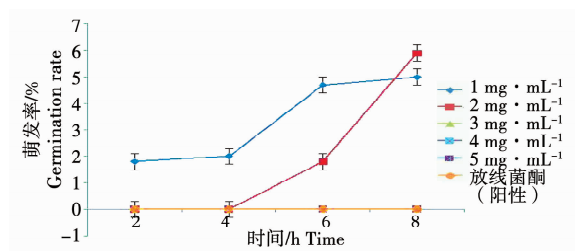


图 12 苦参碱对 0.04 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 12 Effect of matrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.04 mL

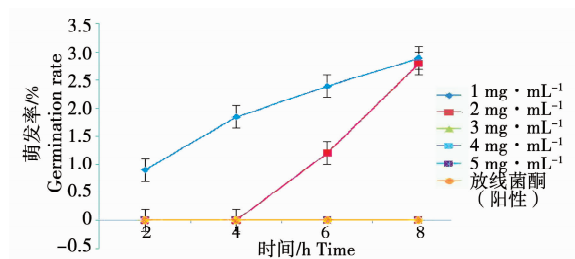


图 13 苦参碱对 0.06 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 13 Effect of matrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.06 mL

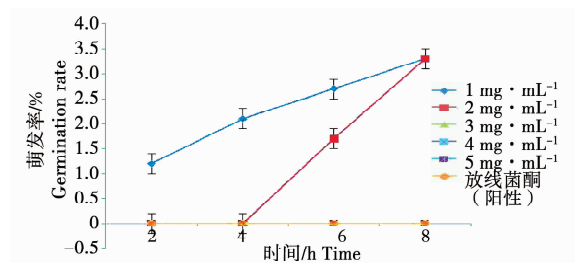


图 14 苦参碱对 0.08 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 14 Effect of matrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.08 mL

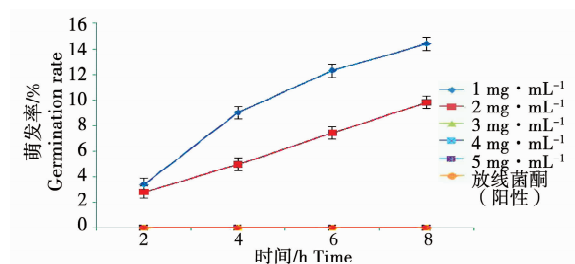


图 15 苦参碱对 0.10 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 15 Effect of matrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.10 mL

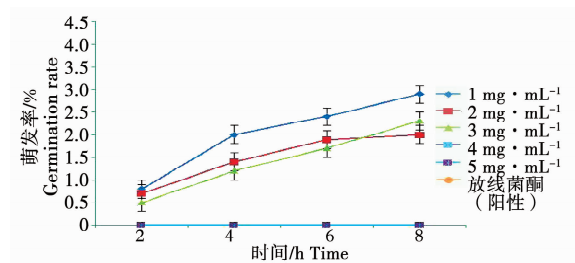


图 16 氧化苦参碱对 0.02 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 16 Effect of oxymatrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.02 mL

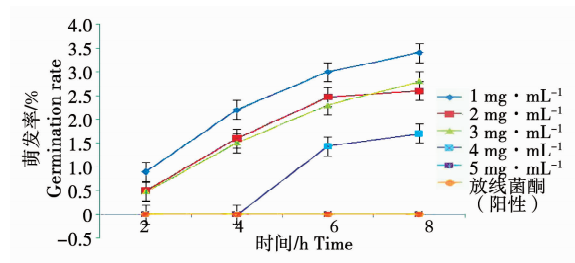


图 17 氧化苦参碱对 0.04 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 17 Effect of oxymatrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.04 mL

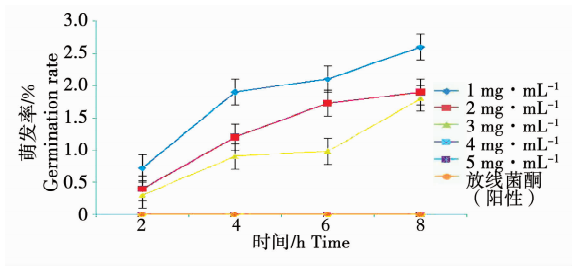


图 18 氧化苦参碱对 0.06 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 18 Effect of oxymatrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.06 mL

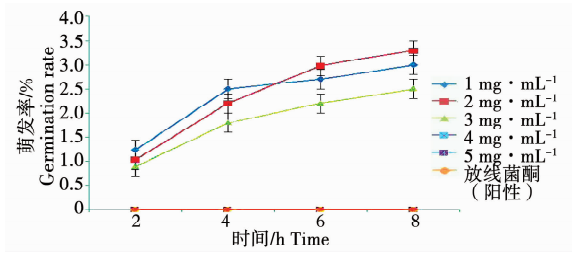


图 19 氧化苦参碱对 0.08 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 19 Effect of oxymatrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.08 mL

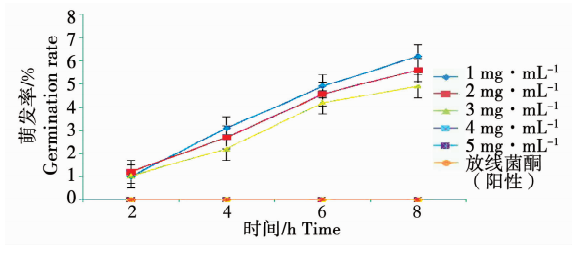


图 20 氧化苦参碱对 0.10 mL 孢子悬浮液中灰霉孢子萌发率的影响

Fig. 20 Effect of oxymatrine against *Botrytis cinerea* spore germination rate in spore suspension of 0.10 mL

Inhibition Effect Against *Botrytis cinerea* with Matrine and Oxymatrine

YAO Hong-li, ZHANG Hao, YE Jia

(College of Life Science and Engineering, Handan University, Handan, Hebei 056005)

Abstract: In order to research the inhibition effect of matrine and oxymatrine against *Botrytis cinerea*, the plate method was adopted to observe inhibition effect that different concentrations of matrine and oxymatrine inhibited spore germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* (wild type strain 38B1). The results showed that *Botrytis cinerea* mycelial growth was completely inhibited by matrine of 8 mg·mL⁻¹ and oxymatrine of 10 mg·mL⁻¹. After 8 h, when the matrine concentration was 3 mg·mL⁻¹ and the oxymatrine concentration was 4 mg·mL⁻¹, *Botrytis cinerea* spore germination was effectively inhibited. With the same concentrations of matrine and oxymatrine and treatment time adding the spore suspension 0.06 mL, *Botrytis cinerea* spores germination rate was the lowest.

Keywords: matrine; oxymatrine; *Botrytis cinerea*; mycelium; spore germination

3 结论

接菌培养时间相同,苦参碱及氧化苦参碱浓度在 8~12 mg·mL⁻¹ 和 10~12 mg·mL⁻¹ 范围内均能较好地抑制灰霉菌丝体的生长。苦参碱和氧化苦参碱溶液处理孢子悬浮液 2、4、6、8 h 后,其浓度分别为 3 和 4 mg·mL⁻¹ 时均能较好地抑制孢子的萌发。

灰霉菌营养体——菌丝体对药物的敏感性不如繁殖体——孢子对药物敏感,药物对孢子的抑制作用强于菌丝体,苦参碱及氧化苦参碱溶液处理孢子萌发的有效抑制浓度低于处理灰霉菌丝体的浓度。接菌培养时间相同时,苦参碱对灰霉菌丝体生长及孢子萌发的抑制效果强于氧化苦参碱。

参考文献:

[1] 赵娟. 温室黄瓜两种病原菌对高温胁迫的应答[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2011.

[2] 李朋举. 竹红菌甲素对番茄灰霉菌的抑制作用[D]. 杭州:浙江农林大学,2014.

[3] 段丹萍,乔勇进,鲁莉莎,等. 香樟叶提取物对草莓灰霉病菌的抑制效果及保护酶活性的影响[J]. 湖北农业科学, 2011,50(4):723-727.

[4] 王祥洪,杨季冬. 苦参碱-氨基黑体系的显色反应及其分析应用[J]. 南京大学学报:自然科学版, 2010, 46(2): 236-242.

[5] 余永婷. 苦豆子生物碱提取分离纯化及抑菌性研究[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2007.

[6] 付颖,王常波,叶非. 我国苦参碱农药研究应用概况[J]. 农药科学与管理, 2005,26(12):30-33.

[7] 冯俊涛,石勇强,张兴. 56 种植物抑菌活性筛选试验[J]. 西北农林科技大学学报, 2001,29(2):65-68.

[8] 袁静,关丽杰,丛斌,等. 苦参生物碱抑菌生物活性测定[J]. 农药, 2005,44(2): 86-89.

[9] 耿建峰,黑田克利,田中一久. 洋葱油和大蒜提取物对灰霉菌的作用效果[J]. 中国蔬菜, 2008(5):20-22.