

地果地上部分抑菌活性研究

许慧敏¹,魏少鹏^{1,2},姬志勤^{1,2*}

(1.西北农林科技大学 植物保护学院,陕西 杨陵 712100;2.陕西省植物源农药研究与开发重点实验室,陕西 杨陵 712100)

摘 要:采用孢子萌发法和菌丝生长法测定地果地上组织甲醇提取物对黄瓜霜霉病菌和马铃薯晚疫病菌的抑菌活性,提取物对 2 种供试病菌的孢子囊萌发,对马铃薯晚疫病菌菌丝生长均具有强烈的抑制作用,浓度为 1 000 μg/mL 时,抑制率均达到 90%。盆栽试验和田间药效试验结果表明,10%的地果提取液稀释 100 倍对黄瓜霜霉病菌和马铃薯晚疫病菌的盆栽防效分别为 85.89%和 93.82%,对黄瓜霜霉病的防效为 76.76%。

关键词:地果;黄瓜霜霉病;马铃薯晚疫病;生物防治

中图分类号:S763.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2020)02-0149-04

Antifungal Activity of the Aerial Parts of *Ficus tikoua*

XU Hui-min¹,WEI Shao-peng^{1,2},JI Zhi-qin^{1,2*}

(1. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China;
2. Shaanxi Province Key Laboratory of Research & Development on Botanical Pesticides, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: The antifungal activities of the methanol extract of the aerial parts of *Ficus tikoua* on two fungi, *Pseudoperonospora cubensis* and *Phytophthora infestans* were evaluated by the method of inhibition rate on spore germination and on mycelial growth. The bioassay results showed that the extracts had strong inhibitory effect on the release of the zoospore of the two tested fungi and the mycelium growth of *P. infestans*, and their inhibition rates were all above 90% at the concentration of 1 000 μg/mL. The results of pot experiments showed that the control effects of the 10% extracts (100-fold dilution) on cucumber downy mildew and late blight of potato were 85.89% and 93.82%, respectively. The results of field efficacy trials indicated that the control effect of the extract on cucumber downy mildew was 76.76%.

Key words: *Ficus tikoua*; *Pseudoperonospora cubensis*; *Phytophthora infestans*; biological control

地果(*Ficus tikoua*),一种匍匐木质藤本灌木,属于桑科榕属,在我国秦岭南部等地广泛存在^[1]。地果的根、茎、果均可入药,是我国西南少数民族地区广泛使用的民族药材,主要用于治疗痢疾、黄疸、风湿疼痛等症^[2]。地果化学成分研究迄今仅有非常有限的几篇文献报道,从地果全草和根茎中分离到黄酮、甾醇及脂肪酸类化合物^[3-5]。近年对地果地上组织中的化学成分和抑菌活性进行了系统研究,从中分离鉴定了 20 个化合物,主要包括原青花素、黄酮和苯并呋喃类化合物^[6-9]。为更好地开发利用这

一野生资源,测定了地果地上组织提取物对黄瓜霜霉病菌及马铃薯晚疫病菌的离体抑菌活性,并通过盆栽和田间药效试验研究了地果提取物制剂对黄瓜霜霉病及马铃薯晚疫病的防治效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料 黄瓜:感病品种“津优 1 号”。马铃薯:感病品种“早大白”。地果:2009 年 9 月采集于四川省洪雅县。地果提取物:称取 6 kg 地果材

收稿日期:2019-06-03 修回日期:2019-07-17
基金项目:国家重点研发计划资助(2017YFD0201402)。
作者简介:许慧敏,女,硕士在读,研究方向:农药化学。E-mail:2369340182@qq.com
*通信作者:姬志勤,男,研究员,研究方向:农药化学。E-mail:jizhiqin@nwsuaf.edu.cn

料,通风晾干、粉碎,用 50 L 甲醇回流提取 4 次,每次 2 h,合并提取液,减压浓缩,即得地果甲醇提取物 336 g(提取率 5.6%),于 4℃ 冰箱中保存备用。

1.1.2 供试菌种 黄瓜霜霉病菌:*Pseudoperonospora cubensis*,采于西北农林科技大学农药研究所试验田栽培的黄瓜发病叶。马铃薯晚疫病病菌:*Phytophthora infestans*,由西北农林科技大学植物保护学院提供。于 16℃ 恒温生化培养箱中继代培养,4℃ 恒温箱中保存。

1.1.3 主要试验试剂和药剂 50% 烯酰吗啉水分散粒剂对照药剂,深圳诺普信股份有限公司。甲醇(分析纯),广东光华科技股份有限公司。

1.1.4 主要仪器设备 LS-B50L 型立式压力蒸汽灭菌器,江阴滨江医疗设备厂。SW. CJ. IBV 型超净工作台,苏净集团安泰空气技术有限公司。HH. 1311.420 型电热恒温培养箱,上海跃进医疗器械厂。多功能光学显微镜 YS100,日本 Nikon。

1.1.5 主要培养基 PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 13~15 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 值为 7.0。黑麦培养基:黑麦粉 60 g、琼脂粉 18 g、葡萄糖 20 g,去离子水 1 000 mL。

1.2 方法

1.2.1 对黄瓜霜霉病菌孢子萌发的影响 从试验田栽培的黄瓜中采收发病的新鲜叶片,采摘时保留 5 cm 的叶柄,将切口用干净的湿纱布包住,流水冲洗病叶,洗去叶片上的杂质后放在铺有湿润滤纸片的培养皿中保湿,保存在 25℃ 的恒温箱中,24 h 长出新霉层,用于制备病菌孢子悬浮液^[10]。设置无菌水为空白对照,每个处理重复 3 次,用无菌水冲洗新霉层,洁净纱布过滤,血球板计数法统计孢子数目,使视野内 1 mL 悬浮液含孢子数目 10⁵ 个,带药孢子悬浮液设置 3 个浓度梯度 2 000、1 000 μg/mL 和 500 μg/mL,制备方法为将 50 μL 的孢子悬浮液分别和 50 μL 的各浓度的药液等体积混合,培养温度为 25℃,4 h 后,在显微镜下观察孢子是否萌发^[11],按照下式计算抑制率。

$$\text{抑制率}/\% = \frac{\text{对照萌发率} - \text{处理萌发率}}{\text{对照萌发率}} \times 100$$

1.2.2 对马铃薯晚疫病病菌孢子萌发的影响 将马铃薯晚疫病病菌接种于 5% V8 培养基上进行培养,10 d 后,用适量无菌水冲洗收集孢子囊,调节孢子囊悬浮液浓度至在 10×10 倍显微镜下,视野中含有 20~30 个孢子囊^[12],孢子囊悬浮液与药液等体积(总体积 100 μL)混合于灭菌的洁净干燥凹玻片上,凹玻片放于 U 形支架上并置于灭菌的培养皿中,皿中放置用无菌水浸湿的灭菌滤纸保湿,盖上皿盖,黑暗

4℃ 放置 5 h,促使游动孢子释放。每处理重复 3 次,以无菌水为空白对照。镜检总孢子囊数、空孢子囊数,每次重复镜检 6 个视野,根据 1.2.1 计算抑制率。

1.2.3 对马铃薯晚疫病病菌菌丝生长的影响 将地果提取物加入冷却至 50℃ 黑麦培养基,配制带药培养基,浓度梯度设置同 1.2.1,将配制好的带药培养基在直径 9 cm 的培养皿中进行冷却,用直径 0.5 cm 的接种器制备菌饼,接种于冷却后的带药培养基的正中央,空白对照为 500 倍的甲醇稀释液,3 次重复,无光照,在 16℃ 恒温中培养,菌落直径的测量采用十字交叉法^[13-14],按照下式计算抑制率。

$$\text{抑制率}/\% =$$

$$\frac{\text{对照菌丝净生长量} - \text{处理菌丝净生长量}}{\text{对照菌丝净生长量}} \times 100$$

1.2.4 对黄瓜霜霉病盆栽防治试验 将盆栽黄瓜于温室中进行培养,幼苗长出 5 片叶子时,将 10% 地果提取物稀释 100 倍,用干净的喷壶喷于黄瓜幼苗上,1 d 后,调节病菌孢子囊悬浮液的浓度,使 1 mL 悬浮液中含有的孢子囊个数为 5 000 个,喷雾接种于喷施粗提物后的植株上,使用保鲜膜对接种后的植株保湿,空白对照为清水,药剂对照为稀释 2 000 倍的 50% 烯酰吗啉药液,3 次重复,保持 12 h 光照、12 h 黑暗,5 d 左右调查植株的发病情况,相对防效和病情指数^[15]分别按下式计算。

$$\text{相对防效}/\% =$$

$$\frac{\text{对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}}{\text{对照区病情指数}} \times 100$$

$$\text{病情指数}/\% = \frac{\sum \text{病级叶片数} \times \text{该病级数值}}{\text{调查总叶数} \times \text{最高级值}} \times 100$$

1.2.5 对马铃薯晚疫病盆栽防治试验 马铃薯晚疫病病菌的盆栽试验植株为盆栽马铃薯,将 10% 地果提取物稀释 100 倍喷于供试植株上,1 d 后将马铃薯晚疫病病菌游动孢子悬浮液喷雾接种于带药植株上,孢子悬浮液浓度为每 1 mL 含 5 000 个孢子,保鲜膜保湿,空白对照为清水,药剂对照为稀释 2 000 倍的 50% 烯酰吗啉药液,3 次重复,保持 12 h 光照,12 h 黑暗,5 d 后调查发病情况,相对防效和病情指数计算同 1.2.4,分级方法^[16]及计算公式参照农业部农药鉴定所生测室(1993)。

1.2.6 田间防效试验方法 地果提取物对黄瓜霜霉病的田间防效试验基本与盆栽试验相同,供试植株为实验田中长至 5 片叶子的黄瓜植株,选取 20 株黄瓜幼苗为一个处理,每处理重复 3 次,设置清水为空白对照,稀释 2 000 倍的 50% 烯酰吗啉药液为药剂对照,5 d 后调查发病情况,计算相对防效和病情指数。

2 结果与分析

2.1 对黄瓜霜霉病及马铃薯晚疫病菌游动孢子释放的影响

由表 1 可以看出,地果提取物对黄瓜霜霉病菌和马铃薯晚疫病菌均具有较好的防治效果,1 000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下,对孢子萌发的平均抑制率分别为 94.28%和 96.52%,500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下,平均抑制率分别为 77.24%和78.19%。

表 1 地果提取物对 2 种供试病菌孢子萌发影响

Table 1 The effects of extracts of <i>Ficus tikoua</i> on spore germination of the two tested pathogens %										
浓度 / $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	黄瓜霜霉病菌					马铃薯晚疫病菌				
	I	II	III	平均	差异显著性	I	II	III	平均	差异显著性
2 000	97.95	98.95	98.45	98.45	aA	98.96	98.89	98.93	98.93	aA
1 000	95.91	91.58	95.34	94.28	bA	96.75	95.23	97.60	96.52	aA
500	75.38	79.20	77.15	77.24	cB	78.95	80.24	75.39	78.19	bB

注:表中小写字母为 0.05 水平显著性,大写字母为 0.01 水平显著性。

表 2 地果提取物对马铃薯晚疫病菌菌丝生长的抑制作用

Table 2 The inhibitory effect of extracts of <i>F. tikoua</i> on the mycelium growth of <i>P. infestans</i>			
培养时间 /d	抑制率/%		
	2 000 $\mu\text{g/mL}$	1 000 $\mu\text{g/mL}$	500 $\mu\text{g/mL}$
3	100.00	100.00	100.00
4	100.00	100.00	93.33
6	100.00	100.00	84.00
7	100.00	96.97	75.76
10	100.00	91.67	66.67

注:表中各数据为 3 次重复的平均值。

表 3 地果提取物对黄瓜霜霉病菌盆栽防治效果

Table 3 The control effects of pot experiments of extracts of <i>F. tikoua</i> on cucumber downy mildew					
处理	防效/%				差异显著性
	I	II	III	平均	
10%地果提取物 100 倍稀释液	77.27	88.89	90.51	85.89	bB
50%烯酰吗啉 WDG 2 000 倍	78.52	89.31	92.95	86.93	aA



图 1 地果提取物对黄瓜霜霉病的盆栽防治效果

Fig. 1 The control effects of pot experiments of extracts of *F. tikoua* on cucumber downy mildew

2.5 田间防效试验结果

地果提取物田间防治黄瓜霜霉病结果见表 5,图 3。由表 5 可以看出,10%地果提取物 100 倍稀

2.2 对马铃薯晚疫病菌菌丝抑制作用

从表 2 可以看出,2 000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下培养 10 d,致病疫霉菌丝未见生长;1 000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下培养 6 d,致病疫霉菌丝未见生长,培养 7 d 和 10 d,提取物对致病疫霉菌丝生长的抑制率分别为 96.97%和 91.67%;500 $\mu\text{g/mL}$ 浓度下培养 3 d,致病疫霉菌丝未见生长,培养 4~10 d,提取物对致病疫霉菌丝生长的抑制率仍可达到 66.67%。

2.3 对黄瓜霜霉病盆栽防治效果

地果提取物对黄瓜霜霉病盆栽防治效果见表 3、图 1。由表 3 可以看出,10%地果甲醇提取物 100 倍稀释液防治黄瓜霜霉病的平均防效达到85.89%,与 50%烯酰吗啉水分散剂剂 2 000 倍的防治效果相当。

2.4 对马铃薯晚疫病盆栽防治效果

地果提取液对黄瓜霜霉病盆栽防治效果见表 4、图 2。由表 4 可以看出,10%地果甲醇提取物 100 倍稀释液对马铃薯晚疫病有优异的防治效果,其平均防效为 93.82%。

释液防治黄瓜霜霉病的平均防效为 76.76%,与 50%烯酰吗啉水分散粒剂稀释 2 000 倍的防治效果相当。

表 4 地果提取物对马铃薯晚疫病盆栽防治效果

Table 4 The control effects of pot experiments of extracts of *F. tikoua* on potato late blight

处理	防效/%				差异显著性
	I	II	III	平均	
10%地果提取物 100 倍稀释液	92.09	98.76	83.69	93.82	bB
烯酰吗啉 WDG 2 000 倍	100	100	100	100	aA



图 2 地果提取物对马铃薯晚疫病盆栽防治效果

Fig. 2 The control effects of pot experiments of extracts of *F. tikoua* on potato late blight

表 5 地果提取物对黄瓜霜霉病田间防治效果

Table 5 The control effects of field trial of extracts of *F. tikoua* on cucumber downy mildew

处理	防效/%				差异显著性
	I	II	III	平均	
10%地果提取物 100 倍稀释液	79.16	84.90	66.62	76.76	aA
50%烯酰吗啉 WDG 2 000 倍	61.12	87.86	84.14	77.71	aA



图 3 地果提取物对黄瓜霜霉病田间防治效果

Fig. 3 The control effects of field trial of extracts of *F. tikoua* on cucumber downy mildew

3 结论

地果极易繁殖、生长迅速,在我国野生资源量很大,但目前开发利用程度很低,主要用作公路护坡植被或牲畜饲料。研究结果证实无论是室内离体生测,还是活体药效试验,地果地上组织提取物对黄瓜霜霉病及马铃薯晚疫病均具有很好的防治效果,作为一种生物农药的潜在资源,该植物具有重要的开发价值。

参考文献:

[1] 张秀实,吴征镒.中国植物志:第 23(1)卷.[M].北京:中国科学出版社,1998:156.

[2] 唐丽萍,房秀艳,蒋晖,等.云南习用药材地板藤的质量标准研究[J].云南中医学院学报,2007,30(4):13-16.

[3] 王绪英,向红.地果中黄酮化合物的提取工艺研究[J].贵州农

业科学,2011,39(1):202-204.

[4] 田民义,刘婷婷,洪怡,等.地果化学成分及抗肿瘤活性研究[J].中药材,2018,41(9):1868-1871.

TIAN M Y,LIU T T,HONG Y,*et al.* Chemical constituents from *Ficus tikoua* and their antitumor activities[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials,2018,41(9):1868-1871. (in Chinese)

[5] 徐蔚,王培,李尚真,等.地果根茎化学成分研究[J].天然产物研究与开发,2011,23(2):270-272.

[6] WEI S P,LU L N,JI Z Q,*et al.* Chemical constituents from *Ficus tikoua* [J]. Chemistry of Natural Products,2012,48(3): 484-485.

[7] WEI S P,ZHANG J W,WU W J,*et al.* Water-soluble constituents of *Ficus tikoua* [J]. Chemistry of Natural Products,2013, 49(6):1134-1135.

[8] WEI S P,LUAN J Y,LU L N,*et al.* A new benzofuran glucoside from *Ficus tikoua* [J]. International Journal of Molecular Sciences,2011,12:4946-4952.

息提取方法[J]. 遥感信息, 2017, 32(3): 142-148.

[18] 覃先林, 李增元, 易浩若. 高空间分辨率卫星遥感影像树冠信息提取方法研究[J]. 遥感技术与应用, 2005, 20(2): 228-232.

[19] 刘杰, 李卫正, 张青萍, 等. 基于小型 UAV 的森林公园正射影像制图分析——以上海滨江森林公园为例[J]. 西北林学院学报, 2016, 31(2): 213-218.

LIU J, LI W Z, ZHANG Q P, *et al.* DOM mapping analysis of forest park based on UAV—a case study of Shanghai river-side forest park[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2016, 31(2): 213-218. (in Chinese)

[20] 胡健波, 张健. 无人机遥感在生态学中的应用进展[J]. 生态学报, 2018, 38(1): 25-35.

HU J B, ZHANG J. Unmanned aerial vehicle remote sensing in ecology: advances and prospects[J]. Acta Ecologica Sinica, 2018, 38(1): 25-35. (in Chinese)

[21] 赵峰, 庞勇, 李增元, 等. 机载激光雷达和航空数码影像单木树高提取[J]. 林业科学, 2009, 45(10): 81-87.

ZHAO F, PANG Y, LI Z Y, *et al.* Extraction of individual tree height using a combination of aerial digital camera imagery and LiDAR[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2009, 45(10): 81-87. (in Chinese)

[22] 张凝, 冯跃文, 张晓丽, 等. 结合航空影像纹理和光谱特征的单木冠幅提取[J]. 北京林业大学学报, 2015, 37(3): 13-19.

ZHANG N, FENG Y W, ZHANG X L, *et al.* Extracting individual tree crown by combining spectral and texture features from aerial images[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2015, 37(3): 13-19. (in Chinese)

[23] 朱超洪, 刘勇. 基于影像认知和地学理解的面向对象分类研究[J]. 遥感技术与应用, 2012, 27(4): 536-541.

ZHU C H, LIU Y. A study on object-oriented remote sensing image classification based on image cognition and geographical understanding[J]. Remote Sensing Technology and Application, 2012, 27(4): 536-541. (in Chinese)

[24] 马浩然, 赵天忠, 曾怡. 面向对象的最优分割尺度下多层次森林植被分类[J]. 东北林业大学学报, 2014, 42(9): 52-57.

MA H R, ZHAO T Z, ZENG Y. Object-based multi-level classification of forest vegetation on optimal segmentation scale [J]. Journal of Northeast Forestry University, 2014, 42(9): 52-57. (in Chinese)

[25] BAATZ M, SCHAPE A. Object-oriented and multi-scale image analysis in semantic networks[C]//Proceedings of the 2nd International Symposium on Operationalization of Remote Sensing, Enschede, Netherlands, 1999: 16-20.

[26] 陈旭, 徐佐荣, 余世孝. 基于对象的 QuickBird 遥感图像多层次森林分类[J]. 遥感技术与应用, 2009, 24(1): 22-26, 130.

[27] 王建芳, 包世泰. 面向对象解译方法在遥感影像地物分类中的应用[J]. 热带地理, 2006(3): 234-235, 237-238, 242.

[28] 赵勋, 岳彩荣. 基于遥感数据的林地变化检测方法研究[J]. 林业资源管理, 2019(1): 101-108, 135.

[29] 乔婷, 张怀清, 陈永富, 等. 基于 NDVI 分割与面向对象的洞庭湖湿地植被信息提取技术[J]. 西北林学院学报, 2013, 28(4): 170-175.

QIAO T, ZHANG H Q, CHEN Y F, *et al.* Extraction of vegetation information based on NDVI segmentation and object-oriented method[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(4): 170-175. (in Chinese)

[30] 汪小钦, 王苗苗, 王绍强, 等. 基于可见光波段无人机遥感的植被信息提取[J]. 农业工程学报, 2015, 31(5): 152-159.

WANG X Q, WANG M M, WANG S Q, *et al.* Extraction of vegetation information from visible unmanned aerial vehicle images[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering (Transactions of the CSAE), 2015, 31(5): 152-159. (in Chinese)

[31] 卜帆, 石玉立. 机载 LiDAR 高差和高分影像的城市树冠提取比较[J]. 遥感技术与应用, 2017, 32(5): 875-882.

BU F, SHI Y L. The comparison of urban tree crown extraction based on airborne LiDAR elevation difference and high resolution imagery[J]. Remote Sensing Technology and application, 2017, 32(5): 875-882. (in Chinese)

[32] 李响. 基于 LiDAR 数据和标记控制区域生长法的单木树冠提取[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2015.

(上接第 152 页)

[9] WEI S P, WU W J, JI Z Q. New antifungal pyranisoflavone from *Ficus tikoua* Bur. [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2012, 13: 7375-7382.

[10] 钮绪燕, 詹刚明, 姬志勤, 等. 苦皮藤杀菌剂对黄瓜霜霉病菌的活性测定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2004, 32(11): 30-33.

[11] 王帅, 刘召阳, 高小宁, 等. 10 种生物源杀菌剂对苹果树腐烂病菌的室内活性评价[J]. 西北林学院学报, 2019, 34(1): 150-156.

WANG S, LIU Z Y, GAO X N, *et al.* Antifungal activity of 10 biological fungicides against *valsa mali*[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2019, 34(1): 150-156. (in Chinese)

[12] 王雅琴, 傅育红, 高锦明等. 苦楝内生真菌抗菌活性的研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(1): 20-22.

WANG Y Q, FU Y H, GAO J M, *et al.* Antifungal activity of endophytic fungus from *Melia azedarach* L. [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2007, 22(1): 20-22. (in Chinese)

[13] 黄国洋. 农药实验技术与评价方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 128-142.

[14] 曹静, 曹克强. 中草药提取物 Ts-86 对马铃薯晚疫病病菌的抑制作用[J]. 江苏农业科学, 2009(3): 136-137.

CAO J, CAO K Q. Inhibition of the extract of Chinese traditional medicinal Ts-86 on *Phytophthora infestans*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2009(3): 136-137. (in Chinese)

[15] 汤毅, 曹支敏, 王洁菲. 花椒锈病发生规律与化学防治研究[J]. 西北林学院学报, 2015, 30(1): 150-153.

TANG Y, CAO Z M, WANG J F. Occurrence regularity and chemical control of pricklyash rust[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(1): 150-153. (in Chinese)

[16] GB/T 17980. 34-2000. 农药田间药效试验准则(一)杀菌剂防治马铃薯晚疫病[S]. 2000.