

灰葡萄孢及其毒素的生物活性测定^{*}

王 惠^{1,2}, 张凤云³, 董金皋², 商鸿生¹

(1 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨陵 712100; 2 河北农业大学 毒素实验室, 河北 保定 071001;

3 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘 要] 用对峙培养法和生长速率法分别测定灰葡萄孢及其毒素对植物病原真菌的抑菌活性; 用抑菌圈法测定毒素对植物病原细菌的抑菌活性; 用浸渍法测定毒素的杀虫活性; 以种子幼根幼芽生长抑制率为活性指标, 测定毒素对杂草种子发芽力的抑制活性及对农作物种子发芽势的影响; 在杂草出苗后喷施毒素, 测定毒素对杂草幼苗的杀伤活性和对出苗后农作物生长的影响。结果发现, 3 d 内灰葡萄孢毒素对小麦纹枯病菌、小麦根腐病菌和小麦赤霉病菌的抑制率达 56% 以上; 1 d 内毒素对马铃薯环腐病原细菌的抑菌圈直径为 6 mm, 对白菜软腐病原细菌的抑菌圈直径为 9 mm; 毒素原液对黏虫、小菜蛾和菜青虫的杀伤活性很小, 对反枝苋和牵牛花等双子叶杂草幼苗的杀伤活性达 100%, 对禾本科作物和杂草苗后生长影响很小。毒素对单子叶杂草和双子叶杂草的种子发芽均有抑制作用, 对禾本科作物种子发芽也有一定影响。

[关键词] 灰葡萄孢; 毒素; 抑菌活性; 除草活性

[中图分类号] S482.2⁺92; S476⁺.1

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2003)04-0119-04

灰葡萄孢(*B. otrytis cinerea*)是一种寄主范围很广的植物病原真菌, 其代谢产物——真菌毒素对寄主植物具有致毒活性^[1]。近年来研究发现, 很多植物病原真菌分泌的毒素还具有杀草、杀菌及杀虫等活性^[2~4], 有些毒素的活性物质已经开发成农药^[5]。灰葡萄孢的代谢产物种类很多^[6], 目前尚未见开发利用的报道。本文报道了对灰葡萄孢的抑菌活性及其毒素的杀虫、抑菌、除草活性的研究结果, 以为生物农药的开发利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

毒素液: 将灰葡萄孢(*B. otrytis cinerea*)接入 PD 培养基中, 在 25℃ 条件下黑暗培养 20 d, 用 $\Phi 0.6 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤去菌丝和孢子, 得到毒素液。

供试病原真菌: 小麦纹枯病菌(*R. izootonia cerealis*)、小麦根腐病菌(*Cochliobolus sativus*)、小麦赤霉病菌(*Gibberella zeae*)、苹果轮纹病菌(*Physalospora pirina*)、番茄早疫病菌(*A. lternaria solani*)、玉米小斑病菌(*B. ipolaris maydis*)、苹果腐烂病菌(*V.alsa mali*)、苹果斑点落叶病菌(*A. lternaria alter-*

nata f. sp. *mali*)、高粱炭疽病菌(*Colletotrichum gram inicola*)为河北农业大学真菌毒素实验室鉴定并保存。

供试病原细菌: 白菜软腐病菌(*Erwinia carotovora*)、马铃薯环腐病菌(*Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*)和黄瓜角斑病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*)分别由河北农业大学植病系提供。

试虫: 3 龄小菜蛾(*P. lutella xylostella* L.)、4 龄黏虫(*Mythimna separata* Walker)分别由西北农林科技大学农药研究所和河北农业大学昆虫系提供, 菜青虫(*Pieris rapae* L.)由陕西杨陵东魏店菜地采集。

供试杂草: 反枝苋(*Amaranthus retroflexus* L.)、马唐(*Digitaria sanguinalis* (L.) Scop.)和稗草(*Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv.)种子采自河北农业大学植物标本园。

供试作物: 小麦、玉米为市售种子。

1.2 方法

1.2.1 抑菌活性测定 灰葡萄孢对植物病原真菌的抑菌活性测定采用对峙培养法^[7]。用 PDA 培养

* [收稿日期] 2002-09-25

[基金项目] 河北农业大学科技攻关重点项目(9816); 河北省教育厅资助项目; 陕西省自然科学基金项目(142101)

[作者简介] 王 惠(1959-), 女, 陕西临潼人, 副教授, 在读博士, 主要从事农药及农药化学研究。

[通讯作者] 董金皋(1963-), 男, 河北邢台人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物病原真菌毒素研究。

基, 在 25℃ 条件下黑暗培养 6 d, 观察拮抗作用。

毒素对病原真菌的抑菌活性测定采用生长速率法^[8]。试验结果以 3 d 后菌丝生长抑制率(3 次重复的平均值)表示。菌丝生长抑制率/% = [(对照菌落直径 - 处理菌落直径)/对照菌落直径] × 100。

毒素对病原细菌的抑菌活性采用抑菌圈法^[8]。以 24 h 后测量的抑菌圈直径(3 次重复的平均值)表示。

1.2.2 除草活性测定 种子幼根幼芽生长抑制率测定^[8]：将毒素液稀释 4 倍, 加入铺有滤纸的培养皿中使滤纸饱和, 分别选取催芽的杂草和农作物种子放在滤纸上, 在 27℃ 条件下保湿培养, 2 d 后测量种子根长和芽长, 以平均根(芽)生长抑制率表示结果(重复 3 次)。根(芽)生长抑制率/% = [(对照根(芽)长 - 处理根(芽)长)/对照根(芽)长] × 100。

幼苗杀伤活性试验：将催芽后的种子播于温室花盆(Φ15 cm)中, 在出苗后第 3 天或第 7 天喷施毒素原液 5 mL, 24 h 后观察幼苗受害程度, 统计死亡率。

1.2.3 杀虫活性测定 杀虫活性试验均采用浸渍法^[8]。试验结果以 5 d 后试虫的校正死亡率表示。校正死亡率/% = [(处理死亡率 - 对照死亡率)/(100 - 对照死亡率)] × 100。

表 1 灰葡萄孢毒素对植物病原真菌菌丝生长的抑制作用

Table 1 Inhibiting effect of metabolite of *B. cinerea* on mycelium growth of plant pathogenic fungi

供试菌 Fungi tested	抑制率/% Inhibition rate	供试菌 Fungi tested	抑制率/% Inhibition rate	供试菌 Fungi tested	抑制率/% Inhibition rate
小麦纹枯病菌 <i>Rhizoctonia cerealis</i>	66.2	高粱炭疽病菌 <i>Colletotrichum graminicola</i>	0	玉米小斑病菌 <i>Bipolaris maydis</i>	43.4
小麦根腐病菌 <i>Cochliobolus sativus</i>	61.6	苹果轮纹病菌 <i>Phyalospora pirina</i>	34.4	小麦赤霉病菌 <i>Gibberella zeae</i>	56.4
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	29.5	苹果斑点落叶病菌 <i>A. alternata f. sp. mali</i>	9.5	苹果腐烂病菌 <i>Valsa mali</i>	28.0

灰葡萄孢毒素对黄瓜角斑病菌、马铃薯环腐病菌和白菜腐烂病菌的抑菌圈分别为 1, 6 和 9 mm。表明灰葡萄孢毒素对白菜腐烂病菌和马铃薯环腐病菌有一定的抑制作用。

2.2 除草活性

表 2 是毒素对杂草和作物种子抑制活性及对幼苗杀伤活性的测定结果。由表 2 可以看出, 灰葡萄孢毒素对马唐、稗草和反枝苋等种子的幼根和幼芽生长抑制率均高于 50%, 表明毒素对单子叶和双子叶杂草种子的发芽均有抑制作用, 而且对禾本科杂草和双子叶杂草的抑制作用差异不大。由幼苗杀伤活性试验结果(表 2)可知, 喷施毒素 24 h 后, 出土 3 d

2 结果与分析

2.1 抑菌活性

对峙培养试验发现, 灰葡萄孢分别同小麦纹枯病菌和小麦根腐病菌在同一培养皿培养时, 在菌落之间都形成约 2 mm 的无色区带, 而且随着培养时间的延长, 两种菌都不会跨越这条无色区带。当灰葡萄孢同小麦赤霉病菌在同一培养皿培养时, 可形成交界面, 交界处呈黄色条带。当灰葡萄孢分别同玉米小斑病菌、苹果轮纹病菌、番茄早疫病菌和苹果斑点落叶病菌在同一皿中培养时, 菌落交界处均不形成拮抗带。以上结果表明, 灰葡萄孢对小麦纹枯病菌和小麦根腐病菌的抑制作用明显, 对小麦赤霉病菌有一定的抑制作用, 对玉米小斑病菌、苹果轮纹病菌、番茄早疫病菌和苹果斑点落叶病菌等抑制作用不明显。

将供试病原真菌在含毒素和不含毒素的培养基上培养 3 d, 菌丝生长的抑制率见表 1。由表 1 可见, 灰葡萄孢毒素对小麦纹枯病菌、小麦根腐病菌和小麦赤霉病菌菌丝生长抑制率高于 56%, 表明灰葡萄孢毒素对这些植物病原菌的抑制作用明显。这一结果与灰葡萄孢本身对植物病原真菌的抑菌试验结果一致。

的反枝苋和野生牵牛花幼苗全部死亡, 而禾本科的稗草和马唐幼苗受伤害较小。因此, 就出土 3 d 的幼苗来看, 灰葡萄孢毒素对杂草的杀伤作用是有选择性的, 主要是杀伤双子叶杂草幼苗。从出土 7 d 幼苗的死亡率可知, 毒素只对反枝苋幼苗有杀伤活性, 对禾本科杂草无杀伤活性。就反枝苋对毒素的敏感程度看来, 出土 3 d 幼苗远较出土 7 d 幼苗敏感。

从表 2 还可以看出, 毒素对禾本科作物的种子发芽也有影响, 对玉米的影响小于小麦。因此在作物苗前施用毒素对小麦的安全性低, 对玉米的安全性较高。另外, 毒素对小麦和玉米出土 7 d 的幼苗均无杀伤作用, 表明在小麦和玉米出苗后使用毒素时两

种作物均安全。

表 2 毒素对植物种子发芽和苗后生长的抑制活性

供试植物 Plant	种子发芽抑制活性 Effect on seed germination		幼苗杀伤活性 Effect on seedling	
	幼根生长抑制率 Inhibition rate to root	幼芽生长抑制率 Inhibition rate to sprout	3 d 幼苗死亡率 Death rate of 3 days seedling	7 d 幼苗死亡率 Death rate of 7 days seedling
马唐 <i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	79	77	10	0
稗草 <i>Echinochloa crusgalii</i> (L.) Beauv.	75	53	7. 5	0
反枝苋 <i>Amaranthus retrof lerus</i> L.	78	80	100	15
牵牛花 Morning glory	-	-	100	-
小麦 Wheat	87	81	5. 3	0
玉米 Corn	50	35	0	0

2.3 杀虫活性

毒素原液对黏虫、小菜蛾和菜青虫的杀虫活性试验结果见表 3。由表 3 可见, 毒素原液对 3 龄小菜

蛾的杀伤活性最高, 对 4 龄黏虫无杀伤活性。稀释 2 倍和 5 倍的灰葡萄孢毒素对 4 种试虫均无活性。

表 3 灰葡萄孢毒素的杀虫活性

Table 3 Insecticidal effect of metabolite of <i>B. cinerea</i>							
试虫 Insect name	龄期 Insect age	毒素稀释 倍数 Dilution times	校正 死亡率/% Net death rate	试虫 Insect name	龄期 Insect age	毒素稀释 倍数 Dilution times	校正 死亡率/% Net death rate
小菜蛾 <i>P. lutella xylostella</i> L.	3	1	21. 1	菜青虫 <i>P. eris rupa</i> L.	≥ 3	1	10. 5
黏虫 <i>Mythimna separata</i> W.	4	1	0	菜青虫 <i>P. rupa</i> L.	≥ 2	1	15. 8
黏虫 <i>Mythimna separata</i> W.	4	2	0	菜青虫 <i>P. rupa</i> L.	≤ 2	2	0
小菜蛾 <i>P. lutella xylostella</i> L.	5	5	5. 3	菜青虫 <i>P. rupa</i> L.	≤ 2	5	0

注: 每个处理的供试虫数为 20 头。
Note: 20 pests have been used for test each treat

3 结论与讨论

本试验中灰葡萄孢毒素对小麦纹枯病菌、小麦根腐病菌和小麦赤霉病菌表现出良好的抑制活性, 表明其有望开发为防治小麦病害的杀菌剂。另外该毒素还对一些植物病原细菌表现出一定的抑制活性, 也可作为某些蔬菜的专用杀菌剂进行开发。试验中灰葡萄孢毒素也对杂草种子的萌发表现出明显的抑制作用, 对双子叶杂草幼苗也表现出明显的杀伤活性, 表明灰葡萄孢毒素也可以作为除草剂开发利用。同时灰葡萄孢毒素对已出苗的禾本科作物比较

安全, 适合于作为禾本科作物的苗后除草剂。综上所述, 灰葡萄孢毒素有望开发为一种禾本科作物田使用的多用途农药, 既防植物病害, 又防除杂草。

本试验中毒素对出土 3 d 的双子叶杂草幼苗杀伤作用明显, 但对出土 7 d 的双子叶杂草幼苗作用甚微, 可能与幼苗叶片蜡质层增厚, 药液不易进入植物体有关。另外灰葡萄孢毒素的杀虫活性不明显, 可能是该毒素中不含杀虫活性物质, 也可能是此类物质含量太低不足使试虫表现症状, 这有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Rebordinos L, Cantoral J M, Prieto M V, et al The phytotoxic activity of some metabolites of *B otry tis cinerea* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 42: 383- 387.

[2] 王朝华, 张立新, 董金皋. 植物病原真菌毒素中除草活性物质的筛选[J]. *河北农业大学学报*, 2002, (2): 65- 69

[3] Stefano S D, N icoletti R, M ilone A, et al 3-o-methylfunicone, a fungitoxic metabolite produced by the fungus *Penicillium pinophilum* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(8): 1399- 1401.

[4] 高菊芳. 各种青霉菌的有机萃取物及其分离活性物质的杀虫、抗保幼激素和杀菌活性[J]. *世界农药*, 2000, 22(2): 34- 39

[5] 王 惠, 董金皋, 商鸿生. 真菌代谢产物农药开发利用的现状和前景[A]. *中国植物病害化学防治研究*[C]. 第 3 卷. 北京: 中国农业出版社, 2002. 82- 88

- [6] Deighton N, Muckenschnabel I, Colmenares A J, et al Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57: 689- 692
- [7] 方中达 植物研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998 153- 154
- [8] 慕立义 植物化学保护研究方法[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994 56- 90

The bioassay of *Botrytis cinerea* and its metabolite

WANG Hui^{1,2}, ZHANG Feng-yun³, DONG Jin-gao², SHANG Hong-sheng¹

(1 College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Mycotoxin Laboratory, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China;

3 College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract *Botrytis cinerea* and its metabolite were bioassayed. The results show that *Botrytis cinerea* and the metabolite both have a significant fungitatic property to *Rizoctonia cerealis*, *Cochliobolus sativus* and *Gibberella zeae*, the inhibiting rate to three fungi was above 56%. The metabolite also has an antibacterial property to *Erwinia carotovora* and *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. The herbicidal effect of the metabolite is remarkable, all kinds of weeds tested were extremely restrained by the metabolite in seed germination phase. For seedling, the *Amaranthus retrofractus* L. and other dicotyledon weeds were strongly harmed when the metabolite was sprayed on them, but wheat and corn tested were not harmed when same amount of it was used. Thus, the metabolite may be used as a herbicide to inhibit the dicotyledon weeds in wheat and corn fields, and also be used as a fungitatic agent to protect wheat from *Rizoctonia cerealis*, *Cochliobolus sativus* and *Gibberella zeae* etc.

Key words *Botrytis cinerea*; metabolite; fungitatic property; herbicidal activity

欢迎订阅 2004 年《干旱地区农业研究》

《干旱地区农业研究》由国家教育部主管、西北农林科技大学主办,是全面反映我国干旱、半干旱及半湿润易旱地区农业科学技术研究新成果、新理论、新技术及国外有关最新研究进展的学术性期刊。

《干旱地区农业研究》为农业科学中文核心期刊,全国及陕西省优秀科技期刊。被中国科学引文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国学术期刊(光盘版)、中国期刊网及俄罗斯《文摘杂志》等国内外多家权威检索系统收录。

《干旱地区农业研究》主要刊登有关干旱、半干旱及半湿润易旱地区的旱农耕作与栽培、土壤与植物营养、植物与土壤水分动态、节水灌溉、资源开发利用、旱区整治与生态建设、植物抗旱生理、作物育种、旱农机械等研究论文和综合评述以及国外旱农动态等内容。以旱作农业为重点,重视水资源合理利用和灌溉农业的发展;应用科学研究与应用基础科学研究并重是本刊的主要特色。适合广大从事旱农研究的专家、学者、科技人员、生产管理工作者和农林及有关院校师生阅读参考。此外,本刊以优惠价格为广大客户提供有关广告业务服务,有意者请随时与编辑部联系。欢迎订阅,欢迎投稿,欢迎刊登广告。

《干旱地区农业研究》(季刊)国内外公开发行。国际大 16 开本,160 页,每期定价 10.00 元,全年 40 元,全国各地邮局均可订阅。

本刊邮发代号: 52- 97,若漏订者可直接汇款至编辑部补订。国外总发行: 中国图书进出口总公司。编辑部地址: 陕西杨凌 西北农林科技大学西农校区 96 号信箱; 邮编: 712100, 电话: 029-7092370; E-mail: yangy@nwsuaf.edu.cn